

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Орлов Д.С., Назаренко Л.П., Диденко Л.И., Сеитова Г.Н.

СРАВНЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДОВ ДЛЯ СКРИНИНГА НОВОРОЖДЕННЫХ НА БОЛЕЗНЬ ФАБРИ

ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН», Научно-исследовательский институт медицинской генетики, 634009, Томск, Россия

Болезнь Фабри – вызванное мутациями в гене GLA X-сцепленное наследственное заболевание, которое входит в группу лизосомных болезней накопления. Неонатальный скрининг новорожденных мальчиков технически возможен благодаря измерению активности фермента альфа-галактозидазы А в сухих пятнах крови с применением методов масс-спектрометрического и флуоресцентного анализа. Цель исследования: оценить перспективу внедрения сравниваемых методов энзимодиагностики в практику неонатального скрининга. Для обоих подходов показана достоверность различий в измеряемой активности фермента в образцах биологического материала между группами новорожденных и пациентов с болезнью Фабри. Небольшая модификация флуориметрического метода за счет центрифугирования 96-луночного микропланшета перед измерением может улучшить отношение сигнал / шум.

Ключевые слова: неонатальный скрининг; болезнь Фабри.

Для цитирования: Орлов Д.С., Назаренко Л.П., Диденко Л.И., Сеитова Г.Н. Сравнение флуоресцентного и масс-спектрометрического методов для скрининга новорожденных на болезнь Фабри. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (4): 204-206. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-4-204-206>

Для корреспонденции: Орлов Дмитрий Сергеевич, мл. науч. сотр. лаб. наследственной патологии; e-mail: doc_esperanzo@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках Государственного задания Томского НИМЦ на выполнение поисковых научных исследований (Номер государственного учета НИОКТР АААА-А20-120041490003-6).

Поступила 11.11.2021

Принята к печати 17.02.2022

Опубликовано 17.04.2022

Orlov D.S., Nazarenko L.P., Didenko L.I., Seitova G.N.

COMPARISON OF FLUORIMETRIC AND MASS SPECTROMETRIC METHODS FOR FABRY DISEASE NEWBORN SCREENING

Research Institute of Medical Genetics Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, 634009, Tomsk, Russia

Fabry disease is an X-linked hereditary lysosomal storage disorder caused by mutations in the GLA gene. Neonatal screening for Fabry disease in males is feasible by measurement of α -galactosidase A activity in DBS using either the mass spectrometric or fluorogenic substrate. The aim of the study: to assess the possibility of introducing the compared methods into the practice of neonatal screening. In the both assays performed a statistically significant difference of the enzyme activity between affected individuals and controls is reported. The slight modification of the fluorimetric method by centrifugation of a 96-well microplate before measurement could improve signal to noise ratio.

Key words: neonatal screening; Fabry disease.

For citation: Orlov D.S., Nazarenko L.P., Didenko L.I., Seitova G.N. Comparison of fluorimetric and mass spectrometric methods for Fabry disease newborn screening. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (4): 204-206 (in Russ.) DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-4-204-206>

For correspondence: Orlov D.S., researcher of laboratory of hereditary pathology, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, e-mail: doc_esperanzo@mail.ru

Information about authors:

Orlov D.S., <https://orcid.org/0000-0001-7525-0176>;

Nazarenko L.P., <https://orcid.org/0000-0002-1861-433X>;

Didenko L.I., <https://orcid.org/0000-0003-2965-3665>;

Seitova G.N., <https://orcid.org/0000-0002-8421-1416>.

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interest.

Acknowledgment. The work was carried out within the State assignment (State registration number АААА-А20-120041490003-6).

Received 11.11.2021

Accepted 17.02.2022

Published 17.04.2022

Болезнь Фабри входит в группу лизосомных болезней накопления и обусловлена снижением активности фермента альфа-галактозидаза А. Ген *GLA* картирован

на длинном плече X хромосомы. Частота встречаемости классической формы болезни Фабри оценивается как 1:50 000 новорожденных мальчиков [1].

Программы массового неонатального скрининга гемизигот возможны благодаря наличию двух подходов к энзимодиагностике: флуоресцентного и масс-спектрометрического. Наличие патогенетически обоснованной ферментзаместительной терапии дает основание для включения болезни Фабри в программу скрининга новорожденных на наследственные заболевания [2].

Цель данного исследования – оценка перспективы внедрения сравнимых методов энзимодиагностики в практику неонатального скрининга на территории Томской области.

Материал и методы. Материалом для исследования служили образцы сухих пятен крови на стандартных тест-бланках фильтровальной бумаги. Все манипуляции с образцами осуществлялись в соответствии с Хельсинской декларацией ВОЗ. Исследование проведено с использованием оборудования центра коллективного пользования «Медицинская геномика» и биокolleкции «Биобанк населения Северной Евразии» на базе НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

Кровь наносили на тест-бланк и высушивали при комнатной температуре не менее 3 ч вдали от источников тепла и прямого солнечного света. Пробы хранились в холодильнике при +4°С и защищались от влаги. Приготовление и хранение образцов осуществлялось в соответствии с практическими рекомендациями [3].

Флуоресцентный метод (4-MU). Диск фильтровальной бумаги диаметром 3,2 мм выбивали из каждого образца сухих пятен крови, помещали в 96-луночный микропланшет и инкубировали с 50 мкл 0,1 М ацетатного буфера (рН 4,5), содержащего 2,5 мМ 4-метилумбеллиферил- α -D-галактопиранозид и 0,1 М N-ацетилгалактозамин в течение 18 ч при 37°С. Для остановки реакции добавляли 150 мкл 0,2 М глицин-карбонатного буфера (рН 10,5). Флуоресценцию свободного 4-метилумбеллиферона (λ_{ex} =365 нм; λ_{em} =450 нм) измеряли на счетчике Wallac 1420 Multilabel Counter (Victor-2), PerkinElmer (США). Результаты были скорректированы по значениям холостых проб и сопоставлены с калибровочной кривой 4-метилумбеллиферона. Активность фермента представляли в мкмоль/л/ч [4].

Масс-спектрометрический метод (MSMS). Активность шести лизосомальных ферментов, присутствующих в диске 3,2 мм из высушенного пятна крови, одновременно измеряли с помощью набора NeoLSD, PerkinElmer (США). Образцы инкубировали в течение 18 ч при 37°С со смесью реагентов для анализа, которая содержала 6 субстратов, 6 внутренних стандартов и реакционный буфер. Количество образуемого продукта прямо пропорционально активности соответствующего фермента в образце. Внутренние стандарты представляют собой меченые дейтерием версии соответствующих продуктов ферментативных реакций. После инкубации образцы смешивали с раствором для экстракции и водой, и разделяли на водный и органический слои. Продукты реакции неполярны и преимущественно растворяются в органическом слое, аликвота которого и используется для измерения. Нерасщепленные субстраты реакции остаются в водном слое и не вводятся в масс-спектрометр. Этот процесс значительно снижает фоновые сигналы при анализе данных. Внутренние стандарты и продукты ферментативных реакций измеряли с помощью тандемной масс-спектрометрии (FIA-MSMS) с использованием мониторинга множественных реакций

(MRM). Активности ферментов рассчитывали на основе соотношения пиков каждого измеренного продукта и связанного с ним внутреннего стандарта и известных концентраций внутренних стандартов с использованием программы обеспечения для анализатора QSight 225MD UHPLC, PerkinElmer (США) и выражали в мкмоль/л/ч [5].

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием программы SPSS 17.0. Проверка нормальности распределения количественных показателей осуществлялась с использованием критерия Шапиро–Уилка. Данные представляли в виде медианы верхнего и нижнего квартилей $Me (Q_1-Q_3)$. Для сравнения групп использовали непараметрические критерии. Статистически значимыми различия считали при $p < 0,05$.

Для валидации разработанного в лаборатории количественного флуориметрического теста использовали линейную регрессию. Новый тест считался прошедшим валидацию, если и коэффициент регрессии (В) и константа (V_0) не отличаются достоверно от 1 и 0, соответственно. Надежность нового теста, определяющую воспроизводимость результатов, определяли с помощью коэффициента корреляции между результатами первого и повторного тестирования. Новый тест считался надежным, если коэффициент альфа-Кронбаха был больше 0,8.

Результаты. На первом этапе исследования показатель cut-off устанавливался как 30% от среднего значения активности фермента в образцах сухих пятен крови [6]. Образцы с активностью фермента ниже указанного порогового значения исследовались повторно в дублях. При условии нормальной активности фермента дополнительная процедура забора биологического материала не требовалась.

Флуориметрическим методом в течение двух лет проанализирована активность α -галактозидазы А в 881 образце сухих пятен крови, взятых у новорожденных г. Томска в рамках программы неонатального скрининга, без учета повторов, контрольных образцов, а также образцов пациентов, направляемых врачом генетиком на селективный скрининг болезни Фабри. Количество образцов, требующих повторного исследования, составляло менее 5% от общего количества. Ни в одном случае не потребовалось проведение ретеста, что сопоставимо с литературными данными [7]. Такой результат является хорошим показателем, поскольку не приводил к тревожности родителей обследуемых и одновременно не увеличивал нагрузку на лабораторию. Методом тандемной масс-спектрометрии обследованы 340 новорожденных. Ни в одном случае не потребовалось проведения повторного исследования.

Вне зависимости от метода активность α -галактозидазы А в группе новорожденных была значительно выше, и не перекрывалась со значениями, полученными у пациента с болезнью Фабри ($p < 0,05$). Данные обобщены в таблице.

Разработанный в лаборатории флуориметрический тест для определения активности фермента α -галактозидазы А в сухих пятнах крови валидировался с применением масс-спектрометрического теста в качестве референсного.

Коэффициент регрессии В равен $0,922 \pm 0,180$ (стандартная ошибка), а константа V_0 составила $0,967 \pm 1,221$ (стандартная ошибка). Таким образом, 95% доверитель-

Активность фермента α -галактозидазы А в исследуемых группах

Показатели	Активность α -галактозидазы А, мкМ/ч			
	4-MU, Me (Q ₁ -Q ₃)		MSMS, Me (Q ₁ -Q ₃)	
Новорожденные	<i>n</i> =881	7,0 (4,0 – 11,0)	<i>n</i> =340	9,0 (8,0 – 12,0)
Пациент	<i>n</i> =1	0,3	<i>n</i> =1	0,4

Примечание. 4-MU – флуориметрия, MSMS – масс-спектрометрия; *n* – число обследованных.

ный интервал для коэффициента регрессии В включал 1 и рассчитывался по формуле: $0,922 \pm 1,96 \times 0,180$, т.е., между 0.5692 и 1.2748. А 95% доверительный интервал для константы B_0 включал 0 и рассчитывался по формуле: $0,967 \pm 1,96 \times 1,221$, т.е. между -1,42616 и 3,36016.

Коэффициент альфа Кронбаха, отражающий надежность разработанного флуориметрического теста, составил 0,978 (97,8%), $p=0,001$, что указывает на очень хорошую воспроизводимость метода.

Обсуждение. Преимуществами метода тандемной масс-спектрометрии являются высокая аналитическая чувствительность и возможность измерять активность нескольких ферментов одновременно. Достоинствами флуориметрического метода являются простота выполнения и доступность для лабораторий, проводящих неонатальный скрининг [8].

Следует отметить, что соотношение сигнал/шум флуориметрического метода можно улучшить центрифугированием 96-луночного планшета перед измерением флуоресценции. Это позволяет значительно уменьшить количество ложноположительных результатов и, кроме того, проводить измерение без дополнительного этапа переноса образцов в другой планшет. Действительно, измерение флуоресценции необходимо проводить в прозрачных растворах образцов [9].

Заключение. Обе описанные технологии позволяют оптимизировать диагностику болезни Фабри у новорожденных мальчиков до появления развернутой клинической картины и расширить программу массового неонатального скрининга.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 3–9 см. REFERENCES)

2. Кузенкова Л.М., Намазова-Баранова Л.С., Подклетнова Т.В., Геворкян А.К., Вашакмадзе Н.Д., Савостьянов К.В. и др. Болезнь Фабри: особенности заболевания у детей и подростков. *Вопросы современной педиатрии*. 2015; 14 (3): 341–8. DOI: 10.15690/vsp.v14i3.1369.

REFERENCES

1. Mehta A., Hughes D.A. Fabry disease. 2002 Aug 5 [Updated 2017 Jan 5]. In book Adam M.P., Ardinger H.H., Pagon R.A. et al., eds. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2021. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1292/>.
2. Kuzenkova L. M., Namazova-Baranova L. S., Podkletnova T. V., Gevorkyan A. K., Vashakmadze N. D., Savostyanov K. V. et al. Fabry Disease: symptoms in children and teenagers. *Voprosy sovremennoy pediatrii*. 2015; 14 (3): 341–8. DOI: 10.15690/vsp.v14i3.1369. (in Russian)
3. CLSI. Blood Collection on Filter Paper for Newborn Screening Programs; Approved Standard – Sixth Edition. CLSI Document NBS01-A6. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.
4. Linthorst G.E., Vedder A.C., Aerts J.M., Hollak C.E. Screening for Fabry disease using whole blood spots fails to identify one-third of female carriers. *Clin. Chim. Acta*. 2005; 353 (1-2): 201-3. DOI: 10.1016/j.cccn.2004.10.019.
5. Gal A., Hughes D.A., Winchester B. Toward a consensus in the laboratory diagnostics of Fabry disease - recommendations of a European expert group. *J. Inherit. Metab. Dis*. 2011; 34 (2): 509-14. DOI:10.1007/s10545-010-9261-9.
6. Gelb M.H. Newborn Screening for Lysosomal Storage Diseases: methodologies, screen positive rates, normalization of datasets, second-tier tests, and post-analysis tools. *Int. J. Neonatal. Screen*. 2018; 4 (3): 23. DOI: 10.3390/ijns4030023.
7. Lukacs Z., Nieves Cobos P., Mengel E., Hartung R., Beck M., Deschauer M. et al. Diagnostic efficacy of the fluorometric determination of enzyme activity for Pompe disease from dried blood specimens compared with lymphocytes-possibility for newborn screening. *J. Inherit. Metab. Dis*. 2010; 33 (1): 43-50. DOI: 10.1007/s10545-009-9003-z.
8. Schielen P.C.J.I., Kemper E.A., Gelb M.H. Newborn Screening for lysosomal storage diseases: a concise review of the literature on screening methods, therapeutic possibilities and regional programs. *Int. J. Neonatal. Screen*. 2017; 3 (2): 6. DOI: 10.3390/ijns3020006.
9. Schmidt W. Optical spectroscopy in chemistry and life sciences: an introduction. Weinheim: Wiley-VCH; 2005.