

Syventävät opinnot

Mia Muhonen

514555

## Vastasyntyneiden SCID-seulonta TREC-analyysin avulla

*Turun yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.*

# Sisällys

1. Tiivistelmä .....	3
2. Kirjallisuuskatsaus .....	3
2.1 SCID .....	3
2.2 Neonataaliseulonta .....	4
2.3 SCID ja TREC .....	6
2.4 TREC maailmalla .....	8
2.5 Suomen tilanne .....	9
3. Tutkimuksen tarkoitus .....	11
4. Materiaalit ja menetelmät .....	11
5. Tilastolliset analyysit .....	12
6. Tulokset .....	12
7. Pohdinta .....	15
8. Johtopäätökset .....	18
9. Lähteet .....	19

## 1. Tiivistelmä

**Tarkoitus:** SCIDiä (severe combined immunodeficiency) voidaan seuloa mittaamalla vastasyntyneiden verinäytteestä TREC-kopioiden määrä. Alhaiseen TREC-arvoon perustuva seulonta on jo käytössä monessa eri maassa, mutta ei vielä Suomessa. Tutkimme EnLite Neonatal TREC-kitin sopivuutta SCID-seulonnan metodiksi ja erityisesti TREC-kopioiden seulontarajan asettamista.

**Aineisto:** Tutkimuksen aineisto koostui 6000 vauvasta, jotka olivat osallistuneet NeoPilot-tutkimukseen Turussa vuosina 2011-2012. Tapauksiksi katsoimme ne vauvat, joiden TREC-arvo oli alle 30 kopiota/ $\mu$ l ja valitsimme heille kaksi kontrollia, joilla oli normaali TREC-arvo. Potilaita oli seurattu pseudoanonymisoidusti vähintään kuuden vuoden ajan.

**Menetelmät:** TREC-arvoja verrattiin tapauksien ja kontrollien välillä Wilcoxon rank sum 2-sample T testillä. Diagnoosien lukumääriä ryhmien välillä tarkastelimme Wilcoxon rank sum 1-Way testillä. Laskimme myös erikseen yhteen kunkin potilaan välikorva- ja hengitystietulehdukset ja vertasimme niitä ryhmien välillä Pearsonin testillä. Osastohoitovuorokausien ja hoitokäyntien lukumääriä sekä veren lymfosyyttimääriäryhmien välillä vertailimme Wilcoxon rank sum 1-Way testillä.

**Tulokset:** Tapauksien TREC-arvojen mediaani oli 26,2 kopiota/ $\mu$ l ja kontrollien 93 kopiota/ $\mu$ l ( $p < 0,001$ ). Tapauksista 40,6% oli poikia, kun taas kontrolleista 41,5% poikia. Diagnoosien lukumäärien mediaani tapauksilla oli 13 ja kontrolleilla 9, mutta ero ei ollut tilastollisesti merkitsevää (Wilcoxon rank sum 1-Way test, ChiSquare Approximation  $p = 0,6092$ ). Välikorvan- ja hengitystietulehdusten määrillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa (Pearson test,  $p > 0,05$ ). Osastovuorokausien lukumäärien mediaani oli molemmilla ryhmillä 5, eikä ero ollut tilastollisesti merkitsevää (Wilcoxon Rank Sum, 1-Way Test, ChiSquare Approximation,  $p = 0,5628$ ). Hoitokäyntien lukumäärien mediaani oli tapauksilla 11 ja kontrolleilla 8, eikä ero ollut tilastollisesti merkitsevää (Wilcoxon Rank Sum, 1-Way Test, ChiSquare Approximation,  $p = 0,4397$ ). Lymfosyyttien lukumäärän mediaani tapauksilla oli 2,904 ja kontrolleilla 4,719 ja ero ryhmien välillä oli lähes tilastollisesti merkitsevää (Wilcoxon Rank Sum, 1-Way Test, ChiSquare Approximation,  $p = 0,0523$ ). Kuudella lapsella oli yli sata eri diagnoosikoodia. Heistä kolme oli pikkukeskosia ja kolmella muu perussairaus. Lymfosyyttien määrä heillä oli  $1,8 - 7,6 \times 10^9$  (24-70% kokonaisleukosyyteistä).

**Päätelmät:** Tutkimuksen tulosten perusteella hälytysraja 30 kopiota/ $\mu$ l näyttää olevan kansallisen seulonnan aloittamisessa liian korkea. Jopa 0,5% näytteistä jäisi tämän rajan alle ja hälytyksiä tulisi 250 vuodessa koko Suomessa, vaikka todellisia tapauksia lienee vain muutama. Kuitenkin vasta riittävän pitkä kansallinen seulonta osoittaa todellisuudessa sopivan hälytysrajan.

## 2. Kirjallisuuskatsaus

### 2.1 SCID

SCID, eli severe combined immunodeficiency, on harvinainen synnynnäinen immuunivajesairaus, joka altistaa ensimmäisinä elinvuosina hengenvaarallisille infektioille. SCID on vakavin primaarinen immuunivajeiden (PID, primary immunodeficiency) muoto, joka hoitamattomana johtaa lapsen menehtymiseen.

SCID on käsite, joka kuvailee yli 20 erilaista harvinaista perinnöllistä sairautta, joille on tyypillistä adaptiivisen immuunipuolustuksen T- ja B-lymfosyyttien epänormaali toiminta, kypsyminen sekä kehitys (1, 2). Kaikille SCID:lle on tyypillistä merkittävä lasku naiivien T-solujen tuotannossa, mikä johtaa humoraaliseen ja soluvälitteiseen immuunipuutokseen.

Subset	N	0-3 mo	3-6 mo	6-12 mo	1-2 y	2-6 y	6-12 y	12-18 y
3	709	73 (53-84)	66 (51-77)	65 (49-76)	65 (53-75)	66 (56-75)	69 (60-76)	73 (56-84)
19	709	15 (06-32)	25 (11-41)	24 (14-37)	25 (16-35)	21 (14-33)	18 (13-27)	14 (06-23)
16/56	784	8 (04-18)	6 (03-14)	7 (03-15)	7 (03-15)	9 (04-17)	9 (04-17)	9 (03-22)
4	709	52 (35-64)	46 (35-56)	46 (31-56)	41 (32-51)	38 (28-47)	37 (31-47)	41 (31-52)
8	709	18 (12-28)	16 (12-23)	17 (12-24)	20 (14-30)	23 (16-30)	25 (18-35)	26 (18-35)
4/45RA/62L	805	89 (61-94)	88 (64-92)	83 (58-91)	79 (62-90)	70 (50-85)	58 (42-74)	51 (31-65)
8/45RA/62L	807	79 (56-88)	77 (53-88)	72 (47-87)	71 (46-85)	64 (42-81)	58 (39-73)	56 (42-73)
4/45RA	805	90 (64-95)	90 (77-94)	86 (64-93)	81 (63-91)	71 (53-86)	59 (46-77)	53 (33-66)
8/45RA	807	93 (80-99)	94 (85-98)	91 (75-97)	89 (71-98)	86 (69-97)	80 (63-92)	79 (61-91)
4/DR/38	805	3 (01-06)	4 (02-09)	4 (01-09)	5 (02-09)	5 (02-09)	4 (01-08)	3 (02-06)
8/DR/38	807	5 (02-17)	7 (03-16)	8 (03-25)	15 (05-30)	13 (05-29)	9 (02-20)	7 (03-18)
4/DR	805	3 (02-06)	5 (02-10)	5 (02-11)	6 (02-11)	7 (03-12)	6 (03-13)	7 (04-11)
8/DR	807	5 (02-20)	7 (03-17)	10 (04-27)	16 (06-33)	16 (07-37)	12 (06-29)	12 (05-25)
4/38	805	98 (95-99)	96 (90-98)	95 (89-97)	93 (85-97)	87 (74-94)	79 (64-86)	69 (50-79)
8/38	807	97 (89-99)	95 (83-98)	93 (78-98)	91 (73-97)	82 (52-93)	70 (42-86)	64 (33-80)
4/28	806	99 (95-100)	99 (88-100)	98 (90-100)	98 (94-100)	98 (92-99)	98 (92-100)	97 (89-100)
8/28	806	76 (54-87)	75 (43-87)	70 (42-83)	69 (49-81)	63 (42-79)	60 (42-78)	58 (39-76)
4/95	806	11 (05-21)	14 (08-21)	18 (11-34)	23 (11-39)	31 (21-45)	39 (24-53)	49 (32-66)
8/95	806	12 (02-33)	15 (06-36)	22 (08-47)	31 (07-50)	34 (12-57)	36 (10-62)	44 (15-71)
3/4/45RO	676	10 (02-22)	8 (03-16)	9 (05-18)	12 (07-20)	16 (09-26)	21 (13-30)	28 (18-38)
3/4-/45RO	672	3 (01-09)	3 (01-07)	3 (01-08)	6 (02-12)	9 (04-16)	12 (04-21)	13 (04-23)
3/45RO	676	14 (03-31)	13 (04-24)	12 (06-25)	19 (09-31)	27 (15-41)	33 (20-46)	41 (24-57)
3-/19/38	686	49 (13-75)	66 (00-82)	66 (01-78)	60 (00-79)	55 (01-70)	39 (00-60)	19 (00-57)
3-/19	686	50 (14-76)	69 (00-84)	67 (01-80)	63 (00-80)	61 (02-76)	46 (00-67)	21 (00-60)

See legend to Table I. Values are the percentages of the cells expressing the indicated markers for the lymphocyte population defined by the anchor marker presented as medians (10th and 90th percentiles). For example, in the 3/4/45RO subset the value reflects the percentage of CD3<sup>+</sup> T cells that are also positive for CD4 and CD45RO.

Kuva 1: Lymfosyyttien suhteellisen osuuden mediaanit (10% ja 90% fraktiilit) veressä eri ikäisillä terveillä lapsilla (16)

Mutaatio IL2RG-geenissä on yleisin SCID:n aiheuttaja. (3) Muita yleisiä SCID-mutaatiotyyppejä ovat X-kromosomaalinen IL2RG, ADA ja RAG1 (2). SCID-potilaita on länsimaissa arviolta 1:46 000 vastasyntynyttä, joten Suomessakin syntyy SCID-lapsia vuosittain.

Suurin osa SCID:a sairastavista lapsista on oireettomia syntyessään. Maternaaliset vasta-aineet, istukan kautta saatavat IgG:t ja äidinmaidosta saatavat IgA:t, voivat myös viivästyttää vakavien infektioiden puhkeamista SCID-potilaalla. Äidiltä saatujen vasta-aineiden hiipuesssa 3-4 kuukauden kuluessa lapsen immuunipuolustus heikkenee ja vakavien infektioiden määrä lisääntyy aiheuttaen mahdollisesti potilaan menehtymisen, mikäli hoitoja ei aloiteta ajoissa (3,4). Toinen vakava riski SCID-potilaalle liittyy eläviin heikennettyihin rokotteisiin, eli rotavirus-, BCG-, MPR- ja poliorokotteisiin, jotka voivat olla hengenvaarallisia immuunipuutteiselle pikkulapselle. (4)

Koska SCID ei näy lapsessa poikkeavana eikä sukuhistoriakaan auta SCID:n ennustamisessa, ellei perheessä ole aiempaa sairasta lasta, kliininen diagnoosi voidaan tehdä vasta ensimmäisten oireiden ilmaantuessa (3,5). Usein hoidon aloitus vasta tällöin on jo liian myöhäistä, sillä ensimmäinen vakava

infektio voi olla potilaalle hengenvaarallinen. Hoitotuloksen parantamiseksi SCID-potilaat tulisi löytää mahdollisimman pian syntymän jälkeen.

Seulonnan mahdollistama aikaisin tehty hematopoeettisten kantasolujen siirto (HSCT) on tähänastisten tutkimuksien mukaan parantanut SCID-potilaiden ennusteen erinomaiseksi (3). Mikäli HLA-tyypiltään sopiva kantasolujen luovuttaja löytyy, voidaan taata potilaalle jatkuva normaalisti toimivien ja erilaistuvien lymfosyyttien tuotto luuytimessä. Potilaan ennuste parantuu merkittävästi, jos hematopoeettinen kantasolusiirto voidaan toteuttaa ennen 3,5 kk ikää ja ennen ensimmäisiä vakavia infektioita tai komplikaatioita (6). Tämä on mahdollista vain, jos SCID saadaan seulottua heti syntymän jälkeen.

ADA-mutaatiotyyppin SCID:n hoitoon on käytössä geeniterapia sekä entsyymikorvaushoito, ja X-kromosomaaliseen SCID:n geeniterapia. Tukihoitomuotoja SCID:lle ovat esimerkiksi pitkäaikaiset IgG-infuusiot. Myös jatkuvasti kehittyvä CRISPR-Cas-tekniikka on yksi mahdollinen tulevaisuuden hoitomuoto. (6)

Ensimmäinen julkisuuteen tullut SCID-potilas oli Texasissa vuonna 1971 syntynyt David Vetter, ”bubble boy”, joka laitettiin heti syntymänsä jälkeen steriiliin ympäristöön Houstonin sairaalassa. Sopivaa luovuttajaa kantasolusiirtoa varten ei valitettavasti löytynyt tarpeeksi nopeasti ja potilas kuoli 13-vuotiaana siirteen mukana saatuun EBV-infektion aiheuttamaan lymfoomaan. (6)

## 2.2 Neonataaliseulonta

Kirjallisuudessa neontataaliseulontaa kuvataan termillä NBS, eli newborn screening. Neonataaliseulonta on ennaltaehkäisevää terveydenhuoltoa, jonka tarkoituksena on löytää vaikeat taudit jo ennen oireiden ilmaantumista. Seulontatestin on tarkoitus tunnistaa sairast, mutta oireettomat henkilöt riittävän suurella tarkkuudella ja herkkyydellä, jotta tulos on luotettava, mutta saadaan minimoitua mahdollisten väärin positiivisten tulosten määrää.

Seulottavien tautien tulee olla diagnosoitavissa lähes varmasti ja niille täytyy olla olemassa tehokas hoitomuoto, sillä seulottavat taudit ovat usein todella vaikeita hoitamattomina. Lisäksi myös seulonnan hinnan tulee olla kohtuullinen, sillä testit tehdään suurelle joukolle potilaita.

### *Neonataaliseulonnan historiaa*

Vuonna 1968 James Wilson, Englannin terveysministeriö ja Gunnar Junger, Göteborgin Sahlgrenin sairaalan kliinisen kemian johtaja, julkaisivat WHO:lle raportin ”Principles and Practice of Screening for Disease”. (6) Julkaisu on ollut merkittävä neonataaliseulonnan aloittaja ja edelleen seulontaohjelmien suunnittelussa noudatetaan Wilsonin ja Jungerin kriteerejä.

Ensimmäiset seulontatestit kehitti norjalainen Ivan Asbjörn Følling 1940-luvun lopulla. Hän seuloi fenyyliketonuriaa (PKU) pikkulasten vaipoista rauta(III)kloridilla. Menetelmä tosin toimi vain vasta muutaman viikon ikäisillä lapsilla, joten amerikkalainen Robert Guthrie kehitti pian syntymän jälkeen otettavan kantapääveritälänäytteen, jolle tehtiin bakteeriviljely agar-kasvatusalustalla. PKU:a sairastavat potilaat voitiin tunnistaa *Bacillus subtilis* -bakteerikannan kasvun inhibitiosta. (6) Guthrien kantapääveritälänäytettä käytetään nykypäivänäkin neonataaliseulonnassa.

Seuraava merkittävä seulontamenetelmä oli tandem-massapektrometria (MS/MS), joka mahdollisti kemiallisen yhdisteen tunnistamisen molekyylimassan perusteella. Koska massaspektrometrilla voitiin tunnistaa monta eri yhdistettä samanaikaisesti, mahdollisti menetelmä myös usean sairauden seulomisen samasta näytteestä. (6) Massaspektrometrinen menetelmä on edelleen käytössä ympäri maailman, mutta sen ohelle on kehitetty myös spektrofotometrisiä, fluorometrisiä ja immunologisia menetelmiä. (6)

### *Neonataaliseulonta Suomessa*

Sosiaali- ja terveysministeriö (STM) teki vuonna 2015 suosituksen, jonka mukaan kaikille Suomessa syntyville lapsille tarjottaisiin tiettyjen synnynnäisten aineenvaihduntasairauksien seulontatutkimukset. Suositusta ennen seulottiin vain kilpirauhasen vajaatoimintaa vuodesta 1980 alkaen ja ulkomaalaistaustaisilta lapsilta fenyyliketonuria (PKU) 2000-luvusta alkaen. (7)

Kantapääveritälänäytteestä tehtävässä seulonnassa veripisara imeytetään imupaperiin ja kuivatetaan seulontakeskuksen analyysia varten. Seulontanäytteet otetaan kantapään sivusta vähintään 48 tunnin ikäiseltä vauvalta. Tällä hetkellä Suomessa seulottavista sairauksista kaikki muut sairaudet seulotaan tällaisesta kuivaverinäytteestä, mutta kilpirauhasen synnynnäinen vajaatoiminta edelleen napaverinäytteestä. (8)

Aineenvaihduntatautiin seulonta perustuu aineenvaihduntatuotteiden pitoisuuksien mittaamiseen verestä ja tuloksia verrataan laboratorion asettamiin viitearvoihin ja hälytysrajoihin seulottavassa populaatiossa. (8) Kaikki näytteet ympäri Suomen lähetetään tutkittaviksi ja analysoitaviksi Synnynnäisten aineenvaihduntasairauksien seulontakeskukseen SASKEen, Turkuun. Seulontatutkimuksiin osallistuminen on vapaaehtoista, mutta harvinaisten synnynnäisten aineenvaihduntasairauksien seulontaa suositellaan kaikille vastasyntyneille vauvoille.

Vaikka seulontatutkimukset ovat suuri taloudellinen investointi, tulisi kuitenkin moninkertaisesti kalliimmaksi hoitaa potilasta vasta oireiden ilmaantuessa. On arvioitu, että seulomalla 56 000 vastasyntynyttä voidaan löytää 5-10 harvinaista aineenvaihduntatautiin sairastavaa lasta, joista moni voisi välttää kuoleman tai vaikean vammautumisen. Seulonta Suomessa maksaa arviolta pari miljoonaa vuodessa, mutta yhdenkin sairaan hoitaminen vasta oireiden ilmaantuessa voi maksaa elinaikanaan jopa miljoonia euroja. (9) Seulonta on siis taloudellisesti kannattavaa ja lisäksi se luonnollisesti vähentää yksilölle aiheutuvaa kärsimystä.

### *Seulonnan periaatteet*

Neonataaliseulonta ei ole diagnostiikkaa, vaan diagnoosi voidaan tehdä vasta kliinisen tutkimuksen jälkeen. (8, 2) Tavoitteena on löytää sairaudet ennen kuin ne ehtivät aiheuttaa oireita tai vakavia komplikaatioita. Seulontaohjelmaan kuuluu kuitenkin vain pieni osa aineenvaihduntasairauksista, eikä toisaalta normaali seulontalöydös vielä sulje täysin pois sairauden mahdollisuutta. (8) Seulonta ei siis ole täysin aukoton.

Seulonnassa on tarkoituksena asettaa hälytysraja tasolle, jolla kaikki sairastuneet löytyisivät, mutta kuitenkin niin, että väärin positiivisten tuloksien määrä saataisiin minimoitua. Jos seulontaraja on asetettu oikein, tulee väistämättä myös vääriä positiivisia seulontatuloksia, jotta väärin negatiivisten määrä voitaisiin minimoida. (8) Poikkeavasta tuloksesta aiheutuva henkinen rasite potilaalle ja hänen

perheelleen tulee huomioida, ja siksi väärä positiivisia hälytyksiä pyritään välttämään. Mikäli seulonnan tulos on poikkeava, otetaan uusi varmistusnäyte ja sitten edetään diagnostisiin tutkimuksiin. Joissain tapauksissa lapsi on kutsuttava päivystykselliseen sairaalaan ja hoito on aloitettava välittömästi. Seulonnassa poikkeavan tuloksen saattaa aiheuttaa myös jokin muu, kuin juuri seulottava sairaus. Myös näiden oheislöydöksen havaitseminen on hyvä asia varhaisen hoidon aloittamiseksi. (8)

Tehokas ja toimiva seulonta vaatii hyvää yhteistyötä eri tahojen, kuten paikallisten terveydenhoitoalan ammattilaisten, koordinaattoreiden, seulontalaboratorion, seurantatutkimukset suorittavan laboratorion sekä kliinisen lääketieteen ammattilaisten välillä. Myös immunologian ammattilaisten välinen yhteistyö paikalliselle populaatiolle sopivan raja-arvon määrittämisessä on ensiarvoisen tärkeää. Hyvä kommunikaatio auttaa myös herkkyyden ja spesifisyyden parantamisessa, jatkotutkimuksien tekemisessä sekä tutkimuksen hinnan optimoinnissa. Tiedonvälityksen tulee olla katkeamatonta, jotta prosessin tehokkuus säilyy. (2)

### 2.3 SCID ja TREC

SCID ilmenee T-solulymfopeniana ja ensimmäiset tutkimusmenetelmät perustuivat koko veren lymfositimäärän mittaamiseen, mutta tämä menetelmä osoittautui epäherkäksi ja olisi vaatinut nestemäisen verinäytteen. Myös T-solujen virtaussytometriaa harkittiin sopivaksi tekniikaksi, mutta sen todettiin olevan liian aikaa vievää ja kallista. Lisäksi menetelmä vaatii nestemäisen verinäytteen. (6, 2) Muita T-solumarkkereita, kuten CD3-ketjuja ei myöskään ole tarpeeksi kuivatetussa veritaplanäytteessä. (2) TREC-menetelmä on sen sijaan osoittautunut tarkaksi, tehokkaaksi ja kohtuuhintaiseksi vaihtoehdoksi seulonnassa.

#### *TREC ja TCR-proteiinit*

SCID-seulonta perustuu PCR-tekniikkaan (polymerase chain reaction) sekä TREC, eli T-cell receptor excision circle -menetelmään, jonka esitteli ensimmäisen kerran Chan ja Puck vuonna 2005. (10) TREC:t ovat stabiileja rengasmaisia DNA-fragmentteja, joita muodostuu T-lymfosyyttien reseptoreita (TCR) koodaavien geenien uudelleenjärjestäytymisessä kateenkorvassa tapahtuvan lymfositien kypsymisen aikana. (1, 3) Ensimmäisen kerran TREC kuvattiin elektronimikroskoopilla vuonna 1982 ja ensimmäisen TREC-analyysin kehitti Douek et al. (6)

T-solujen monimuotoisuus perustuu erilaisiin T-solureseptoreihin (TCR), jotka ovat merkittävässä asemassa kehon omissa MHC-komplekseissa esiteltyjen vieraiden antigeenien tunnistamisessa. (2) TCR on heterodimeeri proteiini, joka koostuu kahdesta ketjusta ( $\alpha\beta$  tai  $\gamma\delta$ ), jotka pariutuvat lymfositin kypsymisprosessin aikana. Ihmisen T-soluista 95% on  $\alpha\beta$ -tyyppiä ja vain 5%  $\gamma\delta$ -tyyppiä. (3)

Jotta saadaan tuotettua mahdollisimman suuri määrä uniikkeja TCR:a, reseptoreja koodaavan DNA:n täytyy uudelleenjärjestäytyä kateenkorvan soluissa. Reseptorin geenien uudelleenjärjestäytymisen aikana DNA:han muodostuu kahden juosteen katkoksia (double strand breaks) ja eri TCR-geenisegmentit pääsevät yhdistymään. (2) Onnistuneen katkaisun ja liittämisen ansiosta segmenttien välistä poistuneita rengasmaisia DNA-fragmentteja kutsutaan nimellä TREC. (3) T-solujen esiasteet saavat prosessin lopputuloksena uudet uniikit TCR:t, T-solut jatkavat kypsymistään ja vapautetaan lopulta kateenkorvasta perifeeriseen verenkiertoon. (2)

Ihmisellä TCR  $\alpha$ -ketjun uudelleenjärjestäytyminen tapahtuu noin 80% kaikista T-lymfosyyteistä.  $\alpha$ -ketjun rekombinaatiossa syntyvät spesifiset TREC:t on havaittavissa qRT-PCR-menetelmällä (quantitative, real-time polymerase chain reaction) merkityillä alukkeilla. (3, 2) PCR:llä saadaan moninkertaistettua TREC:n lukumäärä, joten pienikin veritäplänäyte riittää tutkimuksen tekemiseen.

TREC:it eivät monistu T-lymfosyytin jakaantuessa tai ole taipuvaisia hajoamaan elimistössä, vaan ne kertovat luotettavasti kateenkorvassa tuotettujen naiivien T-solujen määrästä. Terveillä vastasyntyneillä TREC-arvo on yleensä korkea, mutta SCID:ä sairastavilla huomattavan matala. (3) Äidin T-solut eivät häiritse TREC-analyysia.

### *TREC-analyseissä huomioitavaa*

TREC-analyysi on seulontatutkimus. SCID-diagnoosin varmistamiseksi tulee tehdä myös virtaussytometriamittaus, jotta voidaan poissulkea muut T-lymfosytopeniat (1). Virtaussytometriseen tutkimukseen kuuluu kokonais-T-solujen (sekä CD4+ että CD8+), B-solujen ja NK-solujen määrät sekä erityisesti naiivien (CD45RA+) ja muisti-(CD45RO+) T-solujen prosenttiosuudet. Normaalisti vastasyntyneillä 90% T-soluista on naiiveja, mutta SCID-mutatoituneilla lapsilla lähes kaikki T-solut ovat muistisoluja (CD45RO+). (3) Sekä alhainen T-solujen absoluuttinen määrä että suhteellinen naiivien T-solujen määrä ovat molemmat epänormaaleja ja huolestuttavia löydöksiä. On myös huomioitava, että absoluuttinen lymfosyyttien kokonaismäärä saattaa olla SCID-potilaalla jopa normaali. Äitiperäiset lymfosyytit saattavat vaikeuttaa joskus tulkintaa. (5) Useimmiten geenitutkimus varmistaa diagnoosin.

Veritäplänäytteet tulee säilyttää pakastettuina DNA:n degeneroitumisen estämiseksi ja säilyvyyden takaamiseksi, mutta oikeaoppisesta kuljetuksesta ja säilytyksestä huolimatta TREC-arvo pienenee näytteen vanhetessa. Tämä tulee huomioida tutkimuksissa etenkin, jos näytteet ovat keskenään eri ikäisiä tai eri tavalla käsiteltyjä. TREC:n huonon säilyvyyden takia qRT-PCR:n voi tehdä myös  $\beta$ -aktiinille tai RNAasi P:lle templaatti-DNA:n integraation varmistamiseksi. (3)

Keskosuus on yksi iso riskitekijä alhaiselle TREC-arvolle. Monissa tutkimuksissa on osoitettu TREC-arvon olevan suoraan verrannollinen raskausviikkojen määrään. Alhaisia TREC-arvoja aiheuttaa myös Suomessa muuta maailmaa yleisempi rustohiushypoplasia (6), joka on virheellisen RNA-molekyylin aiheuttama monielinsairaus. Vaikean kasvuhäiriön lisäksi rustohiushypoplasiaan liittyy vakava immuunivaje, hematologisia ongelmia ja lisääntynyt syöpäriski (11). Alhaisia TREC-arvoja aiheuttaa myös muun muassa Downin syndrooma (21-trisomia) ja DiGeorgen syndrooma (22q11.2-deleetio). Kuitenkin vain osa DiGeorgen syndroomaa sairastavista lapsista jää kiinni TREC-menetelmään perustuvassa seulonnassa, sillä TREC-arvo riippuu lymfopenian laajuudesta. Muita T-lymfopeniaa aiheuttavia sairauksia ovat 18-trisomia, CHARGE-syndrooma, Jacobsenin syndrooma sekä muut primaarit immuunipuutokset, kuten ataksia-teleangiektasia ja CID (combined immunodeficiency diseases) (3,6).

T-solulymfopeniaa voi aiheuttaa myös sydänviat, ruoansulatuskanavan epämuodostumat, kylothorax (6) sekä monianomaliat. (3) Monissa tutkimuksissa on myös osoitettu TREC-arvon olevan suoraan verrannollinen raskausviikkojen määrään (13).

Myös äidin terveydentila voi näkyä vastasyntyneen alhaisena TREC-arvona. Äidin immunosuppressiivinen lääkitys, autoimmuunitauti tai HIV-infektio aiheuttavat alhaisen TREC-arvon



lapselle, kuten myös eräät lääkkeet, esimerkiksi ennenaikaisen synnytyksen estoon käytetty ritodriini. (6)

Sen sijaan TREC-menetelmällä ei löydetä tapauksia, joiden SCID perustuu molekulaariseen virheeseen, joka johtuu lymfosyyttien kypsyminenvaiheen häiriöstä. Tähän luokkaan kuuluvat Zap 70 -puutos, MHC II -puutos sekä jotkut ADA (adenosiinideaminaasientsyymi)-puutokset. TREC-menetelmä ei myöskään havaitse niitä T-solupuutoksia, joissa T-lymfosyyttien kvantitatiivinen määrä on normaali, mutta toiminta häiriintynyt. (6)

## 2.4 TREC maailmalla

Vuonna 2005 Kee Chan ja Jennifer Puck ehdottivat TREC-analyysin lisäämistä koko väestön seulontaohjelmaan. (6) SCID-seulontaa TREC-menetelmän avulla on aloitettu 2000-luvulla lisääntyvään tahtiin ympäri maailman.

Yhdysvalloissa ensimmäisenä seulonnan otti käyttöönsä Wisconsinin osavaltio vuonna 2008 ja samana vuonna suoritettiin onnistunut kantasolusiirto SCID-potilaalle. (6) Vuoden 2018 lopussa kaikissa 50 osavaltiossa sekä Puerto Ricossa seulottiin SCID jo kaikilta vastasyntyneiltä (2)

Elokuussa 2018 julkaistun artikkelin mukaan Amerikan lisäksi SCID-seulonta TREC-menetelmällä on otettu käyttöön myös Taiwanissa, Israelissa, Qatarissa, osassa Kanadan osavaltioita ja pian myös Uudessa-Seelannissa. Vuonna 2018 Euroopan maista Norja ja Hollanti seulovat kansallisesti SCID:a ja myös Katalonia seuloo sitä; muualla on edelleen käynnissä esitutkimuksia. Pilottitutkimuksia oli jo silloin käynnissä myös Italiassa, Ruotsissa, Saksassa, Alankomaissa, Japanissa, Ranskassa, Espanjassa, Norjassa, Iso-Britanniassa, Turkissa, Sloveniassa, Saudi-Arabiassa, Iranissa, Islannissa, Tanskassa ja Brasiliassa. (6)

Maissa, joissa verisukulaisuus on yleisempää, SCID-potilaita on merkittävästi enemmän. Useat SCID-tyypit ovat autosomaalisesti resessiivisesti periytyviä, joten niiden esiintyvyys kasvaa sukulaisten välisen avioliittojen myötä. Esimerkiksi Saudi-Arabiassa suvun sisäisiä avioliittoja on lähes 60%, joten SCID-potilaita on jopa 1:3000 syntyneellä lasta, kun taas esimerkiksi Yhdysvalloissa vastaava luku on noin 1:50 000. (4,5,12) SCID:n epidemiologia vaihtelee siis selvästi eri rotujen ja maantieteellisten alueiden välillä. Kehittyvissä maissa seulonta on harvinaisempaa, ja seulonta kattaa usein vain osan populaatiosta. Lisäksi, vaikka TREC-menetelmä on todettu länsimaissa kustannustehokkaaksi, on menetelmän hinta vakava ongelma kehittyvissä maissa (5).

### *TREC-tutkimus Yhdysvalloissa*

Kaliforniassa otettiin maaliskuussa 2016 käyttöön PerkinElmerin EnLite neonatal TREC kit ja vuonna 2017 asetettiin hälytysrajaksi jatkotutkimuksia varten 18 TREC-kopiota/ $\mu$ l. Elokuusta 2010 maaliskuuhun 2017 kerätyistä 3 252 156 neonataalinäytteestä vain 562:ssa oli epänormaali TREC-arvo ja heidät kutsuttiin virtausytometriin tutkimuksiin. Näistä potilaista 213:lla (38%) oli T-solulymfopenia (T-soluja  $>1500/\mu$ l) ja heistä 50:llä oli SCID. (2)

Kaikki seulonnassa löydetyt SCID-potilaat olivat terveitä diagnoosivaiheessa (iän keskiarvo diagnoosivaiheessa 21 päivää, vaihteluväli 0-40 päivää). Kaksi heistä oli hakeutunut hoitoon infektion

tai ihottuman takia ja yksi ruokahaluttomuuden, bronkioliitin ja leukopenian takia. Diagnosoiduista 49 hoidettiin allogeenisella hematopoieettisten kantasolujen siirrolla ja heistä 46 selvisi hengissä (94%). (2)

SCID-potilaiden tärkeimmät genotyypit olivat X-linkattu IL2RG (14 potilasta), ADA (9 potilasta, joilla yhdellä leaky SCID) ja RAG1 (8 potilasta, joista kuudella leaky SCID). Diagnosoiduista kahdella tiedettiin olevan kasvanut riski suvussa ja seitsemällä löydettiin retrospektiivisesti SCID:ä sairastaneita sukulaisia. Tutkimuksessa kaksi SCID-tapausta jäi tunnistamatta neonataaliseulonnassa, sillä tutkimusvaiheessa heidän TREC-arvonsa ylittivät selkeästi seulontarajat, mutta myöhemmällä iällä diagnosoidessa ne olivat laskeneet seulontarajan alle. Näitä tapauksia ei olisi voinut löytää kohtuullisella seulontarajan nostamisella, vaan nämä poikkeukset kertovat SCID:n suuresta mutaatio- ja fenotyypilajajuudesta. TREC on menetelmänä niin spesifi ja tarkka, että se ei ole lisännyt potilaiden perheiden ahdistusta. (2)

#### *TREC-tutkimus Hollannissa Ranskassa ja muualla Euroopassa*

Hollannissa tehtiin SCID-tutkimus, jossa tehtiin PerkinElmerin EnLite Neonatal TREC Kitillä analyysi 1295 kantapääveritaplanäytteelle. Näytteistä 39 (3,0%) jäivät seulontarajan (40 kopiota/ $\mu$ l) alle ja ne testattiin uudelleen. Uusintatestin jälkeen 21 tapausta osoittautui positiiviseksi ja heille tehtiin virtausytometriset tutkimukset tai geenisekvensointi. Seulontarajan todettiin kuitenkin olevan liian korkea, sillä rajan alle jäi liikaa vääriä positiivisia, joten sopivaksi seulontarajaksi valittiin 22 kopiota/ $\mu$ l. Tutkimuksessa selvitettiin myös säilytyksen vaikutus TREC-arvon pienenemiseen vertailemalla kahden viikon, kuukauden, kolmen kuukauden ja vuoden vanhoja näytteitä, jotka säilytettiin jääkaapissa. (1)

Ranskassa suoritettiin suuri DEPISTREC-tutkimus, jossa seulottiin 200 000 vauvaa sekä verrattiin heitä kontrolliryhmään, jossa oli 28 SCID-potilasta, jotka oli diagnosoitu ilman seulontaa saman ajanjakson aikana. Tutkimuksessa käytettiin myös PerkinElmerin EnLite Neonatal TREC Kittä. Ensimmäiseksi seulontarajaksi asetettiin 35 kopiota/ $\mu$ l, jonka alittavat näytteet testattiin uudelleen. Mikäli kaksi kolmesta näytteestä alitti toisen seulontarajan (21 kopiota/ $\mu$ l) ja havaittiin beeta-aktiinin (BTA) normaali amplifikaatio näytteen hyvän laadun merkinä, seulontatulokset tulkittiin positiiviseksi ja otettiin yhteyttä primaarisiin immuunipuutoksiin erikoistuneeseen pediatriin, joka teki lisätutkimukset. (13)

Ranskalaistutkimuksessa menetelmän herkkyys määritettiin 20 kontrollin avulla, joista kaikista otettiin kolme TREC-arvoa. Kaikki arvot alittivat seulontarajan (21 kopiota/ $\mu$ l) ja yksi oli seulontarajalla. 18 TREC-arvoa oli hyvin lähellä nollaa. (13)

190 517 seulottavasta 139 oli positiivisia ja 291 epävarmoja, jotka kutsuttiin uuteen näytteenottoon. Heistä 26 osoittautui uusintatestissä positiiviseksi. Yhteensä positiivisia oli siis 165 potilasta ja heistä kolmella diagnosoitiin SCID. (13)

Samanlaisella menetelmällä on tehty tutkimuksia myös muissa maissa. Alankomaissa Blom asetti seulontatutkimuksessaan TREC-hälytysrajaksi 22 kopiota/ $\mu$ l (1), Adams Iso-Britanniassa 20 kopiota/ $\mu$ l (14) ja Rehavi Israelissa 23 kopiota/ $\mu$ l (15). Eri maissa on kuitenkin hieman eri käytännöt uusintanäytteen ottamiselle ja jatkotutkimuksen järjestämiselle.

## **2.5 Suomen tilanne**

Suomessa aloitettiin vastasyntyneiden seulonta jo lähes 40 vuotta sitten kilpirauhasen toimintahäiriöiden seulomisella napaverinäytteestä laboratoriokokein. Vuosina 2007-2013 TYKS:ssä

toteutettiin Neopilot-tutkimus (VSSH Eettinen tmk 2006/§272), jossa kerättiin näytteet noin 30 000 vastasyntyneeltä, joiden perheiltä oli saatu vapaaehtoinen tutkimuslupa. Näytteistä seulottiin laajasti eri aineenvaihduntasairauksia. Nykyisin Suomessa otetaan vauvoista 2-5 vuorokauden iässä verinäyte, josta seulotaan 22 erilaista vakavaa aineenvaihduntasairautta, joihin kuuluu aminohappojen, orgaanisten happojen ja rasvahappojen aineenvaihdunnan häiriöitä, endokrinologisia sairauksia sekä ureasyklin häiriöitä. Seulottavat sairaudet on valittu yhteistyössä seulontakeskus SASKE:n, laboratorioden sekä hoitavien ja diagnosoivien lääkäreiden kesken. Samankaltainen käytäntö on myös muissa Pohjoismaissa sekä niiden ulkopuolella, vaikkakin seulottavien sairauksien määrä vaihtelee maittain. (8)

Aineenvaihduntasairauksien seulontaan osallistuminen on vapaaehtoista, mutta erittäin suositeltavaa hyvän kattavuuden takaamiseksi. Perheeltä ei tarvita kirjallista suostumusta, vaan suullinen suostumus riittää, sillä seulontatutkimuksesta ei ole katsottu aiheutuvan haittaa potilaalle ja sen voi katsoa kuuluvan vastasyntyneen lapsen oikeuksiin. Halutessaan perhe voi kuitenkin kieltäytyä seulonnasta. (8)

Seulontaan valitaan sairaudet pitkän harkinnan ja tutkimuksien perusteella huomioiden sekä yksilön saama hyöty ja yhteiskunnalle tulevat kustannukset. Seulottavien sairauksien listaa muokataan jatkuvasti ja viime vuosikymmeninä onkin ollut keskustelua SCID:n lisäämisestä suomalaiseen seulontaohjelmaan (8). SCID:n seulonta on onnistuneesti käynnissä jo monessa eri maassa, ja samaa TREC-menetelmää voisi soveltaa Suomessakin.

### 3 Tutkimuksen tarkoitus

Tutkimuksen tarkoituksena on tutkia EnLite Neonatal TREC -kitin sopivuutta SCID-seulonnan metodiksi ja erityisesti TREC-kopioiden seulontarajan asettamista, jotta SCID:n lisäämistä suomalaiseen harvinaissairauksien seulontaohjelmaan voitaisiin harkita.

### 4 Materiaalit ja menetelmät

Tutkimus on osa Neopilot-hanketta, jossa on kerätty vuosina 2007-2013 syntyneiltä vauvoilta kantapäöveritiplänäytteet, joista seulotaan harvinaisia aineenvaihduntasairauksia. Veritiplänäytteet on kerätty niiltä vastasyntyneiltä 2-5 vuorokauden ikäisenä, joiden perheet ovat antaneet tutkimusluvan.

Tutkimuksessa oli mukana 6000 vauvaa, jotka olivat syntyneet v. 2011-2012. Valitsimme em. ajankohdan, jotta tiedot tutkittavien lasten mahdollisista infektiosairastavuuksista olisivat mahdollisimman kattavat ja lasten seuranta oli siis riittävän pitkä (vähintään 6 vuotta).

Poimimme tutkimukseen mukaan vauvat, joiden TREC-arvo oli alle 30 kopiota/ $\mu$ l ja valitsimme heille verrokkit (2 verrokkiä/tutkittava), joilla olisi mahdollisimman sama syntymäpäivä, raskausviikkojen kesto sekä sukupuoli.

Pseudoanonymisoidut potilastiedot tutkimusta varten pyydettiin Turun CRC:ltä. Tutkimusryhmä ei tutustunut tutkittavien sairauskertomusjärjestelmän potilastietoihin, vaan tutkimus tehtiin siis anonymisoidusti. Potilaista kerättiin TREC-arvot, raskausviikot, kaikki diagnoosit, kaikki osastohoitojaksot sekä hoitokäynnit, kaikki tehdyt laboratoriotutkimukset sekä syntymäpainon. Osalla potilaista ei ollut lainkaan diagnooseja tai sairaalakäyntejä ja vain osalla oli tutkittu laboratoriossa leukosyyttien kokonaismäärä sekä erittelylaskenta.

TREC-analyysit tehtiin TYKS:ssä, Synnynnäisten aineenvaihduntasairauksien seulontakeskus SASKE:ssa keväällä 2018 PerkinElmerin EnLite Neonatal Kitillä. Mittauksissa käytetty fluorometri oli PerkinElmerin Victor Enlite. Näytteet oli säilytetty näytteenotosta laboratoriotutkimuksiin pakastettuina. Kontrolleista otettiin yksi TREC-arvo ja tapauksista otettiin kolme peräkkäistä TREC-arvoa, joiden keskiarvoa käytettiin analysoinnissa. Lisäksi näytteistä mitattiin beeta-aktiiniarvot, joilla varmistettiin näytteen laatu sekä monistuksen onnistuminen.

Potilasdataa työstettiin Microsoft Excel Officella, jonka avulla laskettiin myös keskiarvot sekä keskihajonnat. Tilastollisiin testeihin käytettiin ohjelmaa JMP Pro, Version 13 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).



Kuva 2: Lähde: SASKE

## 5 Tilastolliset analyysit

Tapauksiksi poimittiin ne potilaat, joiden TREC-arvo oli alle 30 kopiota/ $\mu\text{l}$ . Lisäksi heiltä mitattiin samasta imupaperista 2 uutta TREC-arvoa. Heille kullekin pyrittiin valitsemaan kaksi samalla raskausviikolla syntynyttä kontrollia mahdollisimman läheltä samaa syntymäpäivää.

TREC-arvojen asettuminen normaalijakauman mukaisesti tutkittiin Shapiro-Wilk W testillä. TREC-arvoista laskettiin keskiarvo (mean), jota käytettiin tilastollisiin testeihin. TREC-arvot vertailtavissa ryhmissä on ilmoitettu mediaaneina (Md) sekä ala- ja yläkvartaaleina (Q1, Q3), sillä kontrollien osalta arvot eivät noudattaneet normaalijakaumaa. Vertailuun tapauksien ja kontrollien välillä käytettiin Wilcoxon rank sum 2-sample T-testiä.

Sukupuoli oli kategorinen muuttuja ja määrät on ilmoitettu prosenttiosuuksina (%).

Diagnoosien lukumäärää vertailtiin tapauksien ja kontrollien välillä Wilcoxon rank sum 2-sample T-testillä. Tutkimuksessa selvitettiin myös ICD-10-järjestelmän mukaisten H65- sekä H66-alkuisten infektioiden, eli korvatulehduksien, sekä J-alkuisten, eli hengitystietulehduksien lukumäärät sekä niiden väliset erot ryhmien välillä. Vertailuun käytettiin Pearsonin testiä.

Osastovuorokausien tai hoitokäyntien lukumäärä ei noudattanut normaalijakaumaa, joten analysointiin käytettiin mediaania (Md) sekä ala- ja yläkvartaaleja (Q1, Q3). Vertailu ryhmien välillä suoritettiin Wilcoxon rank sum 2-sample T-testillä.

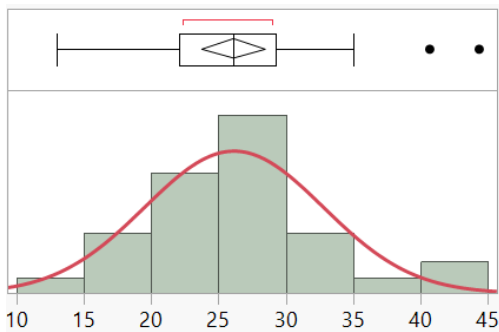
Lymfosyyttien absoluuttinen määrä laskettiin kertomalla lymfosyyttien suhteellinen osuus leukosyyttien kokonaismäärällä. Lymfoosyyttien absoluuttiset määrät eivät noudattaneet normaalijakaumaa, joten tunnuslukuna käytettiin mediaania (Md) sekä ala- ja yläkvartaaleja (Q1, Q3). Vertailu ryhmien välillä suoritettiin Wilcoxon rank sum 2-sample T-testillä.

Tutkimme niiden lasten, joilla seurannassa oli >100 diagnoosia, sairaudet sekä lymfosyyttien kokonaismäärät ja suhteelliset osuudet.

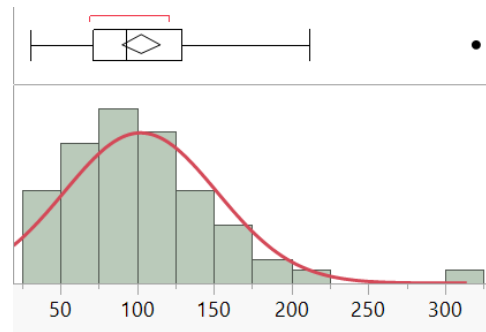
Tilastollisesti merkitseviksi tulkittiin arvot, joiden  $p < 0,05$ .

## 6 Tulokset

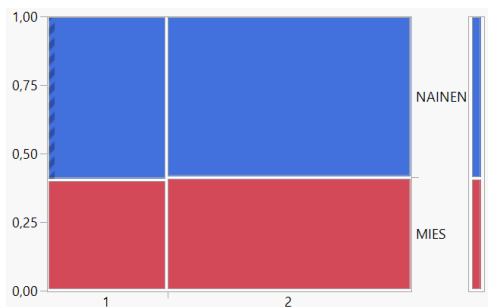
TREC-arvojen osalta tapaukset noudattivat normaalijakaumaa (Shapiro-Wilk W test,  $p = 0,37$ ), mutta kontrollit eivät noudattaneet normaalijakaumaa (Shapiro-Wilk W test,  $p < 0,001$ ). Tapauksien TREC-arvojen mediaani oli 26,2 kopiota/ $\mu\text{l}$  (Q1 = 22,1; Q3 = 29,2) ja kontrollin mediaani 93 kopiota/ $\mu\text{l}$  (Q1 = 71; Q3 = 128) TREC-arvojen ero ryhmien välillä oli tilastollisesti merkitsevä (Wilcoxon rank sum 2-sample T-test,  $p < 0,001$ ).



Kuva 3: Tapauksien TREC-keskiarvot



Kuva 4: Kontrollien TREC-keskiarvot

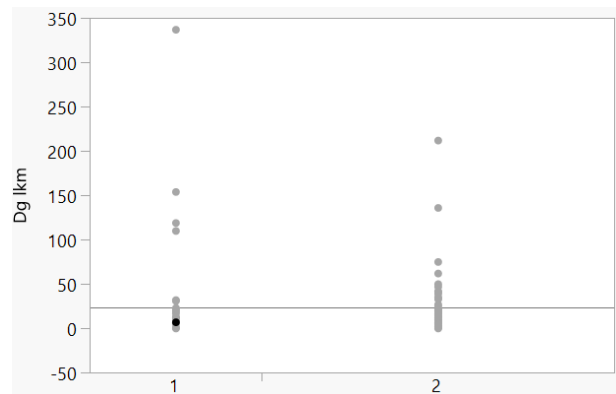


Kuva 5: Sukupuolijakauma tapauksilla (1) ja kontrolleilla (2).

Tutkittavia oli yhteensä 97, joista tapauksia oli 32 ja kontrolleja 65. Tapauksista 13 (40,6 %) oli poikia ja 19 (59,4 %) tyttöjä. Kontrolleista 27 (41,5 %) oli poikia ja 38 (58,5 %) tyttöjä.

Laskimme jokaisen potilaan osalta diagnoosikoodien lukumäärät yhteen. Diagnoosien lukumäärien ei voitu katsoa noudattavan normaalijakaumaa.

Tapauksien (1) diagnoosien lukumäärien mediaani oli 13 (Q1 = 2, Q3 = 22,5) ja kontrollien (2) mediaani oli 9 (Q1= 2,5, Q3 = 22). Ero ryhmien välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää (Wilcoxon rank sum 1-Way test, ChiSquare Approximation  $p = 0,61$ ).



Kuva 6: Diagnoosikoodien yhteenlasketut lukumäärät tapauksilla (1) ja kontrolleilla (2).

ICD-10-järjestelmän mukaiset H65- ja H66- alkuiset, välikorvatulehduksiin viittaavat, diagnoosit laskettiin yhteen kunkin potilaan osalta ja vertailimme diagnoosien lukumääriä tapauksien (1) ja kontrollien (2) välillä. Ero ryhmien välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää H65-diagnoosien (Pearson test, ChiSquare Approximation,  $p = 0,34$ ) eikä H66-diagnoosien osalta (Pearson test, ChiSquare Approximation,  $p = 0,78$ ).

Count	0	1	3	4	5	18	Total
Total %							
Col %							
Row %							
1	25	3	0	0	0	0	28
2	51	1	2	1	1	1	57

Kuva 7: H65-alkuisten diagnoosikoodien yhteenlasketut lukumäärät tapauksilla (1) ja kontrolleilla (2).

Count	0	1	2	3	4	5	6	8	12	16	22	26	Total	
Total %														
Col %														
Row %														
1		19	0	4	0	1	0	1	1	0	1	1	0	28
2		38	1	8	1	2	2	1	2	1	0	0	1	57

Kuva 8: H66-alkuisten diagnoosikoodien yhteenlasketut lukumäärät tapauksilla (1) ja kontrolleilla (2).

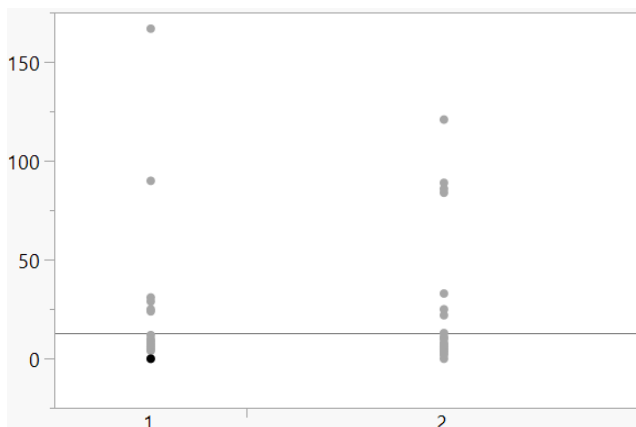
Myös ICD-10-järjestelmän mukaiset J- alkuiset, hengitystietulehduksiin viittaavat, diagnoosit laskettiin yhteen kunkin potilaan osalta ja vertailimme diagnoosien lukumääriä tapauksien (1) ja kontrollien (2) välillä. Ero ryhmien välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevä (Pearson test, ChiSquare Approximation,  $p = 0,19$ ).

Count	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	15	16	17	28	29	Total	
Total %																	
Col %																	
Row %																	
1		14	3	1	5	0	0	1	1	2	0	0	0	0	1	0	28
2		29	7	4	3	6	1	1	0	0	2	1	1	1	0	1	57

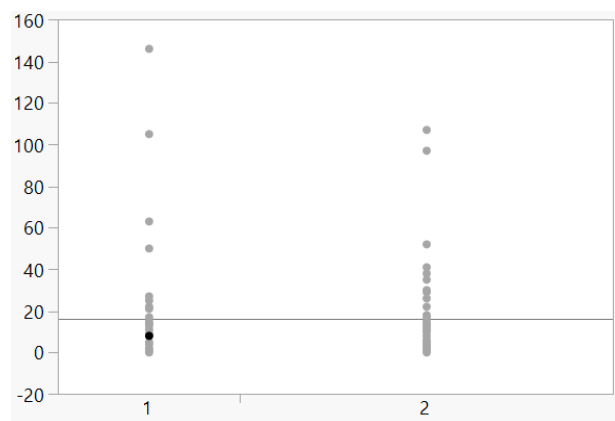
Kuva 9: J-alkuisten diagnoosikoodien yhteenlasketut lukumäärät tapauksilla (1) ja kontrolleilla (2)

Laskimme yhteen kaikkien potilaiden osastolla viettämät vuorokaudet ja vertailimme lukumääriä ryhmien välillä. Osastovuorokausien lukumäärät ei voitu katsoa noudattavan normaalijakaumaa. Tapauksien osastovuorokausien mediaani oli 5 (Q1 = 4, Q3 = 9,75) ja kontrollien mediaani oli 5 (Q1 = 3, Q3 = 8). Vuorokausien lukumäärillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa (Wilcoxon Rank Sum, 1-Way Test, ChiSquare Approximation,  $p = 0,56$ ).

Kultakin potilaalta laskettiin myös yksittäisten hoitokäyntien lukumäärät yhteen ja niitä vertailtiin ryhmien välillä. Käyntien lukumäärien ei voitu katsoa noudattavan normaalijakaumaa. Tapauksien hoitokäyntien mediaani oli 11 (Q1 = 4,25, Q3 = 20) ja kontrollien mediaani oli 8 (Q1 = 2, Q3 = 17,5). Hoitokäyntien lukumäärillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa (Wilcoxon Rank Sum, 1-Way Test, ChiSquare Approximation,  $p = 0,44$ ).

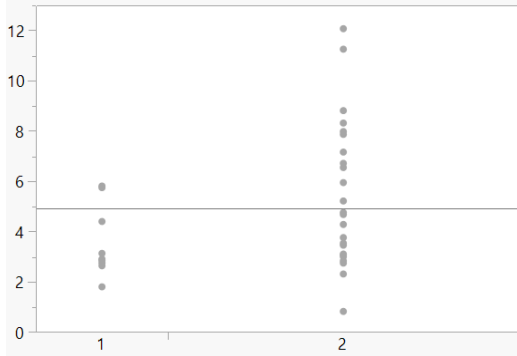


Kuva 10: Osastovuorokausien lukumäärät tapauksilla (1) ja kontrolleilla (2).



Kuva 11: Hoitokäyntien lukumäärät tapauksilla ja kontrolleilla (2).

Lymfosyyttien absoluuttiset lukumäärät viimeisimmän mittauksen perusteella eivät myöskään noudattaneet normaalijakaumaa. Tapauksista vain 9 potilaalta oli mitattu lymfosyytit ja heidän mediaaninsa oli 2,904 (Q1 = 2,6965, Q3 = 5,076). Kontrolleista mittaus oli tehty 24 potilaalle ja heidän mediaaninsa oli 4,719 (Q1 = 3,077, Q3 = 7,696). Ero ryhmien välillä oli lähes tilastollisesti merkitsevä (Wilcoxon Rank Sum, 1-Way Test, ChiSquare Approximation, p = 0,052).



Kuva 12: Lymfosyyttien absoluuttinen lukumäärä tapauksilla (1) ja kontrolleilla (2).

Tutkimme tarkemmin lapsia, joilla oli seurannan aikana yli 110 diagnoosikoodia. Heitä oli kaikkiaan kuusi, joista neljällä TREC-arvo oli alle 30 ja kahdella yli 30. Heistä kolme oli pikkukeskosia ja muilla kolmella oli perussairaus. Yksikään potilaista ei sairastanut seurannan aikana poikkeavan paljon infektiota. Yhdellä lapsista lymfosyyttimäärä oli  $< 2,5 \times 10^9$ . Hänellä oli vain 2 infektiosta johtuvaa poliklinikakäyntiä 6 vuoden aikana eikä yhtään osastohoitoa vaativaa infektiota.

Potilas	TREC	Dg lkm	Merkittävät diagnoosit	Leuk määritysikä	Leuk (x10e9)	Lymf (x10e9)	Lymf-%
1	28	337	Aineenvaihduntatauti	6 kk	7,2	4,7	65
2	25	154	Pikkukeskonen	3 kk	10,9	7,5	69
3	18	119	Pieni syntymäpaino, suolistosairaus	2 pv	7,5	1,8	24
4	27	110	Kehitysvamma	2 pv	9,1	2,8	31
5	562	136	Pikkukeskonen	3 kk	9,1	6,2	68
6	109	212	Pikkukeskonen	8 kk	10,9	7,6	70

## 7 Pohdinta

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää TREC-kopiomäärään perustuvan SCID-seulonnan soveltuvuutta suomalaisaineistossa. Tutkittavat olivat Neopilot-tutkimukseen osallistuneita vastasyntyneitä VSSHP:sta, joiden dataa käsiteltiin pseudoanonymisoidusti.

Tapauksiksi poimittiin ne potilaat, joiden ensimmäinen mitattu TREC-arvo oli alle 30. Heille tehtiin samasta imupaperista kaksi lisämittausta ja kaikkien kolmen mittauksen keskiarvoa käytettiin analyysissä. Osalla tapauksista kaksi muuta arvoa olivat selkeästi korkeampia, jolloin tulosten keskiarvo ylitti 30 (yhteensä 3 potilasta). EnLite kitin valmistaja ehdottaa seulontarajaksi 36 kopiota/ $\mu$ l, mutta suosittelee jokaisen laboratorion selvittävän oman sopivan seulontarajansa vähintään 3000 näytteen perusteella. (10) Päädyimme seulontarajaan 30 muiden länsimaissa tehtyjen pilottitutkimuksien perusteella, sillä raja 30 ei uskottu olevan ainakaan liian alhainen. Halusimme asettaa rajan riittävän korkealle, jottei yksikään positiivinen näyte jäisi havaitsematta.

Kun TREC-seulontaraja asetettiin arvoon 30kopiota/ $\mu$ l, emme havainneet tilastollisesti merkitseviä eroja ryhmien välille tutkimissamme arvoissa: infektioiden määrä, hoitokarjojen määrä tai diagnoosien



lukumäärä 6 ikävuoteen mennessä. Tämän perusteella, että hälytysraja 30 kopiota/ $\mu$ l on liian korkea seulonnan toteuttamiseksi, sillä rajan alle jäisi liian paljon vääriä positiivisia tuloksia.

Veritäplänäyteliuskosten säilytys saattaa alentaa TREC-arvoa, joten vanhemmista veritäplänäytteistä on saatettu saada todellista pienempi arvo. Koska tapauksille on valittu kontrollit mahdollisimman läheltä samaa syntymäpäivää, ei näytteiden iällä kuitenkaan ole merkitystä vertailuissa. Tapauksilla ja heidän kontroleillaan on siis yhtä vanhat veritäplänäytteet, joten todennäköisesti heidän TREC-arvonsa ovat laskeneet yhtä paljon.

Tutkittavien sukupuolijakauma oli hieman naisvoittoinen, mutta se ei vaikuttanut tutkimustuloksiin. Pyrimme valitsemaan tapauksille kontrollit samalta raskausviikolta, samaa sukupuolta ja mahdollisimman lähellä samaa syntymäpäivää, mutta yhdelle tapaukselle jouduimme valitsemaan eri sukupuolta olevan kontrollin. Tästä johtuu prosenttien suuruinen ero tapauksien ja kontrollien sukupuolijakaumien välillä.

Diagnoosien lukumäärien vaihteluväli oli 0-337. Monella potilaalla oli sama diagnoosi useampaan kertaan, millä voi diagnoosista riippuen olla vaikutusta. Olimme erityisen kiinnostuneita yleisistä lasten infektioista, kuten välikorvatulehduksista ja siksi vertailimme erikseen ICD-10-luokituksen mukaan H65- ja H66-alkuisia välikorvan tulehdusten sekä J-alkuisia hengitystietulehdusten diagnoosimääriä ryhmien välillä, mutta tilastollisesti merkitsevää eroa ei tullut. Alhaisempi TREC-arvo, kun hälytysrajana on 30 kopiota/ $\mu$ l, ei siis korreloinut välikorvatulehdusten tai hengitystietulehdusten lukumäärään potilaalla.

Useat monen osastohoitovuorokauden ja hoitokäynnin potilaat olivat syntyneet keskosina, joka luonnollisesti lisää sairaalahoidon määrää, mikä näkyy suurempina osastohoitovuorokausien sekä hoitokäyntien lukumäärinä.

B-Leuk ja B-Diffi oli mitattu vain yhdeksältä tapaukselta ja 24 kontrollilta, mikä on hyvin pieni osa 97 potilaasta. Tapauksien lymfosyyttimäärien mediaani oli  $2,9 \times 10^9/l$ , kun taas kontrollien  $4,7 \times 10^9/l$  ja ero ryhmien välillä oli lähes tilastollisesti merkitsevä.

Poimimme ne potilaat, joilla oli yli 100 diagnoosikoodia ja perehdyimme heidän diagnoosiansa laatuun sekä leukosyytti- ja lymfosyyttiarvoihin. Kuudesta potilaasta yksi kuului kontrolliryhmään ja muut tapauksiin. Yhdelläkään potilaalla ei kuitenkaan ollut SCID:iin viittaavia tuloksia.

Suurin osa yli sadan diagnoosin potilaista oli pikkukeskosia tai pienikokoisia syntyessään, mikä on yhteydessä suurempaan hoidettavien sairauksien sekä sairaalavuorokausien määrään. Huomioimme diagnoosien määrässä kaikki merkityt diagnoosikoodit, vaikka sama koodi toistuisi useamman kerran. Diagnoosien määrän tulkintaa vaikeuttaa se, että lukumäärä nousee jotain perussairautta sairastavilla helposti hyvin suureksi, sillä diagnoosikoodi liitetään jokaiseen käyntiin uudelleen.

Tutkimuksen erityinen vahvuus on iso, noin 6000 vauvan aineisto, jossa oli paljon myös alhaisia TREC-arvoja. Lisäksi kahden verrokin valitseminen yhden sijaan lisää ryhmien välisen eron luotettavuutta. Kattavaan potilastietojärjestelmään on kerätty kaikki diagnoosit, hoitokäynnit ja käynnit yhteen ja potilaiden seuranta-aika on ollut pitkä, vähintään 6 vuotta. Kaikki laboratoriotutkimukset suoritettiin samassa laboratoriossa samana ajankohtana keväällä 2018, mikä lisää tulosten luotettavuutta.

Vaikka tutkimusaineisto on iso, on SCID kuitenkin niin harvinainen sairaus Suomessa, ettei yksikään todellinen SCID-potilas todennäköisesti osu 6000 seulottavaan. Muita tutkimuksen heikkouksia ovat veritäplänäytteiden säilytykseen liittyvät mahdolliset ongelmat, sillä TREC-arvojen tiedetään pienenevän asianmukaisessa pakastesäilytyksessäkin DNA:n degeneroitua. Tätä muutosta on vaikea huomioida analyyseissä eri ikäisten näytteiden välillä. Lisäksi vain pieneltä osalta potilaista oli mitattu lymfosyyttiarvot, joten analyysi täytyi tehdä pienellä aineistolla, mikä heikentää tuloksen luotettavuutta.

## **8 Johtopäätökset:**

Tutkimuksen tulosten perusteella hälytysraja 30 kopiota/ug näyttää olevan kansallisen seulonnan aloittamisessa liian korkea. Jopa 0,5% näytteistä jäisi tämän rajan alle ja hälytyksiä tulisi 250 vuodessa koko Suomessa, vaikka todellisia hälyttäviä tapauksia lienee vain muutama. Tämä aiheuttaisi paljon lisäkustannuksia sekä stressiä potilaiden perheille. Muut maat ovat laskeneet hälytysrajaa selkeästi alemmas, mikä näyttäisi meilläkin järkevältä. Kuitenkin vasta riittävän pitkä kansallinen seulonta osoittaa sopivan hälytysrajan.

## 9 Lähteet

- (1) Blom M, Pico-Knijenburg I, Sijne-van Veen M, Boelen A, Bredius RGM, van der Burg M, Schielen PCJl. An evaluation of the TREC assay with regard to the integration of SCID screening into the Dutch newborn screening program. *Clinical Immunology* 2017 Jul;180:106-110
- (2) Jennifer M. Puck. Newborn screening for severe combined immunodeficiency and T-cell lymphopenia. *Immunological Reviews*, 2019 Jan;Vol 287, Issue 1:241-252
- (3) Routes J, Verbsky J. Newborn screening for severe combined immunodeficiency. *Curr Allergy Asthma Rep* 2018 May 10;18(6):34
- (4) Veronica Mugarab Samedi, Amy, Shafey, Essa Al Awad, Luis Murguia Favela. Immunological emergency in neonate: case report and role of early screening. *Am J Perinatol Rep* 2018;8:e134-e137
- (5) Ceren Can, Şahin Hamilçikan, Emrah Can. Early diagnosis of severe combined immunodeficiency (SC)D in Turkey: a pilot study. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2018 Dec;31(24):3238-3242. Epub 2017 Aug 29
- (6) Jovanka R. King, Hammarström L. Newborn screening for primary immunodeficiency diseases: history, current and future practice. *Journal of Clinical Immunology* 2018 38:56-66
- (7) STM tiedote: STM suosittelee synnynäisten aineenvaihduntasairauksien seulonnan laajentamista. <[https://stm.fi/artikkeli/-/asset\\_publisher/stm-suosittelee-synnynnaisten-aineenvaihduntasairauksien-seulonnan-laajentamista](https://stm.fi/artikkeli/-/asset_publisher/stm-suosittelee-synnynnaisten-aineenvaihduntasairauksien-seulonnan-laajentamista)> 18.1.2019
- (8) Lapatto R, Niinikoski H, Näntö-Salonen K, Mononen I. Vastasyntyneiden aineenvaihduntasairauksien seulonta. *Duodecim* 2018;134:263-9
- (9) Autti-Rämö I, Laajalahti L, Koskinen H, ym. Helsinki: Vastasyntyneiden harvinaisten aineenvaihduntatautiin seulonta. *FinOHTA:n raportti 22/2004*
- (10) Chan K, Puck JM. Development of a population-based newborn screening for severe combined immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115(02):391-398
- (11) Taskinen M, Mäkitie O. Rusto-hiushypoplasia – vaikea kasvuhäiriö ja paljon muuta. *Duodecim* 2011;127(3):273-9
- (12) Hamoud Al-Mousa, Ghadah Al-Dakheel, Amal Jabr, Fahd Elbadaoui, Mohamed Abouelhoda, Mansoor Baig, Dorota Monies, Brian Meyer, Abbas Hawwari, Majed Dasouki. High incidence of several combined immunodeficiency disease in Saudi Arabia detected through combined T cell receptor excision circle and next generation sequencing of newborn dried blood spots. *Front Immunol*. 2018 Apr 16;9:782
- (13) Audrain M, Léger A, Hémond C, Mirallié S, Cheillan D, Rimbart M, Thuaut A, Sébille-Rivain V, Prat A, Pinel E, Divry A, Dert C, Fournier M, Thomas C. Newborn screening for severe combined immunodeficiency: Analytic and clinical performance of the T cell receptor excision circle assay in France (DEPISTREC study). *Journal of Clinical Immunology* 2018 Oct;38(7):778-786. Epub 2018 Sep p24.
- (14) Adams SP, Rashid S, Premachandra T, Harvey K, Ifederu A, Wilson MC. Screening of neonatal UK dried blood spots using a duplex TREC screening assay. *Journal of Clinical Immunology* 2014;34:323-330
- (15) Rechavi E, Lev A, Saraf-Lavy T, Etzioni A, Almashanu S, Somech R. Int. Newborn Screening for severe combined immunodeficiency in Israel. *J Neonatal Screen* 2017;3:13
- (16) Shearer et al. Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age: The pediatric AIDS clinical trials group P1009 study. *J of Allergy and Clinical Immunology* 2003 Nov;112(5):973-80