

Fenilalanin ve Tirozin Düzeyinin Plazma ve Kuru Kan Damlası Örneklerinde Karşılaştırılması

Comparison of Phenylalanine and Tyrosine Level in Plasma and Dry Blood Drop Samples

Halil Kazanasmaz* Meryem Karaca** Ataman Gönel***

* Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye

** Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Pediatrik Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye

*** Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye

Başvuru Tarihi: 20 Haziran 2018

Kabul Tarihi: 12.09.2018

ÖZET

Amaç: Doğumsal metabolik hastalıkların tanısında, aminoasit çeşitlerinin ve miktarlarının doğru analizi çok önemlidir. Fenilalanin metabolizma bozukluğu ön tanısıyla birinci basamak sağlık kuruluşlarından gönderilen olguların kuru kan damlası örneği ve plazmasından elde edilen sonuçlar, sıvı kromatografi tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) yöntemi ile karşılaştırıldı.

Gereç ve Yöntem: Kuru kan damlası örneği ve plazmadan elde edilen fenilalanin (Phe), tirozin (Tyr) ve Phe / Tyr ölçümleri LC-MS/MS yöntemiyle karşılaştırıldı.

Bulgular: Kuru kan damlası örneğiyle belirlenen ≥ 108.49 $\mu\text{mol/L}$ Phe kesme değeri için % 97.3 duyarlılık ve % 97.4 özgüllük saptandı (EAA: 0.997, $p < 0.0001$). Plazma ile belirlenen ≥ 116.96 $\mu\text{mol/L}$ Phe kesme değeri için % 97.3 duyarlılık ve % 100 özgüllük saptandı (EAA: 0.998, $p < 0.0001$). Bland Altman analizinde plazma Phe değerleri kuru kan damlası örneği Phe değerlerinden ortalama 1.3 $\mu\text{mol/L}$ daha yüksek iken, plazma Tyr değerleri ise kuru kan damlası örneğinden elde edilen değerlerden ortalama 0.5 $\mu\text{mol/L}$ daha yüksekti. Passing Bablok regresyon analizinde plazma ve kuru kan damlası örneğinden elde edilen Phe, Tyr ve Phe/Tyr değerleri arasında anlamlı bir farklılık yoktu ($p > 0.05$).

Sonuçlar: Bizim çalışmamızda, benzer Phe, Tyr, Phe/Tyr seviyeleri, hem plazma hem de kuru kan damlası örneğinden % 95 güven aralığında LC-MS/MS yöntemi ile ölçülebilmektedir. Yapılan ROC analizinde kuru kan damlası örneğinden elde edilen sonuçların klinik açıdan yeterli özgüllük ve duyarlılığa sahip olduğu düşünülmüştür. Yenidoğan tarama programlarında ve HPA vakalarının takibinde LC-MS/MS yönteminin kullanılmasının yararlı olabileceği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Kuru kan örneği, hiperfenilalaninemi, tandem kütle spektrometresi, yöntem karşılaştırma

Yazışma adresi: Halil Kazanasmaz

Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-4671-4028>

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye

e-mail: kazanasmazhalil2@gmail.com

ABSTRACT

Purpose: The correct analysis of types and amounts of amino acids is highly important in the diagnosis of inborn errors of metabolism. The results obtained from heel blood drop and plasma of patients who were referred from primary health care institutions with pre-diagnosis of phenylalanine metabolism disorder were compared with liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method.

Materials and Methods: The phenylalanine (Phe), tyrosine (Tyr) and Phe / Tyr measurements obtained from the dry blood drop sample and plasma were compared by the LC-MS / MS method.

Results: For the ≥ 108.49 $\mu\text{mol/L}$ phenylalanine (Phe) cut-off value determined by dry blood drop sample, 97.3% sensitivity and 97.4% specificity were determined (AUC: 0.997, $p < 0.0001$). For the ≥ 116.96 $\mu\text{mol/L}$ Phe cut-off value determined by plasma, 97.3% sensitivity and 100% specificity were determined (AUC: 0.998, $p < 0.0001$). In the Bland Altman analysis, plasma Phe values were higher than dry blood drop sample Phe values by an average of 1.3 $\mu\text{mol/L}$, while plasma tyrosine (Tyr) values were higher by an average of 0.5 $\mu\text{mol/L}$ than dry blood drop sample values. There was no significant difference between Phe, Tyr and Phe/Tyr values obtained from plasma and dry blood drop sample in Passing Bablok regression analysis ($p > 0.05$).

Conclusions: In our study, similar Phe, Tyr, Phe/Tyr levels could be measured by LC-MS / MS method in 95% confidence interval from both plasma and dry blood drop sample. In the ROC analysis performed, the results obtained from the dry blood drop sample were thought to have sufficient specificity and sensitivity in clinical terms. It is thought that using LC-MS/MS method in newborn screening programs and following HPA cases may be beneficial.

Key Words: Dry blood sample, hyperphenylalaninemia, tandem mass spectrometry, method comparison

GİRİŞ

Fenilketonuri (PKU), fenilalanin hidroksilazı (PAH) kodlayan genlerdeki çeşitli mutasyonlardan kaynaklanan, fenilalanin (Phe) metabolizmasının doğuştan gelen otozomal resesif (OR) geçişli bir hastalıktır. PAH normalde Phe'yi ortamda kofaktör tetrahidrobiopterin, moleküler oksijen ve demir bulunmak koşuluyla tirozine (Tyr) dönüştürür (1). Phe metabolizma bozuklukları (FMB) kanda ve beyinde Phe konsantrasyonunda ciddi bir artışa sebep olur, ki bu durum yenidoğan döneminde tedavi edilmezse dikkat eksikliği belirtileri ve ciddi entelektüel bozukluklar da dahil olmak üzere çeşitli nörokognitif ve nöromotor bozukluklara sebep olabilir (2-5). FMB hafif hiperfenilalaninemiden (HPA) klasik PKU'ya kadar değişebilen geniş bir klinik yelpazede karşımıza çıkabilmektedir (5). Yenidoğan tarama programlarındaki (YTP) veriler dikkate alındığında FMB prevalansının çeşitli bölgelerde değişkenlik gösterdiği görülmüştür (örneğin Finlandiya'da 1.000.000 doğumda bir iken Türkiye'de 4200 doğumda bir gibi) (5,6).

FMB, normal bir protein içeren diyet sözkonusu olduğunda kan Phe konsantrasyon-

larına göre sınıflandırılabilir (5,7). Bu sınıflamaya göre: Klasik PKU (Phe ≥ 1200 $\mu\text{mol/L}$; % 1'den az rezidüel PAH aktivitesi), hafif PKU ve ya HPA (Phe 600-1200 $\mu\text{mol/L}$; rezidüel PAH aktivitesi % 1-5 arasında), non-PKU-HPA ve ya ılımlı HPA (Phe 600-120 $\mu\text{mol/L}$; > % 5 rezidüel PAH aktivitesi) şeklinde gruplar tanımlanmıştır (2,5,7).

1960'lı yıllarda Guthrie ve ark. (8) tarafından HPA'yı saptamak için bakteriyel inhibisyon analizine dayanan basit bir test geliştirilmesiyle birlikte PKU, YTP'de erken tespit edilip tedavi edilebilen ilk hastalık olmuştur. Bu tarama testi kullanılarak PKU'lu yenidoğanların saptanması, erken tedavi ile birleştiğinde PKU ile ilişkili bilişsel bozuklukların sıklığında azalmalara sebep olmuştur (9). Zaman içerisinde teknolojik gelişmelerle birlikte fluorometrik immün analiz (FIA) ve tandem kütle spektrometri (MS/MS) yöntemlerinin tarama programlarında kullanılması daha hassas ve duyarlı ölçümlerin yapılabilmesine olanak sağlamıştır (10,11). Günümüzde MS/MS yöntemiyle topuktan alınan kuru kan örneğinde Phe düzeyi FIA yöntemine göre hem daha hassas bir şekilde ölçülmekte hem de eş zamanlı Tyr düzeyi hakkında bilgi de vermektedir (12). Gün-

müzde MS/MS yöntemiyle eş zamanlı olarak birçok farklı hastalık tespit edilebildiğinden daha maliyet etkin bir yöntem olarak birçok gelişmiş ülkede YTP'de kullanılmaktadır(12-14).

Aminoasidlerin çeşitlerinin ve miktarlarının doğru analiz edilmesi, doğumsal metabolik hastalıkların tanısında son derece önemlidir. Günümüzde aminoasid analizi (AAA) için kullanılan analitik yöntemler incelendiğinde yüksek performanslı sıvı kromatografisi kütle spektrometresi (HPLC/MS), gaz kromatografi kütle spektrometresi (GC/MS) gibi kombine yöntemler karşımıza çıkmaktadır (15). LC-MS kütle spektrometresi (MS) ile sıvı kromatografinin (LC) birleşimidir. Yakın zamanda LC-MS yöntemi daha da geliştirilerek, bir kütle spektrometre cihazında iki kütle analizcisini içeren yöntem kullanılmaya başlanmıştır. Sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) olarak adlandırılan bu yöntem sayesinde daha hızlı ölçümler yapılmış, özgüllük ve duyarlılık açısından daha üstün sonuçlar elde edilmiştir (16-18). Bu çalışmada LC-MS/MS yöntemiyle kuru kan damlası örneği ve plazmadan elde edilen Phe ve Tyr düzeyi ölçümlerinin arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu kesitsel çalışma 01.01.2017-31.12.2017 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir. Birinci basamak sağlık kuruluşlarından FMB açısından şüpheli görülüp (FIA yöntemiyle kuru kan damlası örneğinde $>120 \mu\text{mol/L}$ Phe düzeyi tespit edilmesi) pediatrik metabolik hastalıklar kliniğine yönlendirilen 224 hasta çalışmaya dahil edildi. MS/MS analizi için filtre kağıdına alınan kuru kan damlası örnekleri plazma örnekleriyle birlikte eş zamanlı olarak alındı. Tüm numuneler alındıktan hemen sonra analiz edildi. Kuru kan damlası ve plazma örneklerinden yapılan kütle spektrometrik aminoasid analizleri çoklu reaksiyon izleme (MRM) yöntemi vasıtasıyla çalışıldı.

LC-MS/MS kuru kan damlası numune alım ve çalışma protokolü

Filtre kağıdının üretici talimatlarına uygun olarak topuk derisinden numune alımı ger-

çekleştirildi. Plaka kuyucuklarına, 3 mm çapındaki filtre kağıdından (Whatman filter paper 10538018) kuru kan örneği alındı. 200 μl tandem ISTD (internal standart) eklendi. Plaka 30 dakika 500 rpm'de oda ısısında karıştırıcıya koyuldu. Oluşan supernatant yeni kuyucuklara alındı ve azot gazı altında kurutulmaya bırakıldı. Kurutma işlemi bittikten sonra 60 μl türevlendirici ajan (LOT: AS-14061 Immuchrom GmbH, Heppenheim, Germany) eklendi ve 15 dakika 60 °C'de inkübasyona alındı. Azot gazı altında numuneler tekrar kurutuldu. Kurutma işlemi bittikten sonra 100 μl rekonstrüksiyon reaktifi (LOT: AS-14061 Immuchrom GmbH, Heppenheim, Germany) eklenip triple quadripole SHIMADZU LC-MS/MS 8040 cihazında çalışmaya alındı. Standart konsantrasyonlar Phe için 16-129 $\mu\text{mol/L}$ değer aralığındayken Tyr için 32-275 $\mu\text{mol/L}$ değer aralığındaydı. İnternal standart: alanin, arjinin, asparajin, glutamik asit, glisin, valin, lösin, lizin, fenilalanin, tirozin, serin, prolin, ornitin triptofan ve treonin aminoasidlerini içermekteydi.

LC-MS/MS plazma AAA numune alım ve çalışma protokolü

Plazma AAA için venöz kan (2 mL) örnekleri heparinize tüpe alınıp santrifüj edildi. Santrifüj edilen plazmadan 50 μl alınıp tüpe (Eppendorf AG, Hamburg, Almanya) konulduktan sonra üzerine 50 μl aminoasid ISTD (internal standart) eklenip beş saniye süreyle vortekslendi. Son aşamada 700 μl R-1 (Reagent 1) eklenip tekrar beş saniye süreyle vorteksledikten sonra 10000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Oluşan supernatant alınıp vial tüpüne konulduktan sonra triple quadripole SHIMADZU LC-MS/MS 8045 cihazında çalışmaya alındı. Standart konsantrasyonlar Phe için 31-92 $\mu\text{mol/L}$ değer aralığındayken Tyr için 14-114 $\mu\text{mol/L}$ değer aralığındaydı. İnternal standart: alanin, arjinin, asparajin, glutamik asit, glisin, valin, lösin, lizin, fenilalanin, tirozin, serin, prolin, ornitin triptofan ve treonin aminoasidlerini içermekteydi.

Dahil edilme ve dışlama kriterleri

Günümüzde YTP'lerde MS/MS yöntemi önerilmekte ve ılımlı HPA için kanda herhangi bir

Phe >120 µmol/L değeri anlamlı kabul edilmektedir (2). Birinci basamak sağlık kuruluşlarından FMB ön tanısıyla yönlendirilen hastaların LC-MS/MS yöntemiyle plazmasından ya da kuru kan damlası örneğinden elde edilen ölçümlerin en az biriyle Phe >120 µmol/L tespit edilenler pozitif olarak kabul edilip takip altına alındı. Çalışmaya dahil edilen hastalarda laboratuvar hatasını dışlamak için Phe kısıtlı diyet uygulanmayan pozitif gruptaki hastaların en erken bir ay sonra yapılan kontrol muayenelerinde plazma AAA'da Phe >120 µmol/L olanlar çalışma kapsamına dahil edilip Phe ≤120 µmol/L olan hastalar laboratuvar hatası olabileceğinden çalışma kapsamı dışında bırakıldı. Çalışmamızda sadece plazmadan ve ya sadece kuru kan damlası örneğinden elde edilen Phe değeriyle pozitif kabul edilen hastaların ayrıca Phe/Tyr oranı da dikkate alınmıştı (5). Sadece tek bir yöntemle pozitif kabul edilen tüm olguların hem plazma AAA hem de kuru kan damlası örneğinden bakılan Phe/Tyr oranı >3 iken negatif gruptaki olguların tamamında her iki yöntemle bakılan Phe/Tyr oranı <3 idi.

Verilerin Analizi

İstatistiksel analizler SPSS 24.0 versiyonu (SPSS Inc., Chicago, IL) paket programı kullanılarak yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler sayı, yüzde, ortalama ve standart sapma şeklinde özetlendi. Değişkenlerin normal dağılımına uygunluğu görsel (histogram ve olasılık grafikleri) ve Kolmogorov-Smirnov testi kullanılarak incelendi. Normal dağılım göstermeyen olguların analizi Mann Whitney U testi ve Wilcoxon işaretli sıra testi ile gerçekleştirildi. Özgüllük ve duyarlılık analizleri alıcı işlem karakteristiği (Receiver Operator Characteristic, ROC) çözümleme yöntemi ile gerçekleştirildi. Ordinal verilerin karşılaştırılmasında Pearson ki-kare analizi kullanıldı. Çalışmadaki analizlerde olasılık (p) değeri 0.05'ten küçük olduğu (p < 0.05) karşılaştırmalar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Normal dağılım göstermeyen parametrelerin arasındaki ilişki Spearman korelasyon testi ile incelendi. Passing-Bablok regresyon analizi (% 95 güven aralığında), yöntemler arasındaki sabit ve orantılı biasları değerlendirmek için Cusum testiyle birlikte kullanıldı.

Yöntemler arasındaki farklılık ve biasları değerlendirmek için ayrıca Bland-Altman grafiği kullanıldı. Bland Altman ve Passing Bablok analiz ve grafikleri MedCalc yazılımı (version 9.2.0.1, MedCalc Software, Ostend, Belgium) kullanılarak gerçekleştirildi.

SONUÇLAR

Birinci basamak sağlık kuruluşlarından FMB şüphesiyle tarafımıza yönlendirilen 224 hasta çalışmaya dahil edildi. Olguların kliniğimize başvuru anındaki ortalama yaşı 4.32 ± 4.38 ay idi. Olguların % 52.2'si erkek iken % 47.8'i kız cinsiyetteydi. LC-MS/MS yöntemiyle plazmadan ve kuru kan damlası örneğinden eş zamanlı elde edilen sonuçlara göre FMB olan (klasik-hafif PKU ve HPA) 73 hasta pozitif grup olarak değerlendirilirken her iki yöntemle tespit edilen Phe <120 µmol/l olan 151 hasta negatif grup olarak değerlendirildi. LC-MS/MS yöntemiyle 65 olgu hem plazma AAA'dan hem de kuru kan damlası örneğinden elde edilen sonuçlarla pozitif kabul edilirken, üç olgu yalnızca kuru kan damlası örneğinden, beş olgu da yalnızca plazma AAA'dan elde edilen sonuçlarla pozitif kabul edildi. Pozitif grupla negatif grubun cinsiyet dağılımı benzer özellikteydi (Tablo 1). FMB şüphesiyle kliniğimize yönlendirilen 224 olgunun Phe düzeyleri incelendiğinde: dokuz hasta (% 4) klasik PKU (Phe ≥ 1200 µmol/L), bir hasta (% 0.4) hafif PKU (Phe 600-1200 µmol/L), 63 hasta (% 28.1) HPA (Phe 600-120 µmol/L), 151 hasta (% 67.4) ise PKU negatif (Phe <120 µmol/L) olarak değerlendirildi. Buna göre pozitif grupta anne-baba arasındaki akraba evliliği oranı % 78.1 iken negatif grupta % 29.8 idi (Tablo 1). Pozitif grupta negatif gruba göre anne-baba arasındaki akraba evliliği oranı anlamlı olarak daha yüksekti (Tablo 1)

Birinci basamak sağlık kuruluşlarından YTP ile kliniğimize yönlendirilen 224 hastanın 73'ünde (% 32.6) FMB mevcuttu. FMB olan 73 hastanın LC-MS/MS yöntemiyle plazmadan ve kuru kan damlası örneğinden elde edilen sonuçlarının klinik karşılaştırması için ROC eğrisi çizildi. Kuru kan damlası örneğiyle elde edilen değerlerde eğri altındaki alan (EAA): 0.996, $p < 0.0001$ olarak tespit edildi. Buna göre kuru kan damlası örneğin-

den elde edilen sonuçlarla belirlenen ≥ 108.49 $\mu\text{mol/L}$ Phe kesim noktası için duyarlılık ve özgüllük değeri sırasıyla % 97.3 ve % 97.4 idi (Tablo II). Plazma AAA yöntemiyle EAA: 0.998, $p < 0.0001$ olarak tespit edilirken ≥ 116.96 $\mu\text{mol/L}$ Phe kesim noktası için duyarlılık ve özgüllük değeri sırasıyla % 97.2 ve % 100 idi (Tablo 2).

Olguların kuru kan damlası örneği ve plazma AAA ile ölçülen Phe düzeyi, Tyr düzeyi ve Phe/Tyr oranları arasında pozitif bir ilişki mevcut olup spearman korelasyon katsayısı değerleri sırasıyla 0.996, 0.949 ve 0.993 ($p < 0.0001$) idi (Tablo 3). Olguların kuru kan damlası örneği ve plazma AAA ile bakılan Phe düzeyi, Tyr düzeyi ve Phe/Tyr oranı için yapılan Wilcoxon işaretli sıralar testinde arada anlamlı farklılık yoktu (Tablo 3).

Olguların her iki yöntemle bakılan Phe değerleri için %95 uyumluluk sınırında Bland Altman analizi yapıldı. Analiz sonucunda plazma AAA ile bakılan Phe düzeyi kuru kan

damlası örneğinden elde edilen sonuçlardan ortalama 1.3 $\mu\text{mol/L}$ daha yüksek bulundu (Şekil 1). Olguların her iki yöntemle bakılan Tyr değerleri için yapılan Bland Altman analizinde plazma AAA ile bakılan Tyr düzeyi kuru kan damlası örneğinden elde edilen sonuçlardan ortalama 0.5 $\mu\text{mol/L}$ daha yüksek bulundu. Olguların her iki yöntemle bakılan Phe/Tyr oranı için yapılan Bland Altman analizinde ise grafikte ortalama değer sıfır olarak görüldü (Şekil 1). Passing Bablok regresyon analizinde Plazma AAA ve kuru kan damlası örneğinden elde edilen Phe düzeyleri için bakılan CUSUM testi p değeri 0.86 olarak tespit edildi ve yöntemler arasındaki farklılık anlamlı bulunmadı (Şekil 2, Tablo 4). Passing Bablok regresyon analizinde plazma AAA ve kuru kan damlası örneğinden elde edilen Tyr düzeyleri ve Phe/Tyr oranları için CUSUM testi p değeri 0.53 olup yöntemler arasındaki farklılık anlamlı bulunmadı (Şekil 2, Tablo 4).

Tablo 1. Olguların sosyodemografik ve klinik özellikleri
Table 1. Sociodemographic and clinical features of cases

	Pozitif grup (Phe >120 $\mu\text{mol/L}$)(n=72)			Negatif grup (Phe <120 $\mu\text{mol/L}$)(n=151)	*P değeri
	Klasik PKU (n=9)	Hafif PKU (n=1)	İlimli HPA (n=62)		
Cinsiyet E/K	7/2	1/-	80/72	56/47	0.887
Ortalama yaş/ay	3.19 \pm 1.56	1	3.33 \pm 3.90	4.78 \pm 4.52	-
Anne-baba akraba Evet/Hayır	9/-	0/1	40/12	45/106	<0.001
Plazma AAA Phe düzeyi($\mu\text{mol/L}$)	1695.56 \pm 269.30	713.4	194.06 \pm 78.72	60.83 \pm 22.58	-
Plazma AAA Phe/Tyr oranı	30.57 \pm 9.78	15.51	2.71 \pm 1.39	0.85 \pm 0.39	-

*: Pearson ki-kare testi pozitif grupla negatif grup arasında 2x2 şeklinde gerçekleştirildi; AAA: Aminoasit analizi

Tablo 2. Phe metabolizma bozukluğu klinik tanısında kullanılan test yöntemlerinin karşılaştırması
Table 2. Comparison of test methods used in the clinical diagnosis of Phe metabolism disorder

	Eğri altındaki alan (EAA)	Kesim Noktası ($\mu\text{mol/L}$)	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	P
Kuru kan damlası örneği Phe	0.997	108.49	97.3	97.4	<0.0001
Plazma AAA Phe	0.998	116.96	97.3	100	<0.0001

Phe: Fenilalanin; Tyr:Tirozin; Kuru kan damlası örneği: Tandem kütle spektrometresi yöntemiyle topuk derisinden elde edilen numuneye Phe düzeyi ölçme; Plazma AAA: Venöz kandan elden edilen plazmadan tandem kütle spektrometresi yöntemiyle Phe düzeyi ölçme

Tablo 3. Olguların kuru kan damlası örneği ve plazmasından elde edilen ortalama laboratuvar ölçümleri arasındaki ilişki
Table 3. The relation between the mean laboratory measurements of dry blood drop sample and plasma of cases

	Ortalama ±SS	Minimum-Maksimum	Wilcoxon işaretli sıralar testi p değeri	Spearmen korelasyon testi	
				Korelasyon katsayısı (R)	p değeri
Plazma Phe (µmol/L)	166.90±328.85	22.40-2270	0.517	0.938	<0.0001
Kuru kan damlası örneği Phe (µmol/L)	165.62±328.19	25.26-2350			
Plazma Tyr (µmol/L)	83±45.85	20.15-431.15	0.637	0.905	
Kuru kan damlası örneği Tyr (µmol/L)	82.55±43.40	22.04441.80			
Plazma Phe/Tyr oranı	2.63±6.20	0.11-45.86	0.643	0.958	<0.0001
Kuru kan damlası örneği Phe/Tyr oranı	2.61±6.16	0.14-46.63			

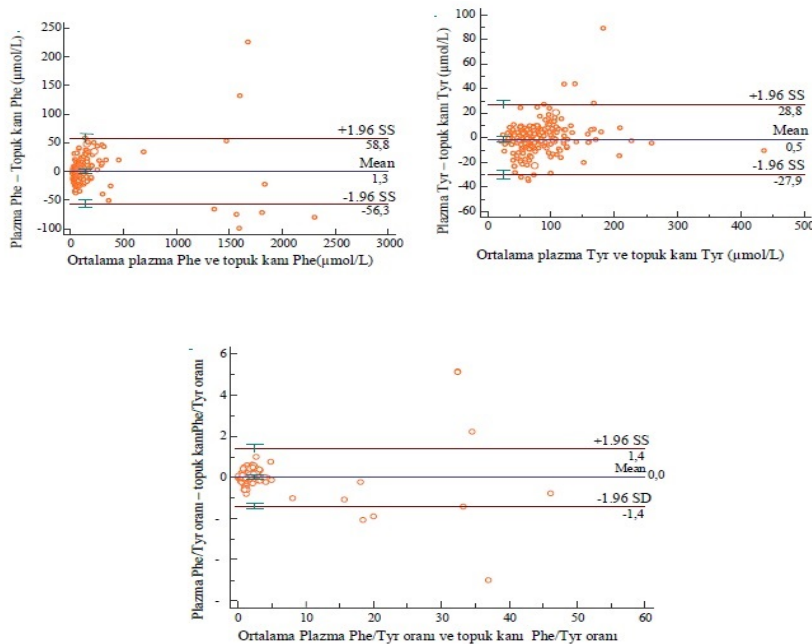
Phe: Fenilalanin; Tyr: Tirozine; SS: Standard sapma

Tablo 4. Olguların plazmasından ve kuru kan damlası örneğinden elde edilen ölçümlerin Passing-Bablok regresyon analizi.

Table 4. Passing-Bablok regression analysis of the measurements obtained from the plasma and dry blood drop samples of the cases.

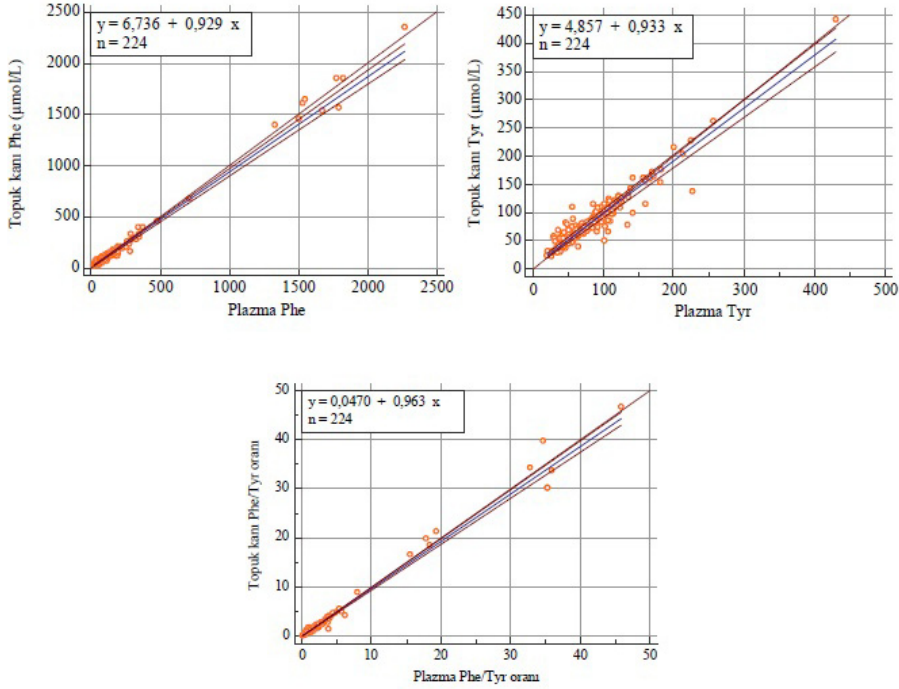
Parametreler (n=224)	P-B Regresyon Denklemi*	Slope (b) 95% CI	Intercept (a) 95% CI	CUSUM testi P değeri
Phe düzeyi (µmol/L)	$y = 6.73 + 0.92x$	0.89-0.96	3.49-10.48	0.86
Tyr Düzeyi (µmol/L)	$y = 4.85 + 0.93x$	0.88-0.97	2.29-7.75	0.53
Phe/Tyr oranı	$y = 0.04 + 0.96x$	0.93-0.99	0.01-0.07	0.53

*:P-B Regresyon Denklemi, $y = bx + a$ 'dır. Bu denklemde y karşılaştırmak istediğimiz yöntem olan kuru kan damlası örneğidir. X ise referans kabul ettiğimiz yöntem olan plazma AAA yöntemidir. CUSUM testinde elde edilen p değeri <0.05 olduğu zaman her iki yöntemle yapılan ölçümler arasındaki farkın anlamlı olduğu kabul edilmektedir.



Şekil 1. Kuru kan damlası örneği ve plazmadan elde edilen ölçümlerin Bland-Altman analiziyle karşılaştırılması.

Figure 1. Comparison of dry blood drop sample and plasma measurements with Bland-Altman analysis.



Şekil 2. Kuru kan damlası örneği ve plazmadan elde edilen ölçümlerin Passing-Bablok analiziyle karşılaştırılması.
Figure 2. Comparison of dry blood drop sample and plasma measurements with Passing-Bablok analysis.

TARTIŞMA

PKU önlenabilir mental ve motor geriliğin sık görülen nedenlerinden biridir ve bu yüzden dolayı hastalığın erken tespitiyle birlikte başlanan diyet ve/veya kofaktör tedavisi klinik açıdan son derece önemlidir (2). Günümüzde YTP'ler ABD'de, Kanada'da ve çoğu Avrupa ülkesinde MS/MS yöntemiyle yapılabilmektedir (14). Bununla birlikte bazı Afrika ve Latin Amerika ülkelerinde günümüzde hala etkin bir YTP yürütülememektedir (14). Türkiye'de ise PKU'ya yönelik YTP FIA yöntemiyle uygulanmaktadır (15). OR geçişli bir hastalık olan FMB'nin Türkiye gibi akraba evliliğinin sık olduğu coğrafi bölgelerde daha yaygın görüldüğü bilinmektedir (2,5,16,17). Çalışmamızda FMB olduğu düşünülen pozitif gruptaki olguların negatif gruba göre anne-baba akraba evliliği oranlarının daha sık olduğu görülmüştür.

PKU tanısındaki gecikmeler ciddi mental sorunlara yol açabileceğinden hastalığın erken tanısı son derece önemlidir (2,22). Gelişmiş ülkelerde YTP'ler kütle spektrometrisi ile

gerçekleştirilip olguların başarılı bir şekilde tanısı konmaktadır(14). Türkiye'de ise PKU tanısı için YTP, FIA yöntemiyle gerçekleştirilmektedir (19,20). Çalışmamızda FMB'li olguların takibinde kullanılan plazma AAA ile kuru kan damlası örneğinden LC-MS/MS yöntemiyle elde edilen ölçümler karşılaştırılmıştır. Plazma AAA sonuçları ile ROC eğrisinde elde edilen $\geq 116.96 \mu\text{mol/L}$ Phe kesim değeri için % 97.3 duyarlılık ve % 100 özgüllük tespit edilirken kuru kan damlası örneğinden elde edilen sonuçlar ile ROC eğrisinde $\geq 108.49 \mu\text{mol/L}$ Phe kesim değeri için % 97.3 duyarlılık ve % 97.4 özgüllük tespit edilmiştir. Elde edilen duyarlılık ve özgüllük oranlarına göre hem plazmadan hem de kuru kan damlası örneğinden elde edilen ölçümlerin klinik açıdan kabul edilebilir etkinlikte olduğu düşünülmüştür. Nitekim yöntemler arasındaki laboratuvar analiz sonuçları Passing-Bablok ve Bland Altman analizleriyle %95 uyumluluk sınırında karşılaştırıldığında aradaki farklılığın anlamlı olmadığı görülmüştür. Grosej ve ark. (23) tarafından yapılan bir çalışmada HPLC/MS yöntemiyle plazmadan ve kuru kan

damlası örneğinden elde edilen sonuçlar karşılaştırılmış ve kuru kan damlası örneğinden elde edilen ortalama Phe düzeyinin plazmadan elde edilen ölçümlere göre % 26 oranında daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Günümüzde MS/MS yöntemiyle MS yöntemine göre daha hızlı ve güvenilir laboratuvar sonuçlarının elde edilebildiği bilinmektedir (16,18). Nitekim çalışmamızda FMB'li olguların hem plazmasından hem de kuru kan örneğinden ölçülen ortalama Phe, Tyr, Phe/Tyr değerleri arasındaki farkın % 95 güven aralığında kabuledilebilir olduğu görülmüştür. Çalışmamızda bazı klasik PKU'lu olguların plazmasından ve kuru kan damlası örneğinden ölçülen yüksek Phe düzeylerinin güven aralığı dışında olduğu görülmüştür. (Şekil 1-2). Her iki yöntemde yüksek Phe düzeyleri için güven aralığı dışındaki bazı ölçümlerin varlığı, daha geniş olgu gruplarında yapılacak çalışmalarla araştırılması gerekmektedir.

SONUÇ

Çalışmamızda LC-MS/MS yöntemiyle hem plazmadan hem de kuru kan damlası örne-

ğinden % 95 güven aralığında benzer Phe, Tyr ve Phe/Tyr değerlerinin ölçülebildiği görülmüştür. Yapılan ROC analizinde kuru kan damlası örneğinden elde edilen ölçümlerin klinik açıdan yeterli özgüllük ve duyarlılığa sahip olduğu görülmüştür. HPA'nın klinik takibinde LC-MS/MS yönteminde Phe ve Tyr değerlerinin plazma yerine daha az invazif bir yöntem olan kuru kan damlası örneğinden elde edilmesinin klinik ve laboratuvar açıdan herhangi bir anlamlı farklılık oluşturmayacağı düşünülmüştür. Bununla birlikte HPA'lı olguların rutin takibinde kuru kan damlası örneğinden elde edilen sonuçların plazmadan elde edilen sonuçların yerine önerilebilmesi için çok daha geniş olgu gruplarında, çok merkezli çalışmaların yapılması gerekmektedir. Türkiye'de kuru kan damlası örneğinden elde edilen numunelerle yapılan YTP'de kullanılan mevcut FIA yönteminin yerine MS/MS yönteminin tercih edilmesiyle hem daha etkin hem de eş zamanlı birçok hastalığın değerlendirilebildiği daha kapsamlı bir tarama programı yürütülebilecektir.

KAYNAKLAR

1. Blau N, van Spronsen FJ, Levy HL. Phenylketonuria. *Lancet*. 2010;376(9750): 1417-27. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60961-0.
2. van Wegberg AMJ, MacDonald A, Ahring K, Bélanger-Quintana A, Blau N, Bosch AM, et al. The complete European guidelines on phenylketonuria: diagnosis and treatment. *Orphanet J Rare Dis*. 2017;12(1):162. doi: 10.1186/s13023-017-0685-2.
3. Al Hafid N, Christodoulou J. Phenylketonuria: a review of current and future treatments. *Transl Pediatr*. 2015;4(4):304-17. doi: 10.3978/j.issn.2224-4336.2015.10.07.
4. Berry SA, Brown C, Grant M, Greene CL, Jurecki E, Koch J, et al. Newborn screening 50 years later: Access issues faced by adults with PKU. *Genet Med*. 2013;15(8):591-9. doi: 10.1038/gim.2013.10.
5. Burgard P, Lachmann RH, Walter J. Hyperphenylalaninaemia. In: Saudubray, J. M, Van den Berghe, G. and Walter J. editor. *Inborn metabolic diseases: diagnosis and treatment 6th ed*. New York: Springer, 2016;253-4.
6. Yıldız Y, Dursun A, Tokatlı A, Coşkun T, Sivri HS. Late-diagnosed phenylketonuria in an eight-year-old boy with dyslexia and attention-deficit hyperactivity disorder. *Turk J Pediatr*. 2016;58(1):94-6.
7. Blau N, van Spronsen FJ. Disorders of phenylalanine and tetrahydrobiopterin metabolism. In: Blau N, Gibson KM, Dionisi-Vici C (eds.) *Physician's Guide to the Diagnosis, Treatment, and Follow-Up of Inherited Metabolic Diseases*. New York: Springer, 2014;3-21.
8. Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics*. 1963;32:338-43.
9. J.C. Dobson, M.L. Williamson, C. Azen, R. Koch, Intellectual assessment of 111 four year-old children with phenylketonuria, *Pediatrics*. 1977;60: 822-7.
10. Chace DH, Millington DS, Terada N, Kahler SG, Roe CR, Hofman LF. Rapid diagnosis of phenylketonuria by quantitative analysis for phenylalanine and tyrosine in neonatal blood spots by tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 1993;39:66-71.
11. Gerasimova NS, Steklova IV, Tuuminen T. Fluorometric method for phenylalanine microplate assay adapted for phenylketonuria screening. *Clin Chem*. 1989;35(10):2112-5.
12. Ceglarek U, Müller P, Stach B, Bührdel P, Thiery J, Kiess W. Validation of the phenylalanine/tyrosine ratio determined by tandem mass spectrometry: sensitive newborn screening for phenylketonuria. *Clin Chem Lab Med*. 2002;40(7):693-7.

13. Vockley J, Andersson HC, Antshel KM, Braverman NE, Burton BK, Frazier DM, et al. American College of Medical Genetics and Genomics Therapeutics Committee. Phenylalanine hydroxylase deficiency: diagnosis and management guideline. *Genet Med*. 2014;16(2):188-200. doi: 10.1038/gim.2013.157.
14. Therrell BL, Padilla CD, Loeber JG, Kneisser I, Saadallah A, Borrajo GJ, Adams J. Current status of newborn screening worldwide: 2015. *Semin Perinatol*. 2015;39(3):171-87. doi: 10.1053/j.semperi.2015.03.002.
15. Krumpochova P, Bruyneel B, Molenaar D, Koukou A, Wuhrer M, Niessen WM, Giera M. Amino acid analysis using chromatography-mass spectrometry: An inter platform comparison study. *J Pharm Biomed Anal*. 2015;114:398-407. doi: 10.1016/j.jpba.2015.06.001.
16. Uaariyapanichkul J, Chomtho S, Suphapeetiporn K, Shotelersuk V, Punnahitananda S, Chinjarempan P, et al. Age-Related Reference Intervals for Blood Amino Acids in Thai Pediatric Population Measured by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *J Nutr Metab*. 2018;2018:5124035. doi: 10.1155/2018/5124035.
17. Fingerhut R, Silva Polanco ML, Silva Arevalo Gde J, Swiderska MA. First experience with a fully automated extraction system for simultaneous on-line direct tandem mass spectrometric analysis of amino acids and (acyl-)carnitines in a newborn screening setting. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2014;28(8):965-73. doi: 10.1002/rcm.6856.
18. Zabielski P, Ford GC, Persson XM, Jaleel A, Dewey JD, Nair KS. Comparison of different mass spectrometry techniques in the measurement of L-[ring-(13)C6] phenylalanine incorporation into mixed muscle proteins. *J Mass Spectrom*. 2013;48(2):269-75. doi: 10.1002/jms.3120.
19. Tezel B, Dilli D, Bolat H, Sahman H, Ozbaş S, Acican D, Ertek M, Köse MR, Dilmen U. The development and organization of newborn screening programs in Turkey. *J Clin Lab Anal*. 2014;28(1):63-9. doi: 10.1002/jcla.21645.
20. Republic of Turkey Ministry of Health, Public Health Agency of Turkey, Child and Adolescent Health Department. <https://dosyaism.saglik.gov.tr/Eklenti/11173,259822214447pdf.pdf?0> Access Date: 26.05.2018
21. El-Metwally A, Yousef Al-Ahaidib L, Ayman Sunqurah A, Al-Surimi K, Househ M, Alshehri A, et al. The Prevalence of Phenylketonuria in Arab Countries, Turkey, and Iran: A Systematic Review. *BioMed Research International*. 2018;2018:1-12. <https://doi.org/10.1155/2018/7697210>
22. Mazlum B, Anlar B, Kalkanoğlu-Sivri HS, Karlı-Oğuz K, Özusta Ş, Ünal F. A late-diagnosed phenylketonuria case presenting with autism spectrum disorder in early childhood. *The Turkish Journal of Pediatrics*. 2016;58(3):318-22.
23. Groselj U, Murko S, Zerjav Tansek M, Kovac J, Trampus Bakija A, Repic Lampret B, et al. Comparison of tandem mass spectrometry and amino acid analyzer for phenylalanine and tyrosine monitoring--implications for clinical management of patients with hyperphenylalaninemia. *Clin Biochem*. 2015;48(1-2):14-8. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2014.09.014.