كيف تعمل فحص ناجح لحديثي الولادة حول ضعف المناعة الأولي

How to make a successful newborn screening for PID?

حمود الموسى
مستشفى الملك فيصل التخصصي ، مركز الأبحاث ، الرياض ، المملكة العربية السعودية.

Hamoud Al-Mousa
King Faisal Specialist Hospital & Research Center, Riyadh, Saudia Arabia.

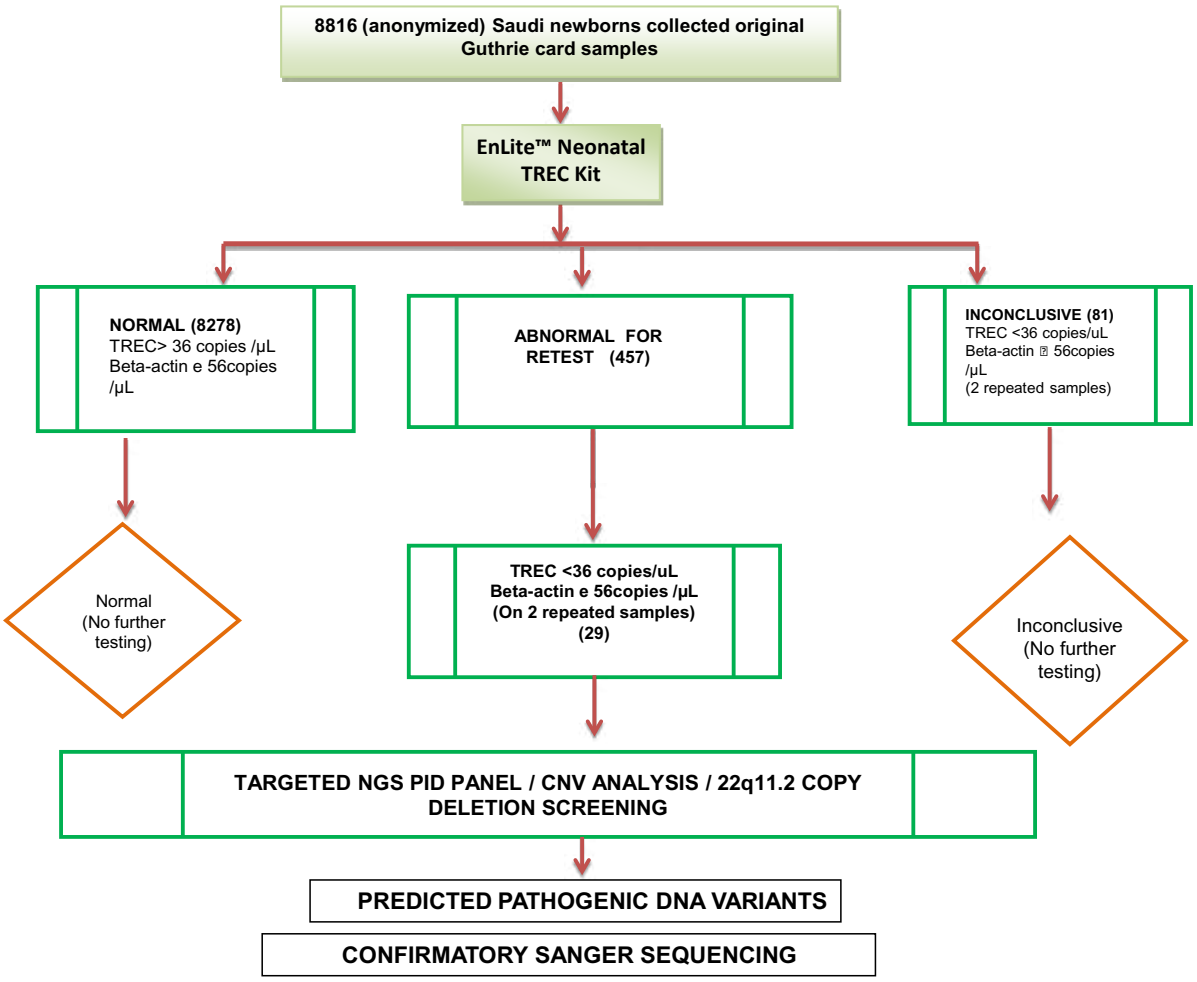
مقدمة:

يعتبر ضعف المناعة المشترك الشديد (ض.م.م.ش) (SCID) من أشد اضطرابات ضعف المناعة الأولي (ض.م.أ)، وهو مجموعة غير متجانسة جينياً تشمل أكثر من 20 خطأ موروث أحادي الجين (monogenic) للجهاز المناعي. ويعاني الأطفال الرضع المصابون بضعف شديد في المناعتين الخلوية والخلطية، وبالتالي هم معرضون بشكل كبير للإصابة بالعداوى البكتيرية والفيروسية والفطرية والانتهازية والتي قد تؤدي إلى الوفاة خلال العامين الأولين من الحياة إذا لم يتم علاجها. ويستجيب ض.م.م.ش للمعايير المتفق عليها في فحص حديثي الولادة، كما أنه عديم الأعراض عند الولادة، ومميت إن لم يعالج. ويتوفر علاج فعال لهذا المرض والتدخل المبكر يحسن نتيجته. إن زرع الخلايا الجذعية المكونة للدم (HSCT) هو العلاج الشافي الأكثر فعالية وتتأثر نتيجته بالعمر عند التشخيص والحالة السريرية للمرضى عند المجيء. وقد لوحظ بشكل عام وجود نسبة بقاء عالية بلغت 95% عند الرضع الذين خضعوا للزراعة في الشهر الأول من العمر بينما بلغ معدل البقاء فقط 70% عند الرضع الذين عولجوا بعد 3 أشهر من العمر.

إن عمليتي استئصال (Excision) وتضفير (splicing) الحمض النووي المسؤول عن انتاج مستقبلة مستضد الخلايا التائية (TCR) ضروريتان خلال مراحل نمو الخلايا التائية وتمايزها (differentiation) لإنتاج خلايا تائية ذات نوعيات مختلفة. أثناء المراتبة الجينية (rearrangement) لمستقبلة الخلية التائية، تدور أجزاء الحمض النووي المحذوفة ولا تخضع لمزيد من المضاعفة في الخلايا المقسمة، وبالتالي فإن دوائر استئصال مستقبلات الخلايا التائية (TREC) هي واصمات ممتازة للخلايا التائية المنتجة مؤخرا. وفي عام 2005، وصف Chan و Puck لأول مرة اختبار دوائر استئصال مستقبلات الخلايا التائية كأداة لفحص حديثي الولادة حول ض.م.م.ش وأنواع أخرى من قلة اللمفاويات التائية. ويمكن تحديد عدد نسخ هذه الدوائر من بقع الدم المجففة (DBS) لبطاقة غوثري باستعمال تفاعل البوليميراز المتسلسل الكمي اللحظي (RT-qPCR).

في عام 2008، تم إجراء فحص دوائر استئصال مستقبلات الخلايا التائية لحديثي الولادة للكشف عن ض.م.م.ش لأول مرة في ولاية ويسكونسن في الولايات المتحدة الأمريكية. بعد ذلك، وبالتحديد سنة 2010، أوصت اللجنة الاستشارية للاضطرابات الوراثية لحديثي الولادة والأطفال في الولايات المتحدة الأمريكية بإجراء فحص عالمي لحديثي الولادة حول ض.م.م.ش. وفي الوقت الحالي، توفر معظم الولايات الأمريكية فحصًا لض.م.م.ش باستخدام اختبار دوائر TREC، كما أن العديد من الدراسات التجريبية جارية في أوروبا وآسيا. وأظهرت نتائج فحص ثلاثة ملايين طفل حديث الولادة حول ض.م.م.ش تواترا بلغ 58,000/1 طفل وتردد عام بنسبة 7300/1 من أشكال قلة الخلايا اللمفاوية التائية ذات الصلة سريريا. ومن المتوقع أن تكون نسبة وقوع (incidence) ض.م.م.ش أعلى في الساكنة التي لديها نسبة عالية من القرابة (consanguinity).

يعتبر ض.م.م.ش أكثر شيوعًا في المناطق ذات المعدلات المرتفعة من زواج الأقارب حيث أن معظم الامراض ذات وراثة متنحية بالصبغيات الجسدية. ويعتبر زواج الأقارب ممارسة شائعة في المملكة العربية السعودية بنسبة 60%. في هذه الدراسة، أجرينا فحصًا أوليا لحديثي الولادة بالاعتماد على دوائر TREC لتقدير حدوث ض.م.م.ش بين السكان السعوديين وتقييم الجدوى من استخدام الجيل التالي من لوحات تسلسل الحمض النووي المستهدِفة لجينات ض.م.أ كأداة تشخيصية للطفرة



ومؤكِدة لانخفاض عدد دوائر TREC في اختبار بقع الدم الجافة على بطاقة غوثري.

طرق:

تم الحصول على عينات بقع الدم الجافة من بطاقات غوثري التي تم جمعها من طرف مختبر الوراثيات الكيميائية الحيوية في مستشفى الملك فيصل التخصصي ومركز الأبحاث (KFSHRC) على مدى 12 شهرا (نونبر 2015-2016). بعد الانتهاء من اختبارات الفحص الروتيني لحديثي الولادة، يتم تحضير بقع الدم المجففة مجهولة الإسم ومعالجتها من أجل اختبار دوائر TREC. تم استخدام اختبار (EnLite™ TREC) لحديثي الولادة. يكون الانقطاع السريري كما يلي: اختبار TREC موجب: < 36 نسخة / ميكرولتر، اختبار سالب : > 36 نسخة / ميكرولتر، وأكثر من 56 نسخة / ميكرولتر من البيطا أكتين (Beta-actin).

سيرورة التجربة:

انظر الشكل.

نتائج:

خضعت 16 عينة ذات نسبة منخفضة من دوائر TREC للاختبار الجيني باستخدام الجيل التالي من لوحات تسلسل الحمض النووي لض.م.أ (T-NGS PID panel). تم تحديد طفرة متماثلة الألائل على مستوى المورثة AK2، وطفرة متخالفة الألائل للمورثة JAK3، وطفرة متماثلة الألائل للمورثة MTHFD1، تم تأكيد الطفرات الثلاث بتسلسل سانجر (Sanger sequencing). وفي عينتين ازالة الجزء الصبغي 22q11.2 مشتبهة بواسطة تفاعل البوليميراز المتسلسل الكمي. (انظر الجدول).

مناقشة:

زواج الأقارب ممارسة شائعة في منطقة الشرق الأوسط وشمال أفريقيا، مع معدل شامل يتراوح بين 20 إلى 50 % وذلك راجع للعديد من العوامل الاجتماعية والثقافية. وقد وفر هذا خلفية لظهور الأمراض ذات الوراثة المتنحية بالصبغيات الجسدية. وقد قدمت هذه الدراسة لأول مرة نسبة وقوع ض.م.م.ش في ساكنة المملكة العربية السعودية في حدود حالة جديدة لكل 2906 ولادة، وهي نسبة أعلى (X20) من تلك المحصل عليها في برامج فحص حديثي الولادة في الولايات المتحدة الأمريكية. هذه النسبة المرتفعة هي قوة دافعة حاسمة قد تؤثر على مدى فعالية التكلفة الإضافية لتنفيذ فحص حديثي الولادة حول ض.م.م.ش في الساكنات ذات القرابة المرتفعة. وهذا ممكن في بلدان الشرق الأوسط وشمال أفريقيا الغنية بالموارد

العينة	المرض	المورثة	الطفرة	البروتين	الاقترانية (Zygosity)
1	ض.م.م.ش	*AK2*	NM_001625:exon6:c.524G>C	p.R175P	Homozygous
2	ض.م.م.ش	*JAK3*	NM_000215:exon10:c.1275T>A NM_000215:exon3:c.308G>A	p.Y425X p.R103H	Compound heterozygous
3	ض.م.م.ش	*MTHFD1*	NM_005956:exon24:c.2404G>A	p.V802I	Homozygous

شريطة أن تعترف السلطات الصحية بخطورة هذه المشكلة الصحية وتوفر جميع الموارد المطلوبة.

تعتبر بقع الدم المجففة (DBS) مصادر محتملة للتحليل الجيني والجينومي. من الممكن أن يتكامل استخدام الجيل التالي من اختبار تسلسل الحمض النووي في برامج فحص حديثي الولادة (ض.م.م.ش) لتسهيل وتسريع الاختبارات الجينية والتشخيص النهائي لحديثي الولادة المصابين. يمكن أن يوفر تقديم الجيل التالي من اختبار تسلسل الحمض النووي المستهدِف في برنامج فحص حديثي الولادة الحالي فرصًا كبيرة لتشخيص سريع ومبكر لأمراض ض.م.أ. ستشمل لوحة الاختبار الجيني (NBS NGS PID) المثالية جميع جينات PID المعروفة التي يمكن أن تسبب انخفاض عدد دوائر TREC. يمكن مراجعة هذه القائمة بسهولة على أساس منتظم لتشمل الجينات المكتشفة حديثًا. ولذلك، فإننا نعتقد أنه يمكن استخدام النهج الحالي كخط فحص جزيئي جيني أولي لتشخيص عينات ذات دوائر TREC منخفضة.

Severe combined immunodeficiency disease (SCID) is the most severe form of primary immunodeficiency disorders (PID) and is a genetically heterogeneous group of over 20 monogenic inherited inborn errors of the immune. Affected infants have severely impaired cellular and humoral immunity and therefore are highly susceptible to bacterial, viral, fungal, and opportunistic infections potentially resulting in death within the first two years of life if untreated. SCID meets the accepted criteria for newborn screening, it is asymptomatic at birth, fatal without treatment, effective treatment is available and early intervention improves outcome. Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is the most effective curative treatment and the outcome is influenced by age at diagnosis and clinical status of patients at presentation. High (95%)overall survival was observed among infants undergoing transplantation in the first month of life compared with only 70% for those treated after 3 months of age.

Excision and splicing of the DNA encoding the T-cell antigen receptor (TCR) genes are required during T cell development and differentiation to produce T cells with diverse antigen specificities. During T cell receptor rearrangement, deleted DNA fragments circulate and do not undergo further replication in dividing cells and thus, T-cell receptor excision circle (TRECs) are an excellent marker of recently formed T cells. In 2005,Chan and Puck first described the T-cell receptor excision circle (TREC) assay as a tool for population based newborn screening for SCID and other T cell lymphopenias. TREC copy number can be determined from Guthrie card dried blood spots (DBS) using real time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR).

In 2008 the TREC assay based newborn screening for SCID was first implemented in Wisconsin, USA. Universal SCID newborn screening was then recommended in 2010 by the Advisory Committee on Heritable Disorders in Newborns and Children in the United States of America (USA). Currently, most of USA states provide screening for SCID using the TREC assay and several pilot studies are ongoing in Europe and Asia. The results of screening three million newborns showed a SCID frequency of 1/58,000 children and an overall frequency of 1/7300 of clinically relevant forms of T cell lymphopenia. SCID incidence is expected to be higher in populations with a high rate of consanguinity.

SCID is more common in areas with high rates of consanguineous marriages since most have an autosomal recessive mode of inheritance. Consanguineous marriages are a common practice in Saudi Arabia with an overall incidence of 60%. In this study, we have conducted a pilot TREC-based newborn screening to assess the incidence of SCID among the Saudi population and assess the feasibility of using targeted next generation sequencing PID gene panel as a confirmatory diagnostic tool for mutation screening from Guthrie card dried blood

→

Zygosity	Protein effect	Mutation	Gene	Disease	sample
Homozygous	p.R175P	NM_001625:exon6:c.524G>C	*AK2*	Severe Combined Immunodeficiency Disease	1
Compound heterozygous	p.Y425X p.R103H	NM_000215:exon10:c.1275T>A NM_000215:exon3:c.308G>A	*JAK3*	Severe Combined Immunodeficiency Disease	2
Homozygous	p.V802I	NM_005956:exon24:c.2404G>A	*MTHFD1*	Severe Combined Immunodeficiency Disease	3

→

spots (DBS) with low TREC count.

Methods:

DBS specimens were obtained from Guthrie cards collected by the Newborn Screening & Biochemical Genetics Laboratory at King Faisal Specialist Hospital and Research Centre (KFSHRC) over a 12 month period (November 2015-2016). After completing the routine newborn screening tests, DBSs were anonymized, punched and processed for the TREC assay. The EnliteTM Neonatal TREC assay was used. The clinical cutoff are as follows: TREC positive: > 36 /µL, TREC negative: 36 copies/µL, and Beta-actin copy of > 56 copies /µL.

Workflow of Experiment:

(See Figure)

Results:

All 16 samples with low TREC assay underwent T-NGS PID panel. A homozygous mutation in AK2, a compound heterozygous mutation in JAK3, and a homozygous mutation in MTHFD1 were identified in three samples respectively and confirmed by Sanger sequencing. Two samples with 22q11.2 deletion were suspected by qPCR. (See table).

Discussion:

Consanguineous marriages are common practice in the Middle East and Northern Africa (MENA) region with an overall incidence ranging between 20 to 50% for multiple socio-cultural factors. This has provided a background where autosomal recessive diseases are abundant. This study had provided the first population-based incidence of SCID in Saudi Arabia of 1 in 2906 births, higher (20X) than the incidence reported from USA newborn screening programs. This high incidence is a critical driving force that would affect the incremental cost effectiveness ratio of implementing SCID newborn screening in highly consanguineous populations. This is possible in resource-rich MENA countries provided that the health authorities recognize the seriousness of such health problem and provide all required resources.

Dried blood spots (DBS) are potential resources for genetic and genomic analysis. The use of next-generation sequencing has the potential to be integrated in SCID newborn screening (NBS) programs to facilitate and accelerate genetic testing and final diagnosis of affected newborns. Introducing unbiased targeted next generation sequencing in the current newborn screening program can provides significant opportunities for rapid and early diagnosis of PIDs. An ideal NBS NGS PID gene panel will include all known PID genes that can cause low TREC. This list can be easily revised on a regular basis to include newly discovered genes. Therefore, we believe that the current approach can be used as a first line molecular genetic screen for diagnosis of samples with low TREC assay.