

# Einführung der Tandem-Massenspektrometrie\*

---

## \* für das erweiterte Neugeborenen-screening am Screeningzentrum Leipzig

U. Ceglarek<sup>1)2)</sup>, P. Müller<sup>1)</sup>, B. Stach<sup>2)</sup>,  
P. Bührdel<sup>1)</sup>, I. Schindler<sup>1)</sup>, J. Thiery<sup>2)</sup>, W. Kiess<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Universitätsklinik und Poliklinik für Kinder und Jugendliche, Universitätsklinikum Leipzig

<sup>2)</sup> Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik, Universitätsklinikum Leipzig

## Einleitung

Seit März 2000 steht dem Screeningzentrum in Leipzig eine innovative Technik zur Verfügung, die es erlaubt, im Neugeborenencreening (NGS) neben der Früherkennung auf Phenylketonurie, Galaktosämie, Hypothyreose, Biotinidasemangel und Adrenogenitalem Syndrom mehr als 20 weitere angeborene Stoffwechseldefekte zu erfassen<sup>1)</sup>. Als Fazit des Modellprojektes zum erweiterten Neugeborenencreening mit Tandem-Massenspektrometrie (TMS) in Bayern<sup>2)</sup> wurde von

der Bundesgesundheitsministerkonferenz im Juni 2001 diese Untersuchung als Bestandteil der Vorsorgeuntersuchung U2 empfohlen. Am Screeningzentrum Leipzig erfolgt das erweiterte Screening auf metabolische Störungen für alle Neugeborenen der Regierungsbezirke Leipzig und Chemnitz sowie für alle Neugeborenen der Bundesländer Sachsen-Anhalt und Thüringen. Damit ist Leipzig neben Heidelberg, Hannover und München eines von bundesweit vier Screeningzentren, in denen diese Untersuchung routinemäßig im Rahmen der Vorsorgeuntersuchung U2 angeboten wird.

Im vorliegenden Bericht wird das Prinzip der Tandem-Massenspektrometrie (TMS) sowie das Spektrum der erfassbaren Erkrankungen und erste Screeningergebnisse aus dem Zeitraum 7/2000- 9/2001 vorgestellt. Infolge der Erfassung von zum Teil schweren und akuten Krankheitsbildern ist es notwendig, den Screeningpro-

zess zu optimieren und die zeitlichen Abläufe zu straffen, damit die frühestmögliche Behandlung des Patienten erreicht wird. Deshalb ist es wichtig, dass die einsendenden Geburtskliniken, Arztpraxen und Hebammen über das erweiterte Krankheitsspektrum und die daraus resultierenden Änderungen für das NGS informiert sind.

## Anwendung der

### Tandem-Massenspektrometrie im NGS

Die Tandem-Massenspektrometrie basiert auf einem physikalischen Messprinzip, bei dem Moleküle in zwei charakteristische Fragmente in zwei hintereinander geschalteten Massenanalysatoren infolge ihres unterschiedlichen Masse zu Ladungsverhältnisses separiert und detektiert werden. Daraus resultiert eine Sensitivität und Spezifität, die es erlaubt, mehr als 50 Parameter pro Probe in einer Analysenzeit von 2 Minuten parallel zu

Tab. 1: Spektrum der erfassten TMS-Parameter

Aminosäuren		Acylcarnitine			
Ala	Alanin	ACges	Acylcarnitine gesamt	MeGlut	Methylglutaryl-carnitin
Val	Valin	C0	freies Carnitin	C14	Tetradecanoylcarnitin
Leu/Ile	Leucin/Isoleucin	C2	Acetylcarnitin	C14:1	Tetradecenoylcarnitin
Met	Methionin	C3	Propionylcarnitin	C14 OH	3-Hydroxy-Tetradecanoylcarnitin
Phe	Phenylalanin	C4	Butyrylcarnitin	C16	Hexadecanoylcarnitin
Tyr	Tyrosin	C5	Isovalerylcarnitin	C16:1	Hexadecenoylcarnitin
Gly	Glycin	C8	Octanoylcarnitin	C16OH	3-Hydroxy-Hexadecanoylcarnitin
Arg	Arginin	C10	Decanoylcarnitin	C16:1OH	3-Hydroxy-Hexadecenoylcarnitin
Cit	Citrullin	MMA	Methylmalonylcarnitin	C18	Octadecanoylcarnitin
		C12	Dodecanoylcarnitin	C18:1	Octadecenoylcarnitin

Tab. 2: Wichtige Erkrankungen des erweiterten NGS

Krankheit	Häufigkeit	Ursache	Symptomatik	Therapie
Ahornsirup-Krankheit (MSUD)	1: 100 000	Störung im Abbau der verzweigtkettigen Aminosäuren	Bewußtseinstörungen, Koma, Krampfanfälle, Hirnödeme, Entwicklungsverzögerungen	Diät
Homocystinurie	1:50 000	Abbaustörung schwefelhaltiger Aminosäuren	geistige Behinderung, Linsenluxation, frühzeitige Neigung zu Thrombose	Diät, Vitamine
Phenylketonurie	1:10 000	Defekt der Phenylalaninhydroxylase Cofaktor-Mangel	Krampfanfälle, Lähmungen, Spastizität, Hyperaktivität, Entwicklungsverzögerung; geistige Behinderung	Diät
Tyrosinämie I	1: 50 000	Abbaustörung Tyrosin	Schweres Leberversagen, Erbrechen, Blutungen	Medikament, Diät
Citrullinämie	1: 60 000	Harnstoffzyklusdefekt	Hyperammonämie, Erbrechen, Krämpfe, Koma, Entwicklungsverzögerung	Diät, Vitamine, Natriumbenzoat
Mittelkettiger Acyl-CoA-Dehydrogenasemangel (MCAD)	1: 10 000	Stoffwechselstörung im Abbau von mittelkettigen Fettsäuren	bei Fastenperioden Unterzuckerung, Koma plötzlicher Kindstod möglich	Carnitin, Vitamine, Vermeidung von Hungerphasen
Langkettiger Acyl-CoA-Dehydrogenasemangel (LCAD)	sehr selten	Stoffwechselstörung im Abbau von langkettigen Fettsäuren	unklare Stoffwechselkrisen, Skelett- und Herzmuskelschwäche, Unterzuckerung, Fettleber	Carnitin, Vitamine, Vermeidung von Hungerphasen
Multipler Acyl-CoA Dehydrogenase-Mangel (Glutarazidurie Typ II, MAD)	sehr selten	Störung des mitochondrialen Elektronentransports	Episodisches Erbrechen, Hypoglykämie ohne Ketose, Organfehlbildungen	Carnitin, Vitamine, Vermeidung von Hungerphasen
Carnitinpalmityl-Transferase I-Mangel (CPT I)	sehr selten	Störung des mitochondrialen Carnitinzyklus	Unterzuckerung, Lebervergrößerung, Krämpfe, Koma	Carnitin, Vitamine, Vermeidung von Hungerphasen
Glutaracidurie Typ I	1: 30 000	Störungen im Abbau von Lysin und Tryptophan, Carnitinverarmung	großer Kopf, Gedeihstörungen, Bewegungsstörungen, Krämpfe	Diät, Carnitin, Vitamine
Propionacidurie	1: 50 000	Defekt im Abbau organischer Säuren (Propionyl-CoA-Carboxylase- Mangel)	Trinkschwäche, Erbrechen, Krampfanfälle, Koma, geistige Behinderung, Todesfälle	Diät, Carnitin, Vitamine
Isovalerianacidurie (IVA)	1: 50 000	Defekt im Abbau organischer Säuren (Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase- Mangel)	frühzeitiges Erbrechen, Koma, geistige Behinderung, Azidose	Diät, Carnitin, Vitamine
Methylmalonacidurie (MMA)	1: 30 000	Abbaustörung organischer Säuren (Methylmalonyl-CoA-Mutase- Mangel)	Gedeihstörung, Erbrechen, Unterzuckerung, Bewegungsstörungen, Azidose	Diät, Carnitin, Vitamine

bestimmen. In Tabelle 1 sind die ermittelten Aminosäuren und Acylcarnitine zusammengefasst.

Diese Parameter bzw. deren Kombination geben Hinweise auf Amino- und Organozidopathien sowie Störungen des Fettsäurestoffwechsels. Einige der wichtigsten erfassbaren Krankheitsbilder, deren Inzidenz, Ursache, Symptomatik und Therapie sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Die Mehrzahl der Krankheiten in Tab. 2 können schon wenige Tage nach der Geburt zu schweren körperlichen und geistigen Schäden führen. Darum ist es notwendig, den Screeningprozess angefangen von der Blutentnahme bis zum Beginn der medizinischen Behandlung zeitlich zu straffen, weil der Therapieerfolg dadurch maßgeblich beeinflusst wird.

### Abnahme und Einsendung der Proben

Der Screeningzeitpunkt sollte für alle Neugeborenen auf den 3. Lebenstag (48-72 Lebensstunde) vorverlegt werden. Die Phenylalanin-Bestimmung wird durch die TMS-Ermittlung des Phenylalanin/Tyrosin (Phe/Tyr)-Quotienten ergänzt<sup>3</sup>. Zusätzlich zur Galaktosebestimmung erfolgt bei Kindern mit Alter 48-72 h die Bestimmung der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase-Aktivität. Bei allen Frühgeborenen (<37 Schwangerschaftswoche) erfolgt ein Zweitscreening zum Zeitpunkt der Entlassung aus der Klinik. Die Blutproben sollten aus der Ferse des Neugeborenen entnommen werden. Das Blut muss direkt auf die Filterkarte in die dafür vorgesehenen Markierungen getropft werden, so dass diese vollständig durchtränkt ist. Venöses Blut kann ebenfalls verwendet werden. EDTA- oder Heparinblut darf nicht aufgetropft werden. Falsch negative oder falsch positive Testergebnisse können sonst nicht ausgeschlossen werden.

Es müssen mindestens 3 Kreise ausgefüllt und durchtränkt sein. Es dürfen keine

Blutropfen übereinander aufgetragen werden oder die Karte von beiden Seiten betropft werden, da dies zur Verfälschung des Blutvolumens pro Blutspot führt und bei der Analyse auffällige Befunde vortäuscht. Nachdem die Karten für 3-4 Stunden luftgetrocknet sind (keine künstlichen Wärmequellen verwenden), können diese in einem Briefumschlag an das Screeningzentrum Leipzig gesandt werden. Um Verzögerungen zu vermeiden, ist es unbedingt notwendig, die Screeningkarten am Tag der Probennahme an das Labor einzusenden.

Für die Untersuchungen sollten nur die aktuellen Filterpapierkarten (S&S 903) verwendet werden. Die Qualität des Filterpapiers alter Testkarten führt zu technischen Problemen. Die Angaben zum Neugeborenen sind wichtig für die medizinische Bewertung der Testergebnisse. Die Testkarte sollte vollständig mit allen Besonderheiten (z.B. Transfusion, verabreichte Arzneimittel) ausgefüllt sein.

#### Verdacht auf Stoffwechseldefekt

Im Normalfall liegen am 6. Lebenstag alle Screeningergebnisse vor. Bei pathologischen Screeningbefunden erfolgt die sofortige Kontaktaufnahme eines pädiatrischen Spezialisten für Stoffwechselerkrankungen der Universitätsklinik und Poliklinik für Kinder und Jugendliche Leipzig mit dem Einsender bzw. behandelnden Kinderarzt und den Eltern des betreffenden Kindes. Durch die intensive Zusammenarbeit zwischen Labor und Kinderarzt kann somit eine schnellstmögliche und fachgerechte Behandlung des betreffenden Kindes realisiert werden.

#### 4. Screeningergebnisse

In Tab. 3 sind die im Screeningzeitraum von Juli 2000 bis September 2001 durch die TMS erfassten Stoffwechseldefekte mit den dazugehörigen Parametern bzw. Parameterverhältnissen zusammengefasst. Die Recallrate betrug bei 0,2 % und lag damit in dem von der ständigen Screeningkommission der Deutschen Gesell-

schaft für Kinder und Jugendmedizin geforderten Bereich.

Zur Qualitätssicherung der Screeningergebnisse erfolgte die Teilnahme an nationalen und internationalen Ringversuchen.

Tab. 3: Ergebnisse des erweiterten NGS am Screeningzentrum Leipzig (31 667 Untersuchungen)

Erkrankung	Anzahl	Parameter
Hyperphenylalaninämie	8	Phe↑, Phe/Tyr↑
Homocystinurie	1	Met↑
MCAD	7	C8↑, C8/C10↑, C8/C12↑

Tab. 3 zeigt, dass der MCAD-Defekt im untersuchten Screeningzeitraum eine ähnliche Inzidenz (1:10 000) besitzt, wie die PKU. Die Homocystinurie mit einer Inzidenz von 1:100 000 wurde bundesweit erstmalig im Neugeborenencreening gefunden.

#### 5. Finanzierung

Die getroffene Finanzierungsvereinbarung mit den gesetzlichen Krankenkassen muss infolge der Einführung des erweiterten Screenings überarbeitet werden. Die Verhandlungen des Universitätsklinikums Leipzig mit dem Sächsischen Sozialministerium und den gesetzlichen

Krankenkassen wurden in diesem Jahr wieder aufgenommen.

#### 6. Zusammenfassung

Durch die Erweiterung des Umfangs des Neugeborenencreenings ergeben sich an die einsendenden Geburtskliniken, Kinderärzte und Hebammen und das Screeninglabor neue Anforderungen. Nur bei einer intensiven Zusammenarbeit zwischen Einsender und Screeningzentrum können die Zeitabläufe so optimiert werden, dass bei Vorliegen eines Stoffwechseldefektes rechtzeitig mit der Therapie begonnen werden kann.

#### Literatur

- <sup>1</sup> Rashed MS. Clinical application of tandem mass spectrometry: 10 years of diagnosis and screening for inherited metabolic diseases. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001; 758: 27-48
- <sup>2</sup> Liebl B, Fingerhut R, Roschinger W, Muntau A, Knerr I, Olgemöller B, Zapf A, Roscher AA. Model project for updating neonatal screening in Bavaria: concept and initial results; *Gesundheitswesen* 2000; 62 (4): 185-89
- <sup>3</sup> Schulze A, Kohlmüller D, Mayatepek E. Sensitivity of elektrospray-tandem mass spectrometry using the phenylalanine/tyrosine ratio for the differential diagnosis of hyperphenylalaninemia in neonates. *Clin Chim Acta* 1999; 283:15-20

Korrespondenzanschrift:  
Dr. rer. nat. Uta Ceglarek  
Universitätsklinik und Poliklinik  
für Kinder und Jugendliche  
Oststraße 21-25, 04317 Leipzig