Abschlussbericht zum Projekt

„Neugeborenenscreening auf Sichelzellkrankheiten mittels Tandemmassenspektrometrie“

an

Kindness for Kids

von
Dr. med. Stephan Lobitz, MSc
Gemeinschaftsklinikum Mittelrhein
Standort Kemperhof
Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie
Koblenzer Str. 115-155
56073 Koblenz
Email: stephan.lobitz@gk.de

Dr. med. Claudia Frömmel
Alexianer St. Hedwig Krankenhaus
Große Hamburger Str. 5-11
10115 Berlin
E-Mail: c.froemmel@alexianer.de

Diplom-Chemikerin Dr. rer. nat. Jeannette Klein
Charité – Universitätsmedizin Berlin
Neugeborenenscreening-Labor
Sylter Str. 2
13353 Berlin
E-Mail: jeannette.klein@charite.de

Dr. med. Oliver Blankenstein
Charité – Universitätsmedizin Berlin
Institut für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie
Augustenburger Platz 1
13353 Berlin
E-Mail: oliver.blankenstein@charite.de

Zusammenfassung

Viele in Deutschland lebende Menschen haben einen eigenen oder familiären Migrationshintergrund. Mit diesen Immigranten ist eine beispiellose gesellschaftliche und kulturelle Vielfalt in unser Land gekommen, die unser Zusammenleben unendlich bereichert. Als Folge der Einwanderung beobachten wir aber auch eine Zunahme bestimmter Erkrankungen, die wir in der Vergangenheit kaum kannten. Eine dieser „neuen“ Erkrankungen ist die Sichelzellkrankheit (SCD), eine gravierende angeborene Bluterkrankung, die in Deutschland vergleichsweise selten auftritt, global gesehen aber die häufigste monogene Erbkrankheit überhaupt ist. Die SCD kann unerkannt schon im Säuglings- oder Kleinkindalter zum Tod, zu lebensbedrohlichen Komplikationen oder zu körperlicher und geistiger Behinderung führen. In vielen Ländern ist die SCD daher Teil der staatlichen Neugeborenenscreening (NBS)-Programme. Als Untersuchungsmethoden kommen vor allem die Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC), die Kapillarelektrophorese (CE) und die isoelektrische Fokussierung (IEF) zum Einsatz.

Wir konnten bereits zeigen, dass die SCD auch bei in Deutschland geborenen Kindern so häufig auftritt, dass hierzulande ein NBS geboten wäre. Ein wesentlicher Hinderungsgrund sind jedoch die Kosten, die überwiegend durch die separate Messmethodik verursacht werden (v.a. Hardware, Verbrauchsmaterialien und Personal).

Die Tandemmassenspektrometrie (MS/MS) ist als Screeningmethode für zahlreiche andere Zielerkrankungen schon seit langem im Einsatz. Tandemmassenspektrometer sind daher in allen deutschen Screeninglaboren vorhanden und das Personal ist in der Anwendung hochqualifiziert. Die Einführung eines NBS auf SCD in Deutschland wäre unserer Einschätzung nach sehr viel wahrscheinlicher, wenn die MS/MS sich als probate Methode erweisen würde. Wir und andere Arbeitsgruppen konnten bereits zeigen, dass die MS/MS grundsätzlich zum NBS auf SCD geeignet ist. Allerdings ist dazu eine separate Messung der Probe erforderlich, während die anderen Zielerkrankungen des NBS in der gleichen Messung detektiert werden können. Durch eine separate Messung erhöhen sich die laufenden Kosten aber erheblich, da die doppelte Messzeit pro Probe erforderlich ist und entsprechende Zusatzkosten entstehen.

Ziel der beantragten Studie war daher - neben der Etablierung der MS/MS im klinischen Alltag - die Überprüfung, ob in der gleichen MS/MS-Messung neben dem SCD-Screening auch ein Screening auf Tyrosinämie und Biotinidasemangel möglich ist. Beide Erkrankungen sind bereits im deutschen NBS-Programm enthalten, werden aber aktuell noch mit separaten Methoden untersucht. Durch eine Bündelung in einer Untersuchung könnten die Kosten deutlich gesenkt werden, was die Einführung eines SCD-Screenings unter ökonomischen Aspekten erheblich wahrscheinlicher machen würde.

Im Rahmen der vorliegenden Studie konnten wir mehr als 100.000 Neugeborene auf eine SCD screenen. 50.000 Kinder wurden außerdem auf Tyrosinämie und Biotinidasemangel untersucht.

Dabei wurden zwölf Kinder mit einer SCD, fünf mit einem partiellen oder vollständigen Biotinidase-Mangel und ein Kind mit einer Tyrosinämie identifiziert. Nebenbefundlich fielen drei Kinder mit einer beta-Thalassaemia major, einer anderen schweren Bluterkrankung auf. Bei allen Kindern wurden die Verdachtsdiagnosen im Verlauf bestätigt. Falsch-negative Befunde sind uns bislang nicht zur Kenntnis gekommen.

Fazit: Ein synchrones Screening auf alle drei (vier) Erkrankungen ist mittels MS/MS zuverlässig möglich.

Detaillierter Bericht

Problemstellung

Die SCD ist eine Erkrankung des roten Blutfarbstoffs Hämoglobin. Sie wird autosomal-rezessiv vererbt und ist durch das Auftreten der Hämoglobinvariante S (HbS) charakterisiert, die das normale Hämoglobin (HbA) weitgehend oder vollständig ersetzt. Von den weltweit jährlich etwa 300.000-400.000 an einer SCD leidenden Neugeborenen werden etwa zwei Drittel in Westafrika geboren, allein 80.000-100.000 in Nigeria. Darüber hinaus gibt es hohe Prävalenzen im gesamten „Malaria-Gürtel“ vom Mittelmeerraum bis nach Südostasien [1-4]. Für Deutschland gibt es bislang nur unvollständige epidemiologische Daten. Expertenmeinungen zufolge werden hier pro Jahr vermutlich zirka 150 Kinder mit einer SCD geboren. Die Zahl der Neudiagnosen steigt seit Jahren kontinuierlich [5]. Durch den erheblichen Flüchtlingszustrom gab es in den letzten Monaten außerdem einen akuten Anstieg der Patientenzahl [6-9].

HbS hat im Gegensatz zu HbA die Eigenschaft, nach Sauerstoff-Abgabe zu polymerisieren. HbS-Polymere führen zu einer Änderung der Form („Sichelzellen“) und zu einer Reduktion der Flexibilität der Erythrozyten. Sichelzellen können Gefäßverschlüsse verursachen, die zu stärksten Schmerzen sowie zu akuten und chronischen Organschäden führen. Die Lebensqualität der Betroffenen wird massiv beeinträchtigt, ihre Lebenserwartung ist signifikant verkürzt [4].

Die Notwendigkeit eines NBS auf SCD leitet sich aus der Tatsache ab, dass lebensbedrohliche Komplikationen der Erkrankung schon im Säuglings- und Kleinkindalter auftreten können, insbesondere, wenn die SCD noch nicht diagnostiziert worden ist. Dies sind vor allem akute Anämie-Episoden (u.a. durch Milzsequestrationen) und Infektionen mit bekapselten Bakterien, die Patienten mit einer SCD aufgrund ihrer funktionellen Hypo-/Asplenie nicht adäquat abwehren können. Durch eine frühzeitige Diagnose und eine anschließende präventive Behandlung (u.a. Aufklärung, Impfungen, Penicillinprophylaxe) können diese schweren Komplikationen zum größten Teil vermieden werden [10-14].

Das deutsche NBS hat derzeit 15 Zielkrankheiten, die mit biochemischen Methoden untersucht werden. Am häufigsten kommt die Tandemmassenspektrometrie (MS/MS) zum Einsatz. Aber auch immunometrische, fluorimetrische und photometrische Testverfahren werden für bestimmte Erkrankungen genutzt. Pro Jahr werden kumulativ zirka 600 Erkrankungen detektiert, was bei einer Geburtenzahl von etwa 800000 pro Jahr einer Prävalenz von etwa 1:1300 entspricht (http://www.screening-dgns.de/Pdf/Screeningreports/DGNS-Screeningreport-d_2016.pdf).

Der entscheidende Nachteil der drei international im NBS auf SCD eingesetzten Methoden (HPLC, CE und IEF) mit Blick auf eine Integration in das deutsche NBS-Programm ist, dass sie nur geeignet sind, Neugeborene mit einer SCD zu identifizieren und daher ergänzend zu den Methoden durchgeführt werden müssen, die zum Nachweis der anderen Zielkrankheiten im NBS angewendet werden.

Die meisten Erkrankungen im deutschen NBS werden mittels MS/MS detektiert. Die unterschiedlichen Formen der SCD lassen sich grundsätzlich auch mit der MS/MS nachweisen [15, 16]. Eine Umstellung der Diagnostik auf MS/MS hätte daher enorme praktische und letztlich auch ökonomische Vorteile. Die allgemeine Akzeptanz eines NBS auf SCD ließe sich damit deutlich erhöhen. Nachteilig ist allerdings,

dass eine separate Messung der Probe erforderlich ist, um nach SCD zu suchen, während alle anderen Erkrankungen in einer einzigen Messung detektiert werden können.

Projektziele

Über einen Zeitraum von zwei Jahren sollten alle Neugeborenen, deren Proben im Berliner NBS-Labor untersucht wurden, mittels MS/MS auch auf SCD getestet werden. Es sollte gezeigt werden, dass ein NBS auf SCD mit der MS/MS unter den Rahmenbedingungen des deutschen NBS-Programms und des deutschen Gesundheitssystems umsetzbar ist. Außerdem sollte gezeigt werden, dass ein MS/MS-Screening auch noch kostengünstiger als ein Screening mit HPLC, CE und IEF ist. Ein weiteres wichtiges Ziel war die Generierung umfassender epidemiologischer Daten für Berlin und Brandenburg. Zusätzlich wollten wir untersuchen, ob das Testsystem, das uns von der Arbeitsgruppe um Prof. Neil Dalton (London) im Rahmen einer Kooperation kostenfrei zur Verfügung gestellt wurde, geeignet ist, in der gleichen Messung neben einer SCD auch eine Tyrosinämie und einen Biotinidasemangel beim Neugeborenen zu detektieren. Die Einführung eines NBS auf Tyrosinämie in Deutschland wurde am 15.03.2018 beschlossen, auf einen Biotinidasemangel werden bereits alle Neugeborenen in Deutschland gescreent. Allerdings geschieht dies photometrisch in einer eigenständigen Untersuchung, die eingespart werden könnte, wenn eine Detektion per MS/MS möglich wäre. Ließen sich also in der gleichen Messung neben der SCD auch Tyrosinämie und Biotinidasemangel untersuchen, wäre die Screening-Untersuchung auf SCD mittels MS/MS sehr viel ökonomischer und ihre Einführung damit auch deutlich wahrscheinlicher.

Durchführung des Projektes

Zielkrankheiten

Alle SCD sind durch die Mutation HBB:c.20A>T charakterisiert. Diese Mutation führt phänotypisch zur Hämoglobinvariante HbS und kommt meist homozygot vor. Es gibt aber auch *compound* heterozygote und sehr selten dominante SCD. Neben der HbS-Mutation haben die Betroffenen dann eine zweite Mutation *in trans* oder *in cis*. Häufig ist dies eine β-Thalassämie-Mutation oder eine Veränderung, die zum Auftreten einer weiteren Hämoglobinvariante, z.B. HbC führt.

Primäre Zielerkrankungen waren folgende klinisch relevanten Genotypen der SCD:

- Homozygote HbS-Krankheit (HbSS-Krankheit, früher: „Sichelzellanämie“)
- HbS/β-Thalassämien (inkl. Subtypen wie HbS/Lepore)
- HbS/C-Krankheit
- HbS/E-Krankheit
- HbS/D^{Punjab}-Krankheit
- HbS/O^{Arab}-Krankheit
- HbS/HPFH-Krankheit

Die Zielerkrankungen haben mit Ausnahme der HbS/β^{+}-Thalassämien gemeinsam, dass sich im Blut der betroffenen Kinder neben dem fetalen Hämoglobin (HbF) HbS nachweisen lässt, aber kein HbA. Diese **pathognomonische** Konstellation macht man sich diagnostisch zunutze. Es handelt sich um eine rein qualitative Aussage, was die Verlässlichkeit der Diagnostik erheblich erhöht.

Bei den HbS/β^+-Thalassämien ist eine residuelle HbA-Produktion unterschiedlichen Ausmaßes nachweisbar. Bei einer hohen Restproduktion sind diese Erkrankungen nur schwer von einem Heterozygotenstatus zu unterscheiden. Eine spezifische Detektion dieses Subtyps der SCD ist daher nicht möglich. Sehr seltene Genotypen, u.a. die wenigen dominant vererbten SCD, lassen sich möglicherweise diagnostizieren, waren aber formal keine Zielerkrankungen [17, 18].
Es gibt andere klinisch relevante Hämoglobin-Erkrankungen als die SCD, die im NBS auf SCD mehr oder weniger verlässlich als Nebenbefunde detektiert werden können. Dies sind im Wesentlichen:

- β-Thalassaemia major
- β-Thalassaemia intermedia
- HbE/β-Thalassämie
- HbH-Krankheit
- andere nicht-sichelnde Hämoglobinopathien

Screeningpopulation

Werden nur Neugeborene mit einer definierten ethnischen Herkunft untersucht, so wirkt das stigmatisierend und potentiell benachteiligend. Umgekehrt könnten Kinder aber auch dadurch benachteiligt werden, dass sie nicht gescreent werden, weil sie kein offensichtliches Erkrankungsrisiko haben, aber trotzdem betroffen sind. Vor diesem Hintergrund genügt ein gerichtetes Screening nicht mehr den heutigen ethischen Ansprüchen.
Auch aus praktischen Gründen ist ein universelles Screening meist einfacher umzusetzen als ein gerichtetes. Viele Familien mit Migrationshintergrund sind schon über mehrere Generationen in Deutschland, so dass das Erkrankungsrisiko eines neugeborenen Kindes nicht mit einer ausreichenden Sicherheit aufgrund der mutmaßlichen ethnischen Herkunft, seiner Hautfarbe oder gar seines Namens abgeschätzt werden kann.
Um eine möglichst vollständige Identifikation erkrankter Neugeborener sicherzustellen und eine Stigmatisierung bestimmter Risikogruppen zu vermeiden, ist ein universelles Screening aller in Deutschland geborenen Kinder indiziert.

Screeningmethodik

Die MS/MS trennt und identifiziert Moleküle aufgrund ihrer Masse und Ladungseigenschaften. Vor der Messung wurde das in der Blutprobe enthaltene Hämoglobin mittels Trypsins verdaut. Die entstandenen Peptide wurden detektiert und quantifiziert. Die gefunden Mengen wurden ins Verhältnis zu Standards und zu anderen Peptiden in der Probe gesetzt. Gesucht wurde nach der pathognomonischen Konstellation: Nachweis von HbF und HbS bei gleichzeitiger Abwesenheit von HbA. Automatisierte Systeme sind geeignet, einen hohen Probendurchsatz zu verarbeiten. Dies ist bei den enormen Probenzahlen im NBS unabdingbar.
Screening-positive Proben wurden erneut untersucht. Bestätigte sich der Befund, wurde die betroffene Familie telefonisch benachrichtigt und in unsere Spezialsprechstunde für Hämoglobinopathien eingeladen. Dort erfolgte eine ausführliche Aufklärung über die Bedeutung des Befundes und eine erneute Blutentnahme, die zur molekulargenetischen Absicherung des Screening-Ergebnisses diente.

Auf diese Weise stellten wir sicher, dass alle Neugeborenen mit einer SCD sofort eine verlässliche Diagnose und optimale Betreuung erhielten.

Ergebnisse

Neugeborenenscreening auf SCD

Insgesamt wurden 100652 Neugeborene im Rahmen des Projektes untersucht. **Dabei wurden zwölf Kinder mit einer SCD und nebenbefundlich drei Kinder mit einer beta-Thalassaemia major identifiziert.** Die beta-Thalassaemia major war formal keine Zielerkrankung, wird aber methodisch bedingt mitdetektiert. Es handelt sich um eine schwere Blut-Erkrankung, bei der die Betroffenen lebenslang Transfusionen zum Überleben benötigen.

Neugeborenenscreening auf Biotinidase-Mangel und Tyrosinämie

Es ist uns gelungen, die MS/MS-Methodik zum SCD-Screening so zu modifizieren, dass wir in der gleichen Messung auch Tyrosinämie und Biotinidase-Mangel verdächtige Proben identifizieren konnten. Zum Screening auf Biotindasemangel haben wir den Patientenproben das Substrat Biocytin zugesetzt, das von Biotinidase zu Biotin umgesetzt wird sowie das Substrat 5-Aminolävulinsäure, das unter enzymatischer Vermittlung der Porphobilinogensynthetase zu Porphobilinogen metabolisiert wird. Diese Reaktion wird durch Succinylaceton gehemmt, das bei der Tyrosinämie in großen Mengen anfällt. Durch Messung der Verhältnisse von Biocytin zu Biotin bzw. 5-Aminolävulinsäure zu Porphobilinogen kann daher eine Aussage über die Aktivität der Biotinidase bzw. über die Menge an Succinylaceton (niedrig bei Gesunden, hoch bei Tyrosinämie Typ I) geschlossen werden.

Die Modifikation der Messmethodik hat etwas mehr als ein Jahr in Anspruch genommen, so dass wir nach Etablierung der Methodik noch 50.000 Proben auf Biotinidase-Mangel und Tyrosinämie untersuchen konnten. **Dabei wurden fünf Kinder mit einem Biotinidasemangel und ein Kind mit einer Tyrosinämie identifiziert.**

Kosten

Die Gesamtkosten für Hardware, Verbrauchsmaterialien und Personal lagen mit ziemlich genau drei Euro pro Probe etwas höher, aber letztlich in der gleichen Größenordnung wie bei einem isolierten Screening auf SCD mittels MS/MS, HPLC oder CE. Dafür entfallen bei dieser Methodik die Zusatzkosten der bislang separaten Messung auf Biotinidasemangel (ca. 1,40 EUR) bzw. der etwas komplexeren Probenaufarbeitung beim Screening auf Tyrosinämie (ca. 0,80 EUR). Die Mehrkosten des SCD-Screenings liegen daher in einem Bereich zwischen 0,50 EUR und 1,00 EUR.

Sensitivität und Spezifität

Die Spezifität des NBS auf SCD mittels MS/MS war in unseren Händen 100%. Bisher konnten in unserer Einrichtung alle positiven Befunde im Screening bestätigt werden, d.h. es gab keine falsch-positiven Befunde. Zur Sensitivität können wir naturgemäß nur eingeschränkte Angaben machen. In der Vorstudie haben wir bei 25.000 untersuchten Kindern keine Abweichung zwischen MS/MS-Ergebnis und Befund der CE beobachtet. Außerdem sind uns bis heute (bei einer Nachbeobachtungszeit von inzwischen

immerhin bis zu 30 Monaten) bislang keine Kinder mit falsch-negativen Screeningbefunden bekannt geworden.

Resümee

Erfreulicherweise konnten alle Projektziele erreicht werden:

1.) Es wurden > 100.000 Neugeborene mittels MS/MS auf SCD gescreent und 50.000 Neugeborene auf Tyrosinämie und Biotinidasemangel. Dabei konnten insgesamt 18+3 kranke Kinder identifiziert werden (12x Sichelzellkrankheit, 5x Biotinidasemangel, 1x Tyrosinämie und 3x beta-Thalassaemia major als Nebenbefund).
2.) Es konnte gezeigt werden, dass eine Probe in der gleichen MS/MS-Untersuchung durch Optimierung der Messbedingungen zuverlässig auf Sichelzellkrankheit, Tyrosinämie und Biotinidase-Mangel (und beta-Thalassaemia major) untersucht werden kann.
3.) Die Kosten für ein SCD-Screening mittels MS/MS liegen in der gleichen Größenordnung wie bei Anwendung einer der anderen etablierten Methoden (HPLC, CE, IEF). Dadurch, dass in der gleichen Untersuchung aber auch noch eine Testung auf Tyrosinämie und Biotinidasemangel durchgeführt werden kann und so an anderer Stelle Kosten eingespart werden können, ergeben sich Zusatzkosten durch das SCD-Screening in einer Größenordnung von 0,50 EUR bis 1,00 EUR.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie haben internationale Beachtung befunden. Das Projekt wurde bei der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neugeborenenscreening e.V. im Juni 2018 mit dem *Best Abstract Award* ausgezeichnet. Außerdem haben wir den Preis für das beste Poster bei der *Annual Academy of Sickle Cell and Thalassemia Conference (ASCAT)*, der wichtigsten europäischen Konferenz zum Thema Sichelzellkrankheit, im Oktober 2018 erhalten.

Literatur

1. Piel FB, Patil AP, Howes RE, et al. Global epidemiology of sickle haemoglobin in neonates: a contemporary geostatistical model-based map and population estimates. Lancet 2013;381:142-151.
2. Piel FB, Hay SI, Gupta S, et al. Global burden of sickle cell anaemia in children under five, 2010-2050: modelling based on demographics, excess mortality, and interventions. PLoS Med 2013;10:e1001484.
3. Piel FB, Tatem AJ, Huang Z, et al. Global migration and the changing distribution of sickle haemoglobin: a quantitative study of temporal trends between 1960 and 2000. The Lancet Global health 2014;2:e80-89.
4. Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. Lancet 2010;376:2018-2031.
5. Pattloch D. Sichelzellkrankheit unter Neugeborenen in Deutschland: Eine Studie an Routinedaten der AOK. Das Gesundheitswesen 2018.
6. Lobitz S, Frommel C, Brose A, et al. Incidence of sickle cell disease in an unselected cohort of neonates born in Berlin, Germany. Eur J Hum Genet 2014;22:1051-1053.
7. Grosse R, Lukacs Z, Cobos PN, et al. The Prevalence of Sickle Cell Disease and Its Implication for Newborn Screening in Germany (Hamburg Metropolitan Area). Pediatr Blood Cancer 2016;63:168-170.
8. Kunz JB, Awad S, Happich M, et al. Significant prevalence of sickle cell disease in Southwest Germany: results from a birth cohort study indicate the necessity for newborn screening. Ann Hematol 2016;95:397-402.
9. Kohne E, Kleihauer E. Hemoglobinopathies: a longitudinal study over four decades. Dtsch Arztebl Int 2010;107:65-71.
10. Thomas AN, Pattison C, Serjeant GR. Causes of death in sickle-cell disease in Jamaica. Br Med J (Clin Res Ed) 1982;285:633-635.
11. John AB, Ramlal A, Jackson H, et al. Prevention of pneumococcal infection in children with homozygous sickle cell disease. Br Med J (Clin Res Ed) 1984;288:1567-1570.
12. Lee A, Thomas P, Cupidore L, et al. Improved survival in homozygous sickle cell disease: lessons from a cohort study. BMJ 1995;311:1600-1602.
13. Telfer P, Coen P, Chakravorty S, et al. Clinical outcomes in children with sickle cell disease living in England: a neonatal cohort in East London. Haematologica 2007;92:905-912.

14. Quinn CT, Rogers ZR, McCavit TL, et al. Improved survival of children and adolescents with sickle cell disease. Blood 2010;115:3447-3452.
15. Moat SJ, Rees D, King L, et al. Newborn blood spot screening for sickle cell disease by using tandem mass spectrometry: implementation of a protocol to identify only the disease states of sickle cell disease. Clin Chem 2014;60:373-380.
16. Turner C, Daniel Y, Dalton RN. Newborn screening for sickle cell disease through use of tandem mass spectrometry. Clin Chem 2009;55:1243-1244; author reply 1244-1245.
17. Streetly A, Latinovic R, Hall K, et al. Implementation of universal newborn bloodspot screening for sickle cell disease and other clinically significant haemoglobinopathies in England: screening results for 2005-7. J Clin Pathol 2009;62:26-30.
18. Ryan K, Bain BJ, Worthington D, et al. Significant haemoglobinopathies: guidelines for screening and diagnosis. Br J Haematol 2010;149:35-49.

Koblenz und Berlin, den 11. Juli 2019

Dr. med. Stephan Lobitz, MSc

Dr. med. Claudia Frömmel

Dipl.-Chem. Dr. rer. nat. Jeannette Klein

Dr. med. Oliver Blankenstein