

# Retrospektivní diagnostika nepoznaných příčin náhlého úmrtí kojence

**MUDr. Kristina Strnadová**

Klinika dětí a dorostu  
Univerzita Karlova - 3. lékařská fakulta



Praha 2008

Tato dizertační práce vznikla v rámci postgraduálního doktorského studia v biomedicině na 3. lékařské fakultě Univerzity Karlovy zařazeného do oborové rady Fyziologie a patofyziologie člověka. Práce vznikla ve spolupráci Kliniky dětí a dorostu 3. LF UK a Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde Wien, Rakousko.

Autorka: MUDr. Kristina Strnadová

Adresa pracoviště autorky:

Klinika dětí a dorostu UK- 3.LF a FNKV

Šrobárova 50

Praha 10

100 34

Tel.: +420267162561

Email: [kistr@centrum.cz](mailto:kistr@centrum.cz)

Školitel: Prof. MUDr. Jan Lebl, CSc.

Adresa pracoviště školitele:

Pediatrická klinika UK- 2.LF

V Úvalu 84

Praha 5

150 06

## **Poděkování:**

Mé poděkování patří především doc. MUDr. Felixi Votavovi, Ph.D., za neocenitelné nápady, bez nichž by tato práce postrádala originalitu. Dále děkuji svému školiteli prof. MUDr. Janu Leblovi, CSc., za zprostředkování mezinárodní spolupráce, poskytnutí cenných rad týkajících se formální stránky publikací a vůbec možnost pod jeho vedením celé postgraduální studium dokončit. Děkuji také profesoru Olafu Bodamerovi za poskytnutí vzorků z rakouské populace a velmi užitečné rady při přípravě všech impaktovaných publikací. Také bych ráda poděkovala profesoru Ivanu Bouškovi za nenahraditelnou spolupráci při výběru dětí k zařazení do vyšetřovaného souboru a vídeňským laborantům za pomoc s analýzou tandemovým hmotovým spektrometrem.

Studie byla finančně podpořena výzkumnými záměry VZ MSM 11120001 a VZ MSM 0021620814. Pobyt ve Vídni byl hrazen firmou PRO INFANTIBUS a Fondem mobility UK.

# Obsah

<b>A. Patogeneze syndromu náhlého úmrtí kojence</b>	7
1. Syndrom náhlého úmrtí kojence (Sudden Infant Death Syndrome, SIDS)	7
2. Kandidátní geny predisponující k SIDS	8
2.1. Abnormální serotoninergní funkce, gen pro serotoninový transportér	8
2.2. Geny ovlivňující embryologii autonomního nervového systému	10
2.3. Geny ovlivňující metabolismus nikotinu	11
2.4. Geny regulující zánět	11
2.5. Geny ovlivňující produkci energie	11
2.6. Geny ovlivňující metabolismus glukózy	12
3. Choroby imitující SIDS	12
3.1. SIDS a syndrom prodlouženého QT intervalu	13
3.2. SIDS a poruchy beta oxidace mastných kyselin (FAOD)	17
3.3. SIDS a kongenitální adrenální hyperplázie (CAH)	19
<b>B. Retrospektivní diagnostika nepoznaných příčin náhlého úmrtí kojence</b>	21
<b>C. Úskalí použití archivovaných suchých krevních kapek</b>	22
4. Závislost koncentrace metabolitů na délce skladování	22
Článek 1: Long-Term Stability of Amino Acids and Acylcarnitines in Dried Blood Spots	
5. Závislost koncentrace metabolitů na hematokritu	40
Článek 2: Influence of hematocrit and localisation of punch in dried blood spots on levels of amino acids and acylcarnitines measured by tandem mass spectrometry	
<b>D. Prevalence CAH a FAOD u náhle zemřelých kojenců</b>	54
6. Článek 3: Prevalence of congenital adrenal hyperplasia among sudden infant death in the Czech Republic and Austria	55
7. Prevalence of FAOD among sudden infant death in the Czech Republic and Austria	65
<b>E. Význam studie pro rozšíření novorozeneckého screeningu</b>	70
8. Základní principy novorozeneckého screeningu	70
9. Novorozenecký screening kongenitální adrenální hyperplázie	73
Literatura	77
Publikační činnost autorky	91

## Seznam zkratek

AA	aminokyselina, amino acid
AC	acylkarnitin
Ala	alanin
ANOVA	analysis of variance
Arg	arginin
ASLD	deficit argininosukcinát lyázy
Asp	aspartová kyselina
BD	deficit biotinidázy
BI	bakteriální inhibice
C	chromatografie
C0	volný karnitin
C2	acetylkarnitin
C3	propionylkarnitin
C6	hexanoylkarnitin
C8	oktanoylkarnitin
CAH	kongenitální adrenální hyperplázie
CAT	karnitin acylkarnitin translokáza
CH	kongenitální hypothyroidismus
CF	cystická fibróza
Cit	citrulin, citrulinémie
CPTD I, II	deficit karnitin palmitoyltransferázy I, II
CTD	deficit transporteru karnitinu
<i>CYP21</i>	gen pro 21-hydroxylázu
Del/conv//del/conv	<i>chimericCYP21/CYP21//chimericCYP21/CYP21</i>
ESI-MS/MS	electrospray ionizační tandemový hmotový spektrometr
FAOD	poruchy beta oxidace mastných kyselin, fatty acid oxidation disorders
FC	volný karnitin
GA I	glutarová acidurie typu I
GAA	guanidinoacetát
GAL	galaktosémie
Glu	glutamová kyselina
Gly	glycin
G6PDD	deficit glukóza-6-fosfát dehydrogenázy
HC	hematokrit
HMG-CoA LD	deficit 3-hydroxy 3-methylglutaryl-CoA lyázy
Hom	homocystinurie
I	imunoesej (fluoro-, radio-, enzymo-)
IEM	dědičná porucha metabolismu, inborn error of metabolism
I2//I2	656A/C>G//656A/C>G
I2//Gln318Stop	656A/C>G//Gln318Stop
IVA	isovalerová acidurie
KTD	deficit ketothiolázy
LCHAD	deficit „long chain hydroxyacyl CoA“ dehydrogenázy
Leu	leucin
LQTS	syndrom prodlouženého QT intervalu
MCAD	deficit „medium chain acyl CoA“ dehydrogenázy

3-MCCD	deficit „3-methylkrotonyl-CoA“ karboxylázy
Met	methionin
MG	molekulárně genetická analýza
MMA	methylnalonová acidurie
MS/MS	tandemová hmotová spektrometrie
MSUD	nemoc javorového sirupu
17-OHP	17- hydroxyprogesterone
Orn	ornitin
PA	propionová acidurie
Phe	fenylalanin
PKU	fenylketonurie
SCHCAD	deficit „short chain hydroxyacyl CoA“ dehydrogenázy
SIDS	syndrom náhlého úmrtí kojence, sudden infant death syndrome
TFP	deficit třífunkčního proteinu
Tyr	tyrosin, tyrosinemie
Val	valin
VLCAD	deficit „very long chain acyl CoA“ dehydrogenázy

## A. Patogeneze syndromu náhlého úmrtí kojence

### 1. Syndrom náhlého úmrtí kojence (Sudden Infant Death Syndrome, SIDS)

Syndrom náhlého úmrtí kojence (Sudden Infant Death Syndrome, SIDS) je definován jako **ve spánku vzniklá náhlá smrt kojence, která není vysvětlitelná anamnézou, prohledáním místa úmrtí ani pitevním nálezem** (Hunt 2001, Ozawa et al. 2002a).

Údaje o prevalenci SIDS se liší v jednotlivých zemích a jsou velmi ovlivněny důsledností posmrtného vyšetření a kvalitou pitvy (Coté et al. 1999). SIDS je nejčastější příčinou postneonatální úmrtnosti v rozvinutých zemích. Reprezentuje asi 82 % všech náhlých neočekávaných úmrtí ve věku 1 měsíce až 1 roku (Hunt 2001). Kolem roku 1997 činila **prevalence v USA přibližně 0,64** (Ackerman et al. 2001), **ve Velké Británii 0,62** (Summers et al. 2000) a **v Japonsku 0,37 na 1000** dětí přeživších novorozenecké období (Narita et al. 2001). K SIDS dochází nejčastěji ve věku od 2 do 4 měsíců.

Jak již bylo řečeno, **pitevní nález nevysvětluje příčinu úmrtí**. Tyto děti však mívají určité charakteristické známky – zejména mírný plicní edém, nitrohruční petechie a astrogliózu v mozkovém kmeni (Sawaguchi et al. 2002a). Uvedené patologické změny jsou charakteristické pro stavy hypoxie.

Japonská skupina studovala mechanismy, jakými rizikové faktory ovlivňují fyziologické procesy. Ve spánkové laboratoři pozorovali 20 000 kojenců, z nichž 40 následně zemřelo na SIDS. Mezi patofyziologické charakteristiky budoucích obětí SIDS patří **četnější obstruktivní a smíšené apnoické pauzy, což dokládá poruchu respirační a probouzeční kontroly vázané na spánek. Snížená variabilita srdeční frekvence** svědčí pro větší sympatovagální kontrolu a může být důsledkem opakované expozice hypoxii. Byla zjištěna i

**snížená ventilační odpověď a opožděná probouzecí reakce na hypoxii nebo hyperkapnii,** čili život ohrožující stavy (Ozawa et al. 2002a).

Jednoznačná příčina SIDS nebyla odhalena. Pravděpodobně jde o heterogenní onemocnění, na kterém se podílí **genetická predispozice v kombinaci s vlivy z vnějšího prostředí** jako je **poloha na bříšku, kouření matky, nedonošenost** atd. Dle výše uvedených pitevních a patofyziologických charakteristik obětí SIDS se předpokládá významná role poruch kardiorepiračních, autonomních a probouzecích mechanismů, proto se hledají kandidátní geny, jejichž produkty ovlivňují regulaci právě těchto dějů. Část úmrtí hodnocených jako SIDS však mohou tvořit i jiná onemocnění, která mohou způsobit náhlou smrt bez výrazných patologických změn.

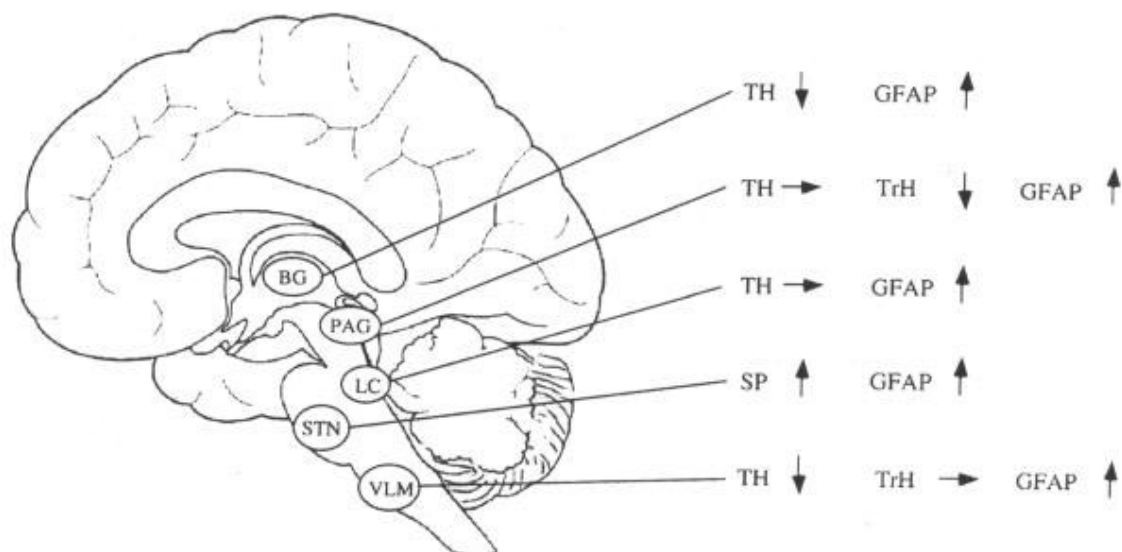
## **2. Kandidátní geny predisponující k SIDS**

Následuje přehled kategorií kandidátních genů, u kterých se na základě epidemiologických a patofyziologických charakteristik a patologických nálezů u SIDS případů předpokládá, že mohou predisponovat a v kombinaci s faktory z vnějšího prostředí vést k SIDS. (Weese-Mayer et al. 2007)

### ***2.1. Abnormální serotoninergní funkce, gen pro serotoninový transportér***

Patofyziologické i patologické změny u některých obětí SIDS ukazují na poruchu mozkového kmene. V mozku těchto dětí byly zjištěny změny imunoreaktivity neurotransmiterů, které mohou být výsledkem buď opakované hypoxie nebo nezralosti kardiorepiračních center (obr.1).





Obr.1. Změny imunoreaktivity neurotransmiterů v mozku obětí SIDS.

BG - bazální ganglia, PAG - periaqueduktální šedá hmota, LC - locus coeruleus, STN - spinální jádro trigeminu, VLM - ventrolaterální medulla, TH - tyrozin hydroxyláza (catecholaminergní neurony), SP - substance P (zvýšená u chronických hypoxických stavů), TrH - tryptofan hydroxyláza (serotonergní neurony), GFAP - gliální fibrilární kyselý protein (značí astrocyty, gliózu)

Upraveno podle Ozawa et al. 2002.

V posledních letech se objevily studie o vztahu mezi SIDS a deficiencí serotonergních drah. Serotonin působí troficky během vývoje, reguluje kardiovaskulární a respirační aktivitu, střídání spánku a bdění, regulaci teploty a cerebrální průtok (Jacobs and Azmitia 1992). Působí na struktury v rostrální ventrolaterální medulle (VLM), kde se předpokládá lokalizace generátoru respiračního rytmu (Ozawa et al. 2002a).

U dětí se SIDS se zjistila **snížená denzita receptorů 5-hydroxytryptaminu typu 1A a 2A** v dorzálním jádře vagu, ncl. solitarius a VLM a naopak zvýšená hustota těchto receptorů v periaqueduktální šedé hmotě. Tyto změny mohou být buď důsledkem chronické hypoxie nebo výrazem poruchy dozrávání kardiorespiračního centra v nervovém systému (Ozawa et al. 2002b). V medulle byl zjištěn větší počet a hustota serotoninových neuronů a nižší hustota serotonin 1A receptorů (Paterson et al. 2006).

Mezi oběťmi SIDS a kontrolami byly zjištěny signifikantní **rozdíly ve frekvenci alel genů, které kódují serotoninový transportér**. U obětí SIDS byly více zastoupeny alely L a XL, které kódují transportér s vyšší schopností přenášet serotonin. U nich dochází k efektivnějšímu zpětnému vychytávání serotoninu z extracelulárního prostoru, čímž se zkracuje doba jeho působení na receptory. L alela byla zjištěna u 22,2 % obětí SIDS oproti 13,5 % u kontrol, XL alela u 5,6 % obětí SIDS ve srovnání s 0,4 % u kontrol. Tyto alely by mohly být biologickým rizikovým faktorem pro SIDS (Narita et al. 2001), ale nikoliv jeho jednoznačnou příčinou.

Weese-Mayer et al. popsali vyšší výskyt polymorfismu VNTR s 12 kopiemi 16 bp úseku v intronu 2 5-HTT genu u SIDS případů Afroameričanů ve srovnání s kontrolami. (Weese-Mayer et al. 2003)

## ***2.2. Geny ovlivňující embryologii autonomního nervového systému***

***PHOX2B* homeobox gen** kóduje transkripční faktor, který hraje klíčovou roli ve **vývoji autonomního nervového systému a v diferenciaci neuronů**, reguluje například diferenciaci v motorické nebo serotoninergní neurony (Pattyn et al 2003). Osm polymorfismů ve třetím exonu *PHOX2B* genu se vyskytlo významně častěji ve skupině SIDS obětí než u kontrol (Rand et al 2006). *PHOX2B* genotyp ovlivňuje i srdeční autonomní regulaci a délku srdečního cyklu, což opět může souviset s náhlým úmrtím (Gronli et al 2008).

## ***2.3. Geny ovlivňující metabolismus nikotinu***

Na základě souvislosti mezi SIDS, expozicí tabákovému kouři a dysregulaci autonomního nervového systému jsou geny ovlivňující metabolismus tabáku dalšími kandidátními geny v etiopatogenezi SIDS. Nebyla zjištěna žádná asociace mezi SIDS a polymorfismy v genech *CYP1A1* a *GSTT1*, kódujících enzymy zodpovědné za metabolismus polycyklických aromatických uhlovodíků, hlavních kancerogenů cigaretového kouře. (Rand et al. 2006)

#### **2.4. Geny regulující záněť**

Známky bakteriální infekce (Morris et al. 2006), hladina endotoxinu (Crawley et al. 1999) a mírná infekce horních cest dýchacích u SIDS případů (Arnestad et al. 2001) vedly ke zkoumání kandidátních genů ovlivňujících reakci na infekci a zánětlivou odpověď. Schneider a Opdal zjistili signifikantně vyšší počet případů **delece v *C4B* genu kódujícím C4 složku komplementu** u SIDS obětí, které měly v anamnéze recidivující infekce nebo známky infekce těsně před smrtí (Schneider et al. 1989 a Opdal et al. 1994). Summers et al. zjistili asociaci **alely A v genu *IL10* pro interleukin-10** (Summers et al. 2000), tato asociace však potvrzena nebyla v jiné větší studii (Opdal et al. 2003).

#### **2.5. Geny ovlivňující produkci energie**

Ve srovnání se zdravými dětmi SIDS oběti bývají méně aktivní a spavější, což vedlo ke zkoumání energetického metabolismu a tedy mitochondriálního genomu (Arnestad et al. 2002). Mitochondriální genom má dvě regulační oblasti (HVR I a HVR II). U případů SIDS byla zjištěna větší četnost substitucí, které mohou poukazovat na nestabilitu mtDNA nebo

přítomnost další mutace v mtDNA (Opdal et al 1998). Bodové mutace v mtDNA byly nalezeny u jednotlivých obětí SIDS (Opdal et al. 2004).

## ***2.6. Geny ovlivňující metabolismus glukózy***

Korelace SIDS s nižší porodní hmotností a intrauterinní růstovou retardací, na kterých se může podílet hypoglykémie, vedla k úvahám, že porucha glukózového metabolismu může být jedním s predisponujících faktorů SIDS. Forsyth et al. 2005 proto zkoumali polymorfismy genů pro klíčové enzymy glukózového metabolismu, glukokinázu a glukóza-6- fosfatázu a nezjistili statisticky signifikantní rozdíl v zastoupení zkoumaných polymorfismů.

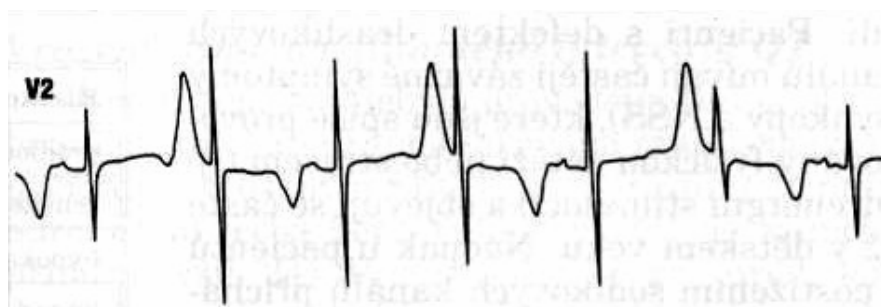
## **3. Choroby imitující SIDS**

Kromě výše zmíněných kandidátních genů a jejich polymorfismů, které za určitých okolností mohou během vulnerabilního období dítěte způsobit náhlé úmrtí existují jasně definované monogenně podmíněné choroby, které mohou vést k náhlému úmrtí bez předchozích varovných příznaků a bez charakteristického patologického nálezu. Přestože pravděpodobně tvoří jen malou část případů SIDS, jejich význam tkví v tom, že jsou diagnostikovatelné novorozeneckým screeningem, a pokud jsou včas léčeny, je možné jejich důsledkům včetně náhlého úmrtí předejít.

Dosud největší geneticky podmíněnou podskupinu SIDS představují mutace v genech pro **syndrom prodlouženého QT intervalu (LQTS)**. Méně významnou, ale opakovaně zkoumanou podskupinu tvoří **poruchy beta oxidace mastných kyselin**. Existují nepřímé důkazy, které naznačují, že část dětí s **kongenitální adrenální hyperplázií** uniká klinické diagnóze a naše hypotéza proto zněla, že se mohou skrývat právě pod diagnózou SIDS.

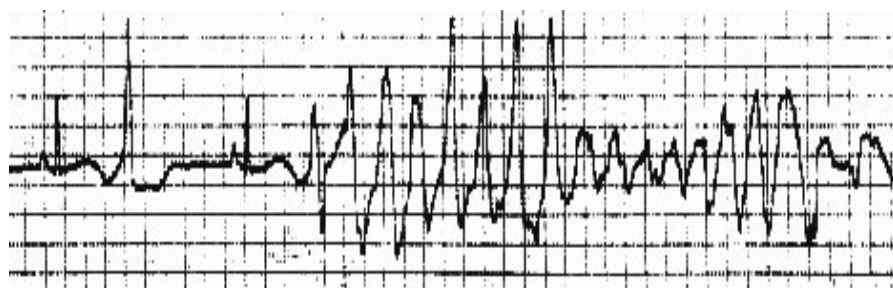
### ***3.1. SIDS a syndrom prodlouženého QT intervalu***

Syndrom prodlouženého QT intervalu (LQTS) je poruchou repolarizace, kterou charakterizuje prodloužení akčního potenciálu (QTc) na EKG, relativní bradykardie a abnormality T vlny (obr.2).



Obr. 2: EKG křivka typická pro LQTS.

Prevalence poruchy se odhaduje přibližně na 1:5000 (Ackerman et al. 2001). Epizodicky může dojít při excesivním prodloužení akčního potenciálu k reaktivaci L-typu  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů nebo  $\text{Na}^{+}$  kanálů a tím k časným následným potenciálům a torsades de pointes (obr. 3), která může vyústit ve ventrikulární fibrilaci (Towbin et al.2001).

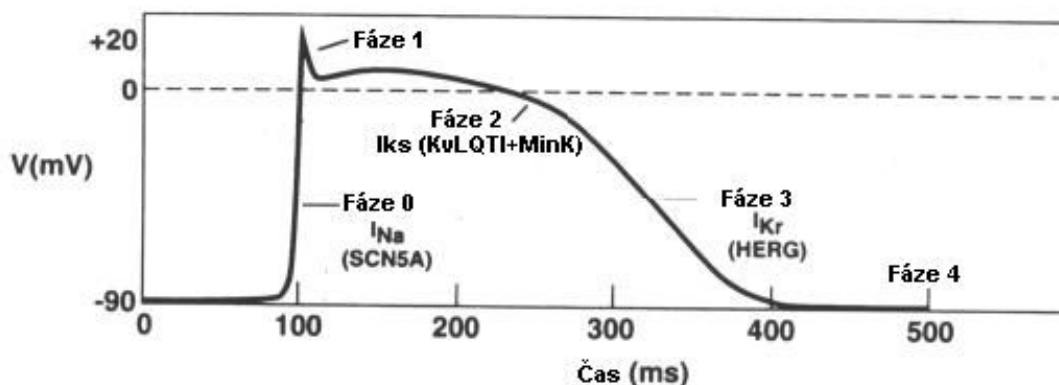


Obr. 3: Torsades de pointes.

Ta se pak projeví synkopou, křečemi nebo náhlou smrtí (Li et al.2000). Někdy je LQTS nazýván „perfektním zabijákem“, protože nezanechává žádné stopy při pitvě. Nabízí se tedy jako možná příčina SIDS (Ackerman et al. 2001, Bajanowski et al.2001).

V prospektivní studii u 34 000 novorozenců se zjistilo, že 50 % z těch, kteří následně zemřeli na SIDS, mělo prodloužený QT interval. Celkový počet obětí SIDS v tomto souboru byl 24, z nich 12 mělo LQTS. Matematicky bylo vypočítáno, že **LQTS zvyšuje riziko úmrtí na SIDS 41x** (Schwartz et al. 2001, Schwartz et al. 2000).

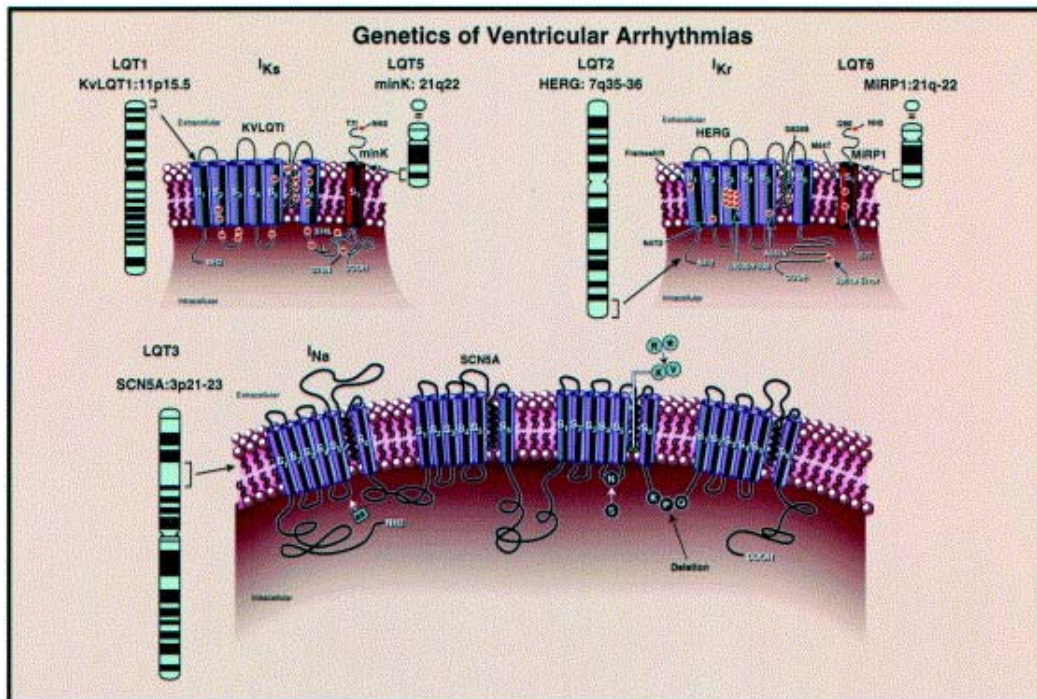
LQTS může být získaný (vyvolaný různými druhy léků nebo iontovými změnami) nebo vrozený (podmíněný mutací genů kódujících iontové kanály). Dosud bylo identifikováno 10 genů způsobujících LQTS, mutace ve třech z nich jsou zodpovědné za 75 % případů LQTS (Weese-Mayer et al.). Obecně platí, že mutace postihující draslíkové kanály vedou ke ztrátě funkce, k opoždění repolarizace a k prodloužení akčního potenciálu. Naopak mutace postihující Na<sup>+</sup> kanál působí nadměrnou funkcí („gain of function“), kanál má změněné vlastnosti a dochází k jeho pozdní inaktivaci a k přetrvávání toku sodíkových iontů v ploché fázi akčního potenciálu s prodloužením depolarizace (Schwartz et al. 2001b) (obr. 4).



Obr.4. Podstata syndromu prodlouženého QT intervalu. Srdeční akční potenciál a některé z genů způsobujících LQTS (dle Towbin et al. 2001)

Pět fází akčního potenciálu: 0 - rychlá depolarizace podmíněná proudem sodíkových iontů do buňky (SCN5A); 1- rychlá repolarizace v důsledku úniku chloridových iontů z buňky; 2 – plateau, rovnováha mezi proudem sodíku a vápníku dovnitř buňky a proudem chloridu a draslíku z nitra buňky; 3 - rychlá repolarizace způsobená proudem draslíku z nitra buňky; 4 - doba mezi maximální negativitou a vrcholem následujícího akčního potenciálu - rovnováha mezi pomalým proudem sodíku do buňky a draslíku z nitra buňky.

V poslední době bylo identifikováno 134 nových mutací (43 bylo známo dříve) způsobujících LQTS (Splawski et al.2000). Nejčastější jsou mutace v genu *KVLQT1*. SIDS je však nejčastěji spojen s typem 3 (LQT3), který je způsoben mutací v genu *SCN5A* pro  $Na^+$  kanál a představuje asi 10-15 % všech případů LQTS (obr. 5).



Obr. 5: Genetika komorových arytmií. Lokalizace genů kódujících srdečních iontové kanály (KvLQT1, minK, HERG, MIRP1, SCN5A), topologie iontových kanálů a některé mutace vedoucí k poruchám iontových kanálů a k některému typu syndromu prodlouženého QT intervalu.  $I_{Ks}$ - pomalu se aktivující draslíkový kanál,  $I_{Kr}$ - rychle se aktivující draslíkový kanál,  $I_{Na}$ - sodíkový kanál (dle Towbin et al. 2001).

Jednotlivé genotypy se liší svými projevy. Při **LQT3** dochází k náhlému **úmrťi v klidu nebo ve spánku** (39 %), při námaze pouze u 13 %. Naopak LQTS1 se nejčastěji (v 62 %) projeví při cvičení a LQTS2 při emocionálním rozrušení (ve 29 %) (Schwartz et al. 2001).

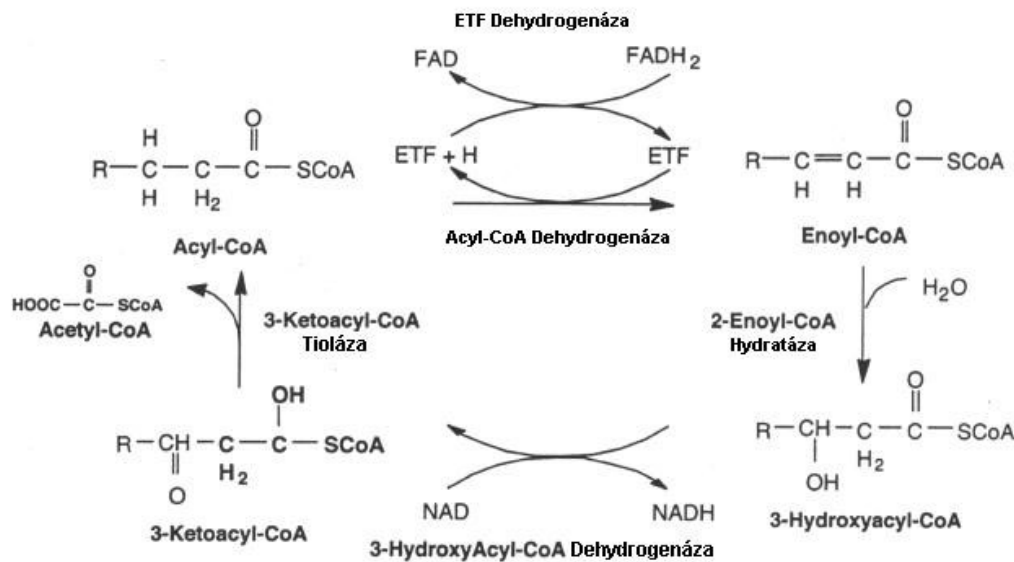
Vazbu mezi SIDS a LQTS dokládají jednak jednotlivé kazuistiky, ale i retrospektivní genetické analýzy u větších souborů SIDS případů. V roce 2000 byla publikována kazuistika 7týdenního dítěte, které našli rodiče cyanotické a bez pulzu. Následně bylo zachráněno z dokumentované komorové fibrilace a bylo zjištěno, že je nosičem *de novo* mutace v **SCN5A genu** (Schwartz et al. 2000). Podobně u dítěte zemřelého ve věku 9 týdnů pod obrazem SIDS byla dodatečně identifikována *de novo* vzniklá mutace v **SCN5A genu** (Wedekind et al. 2001). První rozsáhlejší systematická studie spočívala v molekulárně genetické analýze pěti hlavních LQTS genů u 93 dětí zemřelých na SIDS. U dvou z těchto dětí byla nalezena mutace opět



v *SCN5A* genu (Ackerman et al. 2001). V další práci s 41 vzorky SIDS obětí byla identifikována jedna mutace v *KCNQ1* genu, který podmiňuje LQT1 (Wedekind et al. 2006). Nejnovější výsledky ukazují, že 9,5 % dětí diagnostikovaných jako SIDS ve skutečnosti nese funkčně významnou variantu nebo mutaci v jednom ze 7 genů pro LQTS (Arnestad et al. 2007, Wang et al. 2007).

### 3.2. SIDS a poruchy beta oxidace mastných kyselin (FAOD)

Mastné kyseliny jsou nejprve aktivovány na acyl-CoA thioestery, které jsou pak pomocí transportních proteinů a karnitinu přeneseny do mitochondrií. Tam dochází k vlastní beta oxidaci, která zahrnuje několik enzymaticky kontrolovaných reakcí a vede k odštěpování dvouuhlíkatých jednotek acetyl-CoA (obr. 6).



Obr. 6: Schéma beta oxidace mastných kyselin (dle Vockley et al. 2002).

Tato acetyl-koenzymová rezidua vstupují do cyklu kyseliny trikarboxylové a přes redukující látky a elektronový transportní řetězec vedou k produkci ATP. V játrech z acetyl-CoA vznikají ketolátky, které energeticky zásobují především mozek.

Procesu beta oxidace se účastní alespoň 25 enzymů a transportních proteinů. Dosud byla popsána onemocnění způsobená defektem 22 z nich. Porucha se projeví především v době hladovění, kdy dochází k nedostatečné produkci energie a k hromadění intermediárních metabolitů, což může vyvolat epizody **hypoketotické hypoglykémie** s poruchou vědomí, **kardiomyopatii, srdeční arytmie a svalovou slabost** při hromadění lipidů v těchto tkáních nebo může dojít k jaternímu selhání či rhabdomyolýze s akutním selháním ledvin (Vockley et al. 2002).

Některé dědičné poruchy metabolismu mohou způsobit náhlou smrt a zanechat jen nespecifické patologické změny (např. steatózu jater). Proto mohou být patologicko-anatomicky zařazeny pod diagnózu SIDS. Odhaduje se, že přibližně **3-6 % náhlých a neočekávaných úmrtí** je způsobeno poruchou beta oxidace mastných kyselin, především deficitem **MCAD** (medium-chain acyl-CoA dehydrogenázy), **VLCAD** (very-long-chain acyl-CoA dehydrogenázy; Mathur et al. 1999), **LCHAD** (long-chain hydroxyacyl-CoA dehydrogenázy), **SCHCAD** (short-chain hydroxyacyl-CoA dehydrogenázy; Treacy et al. 2000) a **CAT** (karnitin-acylkarnitin translokázy; Nuoffer et al. 2000).

Poněkud nižší zastoupení metabolických poruch vychází z velké studie z USA. Pomocí tandemového hmotového spektrometru byla provedena analýza 7058 vzorků krve dětí zemřelých do 1 roku života. Více než polovina z nich zemřela na neznámou příčinu. Zjistilo se, že 66 z nich (<1 %) pravděpodobně zemřelo na některou vrozenou metabolickou poruchu. Šlo nejen o defekty beta oxidace mastných kyselin, ale i o další poruchy metabolismu organických kyselin (Chace et al. 2001).

Možnosti prevence náhlého úmrtí u dětí s již známými poruchami beta oxidace mastných kyselin se poněkud liší dle typu defektu. U všech poruch je důležitá prevence dlouhodobého hladovění (nasogastrická sonda na noc nebo podávání kukuřičného škrobu) a omezení podílu tuků ve stravě, u deficitu MCAD navíc podávání MCT (triglyceridů se středně dlouhým řetězcem) a u deficitu karnitinu jeho suplementace.

Vzhledem k tomu, že prvním projevem defektu beta oxidace může být náhlé úmrtí, probíhají v některých zemích pilotní studie novorozeneckého screeningu těchto poruch ze suché krevní kapky pomocí tandemové hmotové spektrometrie.

### **3.3. SIDS a kongenitální adrenální hyperplázie (CAH)**

Kongenitální adrenální hyperplázie (CAH) je autozomálně recesivně dědičná porucha funkce kůry nadledvin. Přibližně 95 % případů je způsobeno mutací **CYP21 genu**, který kóduje 21-hydroxylázu. Deficit 21-hydroxylázy vede ke snížení produkce kortizolu a aldosteronu. Nedostatek kortizolu vyvolává zvýšenou sekreci ACTH, což vede k hyperplázii nadledvin a k nadměrné sekreci androgenů. Podle míry potlačení aktivity enzymu se CAH z klinického hlediska dělí na formu se solnou poruchou, formu prostou virilizující a formu neklasickou.

Nejtěžší forma CAH (**forma se solnou poruchou**) se projevuje metabolickým rozvratem s hyponatrémií, hyperkalemií, dehydratací a šokovým stavem. Předpokládáme, že taková solná krize může vést až k náhlému úmrtí. Fatálním koncem jsou ohroženi především chlapci, neboť u nich chybí diagnostické vodítko, jakým je virilizace zevního genitálu u dívek. Nediagnostikovaní chlapci mohou náhle zemřít v prvních týdnech života a tento stav by mohl být hodnocen jako SIDS v případě, že hyperplázie nadledvin při pitvě unikne pozornosti.

Zatím existují pouze nepřímé důkazy, že malou podskupinu SIDS obětí mohou tvořit děti s nepoznanou kongenitální adrenální hyperplázií. Studie ze Středního Východu poukazují na pravděpodobnou úmrtnost nedagnostikovaných chlapců vzhledem k většímu počtu diagnostikovaných dívek (Lubani et al. 1990, Sack et al. 1997), naopak v rozvinutých zemích je poměr diagnostikovaných chlapců a dívek podobný. Populační studie v rozvinutých zemích uvádějí úmrtnost na diagnostikovanou SW-CAH v kojeneckém věku 0-4 % (Brosnan et al. 1999, Thilen et al. 1990, Van der Kamp et al. 2001), nicméně zcela chybí údaje o nepoznaných úmrtích a skutečná úmrtnost může být tedy vyšší.

## **B. Retrospektivní diagnostika nepoznaných příčin náhlého úmrtí kojence**

Hlavním cílem této studie bylo zjistit, **kolik dětí, které zemřely náhle na neznámou příčinu** většinou pod chybnou diagnózou syndromu náhlého úmrtí kojence (SIDS), **ve skutečnosti zemřelo na některou monogenně podmíněnou a léčitelnou chorobu**. Jak je zmíněno výše, v současné době tvoří syndrom prodlouženého QT intervalu největší podíl vysvětlitelných náhlých úmrtí imitujících SIDS, na druhém místě jsou dle dostupných zdrojů poruchy beta oxidace mastných kyselin a na základě nepřímých důkazů se domníváme, že část dětí, především chlapců s těžkou formou kongenitální adrenální hyperplázie zůstává nediodagnostikována v zemích bez novorozeneckého screeningu a umírá náhle v solné krizi.

Zjištění prevalence těchto léčitelných chorob mezi náhle zemřelými kojenci může poskytnout **argument pro rozšíření novorozeneckého screeningu**. Archivování novorozeneckých screeningových kartiček se suchými kapkami krve a možnost extrakce DNA z nich poskytuje jedinečnou příležitost k retrospektivním studiím zaměřeným jednak na detekci kandidátních genů, jejichž polymorfismy mohou predisponovat k náhlému úmrtí, a jednak k retrospektivní diagnóze těchto monogenně podmíněných léčitelných onemocnění.

Analýza *SCN5A* genu, jehož mutace podmiňují syndrom prodlouženého QT intervalu typu 3, vyžaduje větší množství DNA, než lze extrahovat ze suchých krevních kapek. Zaměřili jsme tedy na detekci **kongenitální adrenální hyperplázie a poruch beta oxidace mastných kyselin** mezi náhle a neočekávaně zemřelými kojenci. Především první část studie (souvislost CAH a SIDS) byla v našem článku publikována poprvé.

## **C. Úskalí použití archivovaných suchých krevních kapek**

K provedení zmíněné retrospektivní studie jsme se rozhodli použít novorozenecké suché krevní kapky na screeningových kartičkách, které jsou ve většině evropských zemích dlouhodobě skladovány. Následující kapitoly shrnují některá úskalí použití dlouhodobě skladovaných novorozeneckých screeningových kartiček (obr. 7).



Obr. 7: Novorozenecká screeningová kartička.

## **4. Závislost koncentrace metabolitů na délce skladování**

Důležitým aspektem použití novorozeneckých screeningových kartiček pro retrospektivní studie je změna koncentrace diagnostických metabolitů v suchých krevních kapkách během dlouhodobého skladování. Změna koncentrace 17-hydroxyprogesteronu během dlouhodobého skladování a po autoklávování byla již jasně definována (Török et al.2002). Existuje vzorec pro korekci koncentrace dle stáří vzorku.

Pro diagnostiku dědičných poruch metabolismu je stěžejní stanovení koncentrace acylkarnitinových zbytků a organických kyselin pomocí tandemové hmotové spektrometrie. Pro retrospektivní diagnostiku dědičných poruch metabolismu je tedy stěžejní závislost

koncentrace zmíněných metabolitů na době skladování, která je poprvé systematicky zpracována v následujícím článku.

### **Článek 1:**

Strnadová KA, Holub M, Mühl A, Heinze G, Tuschl K, Stöckler-Ipsiroglu S, Waldhauser F, Votava F, Lebl J, Bodamer OA. Long-term stability of amino acids and acylcarnitines in dried blood spots used for neonatal screening by tandem mass spectrometry. Clin Chem 2007; 53(4): 717-722

**Long-term stability of amino acids and acylcarnitines in dried blood spots used for neonatal screening by tandem mass spectrometry**

Running title: **Long-term Stability of Analytes in Dried Blood Spots**

**Kristina Anna Strnadová<sup>1,2</sup>, Margareta Holub<sup>2</sup>, Adolf Mühl<sup>2</sup>, Georg Heinze<sup>3</sup>, Karin Tuschl<sup>2</sup>, Silvia Stöckler-Ipsiroglu<sup>2</sup>, Franz Waldhauser<sup>2</sup>, Felix Votava<sup>1</sup>, Jan Lebl<sup>1</sup>, and Olaf A. Bodamer<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Department of Paediatrics, Charles University, CZ-10081 Prague, Czech Republic

<sup>2</sup> Department of General Paediatrics, University Children's Hospital of Vienna, A-1090 Vienna, Austria

<sup>3</sup> Department of Medical Computer Sciences, University of Vienna, A-1090 Vienna, Austria

## **Abstract**

**Background:** Dried blood filter cards, collected for newborn screening, are often stored for long periods of time. They may be suitable for the retrospective diagnosis of inborn errors of metabolism, but no data are currently available on the long-term stability of amino acids and acylcarnitine species.

**Methods:** We analyzed amino acids and acylcarnitines by tandem mass spectrometry in 660 anonymous, randomly selected filter cards from 1989 through 2004. We assessed long-term stability of metabolites by linear regression and estimated annual decrease of concentration for each metabolite.

**Results:** Concentrations of free carnitine increased by about 7.6 % per year during the first five years of storage and decreased by about 1.4 % per year thereafter. Alanine, arginine, leucine, methionine and phenylalanine decreased by 6.5 %, 3.3 %, 3.1 %, 7.3 % and 5.7 % per year, respectively. Acetylcarnitine, propionylcarnitine, citrulline, glycine and ornithine decreased by 18.5 %, 27.4 %, 8.1 %, 14.7 % and 16.3 % per year during the first five years, respectively. Thereafter the decline was more gradual. Tyrosine decreased by 1.7 % per year during the first five years and 7.9 % per year thereafter.

**Conclusions.** The estimated annual loss may aid in the retrospective diagnosis of metabolic disorders. However it should be used with caution and in the context of additional findings consistent with the diagnosis as the error of estimate might be significant.

## **Introduction**

Since the advent of newborn screening for phenylketonuria more than 35 years ago many additional inborn errors of metabolism have been included in neonatal screening



programs. (1,2) In particular, electrospray tandem mass spectrometry (MS/MS) has enabled us to analyse a great number of different metabolites from 3  $\mu$ l whole blood in less than 2 minutes. With its almost 100 % sensitivity and specificity it has become the mainstay for neonatal screening of inborn errors of metabolism, including amino acidopathies, fatty acid oxidation disorders and organic acidurias in many neonatal centers around the world. (3)

Filter cards from each newborn infant are stored for up to 10 years to provide valuable material for epidemiological studies and forensic purposes. (4) Retrospective diagnosis of inborn errors of metabolism may be of particular importance in children that died suddenly and unexpectedly, in particular when a sibling has been diagnosed. (5-11) Retrospective diagnosis of multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency from a 12-year-old blood spot has been reported. (12) The importance of retrospective diagnosis of metabolic disorders in children who died suddenly of unknown reason is that of the possibility of genetic counseling and early diagnosis and treatment of future siblings.

The diagnosis of inborn errors of metabolism is based on the quantitative analysis of amino acids, acylcarnitines and certain ratios exceeding cut-off limits at the 99.5<sup>th</sup> percentile of the reference population. (2, 3) The levels of metabolites in affected infants are typically significantly higher than the respective cut-off limits. For example, in children with PKU blood phenylalanine (phe) levels may exceed 400  $\mu$ mol/l compared to an upper cut-off level of 100 or 150  $\mu$ mol/l. (13) In patients with malonyl-CoA decarboxylase deficiency malonylcarnitine concentrations were found to be 3,9 to 8,8 fold higher than the respective cut-off limits. (14) In some disorders, however, concentrations of diagnostic metabolites may exceed upper cut-off limits only marginally. (13) In addition metabolite levels depend on metabolic status, dietary intake (2) and maturity of the infants (15, 16), which may pose a diagnostic challenge. Time dependent degradation of metabolites during long-term storage of dried blood filter cards may prove to be an additional misleading factor when retrospective

diagnosis is desired. However, only little data regarding the long-term stability of amino acids and acylcarnitines in dry blood filter cards are available.

Consequently, we decided to investigate the long-term stability of these metabolites in dried blood spots on filter cards stored in archives of neonatal screening centers. Our objectives were to identify simplified mathematical models which could describe the time dependent change of metabolite concentrations and adjust for random variation among subsequent years.

## **Materials and methods**

### *Subjects*

60 randomly chosen screening filter cards of children born in January of each of the following years 1989, 1991, 1993, 1995, 1997, 1999, 2000, 2001, 2002, 2003, 2004 (total n=660) were retrieved from the archives in the Czech Republic. The blood was collected by a capillary blood draw from all newborns between the fifth and seventh day of life until June 2003, thereafter between the third and fourth day of life (observed range 2-11 days).

The filter cards (Schleicher & Schuell 1992, Germany) were stored at ambient temperature in a dry environment. The cards were sent from the respective birth clinics to the screening centre through regular public mail in sealed and bagged envelopes, therefore the effects of humidity, temperature, and light should be negligible. None of the filter cards was autoclaved.

### *Acylcarnitine and amino acid analysis*

All samples were analyzed as previously described (17) within three weeks by the same tandem mass spectrometer (MS Wallac, Turku, Finland). Discs 3 mm in diameter

(containing 3,2 ul of blood) were punched out (DBS Puncher, Wallac, Turku, Finland) of the centre of the dried blood spots and transferred to a 96- well microtiter- plate (Greiner, Frickenhausen, Germany). Subsequently 100 µl of methanol extraction-solution mixed with deuterated internal standards (stable isotope standards, CIL, Andover, MA, USA) were added. The concentrations of the internal standards were as follows:  $^2\text{H}_9$ - carnitine 0,76 nmol/ml,  $^2\text{H}_3$ - acetylcarnitine 0,19 nmol/ml,  $^2\text{H}_3$ - propionylcarnitine,  $^2\text{H}_3$ - butyrylcarnitine,  $^2\text{H}_9$ - isovalerylcarnitine,  $^2\text{H}_3$ - octanoylcarnitine and  $^2\text{H}_9$ - myristoylcarnitine 0,04 nmol/ml,  $^2\text{H}_3$ - palmitoylcarnitine 0,08 nmol/ml,  $^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{C}$ -Gly 12,5 µmol/l,  $^2\text{H}_4$ - Ala,  $^2\text{H}_8$ - Val,  $^2\text{H}_3$ - Leu,  $^2\text{H}_3$ - Met,  $^2\text{H}_5$ - Phe,  $^{13}\text{C}_6$ - Tyr,  $^2\text{H}_3$ - Asp,  $^2\text{H}_3$ - Glu,  $^2\text{H}_2$ - Orn.2HCl,  $^2\text{H}_2$ - Cit,  $^2\text{H}_4$ ,  $^{13}\text{C}$ - Arg.HCl 2,5 µmol/l. The plate was sealed and mixed. The samples were then centrifuged and the eluate was evaporated under vacuum. The samples were incubated with butanol and 10% acetylchloride. The resulting solution of butyl-esters of acylcarnitines and amino acids was again evaporated and subsequently reconstituted in 100 ul solvent of water/acetonitrile/formic acid (2500:2500:1). Acylcarnitines and amino acids were detected by tandem mass spectrometer. Source block temperature was 140°C, nebulizer gas was set at 160 l/h and desolvation gas at 518 l/h. Acylcarnitines were measured by positive precursor ion scan of m/z 85 and amino acids by different neutral loss scan functions. Their concentrations were derived from the ratio of the ion intensity of the substance to the corresponding internal standard. We included low and high controls with each batch of samples (i.e., per 96-well plate). All samples and controls were analyzed in a single run sequence. A total of 7 runs were performed to analyze all 60 samples.

### *Statistical analysis*

Because the data were not normally distributed, all data were described by median and interquartile range. Before further statistical computations, we transformed the concentrations

of acylcarnitines and amino acids to a logarithmic scale. The effect of time of storage on the concentration of each substance was assessed by two linear regression models. While for the first model a constant loss of concentration over the period of 15 years was assumed, we introduced a break point after five years of storage for the second model, allowing for two different constant losses before and after five years of storage. The breakpoint was not selected by means of statistical significance but rather determined in advance such that there was an equal amount of available data before and after the breakpoint. Among all possible choices for the breakpoint, our choice statistically guaranteed the most precise results. To simplify interpretation of the results, we refrained from refining our regression models any further. We verified the adequacy of the second model by testing the required additional regression parameter for statistical significance. The parameter estimates from the regression models could be interpreted as yearly declines in concentration, measured on the log scale. Thus, we obtained the annual percent decrease of concentration (L%) from the parameter estimates (B) by retransformation,  $L\% = (\exp(B) - 1) * 100\%$ . The log transformation applied to the original concentrations ensured that the residuals (observed minus predicted values) were approximately normally distributed with equal variance. P-values  $< 0.05$  were considered statistically significant. We used the SAS System v. 8.2 (SAS Institute Inc.) for statistical calculations.

## **Results**

With the exception of free carnitine (C0) and valine (val) all metabolite concentrations showed a decrease (Table 1). C0 increased during the first five years of storage, the largest increase occurred during the first year of storage, when the concentration rose by about 40 %. After storage for more than five years C0 started to decrease gradually. Two different constant losses/gains per year were assumed before and after five years of storage. Thus two curves

(straight lines in logarithmic scale) fitting the data were obtained by linear regression (Fig. 1). The concentration increased by about 7.6 % (5.8-9.3) per year during the first five years of storage and decreased by about 1.4 % (0.5-2.4) per year thereafter. Valine (val) may be regarded as stable, since no significant change of concentration was found during the time period tested (Fig. 2 and Table 1).

**Table 1. Estimated decrease per year of free carnitine (C0), acetylcarnitine (C2), propionylcarnitine (C3), and amino acids during the first 5 years of storage (years of collection, 1999–2004) and between 5 and 15 years of storage (years of collection, 1989–1999).**

<b>Metabolite</b>	<b>Decrease [or increase] per year (1999–2004), \$ (95% CI)</b>	<b>Decrease per year (1989–1999), % (95% CI)</b>
Free carnitine (C0)	[7.6 (5.8–9.3)] <sup>a</sup>	1.4 (0.4–2.3)
Acetylcarnitine (C2)	18.5 (16.4–20.6)	7.5 (6.5–8.4)
Propionylcarnitine (C3)	27.4 (23.7–31.2)	7.8 (6.2–9.4)
Valine	No charge	No charge
Alanine	6.5 (5.8–7.2)	6.5 (5.8–7.2)
Arginine	3.3 (2.9–3.7)	3.3 (2.9–3.7)
Leucine	3.1 (2.5–3.6)	3.2 (2.5–3.6)
Methionine	7.3 (6.7–8)	7.3 (6.7–8)
Phenylalanine	5.7 (5.0–6.3)	5.7 (5.0–6.3)
Citrulline	8.1 (6.5–9.7)	1.5 (0.8–2.3)
Glycine	14.7 (12.8–16.6)	4.4 (3.6–5.3)
Ornithine	16.3 (14.2–18.4)	3.5 (2.6–4.5)
Tyrosine	1.6 (–1.5–4.9)	7.9 (6.2–9.6)

<sup>a</sup> Increase rather than decrease.

The concentration changes for several amino acids, including Ala, Arg, Leu, Met and Phe may be described by a simple exponential model as the estimated loss per year was constant during the fifteen- year period tested (Table 1). The estimated percentile loss per year for Ala, Arg, Leu, Met and Phe was 6.5 % (5.8-7.2), 3.3 % (2.9-3.7), 3.1 % (2.5-3.6), 7.3 % (6.7-8.0) and 5.7 % (5.0-6.3), respectively (Table 1).

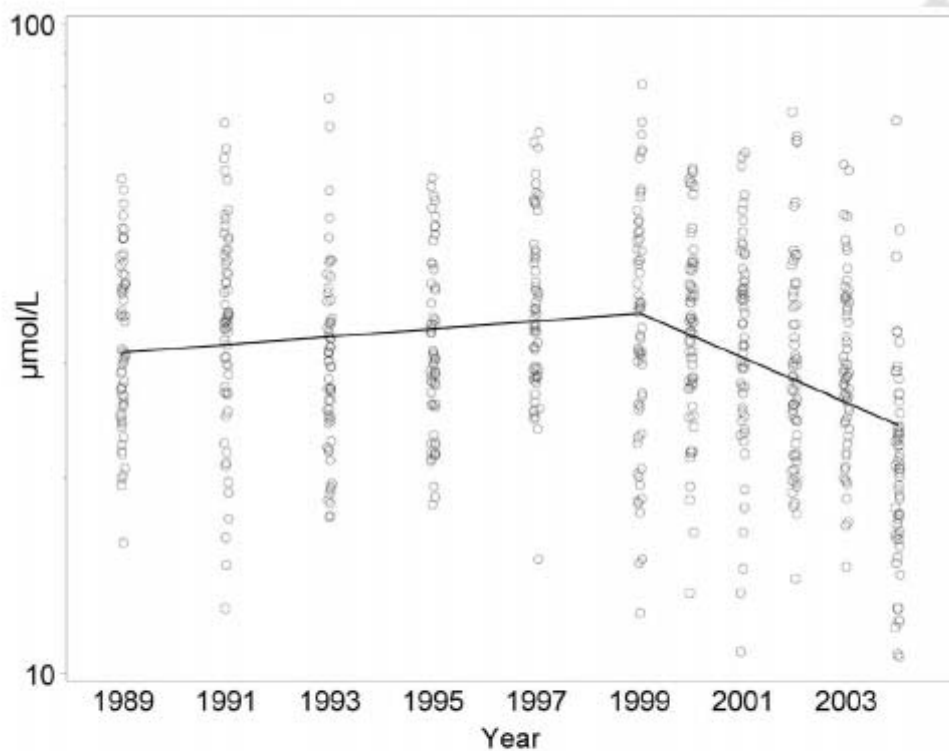


Fig. 1. Free carnitine.

Two straight lines fitting the data were obtained by linear regression. The x axis (logarithmic) represents the year of blood collection, the y axis the concentration in  $\mu\text{mol/L}$ .

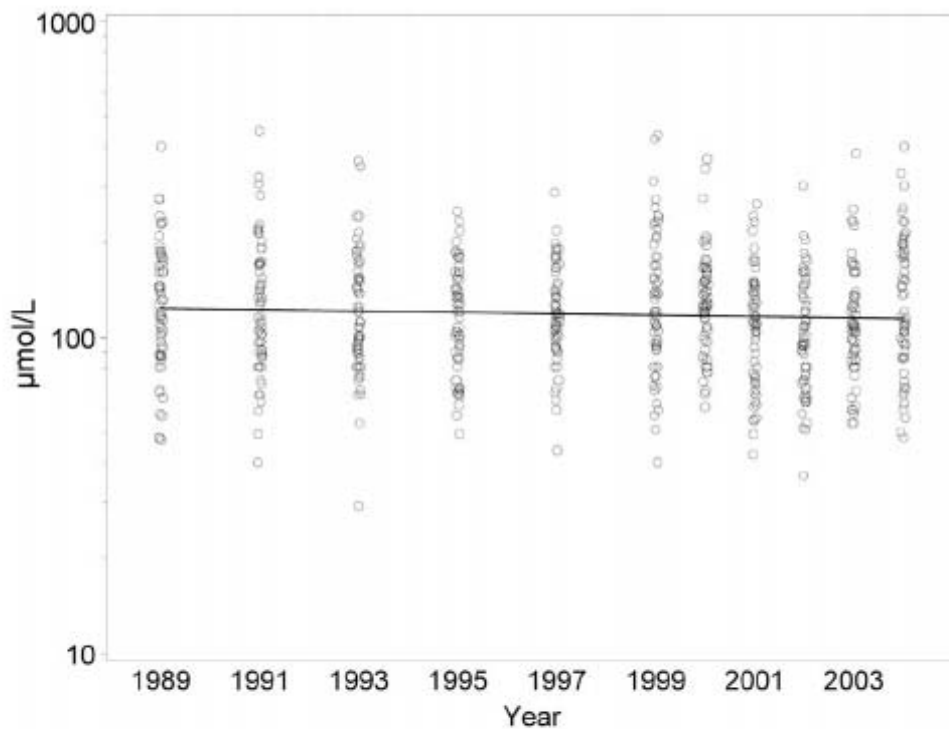


Fig. 2. Valine.

No significant change of Val concentration was observed. A horizontal line fitting the data was obtained by linear regression (see Fig. 1 in the online Data Supplement for phenylalanine). The x axis (logarithmic) represents the year of blood collection, the y axis the concentration in µmol/L.

The concentration of C2, C3, Cit, Gly and Orn decreased significantly during the first five years of storage and more gradually thereafter (Table 1 and Fig. 3).

In contrast, the concentration of tyrosine was relatively stable, with an average annual decrease of 1.7 % (-1.5-4.9) during the first five years of storage, whereas after more than five years of storage the estimated annual decrease was 7.9% (6.2-9.6).

Most acylcarnitines including hexanoylcarnitine (C6) and octanoylcarnitine (C8), crucial for the diagnosis of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency, had to be excluded from the study, since their concentrations are very low even in fresh samples and further decrease could not be detected by the method used. Asp and Glu had to be eliminated from the study as well, because they produce overlapping mass spectra and hence give inaccurate results when analyzed by MS/MS.

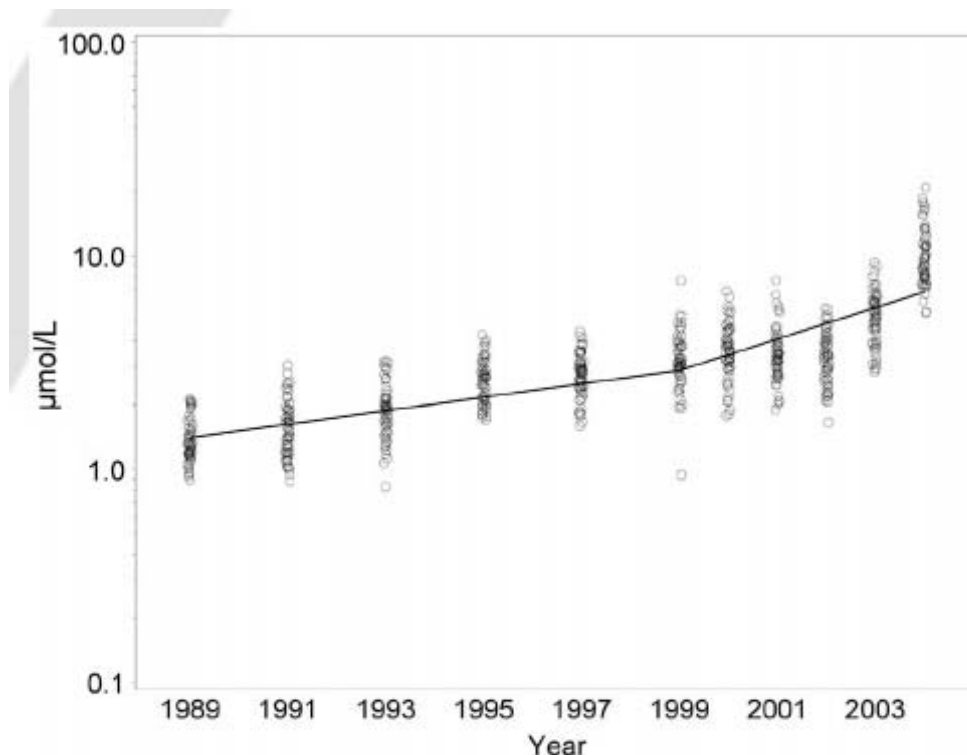


Fig. 3. Acetylcarnitine.

Two straight lines fitting the acquired data were obtained by linear regression (see Fig. 2 in the online Data Supplement for propionylcarnitine). The x axis (logarithmic) represents the year of blood collection, the y axis the concentration in  $\mu\text{mol/L}$ .

## **Discussion**

Residual dried blood spot symplex following newborn screening konstitute an important ressource for health professional, scientists and epidemiologists (17). Data on long-term stability would be valuable for retrospective diagnosis of inborn errors of metabolism to aid in genetic counseling of affected families. We investigated amino acid and acylcarnitine concentrations, usány ESI-MS/MS, in dried blood filter cards stored for up to 15 years.

A numer of studies have examined the stability of genomic or viral DNA, thyroid-stimulating hormone, 17-alfa hydroxyprogesterone, or vitamin A (18-21). Although these studies used a similar approach to investigate long-term stability, the biochemical properties of the investigated compounds are inherently different from acylcarnitine species and/or



amino acids in dried blood spots. Consequently the results cannot be compared with those of our study.

Interestingly, only free carnitine concentrations showed an increase after storage, due to hydrolysis of esterified acylcarnitines (22, 23). Whereas we were able to demonstrate a 40% increase in free carnitine after 1 year of storage, other investigators observed, on average, a 20% increase during the same time period (22, 23). The difference may result from different storage conditions of the filter cards. After 5 years of storage, concentrations of free carnitine gradually decline, likely because of reduced availability of the hydrolyzable esterified acylcarnitines. Short-chain acylcarnitine species (C2, C3) followed a different pattern than free carnitine, as hydrolysis continued (Table 1). The concentration of C3, and the ratios of C3/C2 and C3/C0, are important for the diagnosis of propionic aciduria or methylmalonic aciduria. The cutoff value for C3 in the Austrian screening laboratory is currently set at 3.5  $\mu\text{mol/l}$ . Concentrations observed in infants with propionic aciduria/ methylmalonic aciduria typically exceed 10  $\mu\text{mol/L}$  (2). Accounting for a mean decrease of 27.4% per year during the first 5 years, a retrospective diagnosis of propionic aciduria is still feasible after 3 years of storage. Values observed in some forms of methylmalonic aciduria, or defects of intracellular cobalamin metabolism, range from 6 to 10  $\mu\text{mol/L}$  (2), indicating that concentrations in samples older than 2 years may not be flagged as abnormal without correction for storage time.

Most medium and long acylcarnitine species, as possible indicators for fatty acid oxidation defects could not be evaluated due to their low physiologic concentrations in approximately two thirds of the neonatal screening population (24). Alternatively, the stability of medium and/or long-chain acylcarnitine species can be evaluated using artificially enriched dried blood spots. The stability of C6 and C8 acylcarnitine species, using blood spots enriched with C6 and C8 and stored in sealed plastic bags at 4°C, has previously been established.

After 4.5 years, the concentration decreases of C6 and C8 in blood were 17% and 15%, respectively (22). Retrospective analysis of metabolites that are increased in inborn errors of metabolism would also allow evaluation of their stability in dried blood spots following prolonged storage. Dried blood filter cards from children with malonic aciduria were reanalyzed at different time intervals for up to 900 days, and malonylcarnitine was found to decrease exponentially, with a half-life of 248 days (23).

Madira et al.(24) demonstrated a 50-60 % decrease of phenylalanine during the first five years of storage at room temperature, although according to their graph, only  $\approx 20\%$  were lost during the first 4 years, which is similar to our estimate of  $\approx 25\%$  decrease after the same storage time. It is difficult to conceive why there should be a decrease of 30% during year 5. The article did not report the actual number of samples tested, nor whether samples had been autoclaved. To our knowledge no other studies addressing the issue of long-term stability of metabolites have been published.

According to our findings Phe, Ala, Arg, Leu and Met decrease exponentially with a constant loss during fifteen years of storage (Table 1). Methionine is the least stable of these amino acids, which corresponds to the previous report of Chace et al. (25). These authors investigated the stability of amino acids in dried blood filter cards at 37°C and found out that the initial concentrations of Phe, Leu, Tyr and Val decreased by 15 to 17%, whereas that of Met decreased by 24 % following 30 days of storage (25). More detailed information on concentration changes during storage was not provided.

No significant decrease of Val was observed during the observation period, whereas the concentrations of Leu/Ile fell by an estimated 3.1% per year. At this rate of decrease, the initial concentration would have to be at least 630  $\mu\text{mol/L}$  to exceed the 400  $\mu\text{mol/L}$  cutoff after 15 years of storage. As the observed concentration range for samples from children with maple syrup urine disease (319 to 3650  $\mu\text{mol/L}$ ) overlaps with the normal values, false

negative results may be obtained during neonatal screening, but in the majority of cases a retrospective diagnosis would still be feasible, even after 15 years of storage (26, 27).

The concentration of citrulline fell by 8.1% per year during the first 5 years and by 1.5% per year thereafter. Consequently, the initial concentration should exceed 103  $\mu\text{mol/L}$  to exceed the 60  $\mu\text{mol/L}$  cutoff value after 15 years of storage. These values may be observed in infants with classic citrullinemia, which would most likely be detectable after prolonged storage without correction for storage time.

Other factors may affect the results obtained from testing of dried blood spot filter cards. Limited freezer capacity and other constraints may prevent screening centers from storage of filter cards at lower temperatures. The concentrations of most amino acids and acylcarnitines vary considerably among the normal newborn population, depending on dietary intake, time of blood collection, hematocrit, and position of the punch within the dry blood spot. The concentration of some metabolites may be affected by overlapping spectra with other metabolites (2). Last, the concentration of free carnitine may be unpredictably affected by hydrolysis of acylcarnitines during sample preparation (22).

### **Acknowledgement**

This study was initiated by the Middle European Society for Pediatric Endocrinology (MESPE) study group. The study material (newborn screening cards) was provided by the Czech Neonatal Screening Archive in Prague, laboratory facilities were provided by the Biochemical Genetics and National Neonatal Screening Laboratories in Vienna. K.A.S. was a recipient of financial support from PRO INFANTIBUS.

## References

1. Zytzkovicz TH, Fitzgerald EF, Marsden D, Larson CA, Shih VE, Johnson DM, et al. Tandem mass Spectrometric Analysis of Amino, Organic, and Fatty Acid Disorders in Newborn Dried Blood Spots: A Two- Year Summary from the New England Newborn Screening Program. *Clin Chem* 2001; 47: 1945-1955.
2. Chace DH, Kalas TA, Naylor EW. Use of Tandem Mass Spectrometry for Multianalyte Screening of Dried Blood Specimens from Newborns. *Clin Chem* 2003; 49: 1797-1817.
3. Schulze A, Lindner M, Kohlmüller D, Olgemöller K, Mayatepek E, Hoffmann GF. Expanded Newborn Screening for Inborn Errors of Metabolism by Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry: Results, Outcome, and Implications. *Pediatrics* 2003; 111: 1399-1406.
4. Therrell BL, Hannon WH, Pass KA, Lorey F, Brokopp C, Eckman J, et al. Guidelines for the Retention, Storage, and Use of Residual Dried Blood Spot Samples after Newborn Screening Analysis: Statement of the Council of Regional Networks for Genetic Services. *Biochem Mol Med* 1996; 57: 116-124.
5. Chace DH, DiPerna JC, Mitchell BL, Sgroi B, Hofman LF, Naylor EW. Electrospray Tandem Mass Spectrometry for Analysis of Acylcarnitines in Dried Postmortem Blood Specimens Collected at Autopsy from Infants with Unexplained Cause of Death. *Clin Chem* 2001; 47: 1166-1182.
6. Rinaldo P, Stanley CA, Hsu BYL, Sanchez LA, Stern HJ. Sudden neonatal Death in Carnitine Transporter Deficiency. *J Pediatr* 1997; 131: 304-305.
7. Harpey JP, Charpentier C, Coudé M, Divry P, Paturneau-Jouas M. Sudden Infant Death Syndrome and Multiple Acyl-coenzyme A Dehydrogenase Deficiency, Ethylmalonic-adipic Aciduria, or Systemic Carnitine Deficiency. *J Pediatr* 1987; 110: 881-884.

8. Howat AJ, Bennett MJ, Variend S, Shaw L, Engel PC. Defects of Metabolism of Fatty Acids in the Sudden Infant Death Syndrome. *BMJ* 1985; 290: 1771-1773.
9. Nuoffer JM, de Lonlay P, Costa C, Roe CR, Chamoles N, Brivet M, et al. Familial Neonatal SIDS Revealing Carnitine-acylcarnitine Translocase Deficiency. *Eur J Pediatr* 2000; 159: 82-85.
10. Treacy EP, Lambert DM, Barnes R, Boriack RL, Vockley J, O'Brien LK, et al. Short-chain Hydroxyacyl-coenzyme A Dehydrogenase Deficiency Presenting as Unexpected Infant Death: A Family Study. *J Pediatr* 2000; 137: 257-259.
11. Boles RG, Buck EA, Blitzer MG, Platt MS, Cowan TM, Martin SK. Retrospective Biochemical Screening of Fatty Acid Oxidation Disorders in Postmortem Livers of 418 cases of Sudden Death in the First Year of Life. *J Pediatr* 1998; 132: 924-933.
12. Poplawski NK, Ranieri E, Harrison JR, Fletcher JM. Multiple Acyl-coenzyme A Dehydrogenase Deficiency: Diagnosis by Acyl-carnitine Analysis of a 12-year-old Newborn Screening Card. *J Pediatr* 1999; 134: 764-766.
13. Chace DH, Pons R, Chiriboga CA, McMahon DJ, Tein I, Naylor EW, et al. Neonatal Blood Carnitine Concentrations: Normative Data by Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Pediatr Res* 2003; 53: 823-829.
14. Meyburg J, Schulze A, Kohlmüller D, Pöschl J, Linderkamp O, Hoffmann GF, et al. Acylcarnitine Profiles of Preterm Infants Over the First Four Weeks of Life. *Pediatr Res* 2002; 52: 720-723.
15. Cavedon CT, Bordoux P, Mertens K, Van Thi HV, Herremans N, de Laet C, et al. Age-related variations in acylcarnitine and free carnitine concentrations measured by tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2005; 51: 745-752.
16. Carpenter KH, Wiley V. Application of tandem mass spectrometry to biochemical genetics and newborn screening. *Clin Chim Acta* 2002; 322: 1-10.

17. Bodamer OA, Mitterer G, Maurer W, Pollak A, Mueller MW, Schmidt WM. Evidence for an association between mannose-binding lectin 2 (*MBL2*) gene polymorphisms and pre-term birth. *Genet Med* 2006; 8: 518-524.
18. Chaisomchit S, Wichajarn R, Janejai N, Chareonsiriwatana W. Stability of genomic DNA in dried blood spots stored on filter paper. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2005; 36: 270-273.
19. Waite KV, Maberly GF, Eastman CJ. Storage conditions and stability of thyrotropin and thyroid hormones on filter paper. *Clin Chem* 1987; 33: 853-855.
20. Torok D, Muhl A, Votava F, Heinze G, Solyom J, Crone J, et al. Stability of 17alpha-hydroxyprogesterone in dried blood spots after autoclaving and prolonged storage. *Clin Chem* 2002; 48: 370-372.
21. Oliver RW, Kafwembe EM, Mwandu D. Stability of vitamin A circulating complex in spots of dried serum samples absorbed onto filter paper. *Clin Chem* 1993; 39: 174-175.
22. Chace DH, Hillman SL, Van Hove JLK, Naylor EW. Rapid diagnosis of MCAD deficiency: quantitative analysis of octanoylcarnitine and other acylcarnitines in newborn blood spots by tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 1997; 43: 2106-2113.
23. Santer R, Fingerhut R, Lässker U, Wightman PJ, Fitzpatrick DR, Olgemöller B, et al. Tandem Mass Spectrometric Determination of Malonylcarnitine: Diagnosis and Neonatal Screening of Malonyl-CoA Decarboxylase Deficiency. *Clin Chem* 2003; 49: 660-662.
24. Madira WM, Xavier F, Stern J, Wilcox AH, Barron JL. Determination and Assessment of the Stability of Phenylalanine and Tyrosine in Blood Spots by HPLC. *Clin Chem* 1992; 38: 2162-2163.
25. Chace DH, Adam BW, Smith SJ, Alexander JR, Hillman SL, Hannon WH. Validation of Accuracy-based Amino Acid Reference Materials in Dried- Blood Spots by Tandem Mass Spectrometry for Newborn Screening Assays. *Clin Chem* 1999; 45: 1269-1277.

26. Chace DH, Hillman SL, Millington DS, Kahler SG, Roe CR, Naylor EW. Rapid Diagnosis of Maple Syrup Urine Disease in Blood Spots from Newborns by Tandem Mass Spectrometry. *Clin Chem* 1995; 41: 62-68.
27. Rashed MS, Bucknall MP, Little D, Awad A, Jacob M, Alamoudi M, et al. Screening Blood Spots for Inborn Errors of Metabolism by Electrospray Tandem Mass Spectrometry with a Microplate Batch Process and a Computer Algorithm for Automated Flagging of Abnormal Profiles. *Clin Chem* 1997; 43: 1129-1141.
28. Holub M, Tuschl K, Ratschmann R, Strnadova K, Sperl W, Muhl A, et al. Influence of hematocrit and localisation of punch in dried blood spots on levels of amino acids and acylcarnitines measured by tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 2006; 373:27-31.

## **5. Závislost koncentrace metabolitů na hematokritu a lokalizaci v suché krevní kapce**

Dalším úskalím použití novorozeneckých suchých krevních kapek nejen pro retrospektivní diagnostiku, ale i rutinní screening nebo diagnostiku v čerstvých vzorcích jsou změny koncentrace diagnostických analytů v závislosti na hematokritu a lokalizaci v suché krevní kapce. První studie zaměřená na tuto problematiku je uvedena v následujícím článku.

### **Článek 2:**

Holub M, Tuschl K, Ratschmann R, Strnadova KA, Mühl A, Heinze G, Sperl W, Bodamer OA.. Influence of hematocrit and localisation of punch in dried blood spots on levels of amino acids and acylcarnitines measured by tandem mass spectrometry. Clin Chim Acta 2006; 373:27-31

### **Influence of hematocrit and localisation of punch in dried blood spots on levels of amino acids and acylcarnitines measured by tandem mass spectrometry**

Margareta Holub<sup>a</sup>, Karin Tuschl<sup>a</sup>, Rene Ratschmann<sup>a</sup>, Kristina Anna Strnadová<sup>b</sup>, Adolf Mühl<sup>a</sup>, Georg Heinze<sup>c</sup>, Wolfgang Sperl<sup>d</sup> and Olaf A. Bodamer<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of General Paediatrics, University of Vienna, A-1090 Vienna, Austria

<sup>b</sup>Department of Paediatrics, Charles University, CZ-10081 Prague, Czech Republic

<sup>c</sup>Department of Medical Computer Sciences, University of Vienna, A-1090 Vienna, Austria

<sup>d</sup>Department of Paediatrics, Paracelsus Private Medical University, A-5020 Salzburg, Austria



## **Abstract**

**Background:** Detection of amino acids (AA), acylcarnitines (AC), and guanidinoacetate (GAA) in dried blood spots by tandem mass spectrometry has made it possible to detect different inborn errors of metabolism in neonatal screening programs. Despite its proven sensitivity many issues related to sample preparation remain unsolved. Hematocrit has a profound effect on blood viscosity, and may thereby influence flux and diffusion properties of the blood. As newborn infants show a considerable interindividual variability of hematocrit levels, we investigated its effect on levels of AA and AC in dried blood spots.

**Methods:** Blood samples with defined hematocrit levels (20%, 30%, 40%, 50%, 60%) were produced by diluting blood cells with plasma from a single donor. Forty dried blood spots were made for each hematocrit level and a central as well as a peripheral 3 mm disk was punched and analysed for AA, AC, and GAA, respectively.

**Results:** Levels of most AA and GAA increased significantly with increasing hematocrit ( $p < 0.001$ ), while the effect of hematocrit on some AA was less pronounced. Total AC, free carnitine, some long, medium and short chain AC correlated positively with hematocrit levels ( $p < 0.001$ ). In samples with low hematocrit, levels of most AA and free carnitine were higher in the peripheral than in the central disk ( $p < 0.0001$ ).

**Conclusions:** Both hematocrit and position of the disk within the dried blood spot have a significant and sometimes additive effect on levels of AA, AC and GAA in dried blood spots. Theoretically, diagnoses may be missed depending on hematocrit and position of the disk.

**Keywords:** Neonatal; Screening; Blood spot; Amino acid; Acylcarnitine; Hematocrit

## **Introduction**

The integration of electrospray injection tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) into newborn screening programs allows the detection of numerous metabolites that are relevant for the diagnosis of many inborn errors of metabolism (IEM) [1], [2], [3], [4] and [5]. It has become the mainstay for screening of IEM, including amino acidopathies, defects of fatty acid oxidation and organic acidopathies [1], [2], [3], [4] and [5].

Newborn screening by ESI-MS/MS is based on the semi-quantitative analysis of amino acids (AA) and acylcarnitine ester (AC) using stable isotopically labelled internal standards in whole blood dried on filter cards. Recently, analysis of GAA, a characteristic metabolite for guanidinoacetate-methyl-transferase deficiency, which represents an inborn error in creatine synthesis, was included in our newborn screening program. Diagnosis of IEM is suspected when certain AA, GAA or AC concentrations exceed population dependent cut-off limits. These limits typically reflect the 99th to 99.5th percentile [2] and [3].

Most IEM detected by ESI-MS/MS in newborn screening programs show characteristic metabolite profiles that unequivocally exceed the respective cut-off limits. While this may be true for some disorders, diagnosis may be difficult for others. In addition metabolite levels depend on the metabolic status, dietary intake and maturity of the infants which may pose a diagnostic challenge requiring confirmatory tests such as further biochemical testing, measurement of enzyme activity in fibroblasts or mutation analysis [1], [2] and [4].

There may be additional factors that have a profound effect on the analysis of metabolites. Hematocrit, for example, has a considerable effect on blood viscosity, and thereby may affect flux and diffusion properties of the blood put on filter paper used for

newborn screening. In addition there may be a significant difference of metabolite concentrations between central and peripheral areas within the dried blood spot, due to chromatographic effects. Neonates screened on the third day of life show considerable interindividual variability of hematocrit levels and may therefore be particularly amenable to changes of metabolite concentrations [6], [7] and [8]. This may be particularly true for preterm infants and those who are critically ill on the day of screening [8].

Consequently, we devised a study to investigate whether hematocrit or the location of the punch within the dried blood spot has any effect on concentrations of AA, free carnitine (FC), total carnitine (TC), AC and guanidinoacetate (GAA) measured by ESI-MS/MS.

## **Materials and methods**

### *Samples*

Heparinised blood (50 ml) was taken from a healthy adult volunteer following written informed consent. Blood was spun down immediately and the plasma was separated. Plasma was then added in respective amounts to the corpuscular elements so that samples with defined hematocrit levels (20%, 30%, 40%, 50%, 60%) were obtained. Forty dried blood spots were made for each hematocrit level using standard filter cards (Schleicher, SS 2992). Blood spots were generated by dispensing blood into the centre of the circle on the filter card using a pipette with constant pipetting speed and pressure. The application of blood was stopped as soon as the 15 mm circle was filled by diffusion of blood from the centre of the circle and the filter paper was saturated (i.e. the card was filled with blood on both sides within the circle). The filter paper used was from a single lot and used on a single day in the same laboratory room (i.e. the dryness of the paper as well as room temperature and humidity were identical for all specimens). A central and a peripheral 3 mm disk at a distance of

5.5 mm were punched into polypropylene, round bottomed 96-well microtiter plates (Greiner, Frickenhausen, Germany) and analysed for AA, AC and GAA by ESI-MS/MS.

To investigate potential effects of the printing on the filter paper on blood spreading characteristics, identical blood volume of 70  $\mu$ l were pipetted in printed and unprinted areas of the filter card. By measuring the width of a single blood spot in either direction we have not been able to demonstrate any differences between printed and unprinted areas of the paper (printed: mean 13.38 mm; S.D.: 0.53 vs. unprinted: mean: 13.42 mm; S.D.: 0.51, n.s.).

#### *Acylcarnitine and amino acid analysis*

Each 3 mm disk was eluted in 100  $\mu$ l methanol containing deuterated AC and AA standards (CIL, NSK-B, Andover, MA, USA) and a deuterated GAA standard (Sigma, Germany). The samples were dried during centrifugation under vacuum and subsequently butylated. Butyl esters of free carnitine and various AC species, as well as AA and GAA, were detected by ESI-MS/MS (MS<sup>2</sup> Wallac, Turku, Finland) in positive electrospray mode. Individual AA and AC species and GAA were quantified by comparing their yield to the respective deuterated standard. Total carnitine (TC) was calculated as the sum of all AC and free carnitine (FC). The assay of all samples took approximately 9 h and was performed in random order in a single run on a single day. The tandem mass spectrometer is also used for newborn screening. Consequently drift of the detector response is checked routinely and is negligible in day-to-day analysis.

The following metabolites were analysed: alanine, arginine, aspartic acid, citrulline, glutamine, glycine, methionine, ornithine, phenylalanine, leucine, tyrosine, valine, guanidinoacetate, FC, TC; acetylcarnitine (C2), propionylcarnitine (C3), butylcarnitine (C4), methylmalonylcarnitine (C4DC), isovalerylcarnitine (C5), 3-hydroxyisovalerylcarnitine

(C5OH), glutarylcarnitine (C5DC), hexanoylcarnitine (C6), octanoylcarnitine (C8), decanoylcarnitine (C10), dodecanoylcarnitine (C12), tetradecanoylcarnitine (C14), palmitoylcarnitine (C16), hexadecenoylcarnitine (C16:1), stearoylcarnitine (C18), oleoylcarnitine (C18:1), linolenoylcarnitine (C18:2) [9].

### *Statistical analysis*

Variables are described as mean  $\pm$  standard deviation. Comparison of groups of measurements was done by using analysis of variance (ANOVA) with locus of disk (central or peripheral) and hematocrit (20%, 30%, 40%, 50%, 60%) as fixed effects and filter paper as random effect. While locus is a within-block factor, hematocrit was experimentally varied between blocks. As the evaluation of the 31 metabolites considered leads to inflation of type I error, *p*-values for testing the main effects of locus and/or hematocrit and for testing the interaction of locus and hematocrit were corrected using the Bonferroni–Holm correction [10]. According to the corrected *p*-values for the interaction and the main effects test, parameters were divided into three groups: (a) metabolites showing a significant interaction of locus and hematocrit, (b) metabolites showing significant main effects of locus and/or hematocrit, and (c) metabolites showing no significance. For group (a), pairwise comparisons of hematocrit levels to the reference level 60 were done within both levels of locus. The two loci were compared at each level of hematocrit. For group (b), each level of hematocrit was compared to the value 60, pooling both loci, and loci were compared while pooling all levels of hematocrit. No further comparisons were done for group (c). *p*-values  $< 0.05$  were considered as indicating statistical significance. The SAS System V8.2 (SAS Institute Inc., 2001, Cary, NC, USA) was used for statistical calculations.

### **Results**

Levels of most AA and GAA increased significantly with increasing hematocrit ( $p < 0.001$ ), while the effect of hematocrit on aspartate and tyrosine was less pronounced and not statistically significant (Table 1).

Table 1  
Effect of hematocrit on levels of AA, GAA, FC and AC in central punches

Analyte	Concentration in $\mu\text{mol/l}$ (mean, S.D.), hematocrit (%)				
	20	30	40	50	60
Ala (a)	161.1, 49.3***	213.6, 51.4***	264.7, 51.8 ns	264.0, 51.4 ns	282.8, 57.7
Arg (a)	20.1, 6.1***	24.5, 4.0***	39.1, 4.2 ns	23.3, 4.0***	36.7, 4.5
Cit (a)	10.9, 2.5***	14.3, 1.5***	17.6, 1.7 ns	17.3, 2.2 ns	18.3, 1.7
Gly (a)	110.6, 25.2***	155.8, 12.9***	194.1, 9.3***	218.9, 26.5*	231.8, 13.8
Met (a)	9.5, 1.8***	12.1, 1.1***	14.5, 1.1 ns	14.6, 2.9 ns	15.2, 0.9
Orn (a)	22.6, 4.6***	28.7, 2.5***	32.5, 2.6***	37.3, 5.1 ns	36.6, 3.2
Phe (a)	20.3, 7.5***	26.5, 6.7***	32.9, 8.2 ns	31.7, 7.5 ns	36.4, 9.5
Leu (b)	68.4, 24.5***	94.1, 28.0***	103.4, 25.0*	119.8, 39.9 ns	118.9, 26.8
Tyr (b)	22.9, 11.3***	33.2, 11.9 ns	35.2, 12.0 ns	40.0, 14.4*	36.2, 11.9
Val (b)	106.8, 39.3***	132.7, 38.0**	160.8, 46.9*	158.1, 49.4 ns	166.8, 46.1
GAA (b)	1.7, 0.3***	2.1, 0.3***	2.6, 0.3***	2.4, 0.3***	2.8, 0.3
FC (a)	14.2, 4.2***	18.1, 3.3***	22.8, 3.9 ns	19.2, 4.2*	21.6, 3.6
AC (a)	3.2, 0.6***	4.5, 0.5***	5.5, 0.5***	6.4, 1.0***	7.9, 0.9
TC (a)	17.4, 4.7***	22.7, 3.4***	28.3, 4.0 ns	25.7, 4.6**	29.5, 3.9
C2 (b)	1.9, 0.4***	2.7, 0.4***	3.3, 0.5***	4.0, 0.7***	4.6, 0.6
C3 (b)	0.41, 0.13***	0.56, 0.15***	0.82, 0.19***	0.81, 0.19***	1.31, 0.33
C4 (b)	0.20, 0.09***	0.24, 0.11**	0.27, 0.08 ns	0.21, 0.11***	0.29, 0.11
C4DC (b)	0.16, 0.09***	0.20, 0.11***	0.28, 0.13***	0.34, 0.11**	0.42, 0.14
C5OH (b)	0.13, 0.06***	0.18, 0.09***	0.22, 0.10***	0.28, 0.12*	0.35, 0.11
C16 (b)	0.11, 0.05***	0.18, 0.07***	0.23, 0.08***	0.31, 0.10***	0.35, 0.09
C18 (b)	0.07, 0.04***	0.11, 0.05***	0.17, 0.07***	0.23, 0.09***	0.26, 0.08
C18:1 (b)	0.11, 0.06***	0.20, 0.07***	0.24, 0.09***	0.34, 0.09***	0.42, 0.09
C18:2 (b)	0.05, 0.03***	0.08, 0.05***	0.11, 0.05***	0.13, 0.07***	0.18, 0.06

Concentrations ( $\mu\text{mol/l}$ ) at each respective hematocrit level were compared to the respective concentrations at 60% hematocrit \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.0001$ . (a) Parameters showing a significant interaction of locus and hematocrit, (b) parameters showing significant main effects of locus and/or hematocrit. For group (a), pairwise comparisons of hematocrit levels to the reference level 60 were done within both levels of locus. The two loci were compared at each level of hematocrit. For group (b), each level of hematocrit was compared to the value 60, pooling both loci, and loci were compared while pooling all levels of hematocrit.

Total carnitine, FC, some long chain AC (C16, C18, C18:1, C18:2) as well as some medium and short chain AC (C2, C3, C4, C4DC, C5OH) correlated with hematocrit ( $p < 0.001$ ) (Table 1 and Table 2). For other AC species (C6, C8, C10, C12, C14) a significant correlation was not observed (data not shown).

Table 2  
Effect of hematocrit on levels of AA, GAA, FC and AC in peripheral punches

Analyte	Concentration in $\mu\text{mol/l}$ (mean, S.D.), hematocrit (%)				
	20	30	40	50	60
Ala (a)	212.0, 46.2***	234.0, 51.8**	250.3, 47.9 ns	278.7, 48.3 ns	277.9, 51.6
Arg (a)	24.5, 5.3***	25.2, 4.8***	35.1, 4.2 ns	24.0, 3.3***	33.2, 3.5
Cit (a)	13.5, 1.5***	14.7, 1.3***	16.7, 1.7*	17.2, 1.3 ns	17.8, 1.7
Gly (a)	143.6, 13.5***	167.1, 14.1***	193.6, 10.0***	225.5, 12.1 ns	222.8, 15.4
Met (a)	12.4, 1.0***	13.5, 1.0***	14.6, 1.0 ns	15.4, 1.0 ns	14.9, 1.1
Orn (a)	28.3, 3.6***	29.3, 3.6***	30.5, 2.0**	31.7, 3.1 ns	34.7, 10.2
Phe (a)	26.5, 7.3**	28.5, 4.5*	31.9, 6.9 ns	35.8, 9.7 ns	32.8, 9.6
Leu (b)	90.8, 29.0***	101.3, 24.1***	108.6, 23.0*	122.6, 31.3 ns	116.4, 27.9
Tyr (b)	29.2, 8.8***	29.7, 9.7 ns	25.2, 12.3 ns	37.5, 14.3*	32.8, 11.0
Val (b)	143.8, 44.8***	169.7, 65.1**	147.0, 40.3*	169.6, 48.9 ns	177.6, 70.9
GAA (b)	2.0, 0.2***	2.2, 0.2***	2.7, 0.2***	2.5, 0.2***	3.0, 0.8
FC (a)	20.9, 3.3 ns	20.9, 3.8 ns	22.2, 2.9 ns	22.8, 4.0 ns	21.0, 4.0
AC (a)	3.8, 0.6***	4.5, 0.6***	6.1, 0.6***	6.6, 0.8***	7.5, 1.0
TC (a)	24.7, 3.6***	25.4, 4.0**	28.3, 2.8 ns	29.3, 4.1 ns	28.5, 4.5
C2 (b)	2.2, 0.4***	2.8, 0.5***	3.6, 0.4***	4.0, 0.6***	4.5, 0.6
C3 (b)	0.43, 0.16***	0.56, 0.18***	0.97, 0.27***	0.94, 0.30***	1.26, 0.39
C4 (b)	0.24, 0.10***	0.24, 0.09**	0.32, 0.11 ns	0.23, 0.11***	0.28, 0.11
C4DC (b)	0.16, 0.09***	0.20, 0.11***	0.28, 0.12***	0.32, 0.12**	0.35, 0.11
C5OH (b)	0.13, 0.05***	0.19, 0.09***	0.24, 0.11***	0.32, 0.11*	0.33, 0.12
C16 (b)	0.13, 0.04***	0.17, 0.07***	0.23, 0.08***	0.31, 0.08***	0.37, 0.10
C18 (b)	0.08, 0.04***	0.12, 0.06***	0.18, 0.06***	0.22, 0.09***	0.29, 0.07
C18:1 (b)	0.16, 0.06***	0.20, 0.08***	0.25, 0.08***	0.36, 0.10***	0.41, 0.11
C18:2 (b)	0.08, 0.05***	0.09, 0.04***	0.12, 0.06***	0.15, 0.06***	0.17, 0.07

Concentrations ( $\mu\text{mol/l}$ ) at each respective hematocrit level were compared to the respective concentrations at 60% hematocrit. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.0001$ . (a) Parameters showing a significant interaction of locus and hematocrit, (b) parameters showing significant main effects of locus and/or hematocrit. For group (a), pairwise comparisons of hematocrit levels to the reference level 60 were done within both levels of locus. The two loci were compared at each level of hematocrit. For group (b), each level of hematocrit was compared to the value 60, pooling both loci, and loci were compared while pooling all levels of hematocrit.

Location of the disk within the dried blood spot had an effect on levels of various analytes (Table 3, groups a and b) and was significantly affected by the respective hematocrit in a subgroup (Table 3, group a). At low hematocrit, concentrations of most AA and FC were significantly higher in the peripheral than in the central disk (Table 3).

Table 3.  
Effect of punch location on levels of AA, GAA, AC, and FC measured by ESI-MS/MS

Analyte	Central vs. peripheral punches, hematocrit (%)				
	20	30	40	50	60
Ala (a)	$p < 0.0001$	ns	ns	Ns	Ns
Arg (a)	$p < 0.0001$	ns	$p < 0.0001$	Ns	$p < 0.0005$
Cit (a)	$p < 0.0001$	ns	$p < 0.05$	Ns	Ns
Gly (a)	$p < 0.0001$	$p < 0.005$	ns	Ns	$p < 0.05$
Met (a)	$p < 0.0001$	$p < 0.0001$	ns	$p < 0.005$	Ns
Orn (a)	$p < 0.0001$	ns	ns	$p < 0.05$	Ns
Phe (a)	$p < 0.0005$	ns	ns	$p < 0.05$	$p < 0.05$
Leu (b)	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$
Val (b)	$p < 0.005$	$p < 0.005$	$p < 0.005$	$p < 0.005$	$p < 0.005$
GAA (b)	$p < 0.0001$	$p < 0.0001$	$p < 0.0001$	$p < 0.0001$	$p < 0.0001$
FC (a)	$p < 0.0001$	$p < 0.005$	ns	$p < 0.0001$	Ns
AC (a)	$p < 0.005$	ns	$p < 0.0005$	ns	$p < 0.05$
TC (a)	$p < 0.0001$	$p < 0.005$	ns	$p < 0.0001$	Ns
C18 :2 (b)	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$



For each hematocrit level central and peripheral punches were compared. (a) Parameters showing a significant interaction of locus and hematocrit, (b) parameters showing significant main effects of locus and/or hematocrit. For group (a), pairwise comparisons of hematocrit levels to the reference level 60 were done within both levels of locus. The two loci were compared at each level of hematocrit. For group (b), each level of hematocrit was compared to the value 60, pooling both loci, and loci were compared while pooling all levels of hematocrit.

## **Discussion**

Newborn screening programs employing tandem mass spectrometry rely on population based cut-off values for different metabolites in dried blood filter cards that are typically sampled on day of life three [3] and [4]. In addition, this analytical set-up is used for selective metabolic diagnosis and retrospective analysis of stored filter cards [11], [12] and [13]. For analysis a 3 mm disk is punched from the filter card, the metabolites eluted and typically derivatised to yield corresponding butyl ester prior to analysis [3] and [9]. Quantification of metabolites is based on the fact that a disk of 3 mm contains approximately 3.1  $\mu$ l of whole blood with a hematocrit of 50.1% or approximately 3.2  $\mu$ l with a hematocrit of 53% [14] and [15].

The concentrations of metabolites may vary between plasma and cellular compartment within a blood spot and are therefore amenable to changes of hematocrit. The blood volume within a given 3 mm disk may increase significantly with increasing hematocrit levels. This has been previously shown for a series of 3 mm disks with increasing hematocrit levels from 40% to 70% and analysis of the corresponding blood absorption volume [14]. Hematocrit levels in neonates vary significantly from each other and frequently differ from the assumed

value of 50.1% or 53% [5] and [6]. Up to 5% of newborn infants in the United States are polycythemic, having a hematocrit of 65% or higher [16]. On the other hand premature infants especially those who are critically ill may have significantly lower hematocrit levels at the time of screening [17]. In addition metabolites may be distributed according to chromatographic effects within the spot and therefore location of the punch may have a significant effect. To our knowledge the effects of hematocrit levels and position of the disk within the blood spots on metabolite concentrations relevant to neonatal screening have not been systematically evaluated.

Consequently we tested the effects of five increasing hematocrit levels in combination with two different positions of the disk on 31 metabolites. For all metabolites that showed a correlation with the hematocrit, concentrations were found to be significantly higher in samples with high hematocrit and significantly lower in those with low hematocrit irrespectively of the position of the disk (Table 1 and Table 2). At low hematocrit the total blood volume that is put on the filter card to completely fill a given area is smaller than at high hematocrit (data not shown) which may in part explain the observed differences in metabolite concentrations [14].

The effect of the punch position on levels of some AA was more pronounced in samples with low hematocrit, in which higher metabolite concentrations were found in peripheral compared to central punches due to chromatographic effects.

In cases where metabolite concentrations exceed unequivocally their respective cut-off levels (i.e. classic PKU) hematocrit and/or location of disk do not affect decision making. However, as an example, diagnosis of combined methylmalonic aciduria and homocystinuria (cblC defect) may be difficult by newborn screening as demonstrated by two recent cases in Austria [18]. In this circumstance metabolite concentrations (i.e. C3 and C3/C2) were only marginally above and below their corresponding cut-off levels. It is conceivable that in

atypical cases of such IEM variation of metabolite concentrations due to hematocrit and/or location of the disk may positively or negatively influence decision making and thus the diagnosis [3]. It is conceivable that the diagnosis of a variant IEM could be missed in a central disk of a dry blood spot at a low hematocrit, although this has not been formally tested in the present study.

In summary we found that most metabolites used for newborn screening depend on hematocrit and on position of the disk. The effects of hematocrit and position of the disk were sometimes additive and sometimes even synergistic.

## **References**

- [1] T.H. Zytovicz, E.F. Fitzgerald and D. Marsden *et al.*, Tandem mass spectrometric analysis of amino, organic, and fatty acid disorders in newborn dried blood spots: a two-year summary from the New England Newborn Screening Program, *Clin Chem* **47** (2001), pp. 1945–1955.
- [2] D.H. Chace, T.A. Kalas and E.W. Naylor, Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns, *Clin Chem* **49** (2003), pp. 1797–1817.
- [3] A. Schulze, M. Lindner, D. Kohlmüller, K. Olgemoeller, E. Mayatepek and G.F. Hoffmann, Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism by electrospray ionization-tandem mass spectrometry: results, outcome, and implications, *Pediatrics* **111** (2003), pp. 1399–1406.
- [4] B. Wilcken, V. Wiley, J. Hammond and K. Carpenter, Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry, *N Engl J Med* **348** (2003), pp. 2304–2312.

- [5] M.S. Rashed, Z. Rahbeeni and P.T. Ozand, Application of electrospray tandem mass spectrometry to neonatal screening, *Semin Perinatol* **23** (1999), pp. 183–193.
- [6] S.M. Kayiran, N. Ozbek, M. Turan and B. Gurakan, Significant differences between capillary and venous complete blood counts in the neonatal period, *Clin Lab Haematol* **25** (2003), pp. 9–16.
- [7] J.A. Leipala, M. Talme, J. Viitala, U. Turpeinen and V. Fellman, Blood volume assessment with hemoglobin subtype analysis in preterm infants, *Biol Neonate* **84** (2003), pp. 41–44.
- [8] M.J. Bizzarro, E. Colson and R.A. Ehrenkranz, Differential diagnosis and management of anemia in the newborn, *Pediatr Clin North Am* **51** (2004), pp. 1087–1107.
- [9] O.A. Bodamer and A. Muhl, Analysis of acylcarnitine ester for neonatal screening of inborn errors of metabolism using tandem mass-spectrometry, *Chem Mon* **136** (2005), pp. 1293–1297.
- [10] St. Holm, A simple sequentially rejective multiple test procedure, *Scand J Statist* **6** (1979), pp. 65–70.
- [11] R. Fingerhut, W. Röschinger and A.C. Muntau *et al.*, Hepatic carnitine palmitoyltransferase I deficiency: acylcarnitine profiles in blood spots are highly specific, *Clin Chem* **47** (2001), pp. 1763–1768.
- [12] N.K. Poplawski, E. Ranieri, J.R. Harrison and J.M. Fletcher, Multiple acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: diagnosis by acyl-carnitine analysis of a 12-year-old newborn screening card, *J Pediatr* **134** (1999), pp. 764–766.
- [13] D.H. Chace, J.C. DiPerna, B.L. Mitchell, B. Sgroi, L.F. Hofman and E.W. Naylor, Electrospray tandem mass spectrometry for acylcarnitines in dried postmortem blood specimens collected at autopsy from infants with unexplained cause of death, *Clin Chem* **47** (2001), pp. 1166–1182.

- [14] B.W. Adam, J.R. Alexander and S.J. Smith *et al.*, Recoveries of phenylalanine from two sets of dried-blood-spot reference materials: prediction from hematocrit, spot volume, and paper matrix, *Clin Chem* **46** (2000), pp. 126–128.
- [15] D.H. Chace, B.W. Adam, J.S. Smith, J.R. Alexander, S.L. Hillman and W.H. Hannon, Validation of accuracy-based amino acid reference materials in dried-blood spots by tandem mass spectrometry for newborn screening assays, *Clin Chem* **45** (1999), pp. 1269–1277.
- [16] A. Pappas and V. Delaney-Black, Differential diagnosis and management of polycythemia, *Pediatr Clin North Am* **51** (2004), pp. 1063–1086.
- [17] A.L. Alkalay, S. Galvis, D.A. Ferry, C.F. Simmons and R.C. Krueger, Hemodynamic changes in anemic premature infants: are we allowing the hematocrits to fall too low?, *Pediatrics* **112** (2003), pp. 838–845.
- [18] M. Huemer, B. Simma, B. Fowler, T. Suormala, O.A. Bodamer and J.O. Sass, Prenatal and postnatal treatment in cobalamin C defect, *J Pediatr* **147** (2005), pp. 469–472.

## **D. Retrospektivní diagnostika CAH a FAOD mezi náhle**

### **zemřelými kojenci**

Při stanovení retrospektivní diagnózy jsme brali v úvahu právě změny koncentrace metabolitů během dlouhodobého skladování. Vliv hematokritu a lokalizace v suché krevní kapce jsme pro naše účely považovali za zanedbatelný.

Do studie se kromě České Republiky zapojilo i Rakousko. V obou zemích jsme vyhledali novorozenecké screeningové kartičky dětí narozených v posledních 12 letech, které zemřely náhle a neočekávaně na neznámou příčinu do věku 1 roku, některé z nich splňovaly kritéria SIDS. Celkový počet nalezených vzorků byl 257. Rakouské kartičky však nebyly vhodné pro analýzu tandemovým hmotovým spektrometrem za účelem detekce FAOD, protože byly autoklávované.

V první části jsme se zaměřili na detekci CAH stanovením hladiny 17-hydroxyprogesteronu (17-OHP), diagnóza byla následně potvrzena genetickou analýzou. Zjistili jsme, že 3 z 242 dětí zemřelých na neznámou příčinu ve skutečnosti podlehl nepoznané CAH.

Druhým krokem byla retrospektivní diagnostika dědičných poruch metabolismu (především FAOD) pomocí tandemové hmotové spektrometrie. V celkovém počtu 179 analyzovatelných vzorků se nám podařilo objevit jedno dítě s nepoznaným deficitem long-chain hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenázy (LCHAD). Výsledky první části byly publikovány v následujícím článku.

## **6. Článek 3:**

Strnadová KA, Votava F, Lebl J, Mühl A, Item C, Bodamer OA, Torresani T, Bouška I, Waldhauser F, Sperl W. Prevalence of congenital adrenal hyperplasia among sudden infant death in the Czech Republic and Austria. Eur J Pediatr 2007; 166 (1): 1-4

### **Prevalence of congenital adrenal hyperplasia among sudden infant death in the Czech Republic and Austria**

**Kristina A. Strnadová<sup>1, 2</sup>, Felix Votava<sup>1</sup>, Jan Lebl<sup>1</sup>, Adolf Mühl<sup>2</sup>, Chike Item<sup>2</sup>, Olaf A. Bodamer<sup>2</sup>, Toni Torresani<sup>3</sup>, Ivan Bouška<sup>4</sup>, Franz Waldhauser<sup>2</sup>, Wolfgang Sperl<sup>5</sup>**

<sup>1</sup> Department of Pediatrics, 3<sup>rd</sup> Faculty of Medicine, Charles University, CZ-100 81 Prague, Czech Republic

<sup>2</sup> Division of Biochemical and Paediatric Genetics, Department of General Paediatrics, Medical University of Vienna, A-1090 Vienna, Austria

<sup>3</sup> Department of Endocrinology, University Children's Hospital, Zurich, Switzerland

<sup>4</sup> Department of Forensic Medicine, 2<sup>nd</sup> Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

<sup>5</sup> Department of General Pediatrics, Paracelsus Medical School, Landeskrankenhaus Salzburg, Austria

## **Abstract**

The study was aimed to estimate the number of infants who died of unrecognized congenital adrenal hyperplasia (CAH) in Austria and the Czech Republic within the past thirteen years, before the introduction of adequate neonatal screening. The study was based on retrospective analysis of neonatal screening cards of 242 infants who died suddenly between 7 days and 12 months of age and whose cause of death could not be identified. 17-hydroxyprogesterone (17-OHP) was measured by fluoroimmunoassay and positive samples were subsequently genotyped. Three infants out of 242 may have had unrecognized CAH due to *CYP21* (steroid 21-hydroxylase) gene defect. Their newborn 17-OHP levels and *CYP21* genotypes were 706 nmol/l and del/conv//del/conv, 53 nmol/l and I2//I2 and 811 nmol/l and I2//Gln318Stop, respectively. Conclusion: CAH due to *CYP21* defect can lead to sudden unexpected death without prior symptoms typical for the condition. Hence, newborn screening would have prevented these deaths had it been available. In addition, we have shown that I2 point mutation that is expected to lead to simple virilizing form may lead to fatal outcome.

**Keywords:** Sudden infant death syndrome, neonatal screening, congenital adrenal hyperplasia

## **Introduction**

Congenital adrenal hyperplasia (CAH) due to steroid 21-hydroxylase deficiency (P450C21) is an autosomal recessive disorder of adrenal steroidogenesis with an incidence ranging from 1:10,000 to 1:18,000 in Europe. The classical form is characterized by impaired cortisol synthesis and excess of androgens leading to prenatal virilization in females. About



three-quarters of affected infants suffer additionally from clinically significant aldosterone deficiency, predisposing to attacks of adrenal crisis with vomiting, lethargy, hyperkalemia, hypoglycemia, acidosis and hyponatremic dehydration [13].

If unrecognized and untreated, the adrenal crisis may be life-threatening due to hyperkalemia [28] or dehydration, which mostly occurs during the first weeks of life [4]. Female salt wasters are typically born with ambiguous genitalia (Prader III and higher, according to [11]) and are consequently more likely to be diagnosed prior to the onset of any adrenal crisis. In turn, affected males may remain unrecognized and are at risk of dying during the first salt-wasting crisis. To reduce CAH associated morbidity and mortality through early diagnosis and treatment, neonatal screening based on the detection of 17-hydroxyprogesterone (17-OHP) has been introduced in some countries [3].

However, so far there has been only indirect evidence or single case reports that some CAH patients might have died unrecognized and misdiagnosed as SIDS. One such case was identified retrospectively four years after the child's death [10]. The indirect evidence is based primarily on a higher incidence of CAH detected by newborn screening when compared to previous case surveys of clinically detected patients [8]. Secondly, females are overrepresented among clinically diagnosed children, and thirdly, a higher mortality in infancy was observed in previous siblings of patients with CAH when compared to infant mortality within the reference population [5].

This study aimed to establish the retrospective diagnosis of CAH from dried blood spots on newborn screening cards in a large cohort of infants from the Czech Republic and Austria who died suddenly and whose cause of death could not be identified.

## **Study cohort and methods**

### *Study cohort*

Infants who were born between 1989 and 2001 in the Czech Republic and Austria and who died between 7 days and 12 months of life without known cause were included in the study. The list of subjects was based on data provided by the Czech Institute of Health Care Information and Statistics (UZIS), by the Department of Forensic Medicine in Prague and by the Austrian „SIDS-Arbeitsgruppe“. The corresponding newborn screening cards (156 from the Czech Republic and 101 from Austria) with dried blood spots were retrieved from the neonatal screening archives in Prague and Vienna. The blood was typically collected by heel-prick between the fifth and the seventh day of life (observed range 2-11 days in individual subjects). The cards were subsequently stored at room temperature and standard humidity.

The individuals were divided into three categories according to the criteria approved at the SIDS International Meeting in San Diego in 2004 [6]. One hundred and sixty-five infants (84 from the Czech Republic and 81 from Austria) were assigned to the category IB that includes children with features of SIDS but incomplete documentation. Seventy-nine children (60 from the Czech Republic and 19 from Austria) were assigned to category II that includes children fulfilling the SIDS criteria except for the age limit. Growth abnormalities and/or marked inflammatory changes (bronchitis, otitis etc.) and/or other abnormalities not sufficient to explain death were acceptable within this group. Thirteen children (12 from the Czech Republic and one from Austria) could not be classified as SIDS.

### *Detection of congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency*

All 156 samples from the Czech Republic and 86 samples from Austria (the remainder of the infants was born following the introduction of neonatal screening for CAH) were

analyzed by a solid phase fluoroimmunoassay (DELFLIA Neonatal 17-OHP kit, Wallac, Turku, Finland) to determine the concentration of 17-OHP.

All samples were analyzed twice, and arithmetic means were calculated. Samples exceeding the cut-off value of 30 nmol/l were regarded as positive. Positive samples of premature babies were re-evaluated with birthweight and age adjusted cut-off levels [7]. In order to eliminate the effect of autoclaving which decreases the measurable amount of 17-OHP by approximately 32%, values from autoclaved cards were recalculated using the formula:  $x = (y + 1.177) : 0.68$  [12]. Similarly, to eliminate the effect of storage time, the results from older native samples were corrected by the formula:  $y = e \exp - 62.6 + 0.032x$  [12].

All positive samples were subsequently analyzed for detection of the nine most prevalent CAH-causing mutations of the *CYP21* gene at the Children's Hospital, Zürich, Switzerland. Gene-specific PCR and ligase-mediated mutation detection was used as described previously [1].

## **Ethics**

The study was approved by the Ethical Committee of the 3<sup>rd</sup> Faculty of Medicine, Charles University, Prague.

## **Results**

### *Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency*

In five out of 242 samples, concentrations of 17-OHP following correction for autoclaving and storage time exceeded the cut-off levels adjusted for birth weight and age. In three cases, diagnosis of CAH due to steroid 21-hydroxylase deficiency was confirmed by *CYP21* genotyping. In two additional samples none of the nine most common *CYP21*

mutations was identified, rarer mutations were not totally excluded as there was not enough material available, but the presence of a rare mutation in both alleles would be extremely unlikely. Although not proven we assume that the increased 17-OHP levels might have been caused by contamination, e.g. addition of EDTA into the blood samples. The results and the data on children with elevated 17-OHP levels are summarized in Table 1.

Table 1. Data on five deceased children with 17-OHP levels over the cut-off limit and the corresponding *CYP21* genotypes.

Case	Category of SIDS	Sex	Birthweight (g)	Age at death	17-OHP (nmol/l)	<i>CYP21</i> genotype
1	unclassified	M	4150	14 days	706	del/conv// del/conv
2	II	M	NA	6 months	53	I2//I2
3	II	F	NA	3 months	811	I2//Q318X
4	IB	M	4050	3 months	37	gene defects not detected
5	IB	F	3000	2 months	80	gene defects not detected

F - female; M - male; NA - not available; 17-OHP - 17-hydroxyprogesterone. Category of SIDS corresponds to the criteria approved at International SIDS Meeting in San Diego [6]. Concentrations of 17-OHP are given following correction for storage time [12]. *CYP21* was genotyped to detect nine most prevalent disease causing gene defects. *CYP21* gene defects: del/conv – *chimericCYP21P/CYP21*; I2 - 656 A/C>G); Q318X - Gln318stop.

Case 1: The boy had asymptomatic hypoglycaemia during the first day of life and failed to thrive, none of which evoked any suspicion of CAH. Autopsy revealed bilateral adrenal enlargement.

Case 2: The male infant died suddenly and was classified as SIDS. Adrenal enlargement was not documented at autopsy.

Case 3: The girl acquired rhinitis shortly before death. The autopsy revealed interstitial pneumonitis, alveolar edema and vacuolized hepatocytes. No signs of virilization were noticed clinically or at autopsy. Adrenal glands were found to be normal at autopsy.

## **Discussion**

Three out of 242 children in our study population probably died of unrecognized CAH. To our knowledge, this is the first direct evidence confirming the link between SIDS and CAH due to steroid 21-hydroxylase deficiency.

Our data suggest that the real incidence of SIDS due to CAH may differ from previous indirect estimates. During the 13-year period covered by our study, over 2 million children were born in the Czech Republic and Austria. Hence, the number of deceased children is lower in comparison to the mortality rate assessed by the MEWPE study group predicting about 2-3 missed CAH cases per 400,000 live births [5].

However, three detected cases with confirmed *CYP21* gene defect may extend substantially the clinical understanding of risks associated with unrecognized CAH. Whereas the first case was very typical, including sudden death at 2 weeks of age, adrenal enlargement at autopsy, very high neonatal 17-OHP levels and the most severe *CYP21* genotype, the two additional cases require additional consideration.

The second male infant died at 6 months of age. No adrenal enlargement was revealed at autopsy and the moderately elevated neonatal levels of 17-OHP were not typical for severe form of CAH. His genotype was I2/I2. The I2 mutation leads to an aberrant mRNA splicing usually causing the more severe salt wasting form of CAH. Sometimes there is some residual

normally spliced mRNA leading to the simple virilizing form [4]. This may explain the only moderately increased neonatal 17-OHP, longer survival and normal autopsy findings. Prolonged fasting and/or intercurrent illness might have led to the sudden death.

The third case was a female who died at 3 months of age. Her genotype was I2/Q318X and neonatal 17-OHP was markedly elevated (811 nmol/l). As the phenotype is determined by the less severe mutation (I2), clinical symptoms may have ranged from most severe to milder forms of CAH. However, the 17-OHP level would support a severe clinical form. The lack of clinically ascertained virilization may only be explained by inaccurate subjective assessment. One case of salt-wasting form of CAH in a girl with low-grade virilization (Prader 2) missed on clinical examination has been reported previously [2]. Thus, also female infants may be at risk of sudden death if not recognized and treated early.

To conclude, out of 257 children who died suddenly and unexpectedly in infancy three out of 242 probably died due to unrecognized and untreated steroid 21-hydroxylase deficiency and would have benefited from the neonatal screening programme to detect CAH. Our findings underline the importance of early diagnosis and therapy of CAH, which is an essential prerequisite for the introduction of neonatal screening.

## **References**

[1] Fitness J, Dixit N, Webster D, Torresani T, Pergolizzi R, Speiser PW, Day DJ (1999) Genotyping of CYP21, linked chromosome 6p markers, and a sex-specific gene in neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 960-966.

[2] Gruneiro-Papendieck L, Prieto L, Chiesa A, Bengolea S, Bossi G, Bergadá C (2001) Neonatal screening program for congenital adrenal hyperplasia: adjustments to the recall protocol. *Horm Res* 55: 271-277.

- [3] Honour JW, Torresani T (2001) Evaluation of neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *Horm Res* 55: 206-211.
- [4] Hughes I (2002) Congenital adrenal hyperplasia: phenotype and genotype. *J Pediatr Endocrinol Metab* 15: 1329-1340.
- [5] Kovács J, Votava F, Heinze G, Sólyom J, Lebl J, Pribilincová Z, Frisch H, Battelino T, Waldhauser F (2001) Lessons from 30 years of clinical diagnosis and treatment of congenital adrenal hyperplasia in five middle european countries. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 2958-2964.
- [6] Krous HF, Beckwith JB, Byard RW, Rognum TO, Bajanowski T, Corey T, Cutz E, Hanlick R, Keens TG, Mitchell EA (2004) Sudden infant death syndrome and unclassified sudden infant deaths: a definitional and diagnostic approach. *Pediatrics* 114: 234-238.
- [7] Olgemöller B, Roscher AA, Liebl B, Fingerhut R (2003) Screening for congenital adrenal hyperplasia: adjustment of 17-hydroxyprogesterone cut-off values to both age and birth weight markedly improves the predictive value. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 5790-5794.
- [8] Pang S, Wallace MA, Hofman L, Thuline HC, Dorche C, Lyon ICT, Dobbins RH, Kling S, Fujieda K, Suwa S (1988) Worldwide Experience in Newborn Screening for Classical Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-Hydroxylase Deficiency. *Pediatrics* 81: 866-874.
- [9] Ruppen W, Hagenbuch N, Jöhr M, Christen P (2003) Cardiac arrest in an infant with congenital adrenal hyperplasia. *Acta Anaesthesiol Scand* 47: 104-105.
- [10] Therrell BL, Berenbaum SA, Manter-Kapanke V, Simmank J, Korman K, Prentice L, Gonzalez J, Gunn S (1998) Results of screening 1.9 million Texas newborns for 21-hydroxylase deficient congenital adrenal hyperplasia. *Pediatrics* 101: 583-590.
- [11] Torres N, Mello MP, Germano CMR, Elias LLK, Moreira AC, Castro M (2003) Phenotype and genotype correlation of the microconversion from the CYP21A1P to the CYP21A2 gene in congenital adrenal hyperplasia. *Braz J Med Biol Res* 36: 1311-1318.

[12] Török D, Mühl A, Votava F, Heinze G, Sólyom J, Crone J, Stöckler-Ipsiroglu S, Waldhauser F (2002) Stability of 17-hydroxyprogesterone in dried blood spots after autoclaving and prolonged storage. *Clin Chem* 48: 370-372.

[13] White PC, Speiser PW (2000) Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocrine Reviews* 21: 245-291.



## **7. Prevalence of fatty acid oxidation disorders among sudden infant deaths in the Czech Republic and Austria**

### **Introduction**

Inborn errors of metabolism have long been associated with SIDS. In 1966, Porter hypothesised that some cases of SIDS may result from a combination of subclinical aminoacidopathy, immature neonatal liver function and protein overloading. (Porter et al.) Since then, such an association has been supported by numerous case reports (Harpey et al. 1987, Nuoffer et al. 2000, Ronald et al., Thanka et al. 2005), subsequent diagnosis in siblings (Poplawski et al. 1999), necropsy findings and recently also by retrospective analyses of larger cohorts of suddenly deceased infants (Boles et al. 1998, Chace et al. 2001, Wilcox et al. 2002, Lundemose et al. 1997). The deaths of these children might have resulted from acute metabolic decompensation precipitated by fasting or infection (Vockley et al. 2002) or by acute arrhythmia due to accumulation of toxic acylcarnitines, which interact with cardiac ion channels (Bonnet et al.). Suspicious autoptic findings such as liver steatosis and/or cardiomyopathy may be absent in these cases. The correct diagnosis may be established only by specific tests, e.g. acylcarnitine profiling by MS/MS, which was added to the protocol of post-mortem examination of sudden death cases only in 2003 (Rognum et al. 2003). Until then, some cases of IEM might have been misdiagnosed as SIDS.

### **Method**

#### *Detection by tandem mass spectrometry*

All 156 Czech samples and only 23 Austrian samples could be analyzed by MS/MS as described previously (Carpenter et al. 2002). The remaining Austrian newborn screening

cards had been autoclaved and therefore rendered unsuitable for analysis. 3-mm discs (containing 3,2 µl of blood) were punched (DBS Puncher, Wallac, Turku, Finland) into a 96-well microtiter plate (Greiner, Frickenhausen, Germany), derivatized and analyzed as previously described (Schulze et al. 2003a).

The diagnosis of LCHAD/TFP in one sample was subsequently confirmed by mutation analysis performed in Vienna as follows.

*PCR.* DNA was extracted from dry blood spot filter paper samples using a QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Valencia CA, USA) as described by the manufacturers.

The first round of PCR (primer pair 5'cctatatcacagccacctttcttagtg3'/5'áataccaccgtccatcctggagacaacca3') was carried out as previously described [12], in a total reaction volume of 50µl (PCR product 401bp). In a second, nested PCR reaction (primer pair 5'cctagcagagaaggaatgctctcaggtcc3'/5'ágtcttattagaactttcaaaaactctgc3'), thermal cycling was carried out for 35 cycles as above with 0.5 µl of PCR product from the first round of amplification 400 nM of each nested primer at an annealing temperature of 60°C (PCR product 274bp).

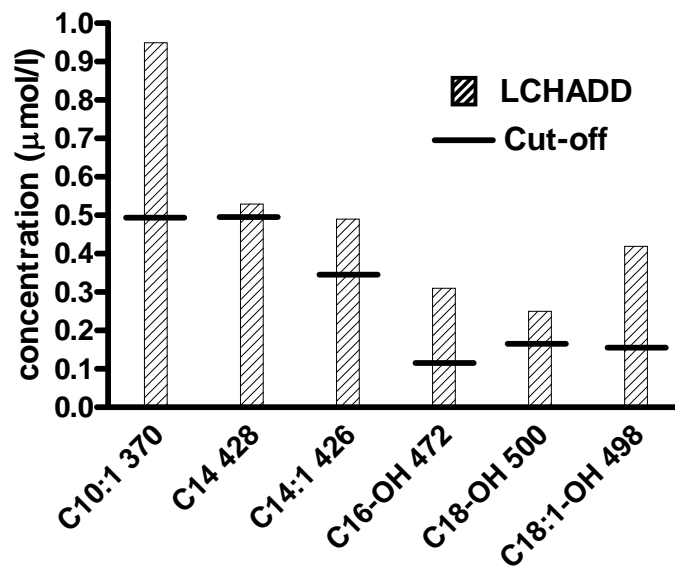
#### *Restriction Enzyme Analysis*

An overnight incubation at 37°C was carried out in a 20µl reaction tube consisting of 10µl PCR product, 7 µl distilled water, 2µl 10xPstI reaction buffer, and 1µl PstI enzyme(10U). The restriction product was separated and visualised on a 1.5% agarose.

The undigested PCR product had a specific band size of 274 bp. The digested product from the normal healthy control and homozygous patient were identified according to the appropriate PCR band sizes: 274bp and 127bp (wild type); 117, 127, 157 bp (homozygote).

## Results

Out of 179 samples analyzed, 28 were flagged as positive for IEM and re-analyzed by an experienced investigator, who interpreted 27 of these as false positive due to a change of concentration during prolonged storage. The acylcarnitine profile of one sample was regarded as diagnostic for LCHAD/TFP deficiency. (Graph 1).



Graph 1: Concentrations of long-chain acylcarnitines and long-chain hydroxy-acylcarnitines in one of our samples indicating LCHAD/TFP deficiency compared to cut-off values.

The diagnosis was subsequently confirmed by mutation screening. The male child was homozygous for the G1528C mutation in the *HADHA* gene.

The boy died suddenly at the age of four months. Autopsy revealed organ steatosis, cardiomyopathy, brain edema and minor gastrointestinal inflammation. However, the cause of death remained undetermined until the present retrospective study.

## Discussion

Studies investigating the prevalence of FAOD among cohorts of SIDS children are numerous. The first ones might have overestimated the link between FAOD and SIDS as they relied on non-specific methods or findings like liver steatosis. In 1976, gross fatty infiltration of liver suggesting an acute metabolic failure was described in 5-7% of children who had died unexpectedly.

Later studies based on urinalysis by gaschromatography-mass spectrometry (GC-MS) provided a lower estimate of about 3% . Similar results were obtained in another report based on fibroblast studies followed by molecular analysis that identified 3 cases of FAOD among 79 SIDS children (Lundemose et al. 1997).

The introduction of MS/MS has enabled a more specific detection of IEM in post-mortem samples of SIDS and has led to lower estimates of FAOD among sudden infant deaths. Using MS/MS the estimated prevalence of FAOD among SIDS has been found to be about 1% (Wilcox et al. 2002). The largest study published so far included more than 7000 post-mortem samples, from which 66 (less than 1%) suggested an IEM as cause of death (Chace et al. 2001). Studies that use genetic analysis for detection of FAOD among SIDS can focus only on a limited number of disorders and hence give even lower estimates. The most common mutation A985G occurring in more than 88% of MCAD was found only in a heterozygous state in three out of 1224 SIDS cases (Arens et al. 1993). On the other hand, another post-mortem genetic study identified two out of 16 SIDS victims with fatty liver to possess mutations causing FAOD, one was a homozygote for A985G mutation causing MCAD, the second one was a compound heterozygote for G1528C mutation causing LCHAD (Zi Yang et al. 2007).

Hence, the finding of only one case of FAOD out of 179 sudden unexpected deaths in our study is consistent with the most recent studies. However, the small sample size does not allow for any conclusion as to the prevalence of different FAOD among SIDS victims.

## **E. Význam studie pro rozšíření novorozeneckého screeningu**

### **8. Základní principy novorozeneckého screeningu**

Novorozeneckým screeninem rozumíme celoplošný časný záchyt nemoci za účelem snížení její morbidity a mortality. Původní kritéria pro zařazení do novorozeneckého screeningu uvedli v roce 1968 Wilson a Jungner. (Wilson et al.1968)

1. Detekovaná nemoc by měla být závažným zdravotním problémem a časný záchyt by měl snížit morbiditu a mortalitu.
2. Nemoc by měla být relativně častá (prevalence > 1:15 000).
3. Musí existovat test, který jasně rozliší zdravé a nemocné jedince.
4. Pacienti musí být identifikováni před vznikem klinického podezření.
5. Musí být dostupná diagnostika a léčba.
6. Cena záchytu musí být ekonomicky vyvážena s prospěchem.

Jako první byl úspěšně zaveden screening fenylketonurie v letech 1962-1963, který byl později rozšířen i na screening kongenitální hypotyreózy. V posledních letech se objevují nové technologie umožňující detekci několika onemocnění při jedné analýze a vybízejí tak k významnému rozšíření novorozeneckého screeningu. Jde především o tandemovou hmotnostní spektrometrii a DNA chipy. Použití těchto nových technologií vede k rozšiřování novorozeneckého screeningu o choroby, které již nesplňují původní kritéria nebo je nelze v kontextu těchto kritérií hodnotit. Tato skutečnost se odráží v rozdílných přístupech v různých zemích. V České republice je prováděn screening fenylketonurie od roku 1970, kongenitální hypotyreózy od roku 1985 a od roku 2006 kongenitální adrenální hyperplázie. V jiných evropských zemích probíhá již rozšířený novorozenecký screening pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie, který zahrnuje především poruchy beta oxidace mastných kyselin,

organoacidopatie a další metabolické poruchy. Ještě v jiných regionech je zvažován screening cystické fibrózy, Gaucherovy lysosomální stádatavé choroby, hereditární hemochromatózy, syndromu fragilního X chromozomu nebo dokonce diabetu mellitu I.typu. (Dondt et al.2007) Rozšířený screening pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie je zaveden kromě několika evropských center ve většině států USA, v Kanadě, v Austrálii a v Kataru (O.A.Bodamer et al. 2007)

Přehled novorozeneckého screeningu prováděného v současné době v Evropě je uveden v následující tabulce.

Tabulka 1: Přehled pravidelně prováděných novorozeneckých screeningů v Evropě (celkem 43 států včetně Turecka; Skotsko a Wales počítány samostatně). Dle Votava et al. 2008)

Choroba	Prevalence	PES	Metody	Smysl screeningu, poznámky
PKU	1:8 000	41	MS/MS, I, BI, C	Dieta zabrání nevratnému poškození CNS. Neprovádí Finsko a Malta z důvodu nízké prevalence.
CH	1:2 700	42	I	Substituce zabrání nevratnému poškození CNS. Neprovádí Moldavsko z ekonomických důvodů.
CAH	1:10 000	13	I	Substituce zabrání život ohrožující solné krizi a u lehčích forem zabrání předčasné pubertě se ztrátou dospělé výšky. Provádí Rakousko, Belgie, Francie, Německo, Itálie, Lucembursko, Holandsko, zčásti Rusko, Slovensko, Španělsko, Švédsko, Švýcarsko a ČR.
CF	1:4 000	8	I+MG	Komplexní léčba zahájena do 2 měsíců věku zlepšuje průběh a prognózu. Provádí Rakousko, Belgie, Francie, Itálie, Skotsko, Španělsko, Wales, Anglie
GAL	1:40 000	8	BI, I	Včasná dieta zabrání metabolické krizi se selháním jater, poškození CNS a oslepnutí, zlepšuje dlouhodobý neurologický stav. Provádí Rakousko, Belgie, Německo, Irsko, Itálie, Švédsko, Švýcarsko a Španělsko
MCADD	1:10 000	8	MS/MS	Dieta a substituce zabrání život ohrožujícímu selhání energetického metabolismu. Provádí Rakousko, Holandsko, Belgie, Německo, Itálie, Španělsko, Anglie, Švýcarsko
BD	1:80 000	6	I	Substituce sníží riziko metabolické krize a poškození CNS. Provádí Rakousko, Belgie, Německo, Itálie, Švédsko, Švýcarsko
G6PDD	až 1:25	1	I	Vyloučení zevních faktorů, které vyvolávají hemolytickou krizi. Provádí Řecko. Uvedená prevalence platí pro endemické oblasti.
Rozšířený (kromě PKU a MCADD) novoroz. screening dědičných metabolických poruch - „rakouské spektrum“:		5	MS/MS	Provádí: Rakousko (18 metabol.chorob), Belgie (14 chorob), Holandsko (10 chorob), Německo (7 chorob), Portugalsko (8 chorob)
MSUD	1:200 000			Dieta sníží riziko život ohrožujícího metabolického rozvratu a poškození CNS.
Tyr I	1:100 000			Léčba zabrání časnému selhání jater
Cit	1:70 000			Komplexní léčba sníží riziko metabolického rozvratu s hyperamonemií – „Rey like“ syndromu..
ASLD	1:70 000			Léčba je prevencí poškození CNS.
Hom	1:200 000			Léčba je prevencí poškození CNS.
CPTD I, II, CTD, KTD, CACTD	1:100 000			Dieta a substituce sníží riziko život ohrožujícího metabolického rozvratu a poškození CNS.
GA I	1:80 000			
IVA	1:50 000			
LCHADD, VLCADD, HMG-CoA LD, 3-MCCD	1:80 000			Dieta a substituce zabrání život ohrožujícímu selhání energetického metabolismu
MMA	1:50 000			
PA	1:100 000			Komplexní léčba sníží riziko život ohrožujícího metabolického rozvratu.



Vysvětlivky: PES = počet evropských států provádějících daný screening; PKU = fenyktonurie; CH = kongenitální hypotyreóza; CAH = kongenitální adrenální hyperplázie; CF = cystická fibróza; GAL = galaktosémie; MCADD = deficit dehydrogenázy „medium-chain acyl-CoA“; BD = deficit biotinidázy; G6PDD = deficit glukozo-6-fosfát dehydrogenázy; MSUD = nemoc javorového sirupu; Tyr I = tyrozinémie I typu; Cit = citrulinémie; ASLD = deficit lyázy argininsukcinátu; Hom = homocystinurie; CPTD I,II = deficit karnitin palmitoyltransferázy I,II; CTD = deficit transportéru karnitinu; KTD = deficit ketothiolázy; CACTD = deficit karnitin-acylkarnitintranslokázy; GA I = glutarová acidurie I typu; IVA = izovalerová acidurie; LCHADD = deficit dehydrogenázy „long-chain acylCoA“; VLCADD = deficit dehydrogenázy „very long-chain acylCoA“; HMG-CoA LD = deficit lyázy „3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA“; 3-MCCD = deficit karboxylázy „3-methylcrotonyl-CoA“; MMA = metylmalonová acidurie; PA = propionová acidurie; MS/MS = tandemová hmotnostní spektrometrie; I = imunoesej (fluoro-, enzymo- či radio-); BI = inhibice růstu bakterií; C = chromatografie; MG = molekulárně genetické vyšetření

Obtížná interpretace původních principů screeningu, zavedení nových technologií, neznámý přirozený průběh nově detekovaných poruch (některé mutace v genu pro MCAD nemusí způsobit klinicky závažnou poruchu) a ekonomická situace v jednotlivých regionech zřejmě vedou k velkým rozdílům ve screeningu mezi jednotlivými zeměmi. (R. J. Pollitt 2006) Je třeba přehodnotit kritéria pro zařazení určitých chorob do screeningu, např. ve Spojeném Království se otázkou novorozeneckého screeningu zabývá UK National Screening Committee (UK NSC), který vyvinul 19 kritérií pro zahrnutí do novorozeneckého screeningu.

Naše retrospektivní studie zaměřená na detekci nepoznaných fatálních případů kongenitální adrenální hyperplázie proběhla právě v rámci zvažování zavedení novorozeneckého screeningu pro CAH.

## **9. Novorozenecký screening kongenitální adrenální hyperplázie**

Novorozenecký screening CAH je zaměřen na deficit 21-hydroxylázy, který je zodpovědný za více než 90% všech případů CAH. Screening je založen na měření koncentrace 17-hydroxyprogesteronu v suché krevní kapce. Incidence v Evropě se pohybuje kolem 1: 15 000. Smyslem novorozeneckého screeningu CAH je časnou diagnostikou a substitucí hormonů nadledvin

1) předejít život ohrožující adrenální krizi, šoku a úmrtí,

- 2) zamezit přidělení chybného pohlaví virilizovaným dívkám a
- 3) omezit vliv nadbytku androgenů, které vedou k malému vzrůstu a psychosexuálním poruchám. (Kaye C. I. et al.2006)

Právě významná mortalita nediagnostikovaných dětí může být jedním z argumentů pro zavedení screeningu pro CAH. Ohroženi jsou především chlapci s těžkou formou CAH se solnou poruchou, kteří se manifestují až první život ohrožující adrenální krizí. Údaje o mortalitě v souvislosti s CAH se liší podle různých zdrojů. Jedna skupina expertů odhadla dokonce 20-40 % úmrtnost na klasickou CAH bez screeningu (Pang S. Y. et al. 1988). Ostatní odhady byly nižší, Americká Pediatriká Akademie uvedla 9 % mortalitu (American Academy of Pediatrics 1996). Nepřímým důkazem, který svědčí pro nepoznanou mortalitu u chlapců je skutečnost, že je diagnostikováno více dívek než chlapců (Pang S. et al. 1977, Kovacs et al. 2001), nicméně nediagnostikovaní chlapci nemusí být ve skupině náhle zemřelých, ale ve skupině chlapců s lehkým fenotypem (Perry R. et al. 2005). Zdaleka ne všechny nemocnice uvádějí větší počet diagnostikovaných dívek než chlapců, stejný počet chlapců i dívek byl zaznamenán např. v Birminghamské dětské nemocnici (Viridi N. K. et al. 1986), v Královské dětské nemocnici ve Viktorii (Lim Y. J. et al. 1995), v nemocnici Sainte-Justine v Montrealu (Perry R. et al 2005) a ve Finsku (Jaaskelainen J. et al. 1997).

Mortalita u diagnostikovaných pacientů s CAH se solnou poruchou se pohybuje mezi 0-4 % v rozvinutých zemích (Grosse et al. 2007) a se zvyšujícím se povědomím a zlepšující se lékařskou kontrolou logicky klesá. Ve Švédsku zaznamenali dvě úmrtí z 93 dětí s CAH se solnou poruchou narozených v letech 1969-1986, čili 2,2 % mortalitu, po zavedení screeningu od roku 1989-1994 nedošlo k žádnému úmrtí (Thilen A. et al. 1990). V Birminghamu došlo ke dvěma úmrtím v letech 1958-1985 (Viridi N. K. et al. 1986). Ve Viktorii v Kanadě zaznamenali 2 úmrtí u 89 dětí s CAH (Lim Y. J. et al. 1995) a v Montrealu jedno z 54, které bylo odhaleno až při pitvě (Van Vliet G. et al. 2004). V USA ve státech se screeningem i bez

screeningu byla zjištěna přibližně stejná prevalence CAH se solnou poruchou a žádné úmrtí (Brosnan P. G. et al. 1999). V Nizozemí byla obdobně identická prevalence v provinciích se screeningem i bez screeningu a k žádnému úmrtí ani v jedné populaci nedošlo (Van der Kamp H. J. et al. 2001). Naopak ve Finsku zemřely v letech 1980-1995 na CAH se solnou poruchou čtyři děti, u jednoho z nich šlo o diagnózu post mortem (Jaaskelainen J. et al. 1997).

Při vyhodnocení uvedených studií vychází průměrná mortalita 1,5 %. Zatím nejsou dostatečně dlouhodobé studie, které by hodnotily účinnost screeningu na snížení mortality spojené s CAH. Ve dvou studiích ve Švédsku (Thilen A. et al. 1990) a v Nizozemí (Van der Kamp H. J. et al. 2001) nedošlo k žádnému úmrtí po zavedení screeningu, v Texasu k jednomu (Therrell B. L. et al. 1998), což v souhrnu odpovídá 0,7 % mortalitě. Mortalita 1,5 % před zavedením screeningu však může být podhodnocena vzhledem k nezapočteným nepoznaným úmrtím.

**Naše práce měla odhalit právě počet nepoznaných dětí s CAH, které zemřely náhle pod chybnou diagnózou SIDS a tím případně podpořit myšlenku rozšíření novorozeneckého screeningu. Podařilo se nám retrospektivně diagnostikovat CAH u 4 z 242 náhle zemřelých dětí bez zjevné příčiny. Tím jsme potvrdili, že novorozenecký screening CAH mohl těmto úmrtím předejít.**

**V testovaném období se v ČR a v Rakousku narodily asi dva miliony dětí. Při prevalenci CAH 1: 15 000 to znamená 133 dětí narozených s CAH, z nichž tedy 4 zemřely pravděpodobně v důsledku adrenální krize, čili nepoznaná mortalita činila asi 5,3 %. Když zanedbáme mortalitu diagnostikovaných a léčených případů CAH, můžeme 5,3 % považovat za celkovou mortalitu na CAH v našem regionu. Novorozenecký screening CAH byl v České republice celoplošně zaveden od let 2006 (Čechy) a 2007 (Morava), nicméně jeho zavedení je stále předmětem diskuzí. Náklady**

screeningu na zachycení jednoho pacienta v České republice činily 1 388 000 Kč, ale vždy je těžké vyčíslit hodnotu jednoho lidského života.

V USA předpokládali 4 % mortalitu a dostali náklady ve výši 100 000 USD na rok zachráněného života (Yoo B. K. et al. 2005). Ale je třeba další odborná debata, která určí, zda převažuje užitek nad náklady.

Co se týká druhé části studie - detekce poruch beta oxidace mastných kyselin mezi náhle zemřelými kojenci, považujeme záchyt u jednoho dítěte za nepřiliš významný. Rozšířený novorozenecký screening zaměřený na velkou skupinu vzácných metabolických poruch v České republice dosud zaveden nebyl.

## Literatura

- Ackerman MJ, Siu BL, Sturner WQ, Tester DJ, Valdivia CR, Makielski JC, Towbin JA. Postmortem molecular analysis of SCN5A defects in sudden infant death syndrome. *JAMA* 2001; 18: 2264-2269.
- Adam BW, Alexander JR, Smith SJ et al. Recoveries of phenylalanine from two sets of dried-blood-spot reference materials: prediction from hematocrit, spot volume, and paper matrix. *Clin Chem* 2000, 46: 126–128.
- Alkalay AL, Galvis S, Ferry DA, Simmons DF, Krueger RC. Hemodynamic changes in anemic premature infants: are we allowing the hematocrits to fall too low? *Pediatrics* 2003; 112: 838–845.
- American Academy of Pediatrics, Committee on Genetics. Newborn screening fact sheets. *Pediatrics* 1996; 98: 473-501.
- Arens R, Gozal D, Jain K, Muscati S, Heuser ET, Williams JC, Keens TG, Ward SL. Prevalence of medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency in the sudden infant death syndrome. *J Pediatr* 1993; 122 (5 Pt 1): 715-718.
- Arnestad M, Andersen M, Vege A, Rognum TO. Changes in the epidemiological pattern of sudden infant death syndrome in southeast Norway, 1984-1998: Implications for future prevention and research. *Arch Dis Child* 2001; 85: 108-115.
- Arnestad M, Opdal SH, Musse MA, Vege A, Rognum TO. Are substitutions in the first hypervariable region of the mitochondrial DNA displacement-loop in sudden infant death syndrome due to maternal inheritance? *Acta Paediatr* 2002; 91: 1060-1064.

- Bajanowski T, Rossi L, Biondo B, Ortmann C, Haverkamp W, Wedekind H, Jorch G, Brinkmann B. Prolonged QT interval and sudden infant death - report of two cases. *For Sci Int* 2001; 115: 147-153.
- Bizzarro MJ, Colson E, Ehrenkranz RA. Differential diagnosis and management of anemia in the newborn. *Pediatr Clin North Am* 2004; 51: 1087–1107.
- Bodamer OA, Muhl A. Analysis of acylcarnitine ester for neonatal screening of inborn errors of metabolism using tandem mass-spectrometry. *Chem Mon* 2005, 136: 1293–1297.
- Bodamer OA, Mitterer G, Maurer W, Pollak A, Mueller MW, Schmidt WM. Evidence for an association between mannose-binding lectin 2 (*MBL2*) gene polymorphisms and pre-term birth. *Genet Med* 2006; 8: 518-524.
- Bodamer OA, Hoffmann GF, Lindner M. Expanded newborn screening in Europe 2007. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30: 439-444.
- Boles RG, Buck EA, Blitzer MG, Platt MS, Cowan TM, Martin SK. Retrospective Biochemical Screening of Fatty Acid Oxidation Disorders in Postmortem Livers of 418 cases of Sudden Death in the First Year of Life. *J Pediatr* 1998; 132: 924-933.
- Brosnan PG, Brosnan CA, Kemp SF, Domek DB, Jelley DH, Blackett PR, Riley WJ. Effect of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1999; 153: 1272-1278.
- Carpenter KH, Wiley V. Application of tandem mass spectrometry to biochemical genetics and newborn screening. *Clin Chim Acta* 2002; 322: 1-10.
- Cavedon CT, Bordoux P, Mertens K, Van Thi HV, Herremans N, de Laet C, et al. Age-related variations in acylcarnitine and free carnitine concentrations measured by tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2005; 51: 745-752.

- Chace DH, Hillman SL, Millington DS, Kahler SG, Roe CR, Naylor EW. Rapid Diagnosis of Maple Syrup Urine Disease in Blood Spots from Newborns by Tandem Mass Spectrometry. *Clin Chem* 1995; 41: 62-68.
- Chace DH, Hillman SL, Van Hove JLK, Naylor EW. Rapid diagnosis of MCAD deficiency: quantitative analysis of octanoylcarnitine and other acylcarnitines in newborn blood spots by tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 1997; 43: 2106-2113.
- Chace DH, Adam BW, Smith SJ, Alexander JR, Hillman SL, Hannon WH. Validation of Accuracy-based Amino Acid Reference Materials in Dried- Blood Spots by Tandem Mass Spectrometry for Newborn Screening Assays. *Clin Chem* 1999; 45: 1269-1277.
- Chace DH, DiPerna J, Mitchell B, Sgroi B, Hofman L, Naylor E. Electrospray tandem mass spectrometry for analysis of acylcarnitines in dried postmortem blood specimens collected at autopsy from infants with unexplained cause of death. *Clin Chem* 2001; 7: 1166-1182.
- Chace DH, Kalas TA, Naylor EW. Use of Tandem Mass Spectrometry for Multianalyte Screening of Dried Blood Specimens from Newborns. *Clin Chem* 2003a; 49: 1797-1817.
- Chace DH, Pons R, Chiriboga CA, McMahon DJ, Tein I, Naylor EW, et al. Neonatal Blood Carnitine Concentrations: Normative Data by Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Pediatr Res* 2003b; 53: 823-829.
- Chaisomchit S, Wichajarn R, Janejai N, Chareonsiriwatana W. Stability of genomic DNA in dried blood spots stored on filter paper. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2005; 36: 270-273.
- Côté A, Russo P, Michaud J. Sudden unexpected death in infancy: What are the causes?. *J Pediatr* 1999; 135:437-443.

- Crawley BA, Morris JA, Drucker DB, Barson AJ, Morris J, Knox WF, Oppenheim BA. Endotoxin in blood and tissue in the sudden infant death syndrome. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999; 25: 131-135.
- Dhondt JL. Neonatal screening: from the „Guthrie age“ to the „genetic age“. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30: 418-422.
- Fingerhut R, Röschinger W, Muntau AC et al. Hepatic carnitine palmitoyltransferase I deficiency: acylcarnitine profiles in blood spots are highly specific. *Clin Chem* 2001; 47: 1763–1768.
- Fitness J, Dixit N, Webster D, Torresani T, Pergolizzi R, Speiser PW, Day DJ. Genotyping of CYP21, linked chromosome 6p markers, and a sex-specific gene in neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 960-966.
- Gronli JO, Santucci BA, Leurgans SE, Berry-Kravis EM, Weese-Mayer DE. Congenital Central Hypoventilation Syndrome: *PHOX2B* Genotype Determines Risk for Sudden Death. *Pediatr Pulmonol* 2008; 43: 77-86.
- Grosse SD, Van Vliet G. How Many Deaths Can Be Prevented by Newborn Screening for Congenital Adrenal Hyperplasia? *Horm Res* 2007; 67: 284-291.
- Gruneiro-Papendieck L, Prieto L, Chiesa A, Bengolea S, Bossi G, Bergadá C. Neonatal screening program for congenital adrenal hyperplasia: adjustments to the recall protocol. *Horm Res* 2001; 55: 271-277.
- Harpey JP, Charpentier C, Coudé M, Divry P, Paturneau-Jouas M. Sudden Infant Death Syndrome and Multiple Acyl-coenzyme A Dehydrogenase Deficiency, Ethylmalonic-adipic Aciduria, or Systemic Carnitine Deficiency. *J Pediatr* 1987; 110: 881-884.



- Herbert E, Trusz-Gluza M, Moric E, Smilowska-Dzielicka E, Mazurek U, Wilczok T. KCNQ1 gene mutations and the respective genotype-phenotype correlations in the long QT syndrome. *Med Sci Monit* 2002; 8: 240-248.
- Holm S. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand J Statist* 1979; 6: 65–70.
- Holub M, Tuschl K, Ratschmann R, Strnadova K, Sperl W, Muhl A, et al. Influence of hematocrit and localisation of punch in dried blood spots on levels of amino acids and acylcarnitines measured by tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 2006; 373: 27-31.
- Honour JW, Torresani T. Evaluation of neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *Horm Res* 2001; 55: 206-211.
- Howat AJ, Bennett MJ, Variend S, Shaw L, Engel PC. Defects of Metabolism of Fatty Acids in the Sudden Infant Death Syndrome. *BMJ* 1985; 290: 1771-1773.
- Huemer M, Simma B, Fowler B, Suormala T, Bodamer OA, Sass JO. Prenatal and postnatal treatment in cobalamin C defect. *J Pediatr* 2005; 147: 469–472.
- Hughes I. Congenital adrenal hyperplasia: phenotype and genotype. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2002; 15: 1329-1340.
- Hunt CE. Sudden infant death syndrome and other causes of infant mortality. *Am J Resp Crit Care Med* 2001; 164: 346-357.
- Jaaskelainen J, Levo A, Voutilainen R, Partanen J. Population-wide evaluation of disease manifestation in relation to molecular genotype in steroid 21-hydroxylase (CYP21) deficiency: good correlation in a well defined population. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 3293-3297.
- Jacobs BL, Azmitia EC. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* 1992; 72: 165-229.

- Kayiran SM, Ozbek N, Turan M, Gurakan B. Significant differences between capillary and venous complete blood counts in the neonatal period. *Clin Lab Haematol* 2003; 25: 9–16.
- Kaye CI and the Committee on Genetics. Newborn Screening Fact Sheets. *Pediatrics* 2006; 118: e934-e963.
- Kovács J, Votava F, Heinze G, Sólyom J, Lebl J, Pribilincová Z, Frisch H, Battelino T, Waldhauser F. Lessons from 30 years of clinical diagnosis and treatment of congenital adrenal hyperplasia in five middle European countries. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 2958-2964.
- Krous HF, Beckwith JB, Byard RW, Rognum TO, Bajanowski T, Corey T, Cutz E, Hanlick R, Keens TG, Mitchell EA. Sudden infant death syndrome and unclassified sudden infant deaths: a definitional and diagnostic approach. *Pediatrics* 2004; 114: 234-238.
- Leipala JA, Talme M, Viitala J, Turpeinen U, Fellman V. Blood volume assessment with hemoglobin subtype analysis in preterm infants. *Biol Neonate* 2003; 84: 41–44.
- Li H, Fuentes-Garcia J, Towbin JA. Current concepts in long QT syndrome. *Pediatr Cardiol* 2000; 21: 542-550.
- Lubani MM, Issa AR, Bushnaq R, al-Saleh QA, Dudin KI, Reavey PC, el-Khalifa MY, Manandhar DS, Abdul Al YK, Ismail EA, et al. Prevalence of congenital adrenal hyperplasia in Kuwait. *Eur J Pediatr* 1990; 149: 391-392.
- Lim YJ, Batch JA, Warne GL. Adrenal 21-hydroxylase deficiency in childhood: 25 years' experience. *J Paediatr Child Health* 1995; 31: 222-227.
- Lundemose JB, Kolvraa S, Gregersen N, Christensen E, Gregersen M. Fatty acid oxidation disorders as primary cause of sudden and unexpected death in infants and

young children: an investigation performed on cultured fibroblasts from 79 children who died aged between 0-4 years. *Mol Pathol* 1997; 50 (4): 212-217.

- Madira WM, Xavier F, Stern J, Wilcox AH, Barron JL. Determination and Assessment of the Stability of Phenylalanine and Tyrosine in Blood Spots by HPLC. *Clin Chem* 1992; 38: 2162-2163.
- Mathur A, Sims HF, Gopalakrishnan D, Gibson B, Rinaldo P, Vockley J, Hug G, Strauss A. Molecular heterogeneity in very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency causing pediatric cardiomyopathy and sudden death. *Circulation* 1999; 99: 1337-1343.
- Meyburg J, Schulze A, Kohlmüller D, Pöschl J, Linderkamp O, Hoffmann GF, et al. Acylcarnitine Profiles of Preterm Infants Over the First Four Weeks of Life. *Pediatr Res* 2002; 52: 720-723.
- Morris JA, Harrison LM, Partridge SM. Postmortem bacteriology: A re-evaluation. *J Clin Pathol* 2006; 59: 1-9.
- Narita N, Narita M, Takashima S, Nakayama M, Nagai T, Okado N. Serotonin transporter gene variation is a risk factor for sudden infant death syndrome in the Japanese population. *Pediatrics* 2001; 107: 690-692.
- Nuoffer JM, deLonlay P, Costa C, Roe CR, Chamoles N, Brivet M. Familial neonatal SIDS revealing carnitine-acylcarnitine translocase deficiency. *Eur J Pediatr* 2000; 159: 82-85.
- Olgemöller B, Roscher AA, Liebl B, Fingerhut R. Screening for congenital adrenal hyperplasia: adjustment of 17-hydroxyprogesterone cut-off values to both age and birth weight markedly improves the predictive value. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 5790-5794.

- Oliver RW, Kafwembe EM, Mwandu D. Stability of vitamin A circulating complex in spots of dried serum samples absorbed onto filter paper. *Clin Chem* 1993; 39: 174-175.
- Opdal SH, Vege A, Saugstad OD, Rognum TO. Is partial deletion of the complement C4 genes associated with sudden infant death? *Eur J Pediatr* 1994; 153: 287-290.
- Opdal SH, Rognum TO, Vege A, Stave AK, Dupuy BM, Egeland T. Increased number of substitutions in the D-loop of mitochondrial DNA in the sudden infant death syndrome. *Acta Paediatr* 1998; 87: 1039-1044.
- Opdal SH, Opstad A, Vege A, Rognum TO. IL-10 gene polymorphisms are associated with infectious cause of sudden infant death. *Hum Immunol* 2003; 64: 1183-1189.
- Opdal SH, Rognum TO. The sudden infant death syndrome gene: Does it exist? *Pediatrics* 2004; 114: e506-e512.
- Ozawa Y, Takashima S. Developmental neurotransmitter pathology in the brainstem of sudden infant death syndrome: a review and sleep position. *Forensic Science International* 2002a; 130: 53-59.
- Ozawa Y, Okado N. Alteration of serotonergic receptors in the brain stems of human patients with respiratory disorders. *Neuropediatrics* 2002b; 33: 142-149.
- Pang S, Hotchkiss J, Drash AL, Levine LS, New MI. Microfilter paper method for 17-alpha hydroxyprogesterone radioimmunoassay: its application for rapid screening for congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1977; 45: 1003-1008.
- Pang SY, Wallace MA, Hofman L, Thuline HC, Dorche C, Lyon IC, Dobbins RH, Kling S, Fujieda K, Suwa S. Worldwide experience in newborn screening for classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Pediatrics* 1988; 81: 866-874.

- Pappas A, Delaney-Black V. Differential diagnosis and management of polycythemia. *Pediatr Clin North Am* 2004; 51: 1063–1086.
- Paterson DS, Trachtenbert FL, Thompson EG, Belliveau RA, Beggs AH, Darnall RA, Chadwick AE, Krous HF, Kinney HC. Multiple serotonergic brainstem abnormalities in the Sudden Infant Death Syndrome. *JAMA* 2006; 296: 2124-2132.
- Pattyn A, Vallstedt A, Dias JM, Samad OA, Krumlauf R, Rijli FM, Brunet J-F, Ericson J. Coordinated temporal and spatial control of motor neuron and serotonergic neuron generation from a common pool of CNS progenitors. *Genes Dev* 2003; 17: 729-737.
- Perry R, Kecha O, Paquette J, Huot C, Van Vliet G, Deal C. Primary adrenal insufficiency in children: twenty years experience at the Sainte-Justine Hospital, Montreal. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 3243-3250.
- Pollitt RJ. International perspectives on newborn screening. *J Inherit Metab Dis* 2006; 29: 390-396.
- Poplawski NK, Ranieri E, Harrison JR, Fletcher JM. Multiple Acyl-coenzyme A Dehydrogenase Deficiency: Diagnosis by Acyl-carnitine Analysis of a 12-year-old Newborn Screening Card. *J Pediatr* 1999; 134: 764-766.
- Rand CM, Weese-Mayer DE, Maher BS, Cooper ME, Marazita ML, Berry-Kravis EM. Sudden infant death syndrome: Case-control frequency differences in paired like homeobox (*PHOX*) 2B gene. *Am J Med Genet Part A* 2006a; 140A: 1687-1691.
- Rand CM, Weese-Mayer DE, Maher BS, Zhou L, Marazita ML, Berry-Kravis EM. Nicotine metabolizing genes *GSTT1* and *CYP1A1* in sudden infant death syndrome. *Am J Med Genet Part A* 2006b; 140A: 1447-1452.
- Rashed MS, Bucknall MP, Little D, Awad A, Jacob M, Alamoudi M, et al. Screening Blood Spots for Inborn Errors of Metabolism by Electrospray Tandem Mass

Spectrometry with a Microplate Batch Process and a Computer Algorithm for Automated Flagging of Abnormal Profiles. *Clin Chem* 1997; 43: 1129-1141.

- Rashed MS, Rahbeeni Z, Ozand PT. Application of electrospray tandem mass spectrometry to neonatal screening. *Semin Perinatol* 1999, 23: 183–193.
- Rinaldo P, Stanley CA, Hsu BYL, Sanchez LA, Stern HJ. Sudden neonatal Death in Carnitine Transporter Deficiency. *J Pediatr* 1997; 131: 304-305.
- Ruppen W, Hagenbuch N, Jöhr M, Christen P. Cardiac arrest in an infant with congenital adrenal hyperplasia. *Acta Anaesthesiol Scand* 2003; 47: 104-105.
- Santer R, Fingerhut R, Lässker U, Wightman PJ, Fitzpatrick DR, Olgemöller B, et al. Tandem Mass Spectrometric Determination of Malonylcarnitine: Diagnosis and Neonatal Screening of Malonyl-CoA Decarboxylase Deficiency. *Clin Chem* 2003; 49: 660-662.
- Sawaguchi T, Franco P, Kato I, Shimizu S, Kahim H, Groswasser J, Sattiaux M, Togari H, Kobayashi M, Takashima S, Nishida H, Sawaguchi A, Kahn A. From epidemiology to physiology and pathology: apnea and arousal deficient theories in sudden infant death syndrome - with particular reference to hypoxic brainstem gliosis. *Forensic Science International* 2002; 130: 21-29.
- Schneider PM, Wendler C, Riepert T, Braun L, Schacker U, Horn M, Althoff H, Mattern R, Rittner C. Possible association of sudden infant death with partial complement C4 deficiency revealed by post-mortem DNA typing of HLA class II and III genes. *Eur J Pediatr* 1989; 149: 170-174.
- Schulze A, Lindner M, Kohlmüller D, Olgemöller K, Mayatepek E, Hoffmann GF. Expanded Newborn Screening for Inborn Errors of Metabolism by Electrospray Ionization- Tandem Mass Spectrometry: Results, Outcome, and Implications. *Pediatrics* 2003; 111: 1399-1406.

- Schwartz PJ, Priori SG, Dumaine R, Napolitano C, Antzelevitch C, Stramba-Badiale M, Richard TA, Berti MR, Bloise R. A molecular link between the sudden infant death syndrome and the long QT syndrome. *N Engl J Med* 2000; 343: 262-267.
- Schwartz P, Priori SG, Bloise R, Napolitano C, Ronchetti E, Piccini A, Goj C, Breithardt G, Schulze-Bahr E, Wedekind H, Nastoli J. Molecular diagnosis in a child with sudden infant death syndrome. *Lancet* 2001a; 358: 1342-1343.
- Schwartz P, Priori S, Spazzolini C, Moss A, Vincent M, Napolitano C, Denjoy I, Guicheney P, Breithardt G, Keating M, Towbin J, Beggs A, Brink P, Wilde A, Toivonen L, Zareba W, Robinson J, Timothy K, Cornfield V, Wattanasirichaigoon D, Corbett C, Haverkamp W, Schulze-Bahr E, Lehmann M, Schwartz K, Coumel P, Bloise R. Genotype-phenotype correlation in the long QT Syndrome. *Circulation* 2001b; 103: 89-95.
- Splawski I, Shen J, Timothy K, Lehmann M, Priori S, Robinson J, Moss A, Schwartz P, Towbin J, Vincent M, Keating M. Spectrum of mutations in long QT syndrome genes: KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation* 2000; 102: 1178-1185.
- Summers AM, Summers CW, Drucker DB, Hajeer AH, Barson A, Hutchinson IV. Association of IL-10 genotype with sudden infant death syndrome. *Hum Immunol* 2000; 61: 1270-1273.
- Thanka J, Padmasani, krishnan L, Kuruvilla S. Fatty acid oxidation disorder as a cause of sudden infant death syndrome (SIDS)- a case report. *Indian Pathol Microbiol* 2005; 48: 485-487.
- Therrell BL, Hannon WH, Pass KA, Lorey F, Brokopp C, Eckman J, et al. Guidelines for the Retention, Storage, and Use of Residual Dried Blood Spot Samples after

Newborn Screening Analysis: Statement of the Council of Regional Networks for Genetic Services. *Biochem Mol Med* 1996; 57: 116-124.

- Therrell BL, Berenbaum SA, Manter-Kapanke V, Simmank J, Korman K, Prentice L, Gonzalez J, Gunn S. Results of screening 1.9 million Texas newborns for 21-hydroxylase deficient congenital adrenal hyperplasia. *Pediatrics* 1998; 101: 583-590.
- Thilen A, Larsson A. Congenital adrenal hyperplasia in Sweden 1969-1986. Prevalence, symptoms and age at diagnosis. *Acta Paediatr Scand* 1990; 79: 168-175.
- Török D, Mühl A, Votava F, Heinze G, Sólyom J, Crone J, Stöckler-Ipsiroglu S, Waldhauser F. Stability of 17-hydroxyprogesterone in dried blood spots after autoclaving and prolonged storage. *Clin Chem* 2002; 48: 370-372.
- Torres N, Mello MP, Germano CMR, Elias LLK, Moreira AC, Castro M. Phenotype and genotype correlation of the microconversion from the CYP21A1P to the CYP21A2 gene in congenital adrenal hyperplasia. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36: 1311-1318.
- Towbin JA, Vatta M. Molecular biology and the prolonged QT syndromes. *Am J Med* 2001; 110: 385-398.
- Treacy EP, Lambert DM, Barnes R, Boriack RL, Vockley J, O'Brien LK, Jones PM, Bennett MJ. Short-chain hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency presenting as unexpected infant death: A family study. *J Pediatr* 2000; 137: 257-259.
- Van der Kamp HJ, Noordam K, Elvers B, Van Baarle M, Otten BJ, Verkerk PH. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in the Netherlands. *Pediatrics* 2001; 108: 1320-1324.
- Van Vliet G, Czernichow P. Screening for neonatal endocrinopathies: rationale, methods and results. *Semin Neonatol* 2004; 9: 75-85.



- Viridi NK, Green A: congenital adrenal hyperplasia in Birmingham: a retrospective analysis (1958-1985). *J Inher Metab Dis* 1986; 9 (suppl 1): 152-155.
- Vockley J, Whiteman DAH. Defects of mitochondrial beta-oxidation: a growing group of disorders. *Neuromuscular Disorders* 2002; 12: 235-246.
- Votava F, Strnadová K. Novorozenecký screening v České republice a v Evropě. *Čes. – slov. Pediat.* 2008; 63: 96-105.
- Waite KV, Maberly GF, Eastman CJ. Storage conditions and stability of thyrotropin and thyroid hormones on filter paper. *Clin Chem* 1987; 33: 853-855.
- Wedekind H, Smits J, Schulze-Bahr E, Arnold R, Veldkamp M, Bajanowski T, Borggreffe M, Brinkmann B, Warnecke I, Funke H, Bhuiyan Z, Wilde A, Breithardt G, Haverkamp W. De novo mutation in the SCN5A gene associated with early onset of sudden infant death. *Circulation* 2001; 104: 1158-1164.
- Wedekind H, Bajanowski T, Friederich P, Breithardt G, Wülfing T, Siebrands C, Engeland B, Mönnig G, Haverkamp W, Brinkmann B, Schulze-Bahr E. Sudden infant death syndrome and long QT syndrome: an epidemiological and genetic study. *Int J Legal Med* 2006; 120: 129-137.
- Weese-Mayer DE, Berry-Kravis EM, Maher BS, Silvestri JM, Curran ME, Marazita ML. Sudden infant death syndrome: Association with a promotor polymorphism of the serotonin transporter gene. *Am J Med Genet Part A* 2003; 117A: 268-274.
- Weese-Mayer DE, Ackerman MJ, Marazita ML, Berry-Kravis EM. Sudden Infant Death Syndrome: Review of implicated genetic factors. *Am J Med Genet Part A* 2007; 143A: 771-788.
- White PC, Speiser PW Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocrine Reviews* 2000; 21: 245-291.

- Wilcken B, Wiley V, Hammond J, Carpenter K. Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. *N Engl J Med* 2003; 348: 2304–2312.
- Wilcox RL, Nelson CC, Stenzel P, Steiner RD. Postmortem screening for fatty acid oxidation disorders by analysis of Guthrie cards with tandem mass spectrometry in sudden unexpected death in infancy. *J Pediatr* 2002; 141: 833-836.
- Wilson JMG, Jungner F. Principles and practice of screening for disease (Public Health papers No. 34). 1968; Geneva: World Health Organization.
- Yang Z, Iantze PE, Ibdah JA. Post-mortem analysis for two prevalent beta-oxidation mutations in sudden infant death. *Pediatr Int* 2007; 49: 883-887.
- Yoo BK, Grosse SD. Cost- effectiveness of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia: a preliminary analysis. National Newborn Screening and Genetic Testing Symposium, Portland, October, 2005.
- Zytovicz TH, Fitzgerald EF, Marsden D, Larson CA, Shih VE, Johnson DM, et al. Tandem mass Spectrometric Analysis of Amino, Organic, and Fatty Acid Disorders in Newborn Dried Blood Spots: A Two- Year Summary from the New England Newborn Screening Program. *Clin Chem* 2001; 47: 1945-1955.

## **Publikační činnost autorky**

### **Původní práce in extenso v časopisech se známým impakt faktorem**

- Holub M, Tuschl K, Ratschmann R, Strnadova K, Sperl W, Muhl A, et al. Influence of hematocrit and localisation of punch in dried blood spots on levels of amino acids and acylcarnitines measured by tandem mass spectrometry. Clin Chim Acta 2006; 373: 27-31 (IF 2,328)
- Strnadová KA, Votava F, Lebl J, Mühl A, Item C, Bodamer OA, Torresani T, Bouška I, Waldhauser F, Sperl W. Prevalence of congenital adrenal hyperplasia among sudden infant death in the Czech Republic and Austria. Eur J Pediatr 2007; 166: 1-4 (IF 1,137)
- Strnadová KA, Holub M, Mühl A, Heinze G, Tuschl K, Stöckler-Ipsiroglu S, Waldhauser F, Votava F, Lebl J, Bodamer OA. Long-term stability of amino acids and acylcarnitines in dried blood spots used for neonatal screening by tandem mass spectrometry. Clin Chem 2007; 53: 717-722 (IF 5,432)

## **Další publikované články in extenso**

- Strnadová K, Votava F, Lebl J. Syndrom náhlého úmrtí kojence: endokrinní a metabolické aspekty. Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa 2004; 7: 83-87.
- Votava F, Strnadová K. Novorozenecký screening v České republice a v Evropě. Čes. – slov. Pediat. 2008; 63: 96- 105.

## **Kapitoly v monografiích**

- Strnadová K, Votava F, Bouška I, Lebl J. Štěpánův krátký životní příběh. In: Lebl J, Macek M et al. Kazuistiky z molekulární genetiky. Praha, Galén 2006: 99-100.

## **Publikovaná abstrakta**

- Lebl J, Hníková O, Hejmanová L, Votava F, Průhová Š, Čiháková D, Vosáhlo J, Al Taji E, Ploranská L, Strnadová K, Rákosníková V. Dětská endokrinologie a metabolismus: Klinické a molekulárně genetické projekty na Klinice dětí a dorostu v roce 2002. In: Vědecká konference 3. LF UK. Praha, 3. LF UK 2002: 19. Konference: Vědecká konference 3. LF UK, Praha, 2002
- Strnadová K, Lebl J, Votava F. Detekce příčin náhlého úmrtí kojence (SIDS) analýzou novorozeneckých suchých krevních kapek. In: Vědecká konference 3. LF UK. Praha, 3. LF UK 2002: 35. Konference: Vědecká konference 3. LF UK, Praha, 2002
- Strnadová K, Votava F, Lebl J, Bouška I. Sudden infant death syndrome - Retrospective diagnosis of endocrine and metabolic causes from dried blood spots. In:

- Slovenska Pediatrija 2003; 3: 194. Konference: 10th Workshop of the Middle European Society for Paediatric Endocrinology (MESPE), Kőszeg, Hungary, 2003
- Strnadová K, Votava F, Bouška I, Lebl J. Syndrom náhlého úmrtí kojence - detekce endokrinních a metabolických příčin analýzou novorozenecké suché krevní kapky. In: Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa 2003; 6(Suppl. 2): 54. Konference: XXVI. endokrinologické dny s mezinárodní účastí, Liberec, 2003
  - Strnadová K, Votava F, Lebl J, Bouška I, Waldhauser F, Bodamer O, Torresani T. Endocrine and Metabolic Causes of Sudden Death in Infancy. In: Slovenska Pediatrija 2004;3: 88. Konference: 11<sup>th</sup> Workshop of the Middle European Society for Paediatric Endocrinology (MESPE), Krems, Austria, 2004
  - Dimová K, Feigerlová E, Strnadová K, Lebl J. Opožděná puberta u 15letého chlapce. In: Česko-slovenská pediatrie 2005; 60: 646-647. Konference: Dny dětské endokrinologie 2005, 6. setkání Pracovní skupiny dětské endokrinologie ČPS Kazuistiky v dětské endokrinologii III, Hradec Králové, 2005
  - Strnadová K, Votava F, Lebl J, Bouška I, Waldhauser F, Bodamer O, Torresani T. Příběhy dvou náhle zemřelých dětí. In: Česko-slovenská pediatrie 2005; 60: 629. Konference: Dny dětské endokrinologie 2005, 6. setkání Pracovní skupiny dětské endokrinologie ČPS Kazuistiky v dětské endokrinologii III, Hradec Králové, 2005
  - Strnadová K, Votava F, Lebl J, Bouška I, Waldhauser F, Bodamer O, Torresani T. Endocrine and metabolic causes of sudden death in infancy. In: Sborník abstrakt - 14th Meeting of Paediatric Research of Central European Countries, 2005. Konference: 14th Meeting of Paediatric Research of Central European Countries, Praha, 2005
  - Strnadová K, Lebl J, Votava F. Prevalence of congenital adrenal hyperplasia among sudden infant death in the Czech Republic and Austria. In: Sborník abstrakt -

Pediatrický kongres s mezinárodní účastí. Konference: Pediatrický kongres s mezinárodní účastí, Praha, 2006

- Strnadová K, Votava F. Stabilita aminokyselin a acylkarnitinů v dlouhodobě skladovaných suchých krevních kapkách. In: Vědecká konference 3. LF UK. Praha, 3. LF UK 2007. Konference: Vědecká konference 3. LF UK, Praha, 2007