



---

UniversitätsKlinikum Heidelberg

# **Erfahrungen mit dem CF-Screening auf Basis verschiedener second tier-Verfahren (IRT/PAP vs. IRT/DNA) im Hinblick auf das zukünftige CF- Screeningprotokoll nach G-BA-Richtlinie**

**Jürgen G. Okun**

Dietmar-Hopp-Stoffwechszentrum

Stoffwechzellabor und Neugeborenenenscreening

Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, Klinik I, Universitätsklinikum Heidelberg



# Fokus

**CF-Screening im Überblick und im Hinblick auf das zukünftige Screeningprotokoll nach G-BA-Richtlinie:**

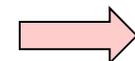
**Wie kam es zu dieser Screeningkombination?**

**Was bedeutet deren Umsetzung für den Laborablauf?**

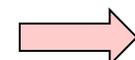


# Überblick Tagesprogramm

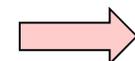
Uhrzeit	Referent	Thema
08.15 – 09.05	Dr. Hans-Wolfgang Schultis <i>Tagungspräsident</i>	Begrüßung Vorstellung-Diskussion der Poster Ausstellung
09.05 – 09.30	PD Dr. Jürgen Okun <i>Stoffwechszentrum Heidelberg</i>	Erfahrungen mit dem CF- Screening auf Basis verschie- dener second tier-Verfahren (IRT/PAP vs. IRT/DNA) im Hinblick auf das zukünftige CF-Screeningprotokoll nach G-BA-Richtlinie
09.30 – 09.55	Sophia Weidler <i>Universitätsklinikum Dresden</i>	Vergleich von Cut off-Kombi- nationen für IRT und PAP auf der Basis von 500.000 NGS mit 105 Patienten aus drei CF-Screeningzentren
09.55 – 10.20	Dr. Lutz Nährlich <i>OA Päd. Pneumologie, UKGM</i>	Konfirmationsdiagnostik bei positivem CF Screening
10.20 – 10.45	OÄ Dr. Jutta Hammer- mann, Christiane Herzog <i>Mukoviszidosezentrum Dresden</i>	Integrierte Betreuung betrof- fener Kinder
10.45 – 11.10	Dr. Cornelia Müller & Koll. <i>Universitätsmedizin Greifswald</i>	Ergebnisse des Mukoviszido- se-Screenings in Mecklen- burg-Vorpommern
11.10 – 11.30	Kaffeepause	
11.30 – 11.55	PD Dr. Matthias Kappler <i>CF Ambulanz LMU München</i>	Behandlungsmöglichkeiten der Mukoviszidose und Ihre Grenzen

 **Aktueller Stand zum CF-Screening**

 **Neue Cut off Strategie der ersten beiden Stufen**

 **Konfirmationsdiagnostik**

 **Betreuung und Therapie**

 **Erfahrungen mit dem CF-Screeningprozess**

 **Therapie**

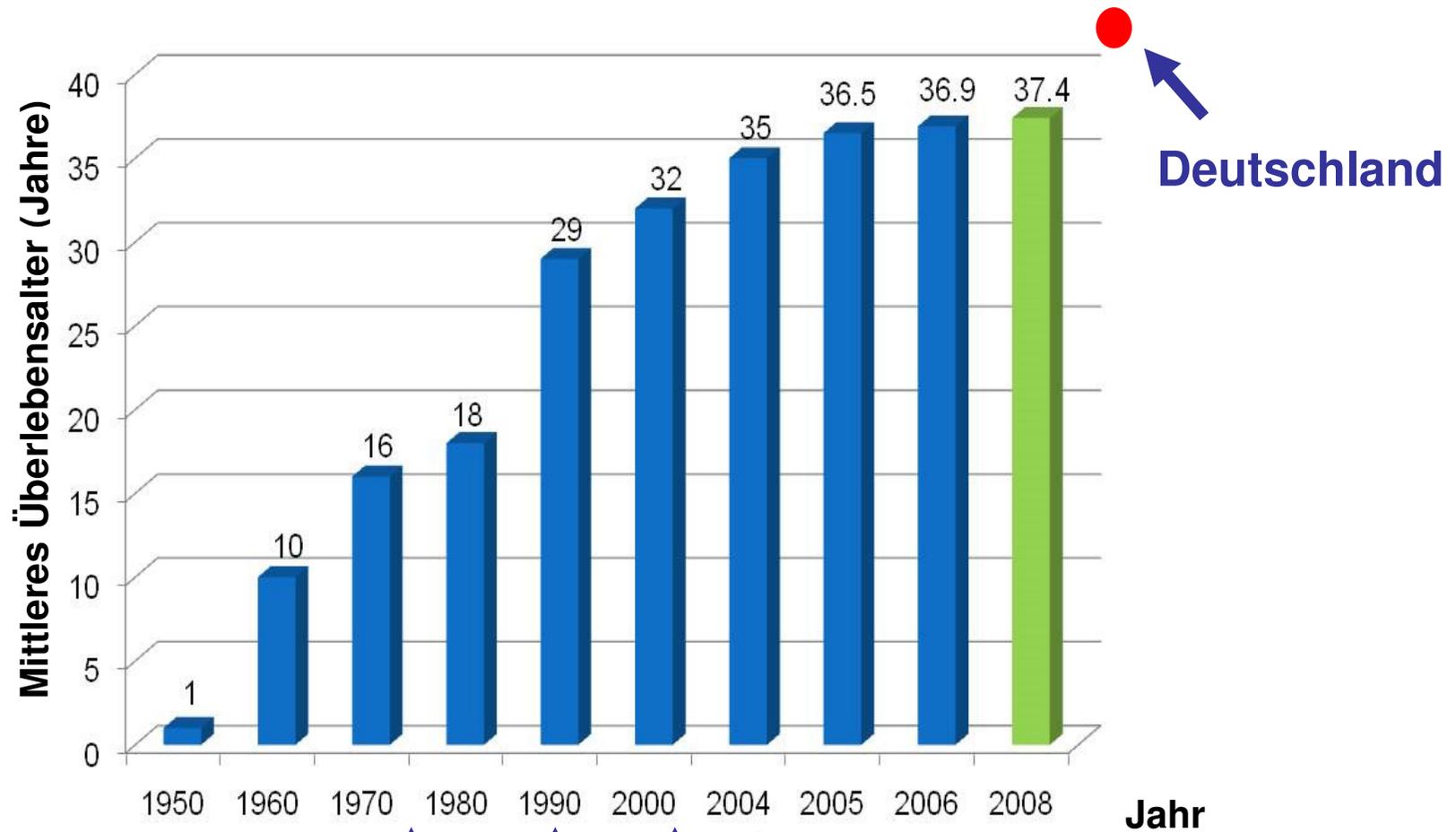


# Die Cystische Fibrose

- Die Mukoviszidose (zystische Fibrose; CF) ist die häufigste autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung bei Kaukasiern in Europa und Nordamerika mit einer **Inzidenz von ca. 1 von 3000 Neugeborenen (HD-Daten: 1:4500)**.
- Ursache der Erkrankung ist ein genetisch bedingter Defekt eines Ionenkanals in der Zellmembran, der zur Bildung von zähem Schleim in den schleimproduzierenden Drüsen des Körpers führt. Hauptbetroffene Organsysteme sind die Lunge und der Magen-Darm-Trakt.
- Inzwischen sind mehr als **2000 Mutationen** bekannt, die für den zugrunde liegenden Defekt im so genannten **Cystic-Fibrosis-Transmembrane-Conductance Regulator (CFTR)-Gen** verantwortlich sind. Unterschiedliche Mutationen führen zu unterschiedlichen Phänotypen der Erkrankung.
- Die CF ist bisher noch nicht heilbar und noch in den 60er Jahren lag die **Lebenserwartung** der Patienten unter 10 Jahren. Inzwischen erreichen einige Patienten bereits das **4. Lebensjahrzehnt**, was auf eine wesentlich bessere Therapie zurückzuführen ist.



## Verbesserung der Lebenserwartung



↑  
↑  
↑  
↑  
Kreon Pulmozyme Tobi Hypertones Kochsalz  
Fortum



# Frühe Diagnose

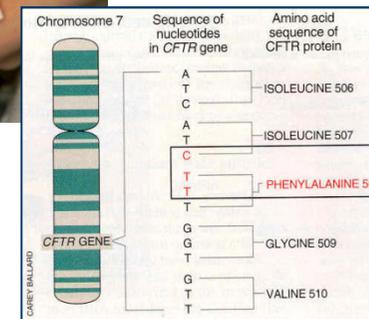
- Entscheidend für die optimale Behandlung der Patienten ist der **Zeitpunkt der Diagnose**.
- Daher ist eine möglichst frühe Diagnosestellung, am besten im **Rahmen des regulären Neugeborenen Screenings** anzustreben.
- Ziele aller Projekte und Studien der letzten anderthalb Dekaden zu diesem Thema:
  - Ermittlung des optimalen Verfahrens für ein modernes CF-Screening
  - Identifizierung des Nutzens, der Risiken und der Kosten
  - Integration des CF-Screenings in das reguläre Neugeborenen Screening



# Derzeitige Screening-Strategien

## 1. Stufe 2. Stufe 3. Stufe

- IRT - IRT
- IRT - DNA
- IRT - DNA - IRT
  
- ?

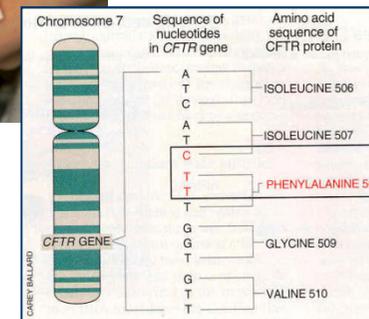




# CF-Screening gemäß GBA

## 1. Stufe 2. Stufe 3. Stufe

- IRT - IRT
- IRT - DNA
- IRT - DNA - IRT
  
- IRT - PAP - DNA





## Wie kam es zu dieser Screeningkombination?

- Bestimmung von humanem **immunoreaktivem Trypsin (IRT)** als erster Schritt ist Konsens im Sinne des ersten Schritts.
- IRT **alleine ist nicht ausreichend sensitiv** und die hohe Zahl an falsch-positiven Befunden führte zu einer **hohen Anzahl an durchgeführten Schweißtests**.



## Warum PAP (Pankreas-assoziiertes Protein) als 2. Stufe?

- Kombination von **IRT mit der DNA-Mutationsanalyse**:
  - Erhöhung der Sensitivität und des PPV, aber:
    - **Screening der heterozygoten Mutationsträger**
- Daher Kombination IRT mit PAP:
  - Weniger Carrier-Detektion (>75 %)
  - Weniger CFSPID (CF-Screening positiv, Inconclusive Diagnosis)

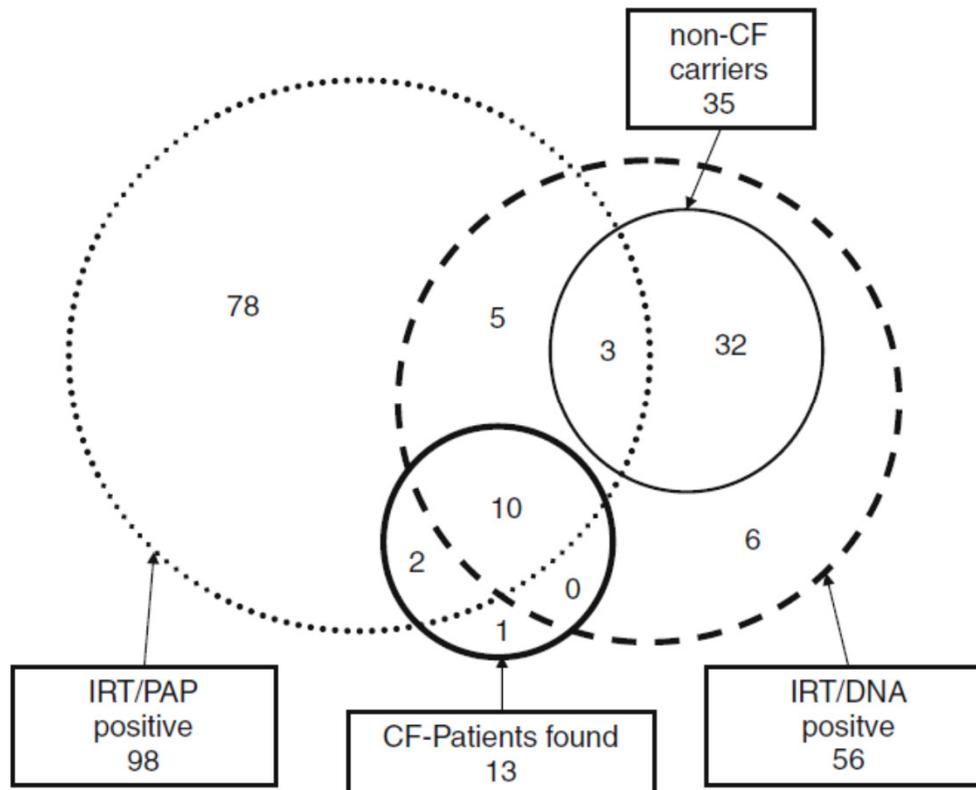


J Inherit Metab Dis (2010) 33 (Suppl 2):S263–S271  
DOI 10.1007/s10545-010-9174-7

NEWBORN SCREENING

**Initial evaluation of a biochemical cystic fibrosis newborn screening by sequential analysis of immunoreactive trypsinogen and pancreatitis-associated protein (IRT/PAP) as a strategy that does not involve DNA testing in a Northern European population**

Olaf Sommerburg · Martin Lindner · Martina Muckenthaler · Dirk Kohlmueller ·  
Svenja Leible · Reinhard Feneberg · Andreas E. Kulozik · Marcus A. Mall ·  
Georg F. Hoffmann



**Carriers not detected with IRT/PAP:**

- Heidelberg 2010: 91 %
- Prague 2012: 75 %
- Netherlands 2012: 88 %
- Heidelberg 2012: 79 %



ORIGINAL ARTICLE

## Novel strategies in newborn screening for cystic fibrosis: a prospective controlled study

Annette M M Vernooij-van Langen,<sup>1</sup> J Gerard Loeber,<sup>2</sup> Bert Elvers,<sup>2</sup> Ralf H Triepels,<sup>3</sup> Johan J P Gille,<sup>4</sup> Catharina P B Van der Ploeg,<sup>5</sup> Sandra Reijntjens,<sup>1</sup> Edward Dompeling,<sup>6</sup> Jeannette E Dankert-Roelse,<sup>7</sup> on behalf of the CHOPIN Study Group

**Thorax 2012**

**Table 1** Results of three different screening strategies with an immunoreactive trypsinogen cut-off level of 60 µg/l (n=145 499)

	IRT/PAP	IRT/DNA/seq
Test positive, n (%)	171 (0.12)	37 (0.025)
CF with MI*	2	4
CF, no MI	19	20
False positive	146	0
Equivocal diagnosis†	4	13
Test negative	145 328	145 462
No CF	145 325	145 462
CF with MI*	2	0
CF, no MI	1	0
Carriers	0	67
Sensitivity, % (95% CI)	95.0 (73.1 to 99.7)	100 (80.0 to 100)
Specificity, % (95% CI)	99.897 (99.879 to 99.912)	99.991 (99.984 to 99.995)
PPV, % (95% CI)	12.3 (7.9 to 8.4)	64.9 (47.4 to 79.3)



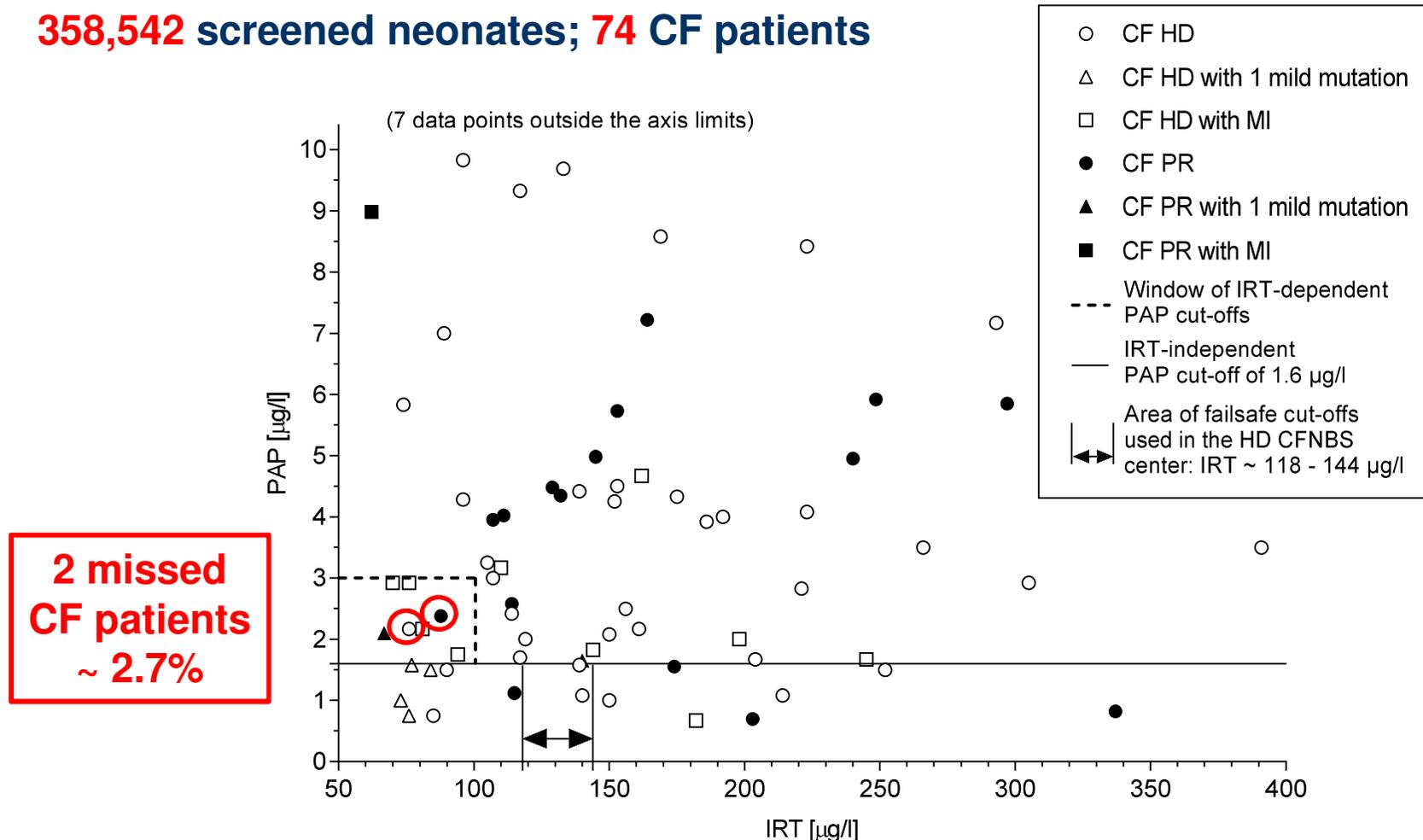
# Sensitivitätsproblem von PAP

- Lösungsstrategien:
  - Ansatz 1: **1** cut-off für PAP **statt 2 IRT-abhängige cut-offs** für den Parameter
  - Ansatz 2: Einführung eines **Fail-Safe Verfahrens (Safety Net)**



# Missed CF patients due to the IRT/PAP protocol with two IRT-dependent PAP cut-offs in the cohorts from Heidelberg (2008-2013) and Prague (2009-2011)

**358,542** screened neonates; **74** CF patients





# Does an IRT/PAP protocol need a safety net? – Yes!

## Prospective and parallel assessments of cystic fibrosis newborn screening protocols in the Czech Republic: IRT/DNA/IRT versus IRT/PAP and IRT/PAP/DNA

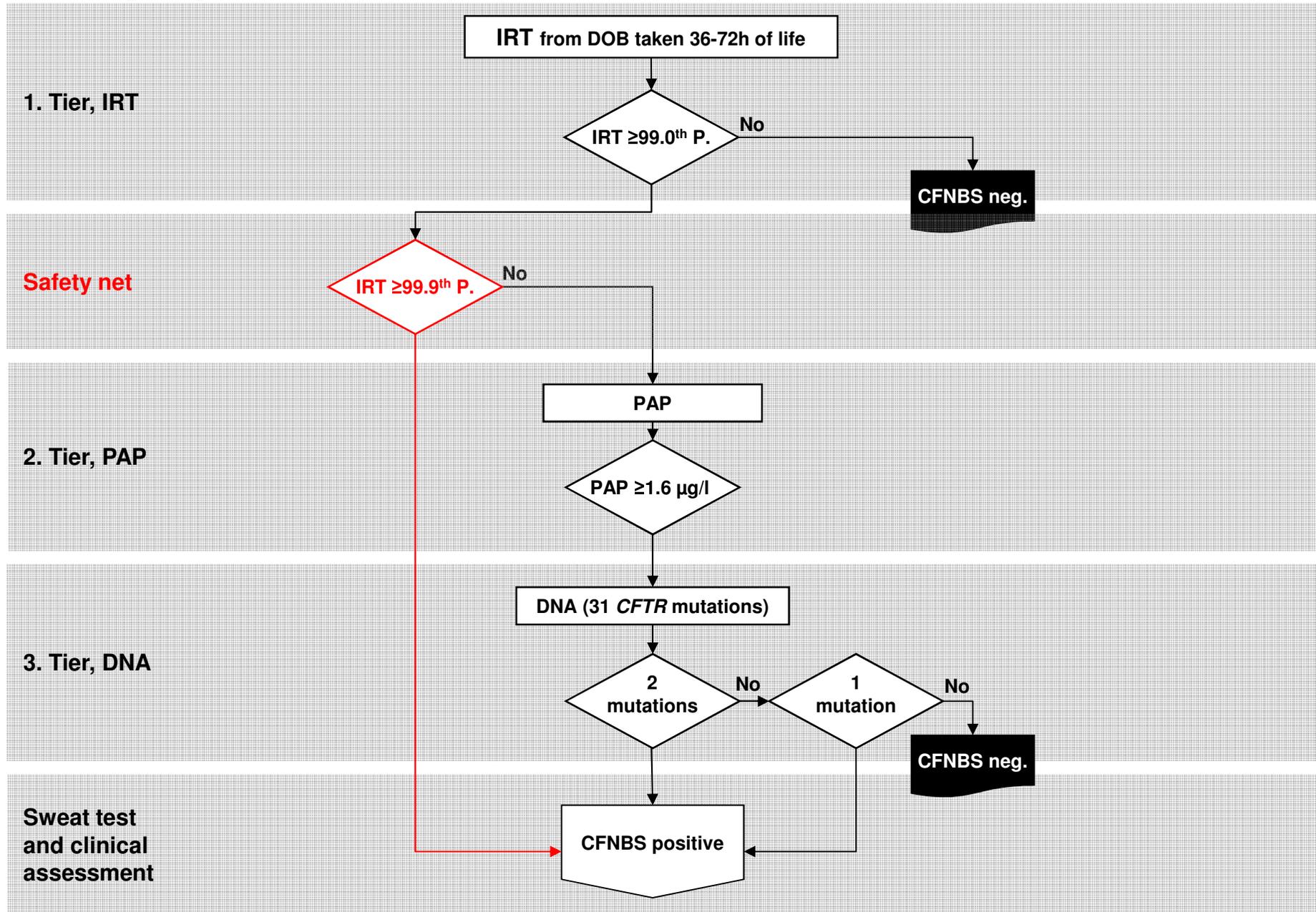
Veronika Krulišová • Miroslava Balašáková •  
Veronika Skalická • Tereza Piskáčková •  
Andrea Holubová • Jana Paděrová • Petra Křenková •  
Lenka Dvořáková • Dana Zemková • Petr Kračmar •  
Blanka Chovancová • Věra Vávrová •  
Alexandra Štambergová • Felix Votava •  
Milan Macek Jr.

Eur J Pediatr  
DOI 10.1007/s00431-012-1747-z

ORIGINAL PAPER

Table 2 False negatives due to mean PAP concentrations below the cut-off

	IRT (ng/mL)	PAP (ng/mL)	<i>CFTR</i> Genotype <sup>a</sup>	Sweat chloride concentration (mmol/L)
Patient 1	174	0.93	F508del/ F508del	109.6
Patient 2	337	0.49	F508del/ F508del	98.7
Patient 3	203	0.42	F508del/ F508del	103.7
Patient 4	115	0.67	F508del/ I507del	93.2
Patient 5 <sup>b</sup>	87.8	1.43	G542X/ E1104K	74.5





# Algorithmus IRT und PAP

- Dieser IRT Test gilt als positiv, wenn der Wert  $\geq$  der 99,0. Perzentile ist.
- Bei einem IRT  $\geq$  der 99,0. Perzentile und  $<$  der 99,9. Perzentile wird in einem zweiten Schritt aus derselben Blutprobe ein PAP-Test durchgeführt.



# Mutationsanalyse

- Ergibt der **PAP-Test** einen **Wert  $\geq 1,6 \mu\text{g/l}$**  erfolgt im dritten Schritt eine molekulargenetische Untersuchung auf die häufigsten **31 Mutationen des CFTR-Gens**
- Das Screening auf Mukoviszidose im dritten Schritt gilt ebenfalls als positiv, wenn **mindestens eine Mutation des CFTR-Gens** gefunden wurde.



# Fail-Safe-Verfahren

- Ist der **IRT-Wert  $\geq 99,9$ . Perzentile**, ist das Screening auf Mukoviszidose bereits nach der **ersten Stufe positiv**.
- Die **zweite und dritte Stufe** werden dann **nicht durchgeführt** und es erfolgt sofort die **Konfirmationsdiagnostik** (Schweißtest und / oder direkte Bestimmung der CFTR-Funktion). Damit werden keine Patienten mit selteneren Mutationen benachteiligt.
- **In allen anderen Konstellationen gilt das Screening als negativ.**



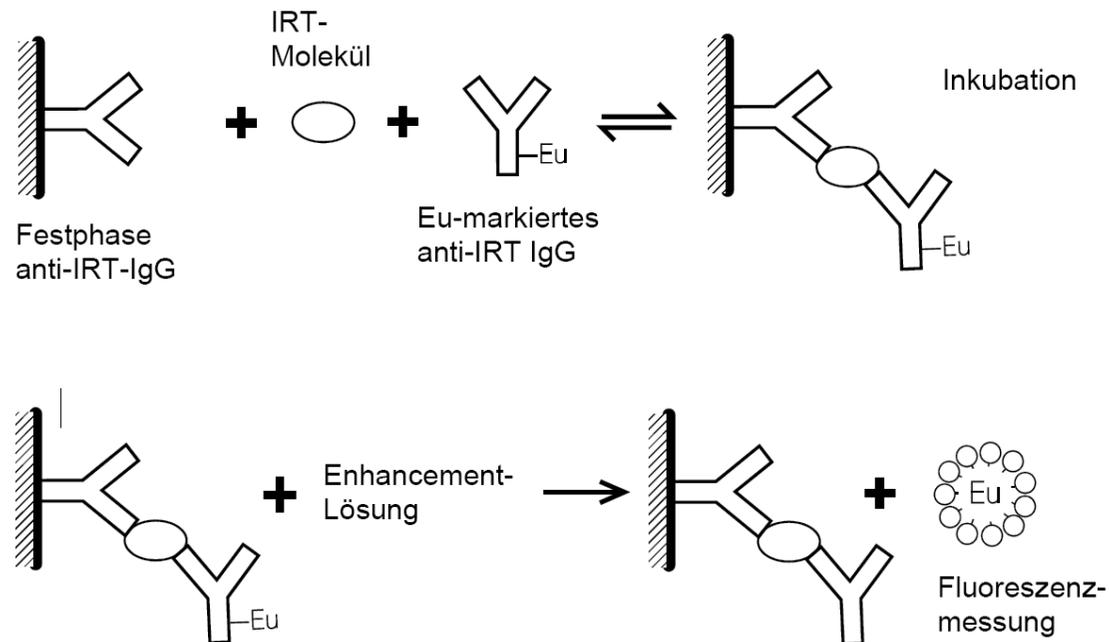
# Umsetzung CF-Screening

- Der GBA wird sich daher nun auf diese **dreistufige Abfolge IRT, PAP und DNA** zum CF-Screening festlegen.
- **Was bedeutet deren Umsetzung für den Laborablauf?**
  - Wie wird die Reihenuntersuchung im Labor durchgeführt?
  - Wann wird der Einsender und die Personensorgeberechtigten durch das erbringende Laboratorium informiert?



# IRT als ersten Schritt

- Fluoreszenzimmunoassay zur Bestimmung von humanem immunoreaktivem Trypsin (IRT)



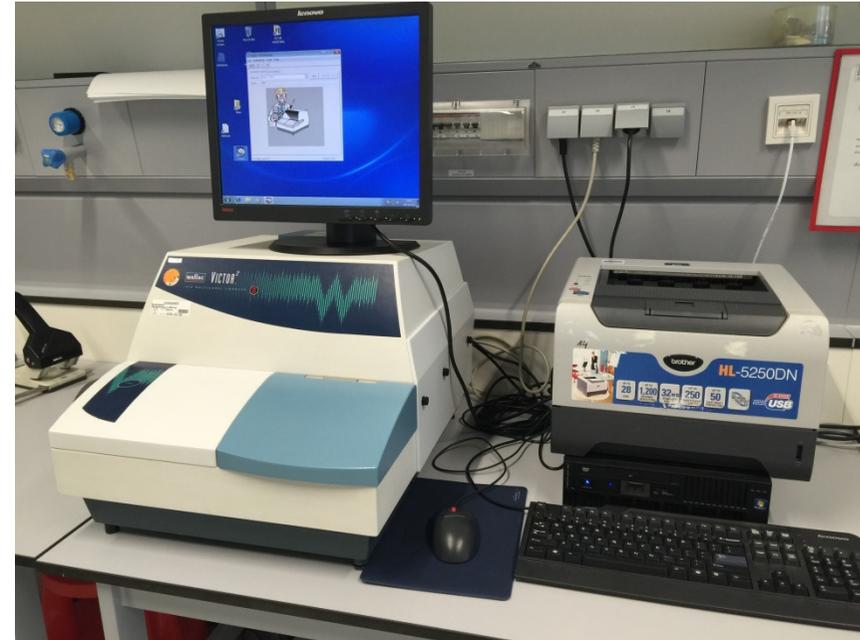
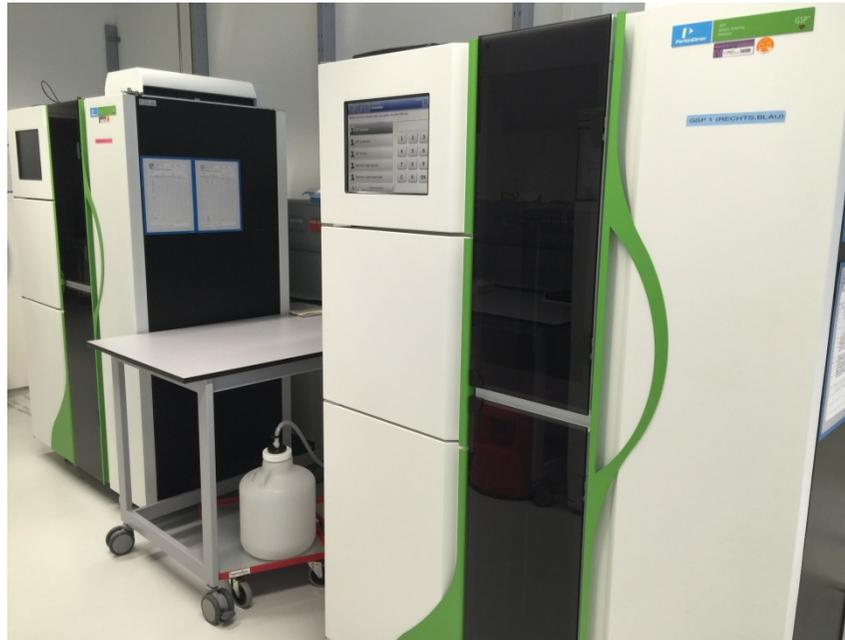


# IRT: Analytische Plattformen

**GSP, AutoDelfia**

oder

**Victor**





# Eckdaten zur IRT-Bestimmung

- Plattformen für den Test sind bereits im regulären Neugeborenenenscreening vorhanden.
- Durchführung und Umlaufzeiten sind vergleichbar mit den Fluoreszenzimmunoassays für TSH und 17-OHP.
- Aufgrund der Fallzahlen im ersten Schritt ohne Reagenzien-Verluste im regulären Betrieb einsetzbar.



# PAP als zweiten Schritt

- (Fluoreszenz)immunoassay zur Bestimmung des Pankreatitis-assoziierten Proteins (PAP)



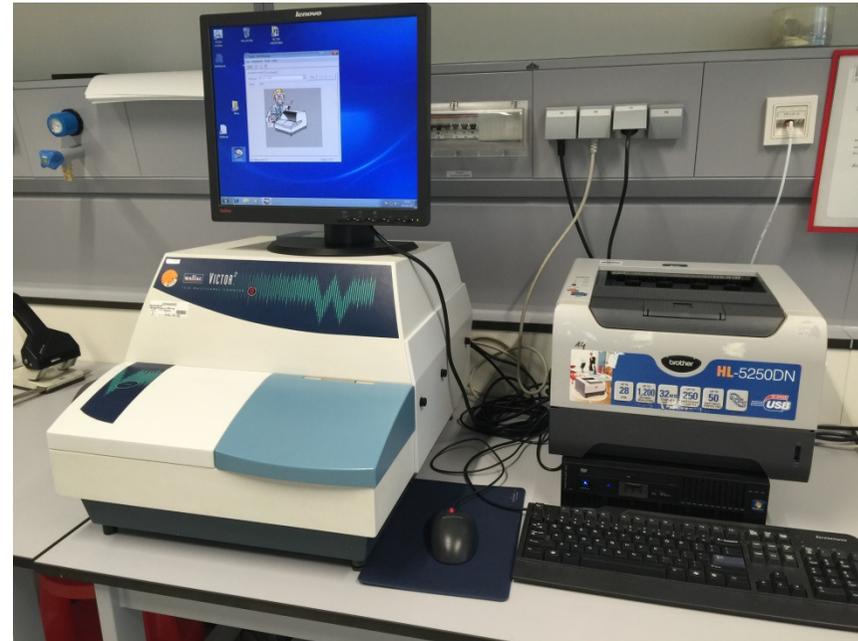


# PAP: Analytische Plattformen

**Photometer (mucoPAP)**

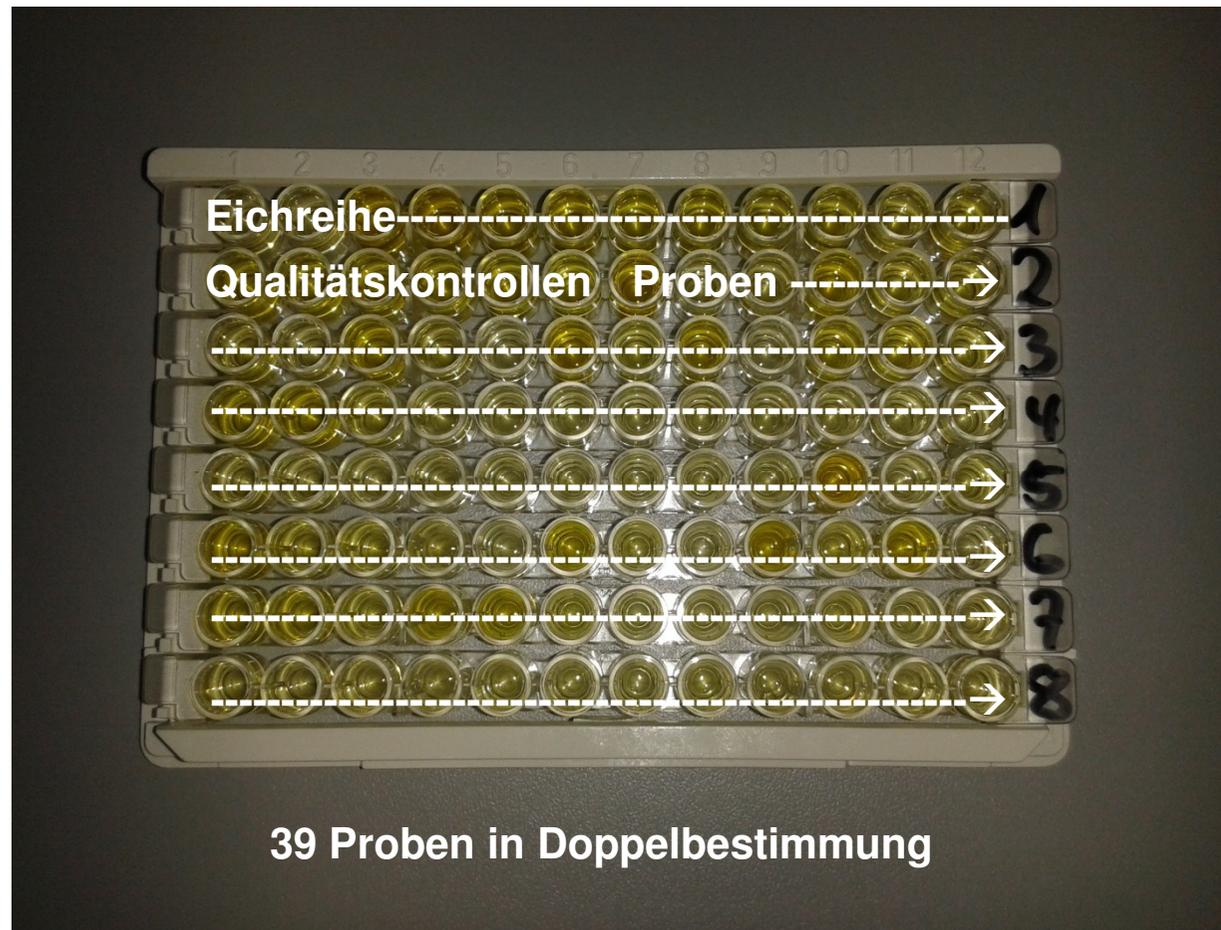


**Victor (mucoPAP-F)**





# mucoPAP-Test





# Eckdaten zur PAP-Bestimmung

- Die Plattform für den Test in beiden Formen sind bereits im regulären Neugeborenenenscreening vorhanden.
- Bei der Durchführung dieses zweiten Schritts ist mit **u.U. erheblichen Reagenzien-Verlusten** zurechnen.
- Die Umlaufzeit liegt durch eine 16 stündige Elution der Trockenblutproben bei 2 Tagen.
- In Heidelberg wird im Moment die mucoPAP-Testung alle 3-4 Wochen durchgeführt (wenn eine Platte mit 39 Doppelmessungen gefüllt ist).
- Zukünftig: Einführung von mucoPAP-F



# DNA als dritter Schritt

- Die Isolierung von **genomischer DNA aus Trockenblut** wird mit Hilfe eines zertifizierten Extraktionskits durchgeführt.
- Nach anschließender PCR-basierter Amplifikation der **Genabschnitte des CFTR-Gens** mit den 31 häufigsten Mutationen erfolgt die Markierung der PCR-Proben durch **Hybridisierung** mit Fluoreszenz-markierten spezifischen Oligonukleotidsonden.
- Die Detektion der Mutationen erfolgt auf den **Microarray-Chips** mit Hilfe eines softwareunterstützten Scanners.

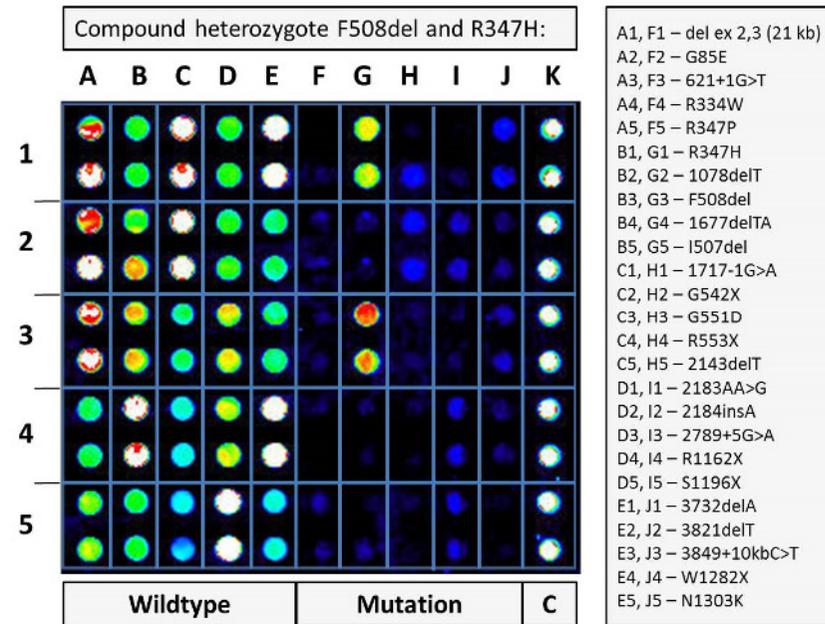


# DNA: Analytische Plattform

## Slide Scanner



## Microarray-Chips





# Screening auf 31 Mutationen

- |                          |                        |
|--------------------------|------------------------|
| 1. F508del (77,8 %)      | 17. 3272-26A>G (0,2 %) |
| 2. N1303K (2,2 %)        | 18. dell507 (0,2 %)    |
| 3. R553X (2,1 %)         | 19. G85E (0,2 %)       |
| 4. G542X (2,0 %)         | 20. 621+1G>T (0,2 %)   |
| 5. G551D (1,7 %)         | 21. 3659delC (0,2 %)   |
| 6. R347P (1,3 %)         | 22. R334W (0,2 %)      |
| 7. 3849-10kb C>T (0,9 %) | 23. 1677delTA (0,2 %)  |
| 8. 1717-1G>A (0,9 %)     | 24. 1078delT (0,1 %)   |
| 9. CFTRdele2,3 (0,8 %)   | 25. E92X (0,1 %)       |
| 10. W1282X (0,6 %)       | 26. 3905insT (0,1 %)   |
| 11. 2789+5G>A (0,6 %)    | 27. E60X (0,1,%)       |
| 12. 2183AA>G (0,4 %)     | 28. I336K (0,1,%)      |
| 13. 13. R1162X (0,3 %)   | 29. 2184insA (0,1 %)   |
| 14. 14. M1101K (0,3 %)   | 30. A455E (0,1 %)      |
| 15. 15. 2143delT (0,3 %) | 31. Y1092X (0,1 %)     |
| 16. 2184delA (0.3%)      |                        |

**R117H (0,5 %) und D1152H (0,1 %) sind Ausgenommen, da „mutation of varying clinical consequence“**



# Eckdaten zur Mutationsanalyse

- Umlaufzeiten DNA-Extraktion und –Analyse: 1 Tag
- Ein Testkit ist ausreichend für 5 Patienten
- Nicht unerhebliche Kitkosten (Brutto ca. 100 € / Testung)
- Hohe Primäranschaffungskosten für die Scannereinheit zur Detektion der Mutationen auf den *Microarray-Chips*
- Akkreditierung des Verfahrens für den Einsatz im Neugeborenenenscreening



# Umsetzung CF-Screening

- Wie kann nun ein Ablaufplan aussehen?
  - Wie ist die zeitliche Taktung der drei Stufen im Laborablauf?
  - Wann erfolgt Befundmitteilung?
- Was gibt der Entwurf vor?
  - „Das Labor teilt dem Einsender (Ärztin/Arzt) der Blutprobe **innerhalb von 14 Tagen** mit, ob das Reihenuntersuchungsergebnis positiv oder negativ ist.“



# Ablaufschema

- Möglicher Ablaufplan:
  - IRT-Testung: **Täglich**
  - PAP-Testung: **Wöchentlich, zweiwöchentlich** oder monatlich?
  - DNA (Mutationsanalyse): **Zweiwöchentlich** oder monatlich?
- Anmerkungen:
  - Der Schweißtest ist in den ersten vier Lebenswochen nicht aussagekräftig.
  - Würde man die Behandlung nach positivem CF-Screening noch vor der vierten Lebenswoche auch ohne die Konfirmationsdiagnostik(Schweißtest) beginnen?



# Schlussfolgerungen

- Die **erste Schritt (IRT)** des dreistufigen Verfahrens lässt sich aufgrund der vorhandenen analytischen Plattformen leicht in den Ablauf des regulären Neugeborenen Screenings integrieren.
- Dies gilt dies auch für die **PAP-Testung als zweitem Schritt**. Hier kann aber die geforderten Taktung (zweiwöchentlich) zu Reagenzien-Verlusten führen.
- Der **dritte Schritt (DNA)** erfordert die Anschaffung eines softwareunterstützten Scanners zur Detektion der Mutationen auf den *Microarray-Chips*, sofern das Neugeborenen Screeninglabor ohne Einbindung in ein klinisch-chemisches Laboratorium agiert, in welchem eine solche Plattform meist schon vorhanden ist.

Aber vor der Verabschiedung dieser Richtlinie ...



## ... sollte sichergestellt sein, dass ...

- der einzige Anbieter von PAP-Kits, die Voraussetzungen dafür erfüllt, auch in den nächsten Jahren zuverlässige PAP-Kits liefern zu können.
- der Anbieter die Zusage machen kann, dass er den Kit zum Start in einer **ausreichendem Menge** an die Screeninglaboratorien ausliefern kann.
- der Anbieter aufgrund der eher geringen Probenzahlen in der zweiten Stufe **u.U. den Kit in separat bestellbare Einzelkomponenten** anbietet.
- im Rahmen der Evaluation des CF-Screenings sollte geprüft werden, mit welcher **Frequenz die PAP- bzw. DNA-Analysen** in den Laboren am besten durchgeführt werden sollen.

# Vielen Dank!



**Mirjam Stahl**  
**Susanne Hämmerling**  
**Cornelia Joachim**  
**Stefan Fichtner**  
**Margit Happich**  
**Dirk Kohlmüller**  
**Marcus Mall**  
**Georg F. Hoffmann**

**Olaf Sommerburg**

[olaf.sommerburg@med.uni-heidelberg.de](mailto:olaf.sommerburg@med.uni-heidelberg.de)



**Jutta Hammermann, Marina Stopsack**



**Sebastian Schmidt, Cornelia Müller**



**Veronika Krulišová, Felix Votava**  
**Milan Macek**



# Vielen Dank!

Dr. Dr. Wolfgang Schultis (Weiden)

Dr. Uta Nennstiel-Ratzel (München)



**Danke für Ihre Aufmerksamkeit!**