

KWANTIFISERING VAN URINêRE ORGANIESE MATERIAAL BY DIE IDENTIFISERING VAN AANGEBORE METABOLIESE SIEKTE-TOESTANDE

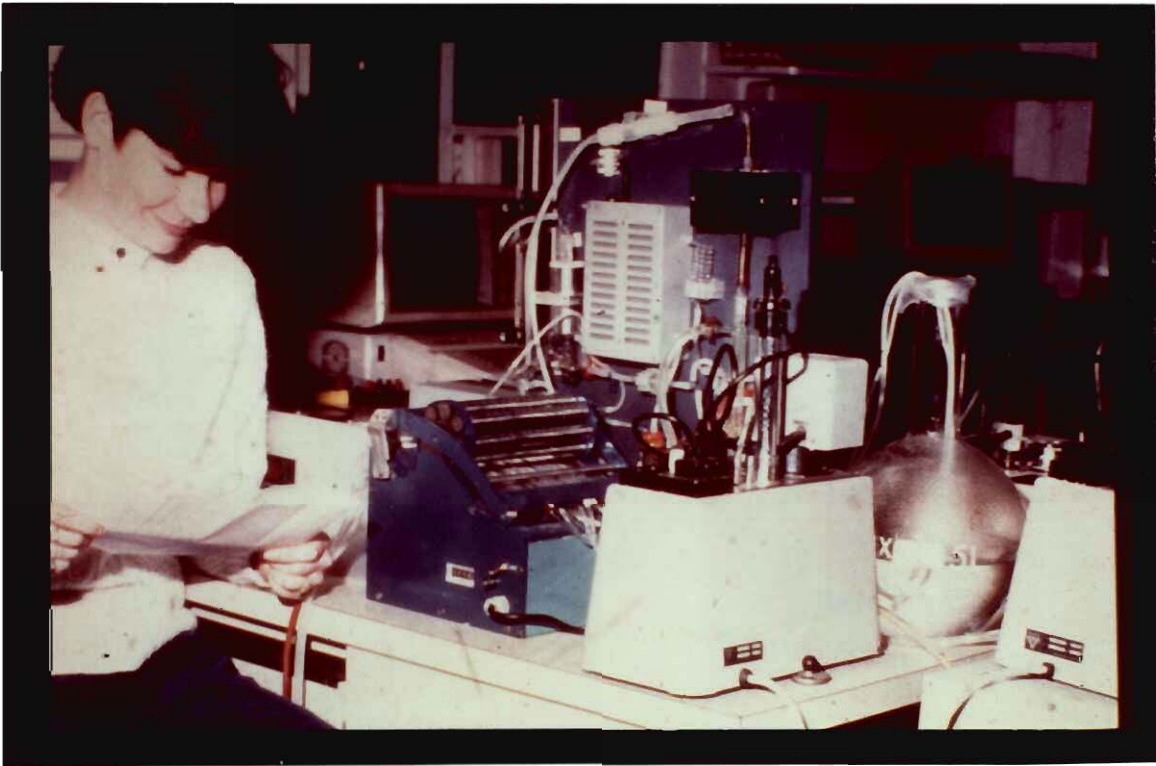
deur

NADENE CANN
(B.Sc. HONNS)

VERHANDELING VOORGELê TER GEDEELTELIKE VOLDOENING AAN DIE
VEREISTES VIR DIE GRAAD MAGISTER SCIENTIAE (BIOCHEMIE, MET
SPESIALISERING IN BIOTEGNOLOGIE) AAN DIE POTCHEFSTROOMSE
UNIVERSITEIT VIR CHRISTELIKE HOër ONDERWYS

STUDIELEIERS : MNR L.J. MIENIE
PROF W.J. DE WET

NOVEMBER 1993



*Man cannot help hoping, even if he is a scientist.....
he can just hope more accurately.*

ANON

INHOUDSOPGAW E

	OPSOMMING	1
	ABSTRACT	2
HOOFSTUK 1	INLEIDING	3
HOOFSTUK 2	LITERATUUROORSIG	5
2.1	INLEIDING	5
2.2	METABOLISME EN METABOLIESE WEë	8
2.3	VERBAND TUSSEN METABOLISME EN DIE INHOUD EN EIENSKAPPE VAN URINE	11
2.4	METABOLIESE SIEKTE-TOESTANDE	16
2.4.1	Inleiding	16
2.4.2	Diagnose van aangebore metaboliese siekte-toestande	20
2.4.3	Metaboliese siftingsprogramme	24
2.5	SAMESTELLING VAN SIFTINGSPROGRAMME EN DIE SIFTINGSPROTOKOL VIR AMINO- EN ORGANIESE SUURURIEë IN DIE DEPARTEMENT BIOCHEMIE AAN DIE PU VIR CHO	26
2.5.1	Inleiding	26
2.5.2	Seleksie van pasiënte op grond van kliniese simptome	28
2.5.3	Chemiese siftingsanalises	29
2.5.4	Siftingsprotokol in Departement Biochemie	33
2.5.5	Alternatiewe benaderings	44
2.6	PROBLEEMSTELLING EN BENADERINGSWYSE	50
2.6.1	Probleemstelling	50
2.6.2	Benaderingswyse	52
HOOFSTUK 3	KWANTIFISERING VAN URINêRE ORGANIESE MATERIAAL MET BEHULP VAN DIE AQUADOC™- METODE, OPTIMALISERING EN STANDAARDISERING	54
3.1	DIE AQUADOC-APPARAAT	54
3.2	AANVANKLIKE EVALUERING	59
3.3	VERBETERINGS AAN AQUADOC : OPTIMALISERING	67
3.4	OKSIDERING VAN METABOLIE TE	75
3.5	KREATINIENBEPALING	83
3.6	SAMEVATTING	88

INHOUDSOPGAWE

(vervolg)

HOOFSTUK 4	EVALUERING VAN DIE AQUADOC-METODE VIR DIE OPSPORING VAN ABNORMALE METABOLIETVLAKKE	91
4.1	INLEIDING	91
4.2	ONDERSOEK NA METABOLIETVLAKKE IN DIE URINEMONSTERS VAN 'N KONTROLEGROEP	93
4.3	BEPALING VAN DIE URINÊRE OPGELOSTE KOOL-STOFKONSENTRASIE IN PASIËNTE MET GEDIAGNOSEERDE AANGEBORE METABOLIESE DEFEKTE	103
4.4	TOETSING VAN DIE HERHAALBAARHEID VAN DIE PROSEDURE	109
4.5	EVALUERING VAN MONSTERS IN PARALLEL MET DIE STANDAARD SIFTINGSPROGRAM	118
4.6	SAMEVATTING	130
HOOFSTUK 5	BESPREKING	134
5.1	INLEIDING	134
5.2	VERBETERING VAN AQUADOC	134
5.3	DOC-WAARDES VAN NORMALE KONTROLES EN BEVESTIGDE PASIËNTE	138
5.4	BRUIKBAARHEID VAN DIE AQUADOC-APPARAAT VIR METABOLIESE SIFTING	149
5.4.1	Aanvanklike probleemstelling	149
5.4.2	Betroubaarheid van die AquaDoc	149
5.4.3	Urinêre organiese materiaal as diskriminant by die opsporing van aangebore metaboliese siekte-toestande .	150
	BYLAAG 1	A.1 - A.16
	LYS VAN AFKORTINGS	B.1
	BEDANKINGS	C.1
	LITERATUURLYS	D.1 - D.3

OPSOMMING

Aangebore metaboliese siekte-toestande is vir 25 - 30% van kindersterftes in ontwikkelde lande verantwoordelik en met die oog op behandeling en genetiese raadgewing is vroeë diagnose van dié siektes noodsaaklik. Die omslagtigheid en koste van toetse wat in metaboliese siftingsprogramme ingesluit word, maak dit onprakties vir die hantering van groot hoeveelhede monsters en plaas hulle buite die bereik van die meerderheid Suid-Afrikaners. Eerstefase toetse is belangrik om onnodige verdere toetsing van pasiënte, waar geen aangebore metaboliese siekte-toestand ter sprake is nie, te verhoed. Een-dimensionele dunlaagchromatografie vervul tot 'n mate hierdie funksie vir aminosure, maar daar bestaan nie 'n eerstefase toets vir organiese sure nie. 'n Volledige organiese suurekstraksie en gaschromatografiese analise moet uitgevoer word.

Toe die WNNR ingestem het om 'n apparaat wat hulle vir die kwantifisering van organiese waterbesoedeling ontwikkel het, aan die laboratorium beskikbaar te stel, het die gedagte ontstaan dat die apparaat moontlik die antwoord op die probleem kon bied. Aangesien urine 'n waterige oplossing is en pasiënte met aangebore metaboliese siekte-toestande meer metaboliete in hulle urine uitskei, behoort 'n selektering op grond van hoër organiese inhoud te kan plaasvind en monsters met 'n lae inhoud sal nie verder getoets word nie. Aangesien die apparaat nie voorheen vir dié doel aangewend is nie, moet die metode gestandaardiseer word. 'n Kontrole- en pasiëntgroep moes saamgestel word en die prosedure moes ook met die huidige siftingsprogram vergelyk word, voordat daar besluit kon word of die metode wel geskik sou wees as 'n eerstefase toets.

ABSTRACT

Inherited metabolic diseases are the cause of 25 - 35% of infant deaths in industrialized countries. In order to facilitate the treatment and genetic counselling of these diseases, early diagnosis is imperative. The high costs of the cumbersome tests that are included in metabolic screening programmes, make them impractical for the handling of large numbers of specimens and also place them beyond the reach of most South Africans. Simple, first phase tests are important in the selection of patients that possibly have an inherited metabolic disease. One-dimensional thin-layer chromatography is used for the initial screening of amino acid defects, although it is not a fool-proof method, but a complete organic acid extraction and gas chromatographical analysis is necessary for organic acid screening.

The CSIR agreed to make an apparatus available that they had developed for the analysis of organic water pollution and this seemed to offer a solution to the problem. Considering that urine is an aqueous solution and that patients that suffer from inherited metabolic diseases usually excrete greater amounts of metabolites in their urine, selection based on a greater organic content should be able to be made. In so doing, a large number of specimens with a lower organic content need not have to be tested. Control and patient groups will have to be compiled in order to standardise the method, which has not yet been applied to this situation. A complete evaluation must be carried out in order to decide if the method has enough merit to use in a metabolic screening programme.

H O O F S T U K 1

INLEIDING

Elke lewende organisme benodig energie vir die voortsetting van lewe. Energie word gevorm en benut tydens die metabolisme van die organisme. Metabolisme behels die chemiese veranderinge van biochemikalieë wat in organismes plaasvind (McMurray, 1977). Elke metabolisme weg bestaan meestal uit 'n reeks ensiem-gekataliseerde reaksies wat 'n substraat na 'n produk omvorm (Newsholme & Start, 1973). Sekere oorerflike siekte-toestande word veroorsaak deur die afwesigheid of foutiewe werking van ensieme wat spesifieke metabolisme stappe kataliseer. Die voorkomssyfer van metabolisme siekte-toestande is nie baie hoog nie, maar ernstige siekte word dikwels in pasgebore babas en jong kinders veroorsaak. Ongelukkig word heelparty van hierdie defekte nie gediagnoseer nie en die kinders sterf sonder dat behandeling toegedien kon word.

Tegnologiese vooruitgang het intussen analitiese apparatuur sodanig verbeter dat ondersoeke na metabolisme defekte heelwat vergemaklik word. Enige kind wat ernstige kliniese simptome wat nie aan 'n algemene oorsaak toegeskryf kan word nie, toon, behoort verwys te word vir 'n metabolisme ondersoek. Hierdie ondersoeke vorm deel van siftingsprogramme vir aangebore metabolisme siekte-toestande en die voordele van sulke programme is die volgende (Holton, 1988) :

- i) Vir die pasiënt - Sodra 'n siekte gediagnoseer is, sal die gepaste behandeling toegedien kan word. Alhoewel sekere siektes onbehandelbaar is, sal 'n positiewe diagnose onnodige mediese besoeke en behandeling verhoed. Mortaliteit en morbiditeit kan met 'n effektiewe siftingsprogram heelwat verlaag word.
- ii) Vir die gesin - Bekommernis en onsekerheid oor die oorsaak van die kind se siekte word uit die weg geruim. Indien 'n lid van 'n gesin met 'n aangebore metabolisme siekte-toestand gediagnoseer word, sal daar voorgeboortelike ondersoeke tydens volgende swangerskappe uitgevoer kan word, om te bepaal of daardie kind ook geaffekteer is. Behandeling kan in so 'n geval reeds baie vroeg toegedien word.

iii) Vir navorsing - Hierdie voordeel hou dalk nie direk met sifting verband nie, maar weens verbetering van behandelingsmetodes en ook die toetse wat gebruik word in die siftingsprogram, is dit tog van belang.

Alhoewel die siftingsprogramme wat in werking is, goeie en betroubare resultate lewer, word daar nogtans probleme ondervind. Een van die grootste is die feit dat daar nie tans 'n geskikte metode vir die massa-sifting van organiese suururieë beskikbaar is nie (Lehnert & Niederhof, 1984). Heelwat organiese suururieë veroorsaak onherroeplike breinbeskadiging of sterftes onder die pasiënte en dit is dus van die uiterste belang dat hierdie probleem aangespreek moet word. 'n Vinnige, eerstefase toets wat moontlik nie alleen hierdie spesifieke groep defekte nie, maar ook ander, opspoor, sou sake heelwat vergemaklik.

'n Apparaat wat deur die WNNR ontwikkel is vir die opsporing van opgeloste organiese koolstof, bied moontlik 'n oplossing. Aangesien pasiënte wat aangebore metaboliese siekte-toestande het, hoër konsentrasies metaboliete uitskei as persone wat nie aan sulke toestande ly nie, behoort die apparaat geskik te wees vir die kwantifisering van hierdie metaboliete. Op hierdie manier sal koolhidrate, aminosure, organiese sure en enige ander opgeloste verbindings, gekwantifiseer kan word en 'n hoë konsentrasie metaboliete behoort 'n aanduiding te wees van die teenwoordigheid van 'n metaboliese defek.

Die doel van hierdie studie was eerstens die toetsing van die geskiktheid van die apparaat self, om betroubare kwantifisering van opgeloste urinêre koolstofmateriaal moontlik te maak. Tweedens moes daar bepaal word of opgeloste urinêre koolstofmateriaal wel as 'n diskriminant by die identifisering van aangebore metaboliese siekte-toestande aangewend kan word. Toetsing van die apparaat se betroubaarheid word in Hoofstuk 3 beskryf. Drie groepe monsters, naamlik 'n kontrolegroep, bevestigde pasiënte en persone wat verwys is vir metaboliese sifting, is gebruik om te bepaal of opgeloste urinêre koolstof as 'n diskriminant by die identifisering van metaboliese defekte aangewend kan word. Hierdie resultate volg in Hoofstuk 4. 'n Bespreking van die resultate wat vir hierdie studie verkry is, word in Hoofstuk 5 uiteengesit.

H O O F S T U K 2

LITERATUUROORSIG

2.1 INLEIDING

Elke lewende organisme het 'n interne milieu wat sodanig gereguleer word om 'n toestand van dinamiese ewewig, of homeostase, in stand te hou. Die regulerende prosesse is die homeostatiese meganismes van die liggaam en die instandhouding van hierdie meganismes is al deeglik nagevors. Mensmetabolisme is veral intensief bestudeer. Die rede hiervoor is dat goeie gesondheid afhanklik is van die korrekte funksionering van die vele metaboliese weë wat in ons liggame voorkom. T H Huxley haal aan in "The Essentials of Human Metabolism" (McMurray, 1977) "a mass of living protoplasm is simply a molecular machine of great complexity, the total results of the working of which, or its vital phenomena, depend on the one hand on its construction, and on the other upon the energy supplied to it." Die energie wat aan selle verskaf word maak enkele prosesse moontlik. Enkele metaboliese weë word saamgestel om stelsels te vorm wat uiteindelik 'n eenheid vorm wat as 'n lewende wese beskou kan word. Die integrering van die verskillende metaboliese stelsels in die liggaam word in figuur 2.1 getoon.

'n Disfunksie wat in een van die metaboliese weë voorkom kan veroorsaak dat baie ander beïnvloed word. Dit veroorsaak dat die diagnose en opklaring van 'n aangebore metaboliese siekte-toestand heelwat bemoeilik word. Navorsing op die gebied van sulke siektes het aanleiding gegee tot verdere tegnologiese ontwikkelings om diagnose en behandeling te verbeter. Die apparate en metodes wat tans beskikbaar is vergemaklik beide die uitvoering van toetse in 'n ondersoek en die kwaliteit van diagnose. Aangesien die studies van hierdie disfunksies al sodanig gevorder het, kan spesifieke diagnoses sonder volledige bewys daarvan gemaak word.

Verskillende metodes is ontwikkel om gedefinieerde vraagstukke te beantwoord. Sommiges is eenvoudiger as ander, maar hulle het almal as doelwit die identifisering van metaboliese afwykings. Daar is egter steeds gebiede waarin heelwat antwoorde ontbreek. Navorsing op die kliniese gebied van vele siekte-toestande het al baie goed gevorder en alhoewel diagnoses op grond van kliniese simptome gemaak kan word, ontbreek die inligting aangaande geen-mutasies. Siftingsprogramme vir metaboliese afwykings funksioneer oor die algemeen goed maar, soos aangetoon sal word, is die huidige prosedures soms omslagtig en duur. Aangesien hierdie studie oor die ontwikkeling van 'n prosedure vir 'n vroeë diagnose van metaboliese afwykings handel, sal dit gepas wees om sekere aspekte van die mens-metabolisme toe te lig.

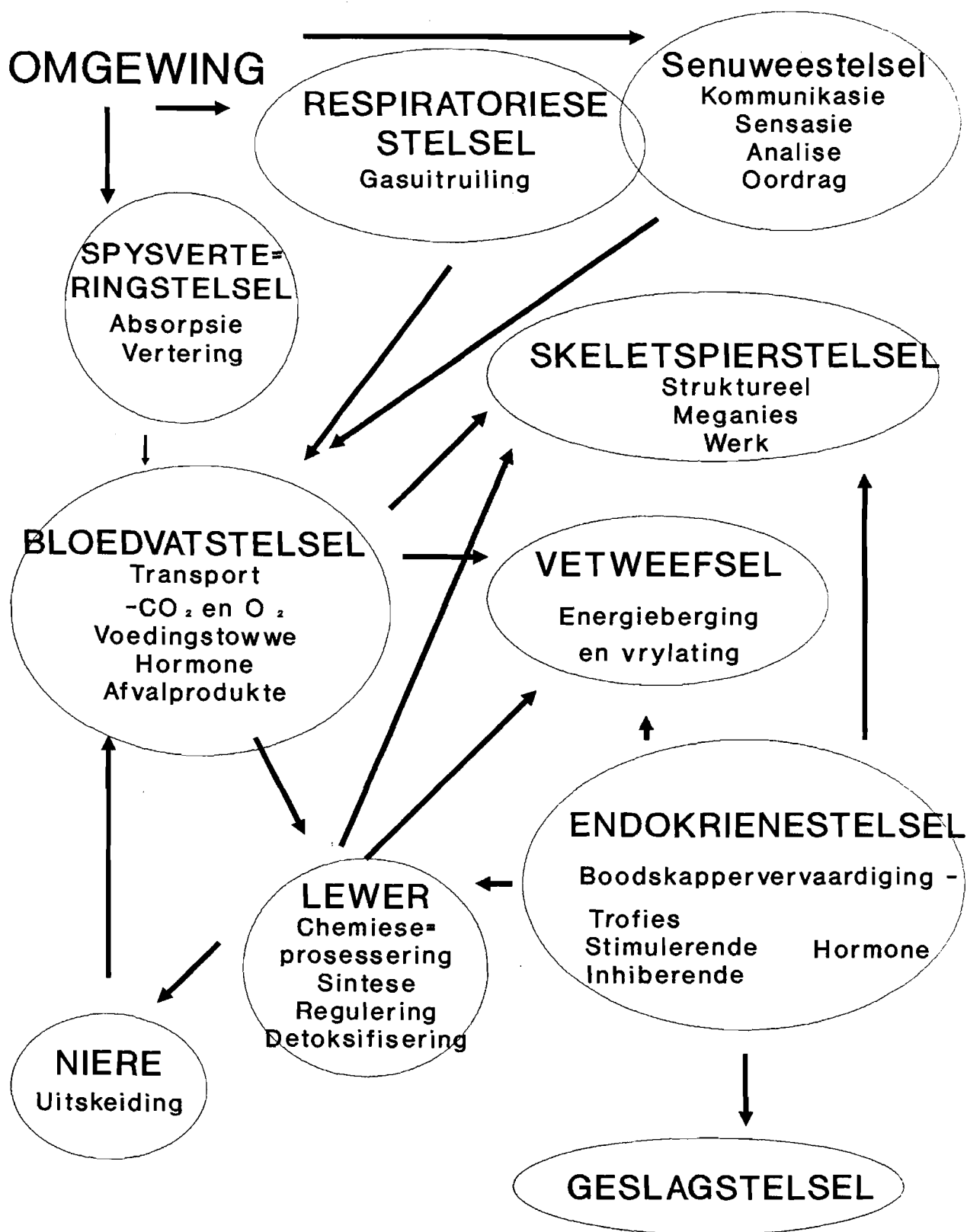


Fig 2.1 Integrering van die metaboliese weë in die ligam. Al die verskillende sub-stelsels integreer met mekaar om uitendelik 'n eenheid te vorm.

2.2

METABOLISME EN METABOLIESE WEË

Metabolisme behels die chemiese veranderinge van biochemikalieë wat in organismes plaasvind. Die chemiese reaksies word deur ensieme gekataliseer, wat op hulle beurt onder die beheer van gene, hormone, energie-toestande en eindprodukte staan (McMurray, 1977). Metabolisme kan in twee prosesse verdeel word, naamlik anabolisme en katabolisme. Tydens anabolisme word eenvoudige uitgangstowwe gereduseer tot ander verbindings, wat gewoonlik meer kompleks in struktuur is en wat vir spesifieke funksies in die liggaam nodig word. In teenstelling hiermee, behels katabolisme die omvorming van soms komplekse verbindings tot meer geoksideerde produkte wat gewoonlik met verskaffing van energie gepaardgaan. Die geoksideerde verbindings het 'n eenvoudiger struktuur en in die geval van volledige katabolisme is die eindprodukte CO_2 en water. Anabolisme sowel as katabolisme word voortdurend gereguleer sodat daar 'n fyn balans tussen hierdie twee prosesse bestaan. Sekere selkomponente word voortdurend vir energievrystelling geoksideer en word deur die voedsel wat ingeneem word aangevul. Onvoldoende diëte, vasting, koors en siekte veroorsaak dat katabolisme oorheers en gewigsafname en soms die dood kan voorkom. Swangerskap, laktering, groei, wond-genesing en herstel van siektes, het die teenoorgestelde effek, waartydens anabolisme oorheers. Hoewel dit so mag voorkom, is anabolisme nie die direk-teenoorgestelde van katabolisme nie en suksesvolle anabolisme is afhanklik van volledige katabolisme.

'n Metaboliese weg, hetsy katabolies of anabolies, bestaan meestal uit 'n reeks van ensiem-gekataliseerde reaksies wat 'n substraat na 'n produk omvorm (Newsholme & Start, 1973). Die chemiese-prosesse wat in die individuele stappe van die weg betrokke is, is meestal relatief eenvoudig, maar die totale effek van sodanige metaboliese weg kan kompleks wees. Kofaktore is dikwels betrokke by die ensiem-gekataliseerde stappe van 'n metaboliese weg. Hierdie kofaktore is dikwels vitamien en spoorelemente en meestal essensieel vir die suksesvolle verloop van die ensiemreaksie. Metaboliese weë is soms uiters moeilik om te bestudeer aangesien ensieme wat by sekere weë betrokke is, se struktuur soms sodanig is dat die oorgangsprodukte altyd aan die ensiem se oppervlakte gebonde bly. Dit verklaar dikwels die onvermoë om oorgangsprodukte te isoleer. Oorgangsprodukte moet soms vir ander metaboliese weë beskikbaar wees. Om hierdie rede bestaan die metabolisme nie net uit los reekse ensiemreaksies nie, maar is dit 'n hoogs-geïntegreerde, komplekse sisteem. Die mobiliteit van die intermediêre binne die sel word gebruik om die metabolisme te reguleer. 'n Verandering in die konsentrasie van 'n metabool gee 'n aanduiding van die stand van metabolisme op 'n sekere tydstip en aanpassings kan, indien nodig, gemaak word.

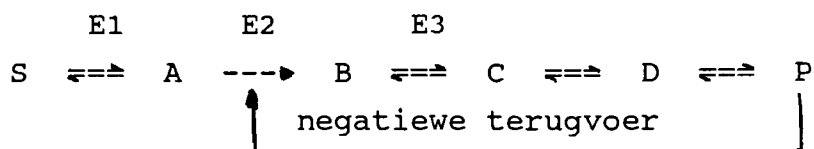
Regulering van metabolisme vind hoofsaaklik op vier maniere plaas (Newsholme & Start, 1973) -

- i) substraat beskikbaarheid
- ii) kofaktor beskikbaarheid
- iii) verwydering van produk
- iv) terugvoerregulering

Die beskikbaarheid van die substraat is teoreties 'n eenvoudige manier om enige metaboliese weg te reguleer. 'n Vermindering in die konsentrasie van die substraat sal die aktiwiteit van 'n ensiem verlaag, en 'n stadiger fluks sal deur die weg plaasvind. 'n Verhoging in die substraat-konsentrasie sal noodwendig die weg stimuleer. In hoër-orde diere is laasgenoemde nie 'n hoof-reguleringsmeganisme nie, behalwe in die geval van plasma-vetsure, maar dit het wel die potensiaal daarvoor (Newsholme & Start, 1973). Kofaktor beskikbaarheid as reguleringsmeganisme is soortgelyk aan regulering deur substraat beskikbaarheid. Inhibisie van die ensiemreaksie kan slegs plaasvind as die kofaktor in baie lae konsentrasies voorkom. Dit is ook slegs moontlik as die kofaktor spesifiek is vir die weg wat ondersoek word en nie by ander weë betrokke is nie. Sulke spesifisiteit van kofaktore is ongewoon (Newsholme & Start, 1973).

Indien 'n substraat omgeskakel word na 'n produk, via 'n reeks reaksies wat almal of nagenoeg almal in ewewig verkeer, sal die verwydering van die produk, deur sy vorming vanaf die substraat beïnvloed word. Die meeste weë van fisiologiese belang word egter by nie-ewewig toestande beheer en produkverwydering speel nie 'n groot rol nie. Eenvoudige metaboliese weë, of dele van enkele weë, kan op hierdie manier gereguleer word (Newsholme & Start, 1973).

Die mees buigbare- en biologies-algemene metode van regulering van ensiemaktiwiteit is terugvoer-regulering. Die volgende diagram verduidelik die begrip :



E1, E2 en E3 is ensieme;
 S verwys na die substraat;
 P is die gevormde produk; en
 A, B, C en D is oorgangsprodukte

Indien die omskakeling van A na B nie in ewewig is nie, kan aangeneem word dat die aktiwiteit van ensiem E2 die totale omskakeling van substraat (S) na produk (P) beheer. Daar sal dus terugvoerregulering plaasvind as (P) die werking van E2 inhibeer. Hierdie manier van regulering sluit enige metaboliet in wat nie die substraat of produk is nie en die prosesse van die reaksie-weg plaas geen beperking op die meganisme van beheer nie. Enige substans kan die aktiwiteit van die ensiem modifiseer en dus die fluks deur die weg beïnvloed (Newsholme & Start, 1973).

2.3

VERBAND TUSSEN METABOLISME EN DIE INHOUD EN EIENSKAPPE VAN URINE

Duran et al (1978) maak die volgende stelling na aanleiding van 'n ondersoek van die metabolietpatroon by propioonsuururie pasiënte : "The metabolic profile of any urine sample is a reflection of the metabolic state of the child superimposed on the intrinsic pattern of enzyme activities involved..."

Uit hierdie aanhaling kan afgelei word dat die inhoud van urine 'n aanduiding van die toestand van metabolisme in die liggaam kan gee. Bewyse vir hierdie stelling blyk bloot uit die bestaan van minimum- en maksimumwaardes vir urinêre metaboliëte. Afwykings in die normaalkonsentrasies, dikwels verhoog, word gebruik om metaboliese afwykings te diagnoseer. Holland en medewerkers (1986) beweer dat die metabolietpatroon van 'n persoon uniek is en dat 'n verandering in die profiel 'n aanduiding van die gezondheidstoestand van die persoon is. Selfs geringe afwykings kan aan minder ernstige siekte-toestande toegeskryf word.

Tydens die vorming van urine word bloed deur die nefrons in die niere van onnodige en onbruikbare verbindings skoongemaak. Veral die eindprodukte van metaboliese weë (ureum, kreatinien, uriensuur) word verwyder. Die ion wat in urine aangetref word is dié wat in die liggaam geakkumuleer het en nie gebruik kan word nie. Die vorming van urine, asook die samestelling daarvan, word beïnvloed deur daaglikse veranderlikes soos spieraktiwiteite, eetgewoontes en selfs emosies terwyl die effektiwiteit van die niere ook 'n belangrike bydrae mag wees. Etlike honderde verskillende verbindings en metaboliëte word in urine aangetref, waarvan die belangrikste die volgende is -

Anorganiese verbindings

natrium- en kaliumsoute

kalsiumsoute

magnesiumsoute

ystersoute

bikarbonate

fosfate

chloriedsoute

anorganiese sulfate

Organiese verbindings

Ureum

Kreatinien

Aminosure

Koolhidrate

Uriensuur

Peptiede

Hormone

Organiese sure

(White et al, 1978 en Guyton, 1986)

Die gemiddelde hoeveelheid urine wat oor 'n 24-uur tydperk uitgeskei word, wissel van 600 tot 2 500ml (White et al, 1978), afhangende van verskeie faktore, maar veral van die ouderdom van die persoon. 'n Konstante verhoging in die hoeveelheid urine wat uitgeskei word (poli-urie), mag simptome wees van psigogeniese polidipsië, uremie, hipertiroïedisme, *diabetes mellitus* en *diabetes insipidus*. In laasgenoemde geval word tot 30l daaglik uitgeskei (Kurtzman, 1974). Meer urine word gedurende die dag as tydens die nag uitgeskei. Nokturie is 'n toestand wat voorkom wanneer 500ml of meer urine in die nag uitgeskei word, sonder dat daar net voor slapenstyd vloeistof ingeneem word. Nokturie is dan dikwels ook een van die eerste simptome van nierversaking. Met verloop van tyd vertraag die nokturie en die urienvolume neem drasties af (oligurie) totdat dit heeltemal staak (anurie).

Die normale kleur van urine wissel van liggeel tot rooigeel, afhangende van die konsentrasie daarvan. Die kleur kan hoofsaaklik toegeskryf word aan urochroom ('n swaelbevattende pigment) en urobilien, 'n afbraak-produk van hemoglobien (Kurtzman, 1974). Variasies in die kleur van urine kan aan verskeie faktore toegeskryf word, wat in Tabel 2.1 weergegee word. Hoe langer urine staan, hoe donkerder word dit; as gevolg van oksidasie van bilirubien. Die karakteristieke reuk van urine word veroorsaak deur die afbraak van ureum na ammoniak. Urineweg-infeksie veroorsaak 'n fekale reuk, terwyl kenmerkende reuke ook as gevolg van bv. aspersies, koffie en antibiotika veroorsaak word. "Vars" urine is gewoonlik helder. Sodra dit 'n ruk lank gestaan het, geskied 'n mate van flokkulasie, bestaande uit spore van nukleoproteïene en epiteelselle vanaf die urineweg teenwoordig in die urien-vloeistof. Indien die urine alkalies is, sal 'n mengsel van kalsiumfosfaat en ammoniummagnesiumfosfaat (trippelfosfaat) ook presipiteer. Oksalate en urate presipiteer ook, maar los op sodra die urine aangesuur word. Uriensuur presipiteer vanuit urine met 'n lae pH (White, 1978)

TABEL 2.1 STOWWE WAT VERANDERING IN URINEKLEUR VEROORSAAK

WIT	PIENKROOI	ROOIBRUIN-PERS	BRUINSWART	GROEN
Fosfate	Piridium	Porfobilien	Rooibloedselle	<i>Pseudomonas</i>
Limfvog	Serenium	Porfobilinogeen	Mioglobien	Kleurstowwe
Etter	BSA	Uroporfirien	Gal	Riboflavien
	Congorooi		Melanien	Evan's Blue
	Senna		Homogentisiensuur	
	Urate		Fenol	
	Fenolftalien		Bilirubien	
	Doksidan		Mesobilirubien	
	Beet (indien ensiemdefek teenwoordig is)		Alkaptonliggame	
	Rooibloedselle		Fenotiziene	
	Hemoglobien		Alfametioldopa	
	Mioglobien		Metronizadool	

Die pH van urine wissel van 4.6 tot 8. Konstant-alkaliese urine kom voor by :

- * urineweg-infeksies
- * respiratoriese- of metaboliese alkalose
- * toediening van urineermiddels
- * hiperaldosteronisme en Cushing se sindroom

Urine wat voortdurend suur is kom voor tydens :

- * metaboliese en respiratoriese asidose
- * koors
- * metaboliese afwykings soos PKU
- * metanolintname
- * niertering

As gevolg van die vorming van ammoniak, word die pH van urine meer alkalies soos dit langer staan (Kurtzman, 1974).

Twee ander verbindings wat in die urine voorkom, is kreatien en kreatinien. Kreatienuitskeiding kom meer gereeld by kinders as volwassenes, en meer by vrouens as mans, voor. Die hoeveelheid kreatinien wat uitgeskei word wissel van persoon tot persoon, maar bly, per individu, besonder konstant op 'n daaglikse basis. Daar is 'n direkte verband tussen urinêre kreatinien en die spiermassa van 'n individu. Die kreatinien-koëffisiënt (mg kreatinien/24-uur/kg) is hoër by mans as by vrouens, en ook laer by oorgewig mense. Die totale hoeveelheid (kreatien + kreatinien) bly ongeveer konstant en 'n daling in die kreatinien-inhoud (vasting, diabetes, hipertiroïedisme) gaan met 'n styging in die kreatien-inhoud gepaard. Omrede die kreatinienuitskeiding op 'n daaglikse basis redelik konstant is, word metaboliete, byvoorbeeld die organiese sure en aminosure wat in die urine uitgeskei word en wat as diagnoseerend vir metaboliese siekte-toestande aangewend kan word, in verhouding met die kreatinien-inhoud uitgedruk.

Urine is baie belangrik in die opsporing van aangebore metaboliese siekte-toestande. In die geval van die meeste metaboliese defekte is dit makliker om 'n diagnose met behulp van 'n urienmonster as met bloed te verkry. Sommige metaboliese siekte-toestande kan uitsluitlik met behulp van urine verkry word. 'n Verhoging in die urinêre metabolietkonsentrasies reflekteer in baie gevalle 'n metaboliese defek.

2.4 **METABOLIESE SIEKTE-TOESTANDE**

2.4.1 **Inleiding**

Die mediese model van 'n siekte hipotetiseer dat sekere manifestasies veroorsaak word deur 'n proses wat 'n sekere oorsaak het. Sulke manifestasies word in die diagnose van die siekte vervat en die proses dui op die patogenie daarvan. Die oorsaak van 'n siekte is óf een wat die liggaam se homeostatiese meganismes ophef (ekstrinsieke oorsaak), óf een wat dieselfde meganismes benadeel (intrinsieke oorsaak).

Die meeste metaboliese siekte-toestande word deur 'n mutasie veroorsaak en dui dus op 'n intrinsieke oorsaak. Hierdie oorsaak word Mendeliaans oorgeërf (Beaudet et al, 1989). Kortom beteken dit dat aangebore metaboliese siekte-toestande veroorsaak word deur mutante gene wat abnormale proteïene (hoofsaaklik ensieme) produseer, waarvan die funksionele aktiwiteit verander is. 'n Skematiese voorstelling hiervan word in Fig 2.2 weergegee en die skema word prakties verduidelik aan die hand van propioonsuururie as voorbeeld.

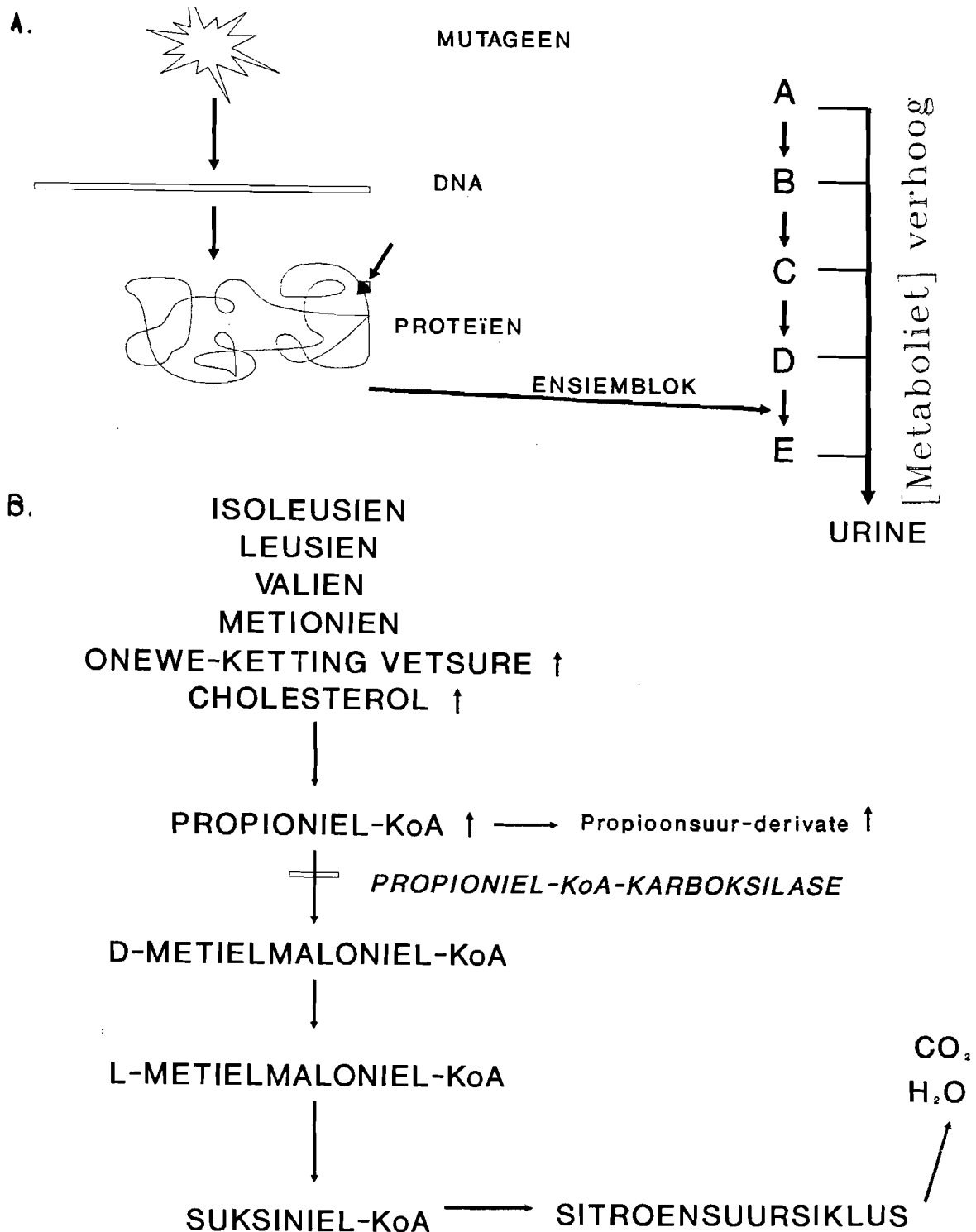


Fig 2.2 'n Aangebore metaboliese siekte-toestand.

- A.** 'n Skematiese voorstelling van 'n siekte-toestand, wat die invloed van 'n mutageen op die proteïen waarvoor die DNA kodeer aandui. Hierdie defekte proteïen kan nie die funksie verrig waarvoor dit ontwerp is nie en 'n metaboliese weg word beïnvloed.
- B.** Aanduiding van die defek by pasiënte met propioonsuururie. Aangesien propioniël-KoA-karboksilase nie sy funksie kan verrig nie, word die daaropvolgende metaboliete nie gevorm nie en dié wat voor die ensiemblokkasie voorkom, word in verhoogde konsentrasies uitgeskei.

Propioonsuururie word veroorsaak deur 'n defek in die ensiem propioniel-KoA-karboksilase. Genetiese analyses het gelei tot die identifisering van twee groepe met verskillende mutante loci (Gravel et al, 1977). Hierdie twee groepe staan as die pccA en pccBC mutantklasse bekend. Hoewel die genetiese mutasies by die mutantgroepe verskil, lei beide tot propioonsuururie, as gevolg van 'n gebrek aan die ensiem propioniel-KoA-karboksilase en dus akkumulasie van propioniel-KoA en voorlopers daarvan (Duran, 1978). Die akkumulasie van propioniel-KoA en intermediêre van kataboliese weë wat tot die vorming van propioniel-KoA lei, het tot gevolg dat groot hoeveelhede geïnduseerde metaboliëte gevorm word. By propioonsuururie is daar al meer as tagtig verskillende geïnduseerde metaboliëte geïdentifiseer, waaronder die mees bekende metielsitroensuur, 3-hidroksipropioonsuur, 3-hidroksivaleriaansuur, 2-metiel-3-ketovaleriaansuur, 2-metiel-3-hidroksivaleriaansuur, propionielglisien, asook langketting ketone soos 2-butanon. Geïnduseerde metaboliëte is fisiologies vreemd en word meestal aktief in die niere uitgeskei. 'n Maklik herkenbare metaboliëtoprofiel van sodanige afwyking kan deur middel van verskillende tegnieke verkry word en uiteindelik vir diagnostiese doeleindes gebruik word. Die teenwoordigheid van kombinasies van bogenoemde verbindings met die afwesigheid van metiëlmaloonsuur dui dan ook gewoonlik op 'n defek in propioniel-KoA-karboksilase (Duran & Wadman, 1981). Geïnduseerde metaboliëte is egter nie die enigste metaboliëte wat in verhoogde konsentrasies in die urine deur pasiënte met 'n metaboliese defek uitgeskei word nie. Die geïnduseerde metaboliëte is dikwels inhibeerders van talle ander metaboliese weë en lei tot verhoogde ketoonliggaam- en aminosuorkonsentrasies.

Herabsorpsie in die niere word waarskynlik ook benadeel, wat tot verdere verhoogde metabolietuitskeiding lei. Hierdie sogenaamde sekondêre metaboliëte, bemoeilik die verkryging van diagnoses en het meerdere biochemici al op 'n dwaalspoor gelei.

Aangebore metaboliese siekte-toestande vorm 'n heterogene groep van meer as 300 genetiese defekte, wat verwant is aan die sintese-, metabolisme-, vervoer- en berging van biochemiese verbindings (Giugliani et al, 1989). Kliniese simptome van hierdie siektes is dikwels nie-spesifiek, soos bv. fisiese- en/of neurologiese vertraging, stuiptrekkings, geelsug, lewer- en/of miltvergroting en skeletveranderinge. By elke pasgebore baba waar daar onverklaarbare fisiese en/of neurologiese agteruitgang, asook ketose, metaboliese asidose en ander biochemiese abnormaliteite voorkom, moet daar vermoed word dat die oorsaak dalk 'n aangebore metaboliese siekte-toestand mag wees. Sekere siekte-toestande is goed behandelbaar indien 'n vroeë diagnose gemaak kan word, maar is andersins fataal. Aangebore metaboliese siekte-toestande kan volgens hul kliniese effek in drie groepe verdeel word (Saudubray et al, 1990) :

- i) dié wat neurologiese "vergiftiging" veroorsaak. In sulke gevalle is daar simptome-vrye periodes, wat afwissel met tydperke waar vomering, koma, hipertonie en abnormale bewegings voorkom. Hierdie siektes is die gevolg van akute- en progressiewe akkumulering van stowwe wat vóór 'n metaboliese blok ontstaan. Die meeste organiese-suururieë val onder hierdie groep;

- ii) dié wat neurologiese "energie-tekorte" veroorsaak. Die simptome van hierdie siektes is gedeeltelik as gevolg van verlaagde energie gebruik- en vormingsprosesse, wat in hart-, lewer-, spier- en breindefekte ontstaan. Glukoneogenese defekte is 'n voorbeeld hiervan. Vertraagde groei kom dikwels voor by pasiënte wat aan hierdie siektes ly, asook ernstige hipotonisiteit en kongenitale afwykings; en
- iii) dié wat lewerdisfunksie en -vergroting aandui.

2.4.2 **Diagnose van aangebore metaboliese siekte-toestande**

Die kliniese diagnose van aangebore metaboliese siekte-toestande word deur 'n aantal faktore bemoeilik (Saudubray et al, 1990) :

- i) Sommige mediese praktisyns redeneer dat hierdie defekte, as gevolg van die seldsaamheid daarvan, eers oorweeg moet word nadat algemene toestande uitgeskakel is.
- ii) Die simptome waarmee die neonaat presenteer, is baie nie-spesifiek en heelparty kinders sterf tydens die neonatale periode, sonder dat 'n spesifieke diagnose gemaak word. Sepsis word dikwels as die rede vir dood aangevoer.
- iii) Lykskouing-bevindings is ook onspesifiek.
- iv) Baie algemene praktisyns oorweeg hierdie siektes slegs in gevalle waar stuiptrekkings en verstandelike vertraging voorkom en let dikwels nie hoogs-spesifieke simptome op nie.
- v) Alhoewel die meeste aangebore metaboliese siekte-toestande oorerflik is, veroorsaak die hedendaagse tendens tot klein families dat gevalle sporadies voorkom.

'n Aantal opsies is beskikbaar vir die diagnosering van aangebore metaboliese siekte-toestande, naamlik ondersoek na die kliniese beeld, ensiembepalings, genetiese analyses en ondersoek na metaboliëpatrone in die urine en plasma. Die belangrikste faktor in die diagnose van 'n aangebore defek is ingesteldheid van die geneesheer. Sodra daar vermoed word dat 'n pasiënt moontlik aan 'n aangebore metaboliese defek ly, moet die teenwoordigheid of afwesigheid daarvan deur 'n laboratorium bevestig word. Metaboliëpatrone van verskillende metaboliese afwykings is gewoonlik baie spesifiek en diagnoses word op grond hiervan gemaak. Van die diagnosties-belangrike metaboliëte mag, as gevolg van onthouding van die primêre metabolië, afwesig wees in die urine. Binne-aarse voeding word dikwels gebruik in 'n geval van ernstige metaboliese defekte en sal defekte van sekere metaboliese weë, onder die omstandighede, nie waargeneem word nie. Galaktose byvoorbeeld, verdwyn binne 24 uur uit die urine van 'n pasiënt wat geen laktose ontvang nie (Nyhan & Sakati, 1976). Hierdie inligting moet ten alle tye aan die laboratorium beskikbaar gestel word.

As gevolg van die hoogs gespesialiseerde aard en uiters duur apparaat gebruik vir diagnostiese toetse, kan die toetse slegs deur gespesialiseerde en dikwels staatsgesubsidieerde laboratoria's uitgevoer word. Hierdie laboratoria's beskik gewoonlik oor 'n siftingsprogram wat saamgestel word uit 'n aantal fases, bestaande uit verskillende benaderings, toetse en metodes. Die meeste siftingsprogramme bestaan uit 'n siftingsfase wat eerstens van 'n kliniese indikasie afhanklik is en opgevolg word deur 'n aantal chemiese toetse wat slegs die moontlikheid van die bestaan van 'n metaboliese afwyking aandui.

In teenstelling met bevolkingsifting, is metaboliese sifting die toetsing van 'n breë reeks aangebore metaboliese siekte-toestande, soos dit presenteer in akute neonatale siekte, kinders met groeivertraging, of waar verstandelike vertraagheid voorkom (Blom et al, 1989; Holton, 1988). Hierdie laboratorium-toetsing word uitgevoer na aanleiding van die pasiënt se kliniese simptome, met die doel om moontlike onderliggende siekte-toestande op te spoor.

Metaboliese siftingsprogramme moet sekere eienskappe hê en aan sekere vereistes voldoen. Daar moet soveel as moontlik pasgebore babas getoets word om 'n ware weerspieëling van die voorkoms van 'n sekere siekte te verkry (Holtzman, 1988). Sardharwalla en Wraith (1989) lê klem daarop dat die analitiese toetse wat uitgevoer word akkuraat, eenvoudig, vinnig, goedkoop en betroubaar moet wees. Alhoewel dit onvermydelik is dat enige toets vals-negatiewe resultate mag lewer, moet hierdie persentasie so laag as moontlik wees. Tesame hiermee moet daar voldoende opvolg analyses op positief-toetsende monsters toegepas word (Holtzman, 1988). 'n Verdere belangrike vereiste van 'n siftingsprogram, is dat die voordele daarvan die finansiële inset moet oorskry. Ekonomiese oorwegings is moeilik bepaalbaar omdat die verlaagde produktiwiteit van 'n vertraagde individu nie maaklik bereken kan word nie. Die voorkoms van 'n siekte-toestand, asook die aantal geaffekteerde individue wat opgespoor kan word, is kern-elemente in die bepaling van die kostes van 'n program en dit wat bespaar kan word (Sardharwalla & Wraith, 1989).

Uiters duur en gesofistikeerde kwantitatiewe toetse, wat in die meeste gevalle lei tot 'n diagnose, volg die moontlike bestaan van die afwyking op. Diagnoses kan bevestig word deur middel van ensiem- of selfs geenanalises. Diagnostisering van pasiënte met aangebore metaboliese siekte-toestande is duidelik van kritiese belang en die sukses van 'n stelsel is afhanklik van vroeë opsporing van hierdie pasiënte. Die vereistes en probleme wat met metaboliese siftingsanalises ervaar word, sal dan in die volgende afdeling bespreek word.

2.4.3 **Metaboliese siftingsprogramme**

Probleme wat by die diagnose van aangebore metaboliese siekte-toestande aangetref word, het genoodsaak dat 'n program wat die opsporing van hierdie afwykings vergemaklik, ontwikkel word. Dit het gelei tot die ontstaan van metaboliese siftingsprogramme. Soos die woord aandui, behels die programme 'n sifting- of sorteringsproses. In mediese terminologie dui sifting gewoonlik op programme waar 'n groot aantal mense vir 'n spesifieke siekte getoets word. Die doel is om groepe met hoë- en lae risiko's vir die siekte te identifiseer en sodoende die positiewe diagnose van 'n groot aantal van die eersgenoemde groep te bevestig (Holton, 1988). Daar moet klem gelê word op die verskil tussen metaboliese- en bevolkingsifting. Bevolkingsifting is die proses waardeur elke gebore individu vir 'n spesifieke siekte getoets word. Fenielketonurie ("PKU") is byvoorbeeld 'n siekte waarvoor in elke staat van die VSA (Stevens et al, 1981) getoets word.

Bo-en-behalwe die bogenoemde oorwegings, moet die siektes waarvoor getoets word, so ver as moonlik behandelbaar wees of moet verdere insidente van die siekte-toestand voorkom word. Die administrasie van die siftingsprogram moet ook sodanig wees dat toetse vinnig uitgevoer kan word; diagnoses vinnig en effektief gemaak kan word; behandeling voorgeskryf word; en opvolgtoetse uitgevoer word sonder om die program te vertraag (Sardharwalla & Wraith, 1989). 'n Belangrike kriterium is ook die sensitiwiteit van die analyses wat in die siftingsprogramme ingesluit word. Sensitiwiteit en spesifisiteit van 'n siftingstoets is geneig om teenoor mekaar te werk en Fig 2.3 dui hierdie beginsel aan. Sensitiwiteit poog om vals negatiewe resultate tot die minimum te beperk om sodoende ongerief en hartseer vir die pasiënte en ouers van die pasiënte te spaar. Spesifisiteit daarteenoor poog om vals positiewe resultate te verhoed. Opvolgtoetse skakel gewoonlik 'n groot mate van sulke gevalle uit, maar 'n hoë persentasie vals positiewe resultate bly steeds ongewens. Die verhouding tussen sensitiwiteit en spesifisiteit moet deur die laboratorium bepaal word. 'n Negatiewe resultaat vir 'n spesifieke toets skakel dus nie noodwendig 'n negatiewe diagnose uit nie.

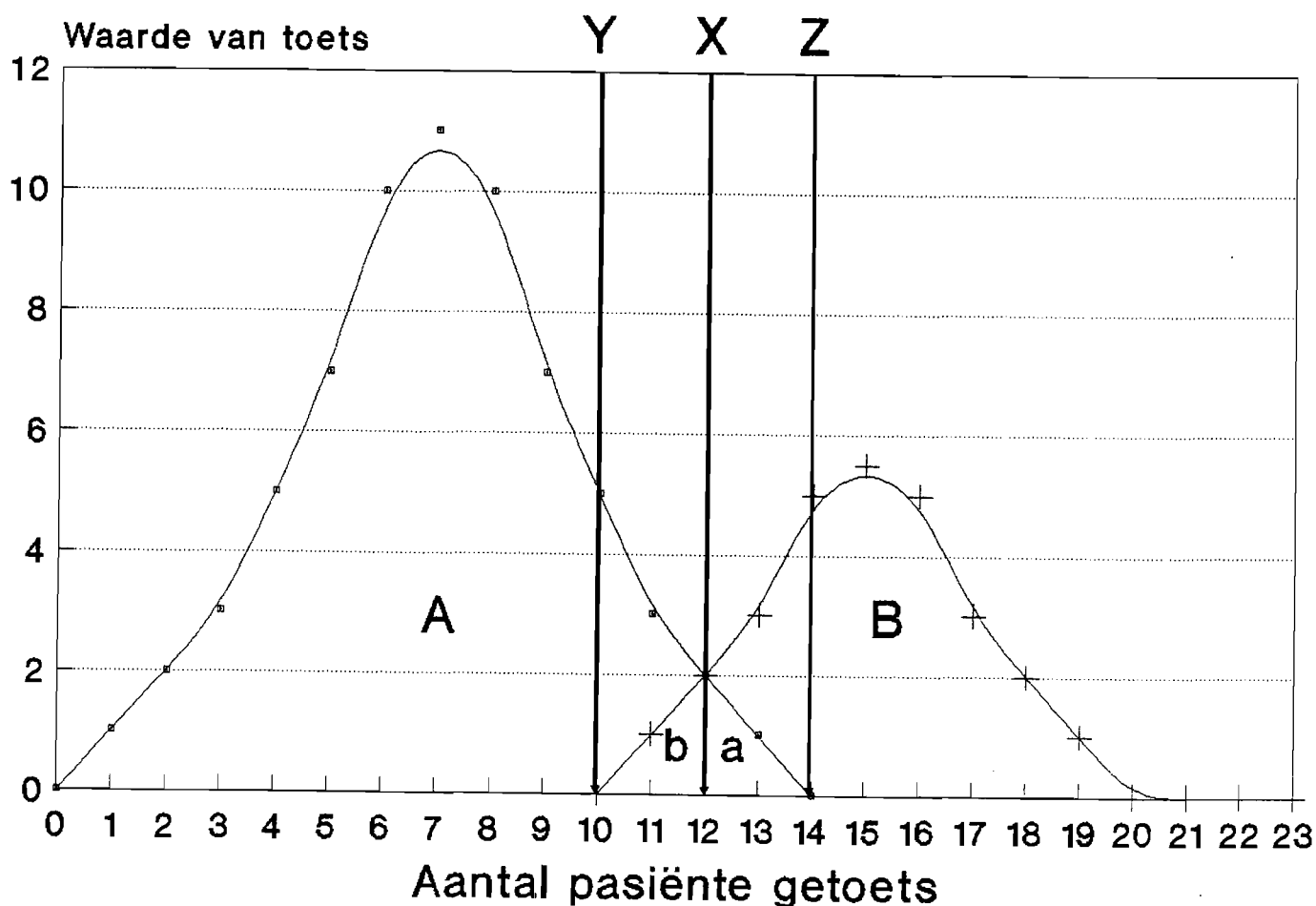


Fig 2.3 Die verspreiding van waardes van 'n siftingstoets wat gebruik word om onderskeid te tref tussen bevolkings met of sonder 'n spesifieke siekte. Deur 'n enkele afsnitpunt (X) te gebruik kom slegs 'n klein gedeelte (b) van die siek bevolking (B) onder X voor. Die meerderheid van die gesonde bevolking (A) lê onder X met 'n klein gedeelte (a) wat abnormale waardes het. Die sensitiwiteit van die toets deur van hierdie een afsnitpunt gebruik te maak is $B/(B+b) \times 100$. $A/(A+a) \times 100\%$ verteenwoordig die spesifisiteit van die toets. Persone met waardes tussen Y en Z behoort aan verdere toetsing onderwerp te word om hulle verder te differensieer (Holton, 1988).

Pasiënte word juis op grond van hul kliniese simptome verwys vir sifting en daar moet baie seker gemaak word dat die pasiënt nie ly aan een van die afwykings nie. Kliniese simptome is van uiterste belang in die beskouing van 'n pasiënt. Geneeshere wat monsters vir analyses verwys, verskaf egter selde die volledige kliniese simptome. Klem moet gelê word op die verskaffing van hierdie inligting, sodat laboratoriumpersoneel bygestaan kan word in hul diagnose van 'n siekte. Suksesvolle metaboliese sifting is gekompliseerd en dit is noodsaaklik dat 'n siftingsprogram so ontwerp word dat dit voldoen aan die aanvraag in 'n spesifieke land of omgewing (Tiwary, 1987). Alhoewel bevolkingsifting nie in Suid-Afrika uitgevoer word nie, hoort dit as 'n toekomsdoelwit gestel te word. Die laboratoria wat tans metaboliese sifting vir aangebore metaboliese siekte-toestande uitvoer, kan 'n vertrekpunt vir so 'n doelwit wees.

2.5 SAMESTELLING VAN SIFTINGSPROGRAMME EN DIE SIFTINGSPROTOKOL VIR AMINO- EN ORGANIESE SUURURIEË IN DIE DEPARTEMENT BIOCHEMIE AAN DIE PU VIR CHO

2.5.1 Inleiding

Aangebore metaboliese siekte-toestande is een van die hoof-oorsake van kinderdood in ontwikkelde industriële lande, en is vir 25 tot 25% van kinder sterfgevallen verantwoordelik (Cann *et al*, 1990).^{*} Die stygende kostes van mediese sorg het die owerhede van hierdie lande se aandag op programme wat vroegtydig aangebore metaboliese defekte kan opspoor, gevestig.

* CANN, N; KRUGER, N; KNOLL, D P; WILLEMSE, R; ERASMUS, E & MIENIE, L J (1991). Screening for metabolic diseases in South Africa. Poster for 10th Annual South African Biochemical Society Congress, Pietermaritzburg.

Laboratoriums wat abnormale metabolietvlakke in liggaamsvloeistowwe kan opspoor is gestig en met die tegnologiese ontwikkeling het die soektog na en navorsing van metaboliese siekte-toestande deurgaans verbeter. Analitiese tegnieke soos hoë-druk vloeistofchromatografie (HPLC), HPLC-massaspektrometrie (HPLC-MS), kernmagnetiese resonansie (NMR), gaschromatografie-massaspektrometrie (GC-MS), vinnige atoombombardement-massaspektrometrie (FAB-MS) en GC-MS-MS word gebruik vir die studie van metaboliese siekte-toestande, asook vir die diagnose daarvan. Tot soveel as 32 verskillende analyses kan selektief uitgevoer word om die beste moontlike resultate te verkry (Cann et al, 1990).

Faktore soos die teikengroep, voorkoms van spesifieke metaboliese defekte in 'n gebied of bevolkingsgroep, belang van metaboliese defekte as oorsaak van neonatale sterftes in die bevolking en kapitaal beskikbaar vir metaboliese sifting, sal uiteindelik bepaal watter toetse in 'n metaboliese siftingsprogram ingesluit sal word. Die mees algemeen gebruikte siftingsprogram word soos volg saamgestel :

- FASE 1 Seleksie op grond van kliniese indikasie
- FASE 2 Chemiese siftingsanalises
- FASE 3 Gesofistikeerde kwantitatiewe analises
- FASE 4 Bevestiging van diagnose

Die meeste laboratoriums gebruik kombinasies van bogenoemde fases, aangesien die bevestiging van 'n diagnose dan makliker geskied. Afdelings 2.5.2, 2.5.3 en 2.5.4 handel oor siftings wat op die fases gebasseer is.

2.5.2 Seleksie van pasiënte op grond van kliniese simptome

Kliniese simptome van metaboliese defekte is dikwels onspesifiek. Kliniese beeld van dieselfde defek kan van pasiënt tot pasiënt wissel en 'n daaglikse variasie by een pasiënt, is kenmerkend van heelwat van die aangebore metaboliese defekte. Op die breedste gestel, moet aanvaar word dat 'n metaboliese defek as 'n moontlike oorsaak gesien moet word by enige pasiënt waarvan die kliniese beeld nie aan 'n bevestigde rede toegeskryf kan word nie. Nogtans is daar enkele simptome wat meer algemeen by pasiënte met aangebore metaboliese siekte-toestande waargeneem word. 'n Opsomming van hierdie simptome word in Tabel 2.2 weergegee.

Tabel 2.2 KLINIESE KRITERIA WAT WÊRELDWYD GEBRUIK WORD OM 'N PASIËNT VIR METABOLIESE SIFTING TE VERWYS

Konvulsies	Afkeur vir sekere voedselsoorte
Koma	Verstandelike vertraging
Vomerig	Neurologiese agteruitgang
Hipertonie/hipotonie	Self-mutilering
Abnormale liggaamsreuke	Oog- en oordefekte
Metaboliese asidose	Abnormale vel en/of hare
Ketose	Vertraagde ontwikkeling
Hipoglisemie	Hepatomegalie (lewervergroting)
Hiperammonemie	Splenomegalie (miltvergroting)

Die diagnosering van pasiënte met aangebore metaboliese defekte is met uitsonderings na, byna onmoontlik. Met die kliniese beeld alleen as indikator, kan optimaal van 'n identifisering van pasiënte met 'n **moontlike** metaboliese defek verkry word. Suksesvolle identifisering van pasiënte met 'n moontlike aangebore metaboliese defek sal afhang van die ondervinding van die klinici.

2.5.3 Chemiese siftingsanalises

Die doel van siftingstoetse is om 'n hoë risikogroep pasiënte uit 'n groter groep te ken, sonder om noodwendig tot 'n finale diagnose te kom. Vals positiewe en vals negatiewe indikasies is onvermydelik, maar daar moet gepoog word om dié getalle so laag as moontlik te hou. Aangesien al die pasiënte wat na 'n laboratorium verwys word, deur hierdie siftingsfase moet gaan, is dit vanselfsprekend dat die toetse nie duur of tydrowend moet wees nie. Die samestelling van die tweede fase van die siftingsprogram sal weer eens afhang van 'n aantal faktore waarvan hoë voorkoms van spesifieke metaboliese siektes, hoeveelheid pasiënte wat na 'n laboratorium verwys word en beskikbaarheid van fondse, die belangrikste is.

Siftingsanalises het aanvanklik uit uiters eenvoudige, goedkoop kleuringstoetse, soos ferrichloried en dinitrofenielhidrasien, bestaan. Gaandeweg is egter meer metaboliese defekte ontdek en telkens moes meer en meer komplekse analises tot die groep van toetse gevoeg word. Die vereistes vir hoë tegnologiese siftingstegnieke het sodanig toegeneem dat sommige laboratoriums reeds GC-MS as siftingstegniek gebruik (Divry et al, 1987). Sommige siftingsprogramme bestaan egter slegs uit eenvoudige chemiese toetse. Giugliani et al (1989) het van 'n siftingsprogram gebruik gemaak wat uit hoofsaaklik die mees eenvoudigste tegnieke bestaan het. Tabel 2.3 bevat 'n lys van die tegnieke wat gebruik is.

Tabel 2.3 CHEMIESE TEGNIEKE WAT GEBRUIK IS IN DIE SIFTINGSPROGRAM WAT DEUR GIUGLIANI EN MEDEWERKERS GEVOLG IS

TOETS	METABOLIE TE WAARVOOR GETOETS WORD
Benedict se toets	Reduserende suikers
Ferrichloried	Fenielalanien en tirosien
Dinitrofenielhidrasien	Ketosure
Nitroso-naftol	Tirosienmetaboliete
Millon se toets	Tirosienmetaboliete
Sianiednitroprussied	Sisteien en homosisteien
Toluidienblou	Glikosaminoglikane
Setieltrimetielammoniumchloried	Glikosaminoglikane
P-nitroanilien	Metiellaloonsuur
Erlich se toets	Porfiriene
Papierchromatografie	Aminosure - urine
Papierchromatografie	Aminosure - bloed

Vir 'n siftingsanalise wat uitgevoer word met bogenoemde toetse, sal die volgende ter sprake wees, met werkseenhede bepaal deur die SAIMN. Een eenheid = R1,16.

Benedict se toets	5	R 5,80
Ferrichloried	2	R 2,32
Dinitrofenielhidrasien	2	R 2,32
Nitroso-naftol	2	R 2,32
Millon se toets	2	R 2,32
Sianiednitroprussied - sisteien	5	R 5,80
Sianiednitroprussied - homosisteien	5	R 5,80
Toluidienblou	5	R 5,80
Setieltrimetielammoniumchloried	5	R 5,80
P-nitroanilien	5	R 5,80
Erlich	5	R 5,80
Papierchromatografie urine	2	R 26,68
Papierchromatografie bloed	23	R 26,68
TOTAAL	89	R103,24

Beraamde tyd vir finale uitslag 24 uur

Giugliani en sy medewerkers het die program gebruik om 566 verwysde pasiënte te sif vir aangebore metaboliese defekte en 'n skematiese uiteensetting van die prosedure wat hulle gevolg het word in Fig 2.4 getoon. Met behulp van die program het 143 (25,25%) pasiënte abnormale resultate vertoon. Uit hierdie groep pasiënte kon uiteindelik by 46 pasiënte (32%, of 8,1% van die oorspronklike 566 pasiënte) die vermoede van 'n aangebore metaboliese defek bevestig word. Geen abnormale resultate is by 114 pasiënte verkry nie en meer gesofistikeerde toetse is gebruik om hulle verder te ondersoek. 'n Verdere 30 pasiënte is met 'n metaboliese defek geïdentifiseer. Die siftingsprogram toon 'n sensitiwiteit van 60,5%, 'n spesifisiteit van 80,2% en 'n effektiwiteit van 77,5%. Dit is egter opvallend dat slegs PKU, tirosienemie en nie-ketotiese hiperglisienemie met behulp van die program opgespoor is. In 'n ondersoek wat in die Departement Biochemie geloods is, het dit geblyk dat soveel as 50% van die aminosuurdefekte nie met behulp van papier- of dunlaagchromatografie waargeneem kan word nie. Organiese suururieë het ook wêreldwyd 'n hoë voorkoms. In sommige laboratoria's is 50% van die metaboliese defekte wat gediagnoseer word, organiese suururieë. Giugliani en sy medewerkers kon egter nie 'n enkele pasiënt met 'n organiese suururie opspoor nie. Indien die feite in ag geneem word, wil dis dus voorkom of die sensitiwiteit van die program hoogstens 35% beloop.

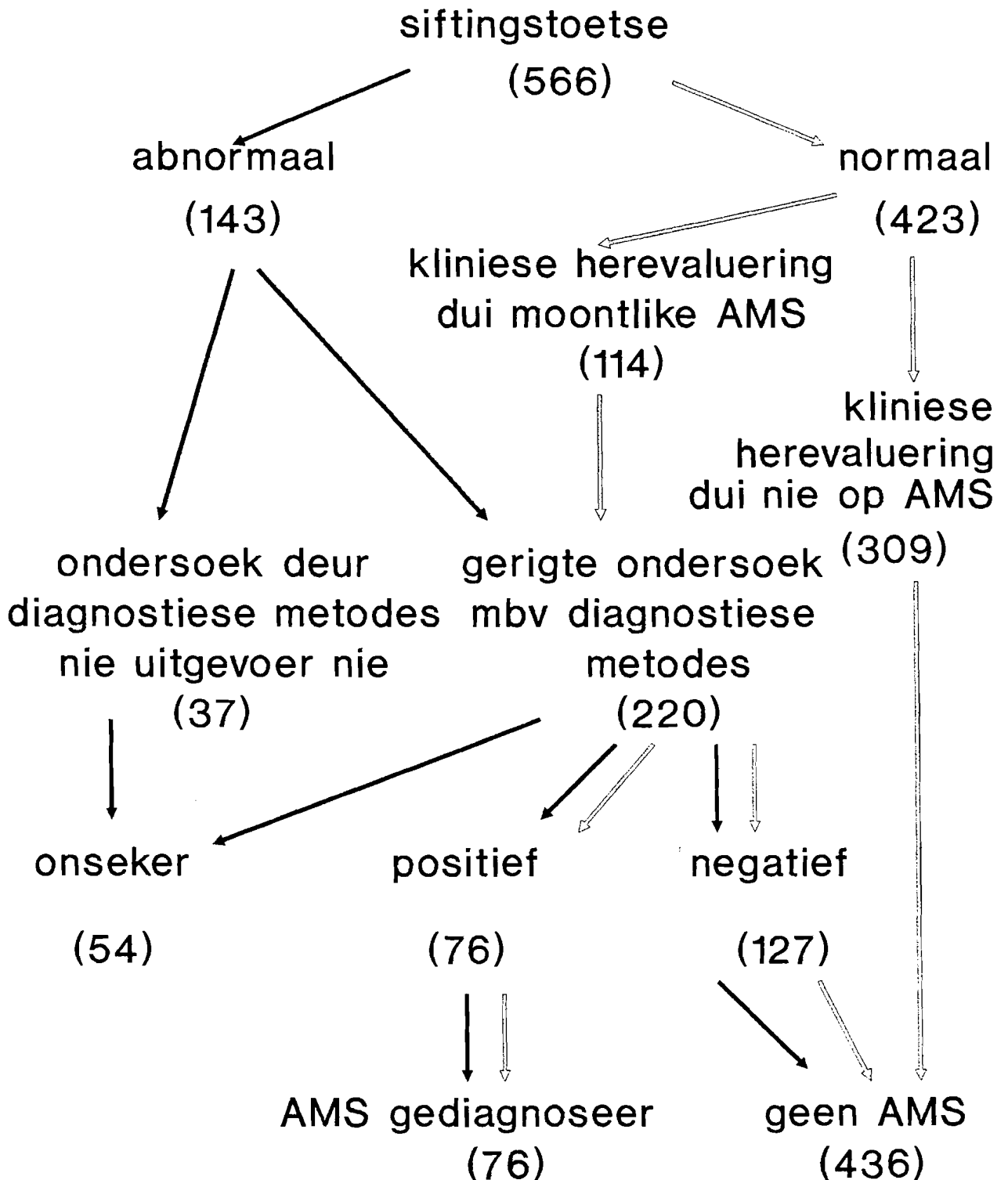


Fig 2.4

Siftingsprotokol wat deur Giuliani en sy medewerkers gevolg is. Eenvoudige toetse is gebruik en slegs enkele verskillende siektes is gediagnoseer. Geen organiese suururieë is met behulp van hul program gediagnoseer nie.

2.5.4 **Siftingsprotokol in Departement Biochemie**

Die metaboliese siftingsprogram in die Departement Biochemie aan die Potchefstroomse Universiteit is in 1983 van stapel gestuur, met die oorspronklike doel om slegs vir organiese-suururieë te toets. Die program is egter uitgebrei om aminosuur-, koolhidraat-, vetsuur-, purien- en pirimidiendefekte op te spoor. Monsters word verkry van die meeste universiteitshospitale (Johannesburg Hospitaal, HF Verwoerd), ander hospitale, sowel as van die grootste patologiese laboratoriums. Die monsters is van geselekteerde pasiënte : dié waar 'n aangebore metaboliese siekte-toestand as die oorsaak van die pasiënt se kliniese simptome vermoed word. Tot onlangs was al die babas van HF Verwoerd Neonataal, wat vroeggebore is, vir metaboliese siekte-toestande getoets. Die program wat tans in werking is, is 'n omvangryke een, met eerstefase- en gesofistikeerde tweedefase toetse en byna 100 monsters word elke maand geanaliseer. Ongeveer 6% van die monsters word met 'n aangebore metaboliese defek gediagnoseer. Die huidige siftingsprotokol word in Fig 2.5 voorgestel.



*Diagnoses word gemaak op grond van kliniese data
gekombineer met die resultate van die toetse*

Fig 2.5 Skematiese voorstelling van die siftingsprotokol vir die diagnose van metaboliese defekte in die Departement Biochemie aan die Potchefstroomse Universiteit vir Christelike Hoër Onderwys. Monsters word gevries ontvang en word dan ook in vrieskaste gebêre totdat toetsing geskied. Die program bestaan uit eenvoudige eerstefase (kreatinien, Clinitest ens.) en meer gesofistikeerde tweedefase toetse (bv. kwantitatiewe aminosuuranalise).

Pasiënte word verwys op grond van hul kliniese simptome. Geneeskundiges word versoek om sover moontlik alle kliniese data van hul pasiënte te verskaf omdat dit 'n beter aanduiding gee van die moontlike siekte-toestand. Al die patologiese laboratoriums en hospitale waarvandaan monsters ontvang word, het voorgeskrewe vorms wat vir elke pasiënt ingevul word en wat alle moontlike relevante inligting aangaande die pasiënt verskaf. Die siftingskaskade vloei verder met aanvanklik eenvoudige toetse wat potensiele pasiënte identifiseer en positiewe resultate word opgevolg met analyses wat GC-MS, HPLC, FAB-MS en kwantitatiewe aminosuuranalise insluit. Indien dit sou gebeur dat 'n definitiewe diagnose nie op grond van die toetsresultate gemaak kan word nie, word die urine- of serummonsters na soortgelyke laboratoriums in die buiteland versend, waar meer gesofistikeerde toetse soos ensiem-analises, uitgevoer kan word. Beladingstoetse word ook uitgevoer.

In die tydperk Januarie 1984 tot November 1991 is 3 694 monsters geanaliseer. Die aantal pasiënte wat jaarliks na hierdie laboratorium oor die bogenoemde periode verwys is, word in Fig 2.6 getoon en die etniese oorsprong van die pasiënte in Fig 2.7. Die monsters van nie-blanke pasiënte word vanaf patoloë en die groot nie-blanke hospitale in die PWV-gebied soos bv. Kalafong en Baragwanath versend (alle inligting vervat in die volgende figure is saamgestel deur D.P. Knoll van die Departement Biochemie).

PASIËNTE WAT VIR SIFTING VERWYS IS

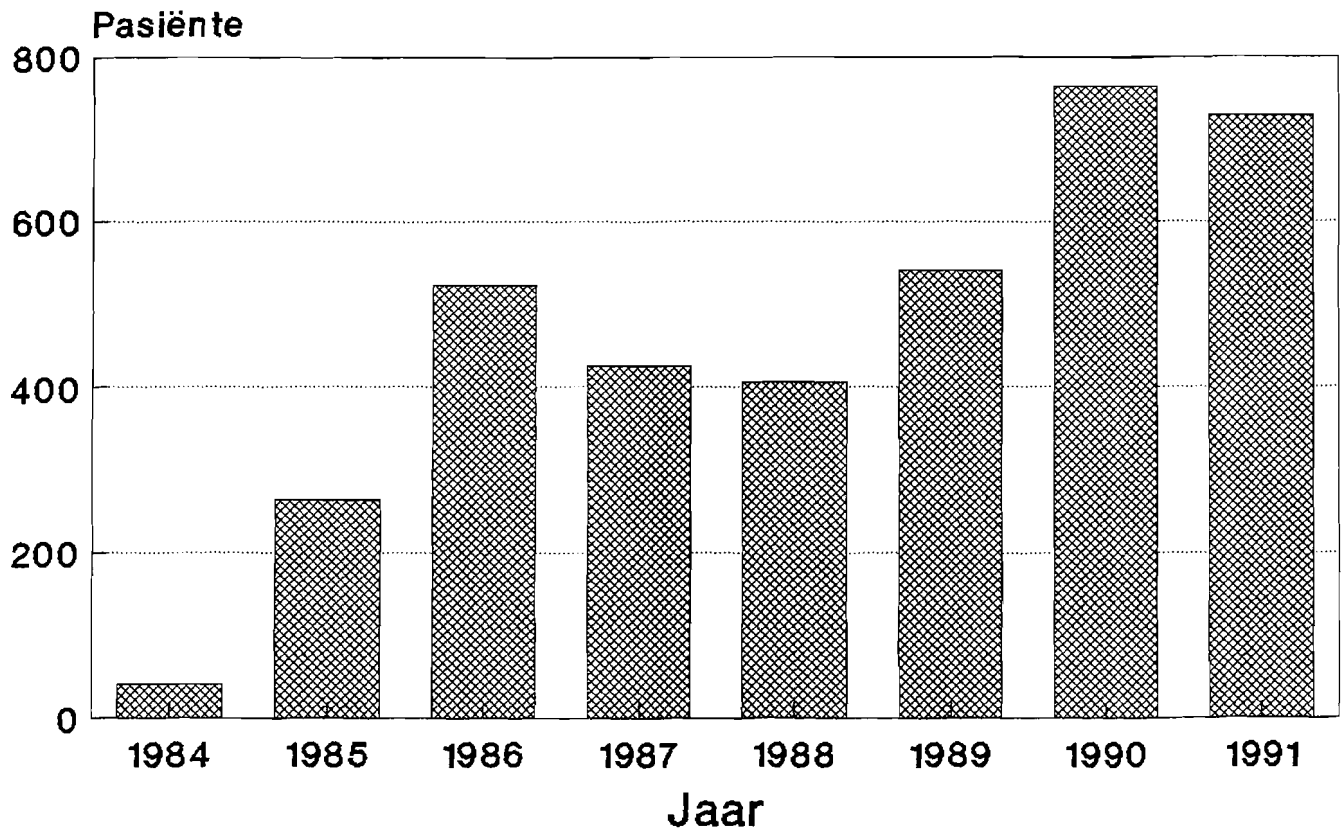


Fig 2.6 Aantal pasiënte wat tussen Januarie 1984 en November 1991 vir metaboliëse sifting verwys is.

Na 'n aanvanklike klein begin, was die algemene tendens 'n styging in die hoeveelheid pasiënte wat verwys is. Indien 'n monster van 'n reeds gediagnoseerde pasiënt ingestuur word vir opvolganalises of die nagaan van die metaboliëse toestand, word die monster nie as 'n tweede, ens. monster beskou nie. Die pasiënt word net een keer getel.

BEVOLKINGSGROEP *	BEVESTIGDE DIAGNOSE	VOORLOPIGE DIAGNOSE	AANTAL VERWYSINGS
Blank	132	70	3237
Nie-blank	18	5	457
Totaal	150	75	3694

* Onderskeid getref op grond van plek van oorsprong en van

Fig 2.7 Etniese oorsprong van pasiënte wat tussen Januarie 1984 tot November 1991 vir metaboliese sifting verwys is.

Die onderskeid is getref op grond van die pasiënte se vanne, asook die plek van oorsprong van die monster. Dit is vanuit die figuur duidelik dat die aantal verwyse pasiënte in die nie-blankegroep, nie die bevolkingsverspreiding in hierdie land weerspieël nie.

Die aantal pasiënte wat verwys is vir sifting het vanaf 1984 heelwat gestyg en daar word tans omtrent 100 monsters elke maand hanteer. Soos uit Fig 2.7 blyk, was slegs 12,4% van die pasiënte wat vir metaboliese sifting verwys is, nie-blank. As daar in ag geneem word dat blankes net omtrent 17% van die bevolking verteenwoordig, is die verspreiding van monsters nie eweredig oor die hele bevolking nie. Een van die redes hiervoor is die kostes van die sifting : dié diens val net nie binne die bereik van elke Suid-Afrikaner nie. 'n Wesenlike poging sal aangewend moet word om metaboliese sifting vir hulle meer bekombaar en bekostigbaar te maak.

Soos reeds genoem, word daar vir amino- en organiese suururieë, koolhidraat-, vetsuur-, purien- en pirimidien defekte gesoek. Alhoewel hierdie afwykings nie algemeen onder die bevolking voorkom nie, verteenwoordig hulle 6,1% van die monsters wat na ons laboratorium verwys word. Tabel 2.3 gee 'n aanduiding van die verskillende aangebore metaboliese siekte-toestande gediagnoseer tydens die siftingsprogram in die Departement. Van die siektes wat gediagnoseer is, verteenwoordig die organiese suururieë 'n groter groep as die aminosuururieë. Die voorkoms van die mees algemene siekte-toestande gediagnoseer in die Departement Biochemie word in Fig 2.8 en 2.9 aangetoon.

**TABEL 2.3 AANGEBORE METABOLIESE SIEKTE-TOESTANDE WAT TUSSEN
JANUARIE 1984 EN NOVEMBER 1991 IN PASIËNTE
GEDIAGNOSEER IS WAT VIR METABOLIESE SIFTING
VERWYS IS**

DEFEK	AANTAL PASIËNTE
Tirosienemie	
Tipe I	3
Tipe II	2
Onopgelos	8
Hiperfenielalanienemie	
PAH	6
DHPR	1
Onopgelos	1
Sistienurie	10
Hartnup se Sindroom	6
Ureumsiklus defekte	
Karbamoïelfosfaatsintetase defek	3
Argininosuksinaatsintetase defek	1
Argininosuksinase defek	1
Arginase defek	1
Hipervalienemie	3
Maple Syrup Uriensiekte	2
Histidienemie	2
Canaran Siekte	1
Sistationienemie	1
Hiperglisienemie	1
Hiperlisienemie	1
Hipermetionienemie	1
Hiperprolienemie	1
Hiperfosfatase	1
Abnormale propioonsuur/metielmaloonsuur metabolisme	
Metielmaloonsuururie	14
Propioonsuururie	10
Meervoudige karboksilase defek	6
Holokarboksilasesintetase defek	2
Biotinidase defek	1

**TABEL 2.3 AANGEBORE METABOLIESE SIEKTE-TOESTANDE WAT TUSSEN
JANUARIE 1984 EN NOVEMBER 1991 IN PASIËNTE
GEDIAGNOSEER IS WAT VIR METABOLIESE SIFTING
VERWYS IS (vervolg)**

DEFEK	AANTAL PASIËNTE
Asiel-KoA-dehidrogenase defekte	
Kortketting (SCAD)	1
Langketting (LCAD)	1
Mediumketting (MCAD)	5
Karnitien defek	2
Onopgeloste dikarboksielsuururie	4
Glutaarsuururie Tipe II	4
Etielmalonieladapiensuururie	3
Meervoudige asiel-KoA-dehidrogenase defek	3
Vertakteketting organiese suururieë	
Isovaleriaansuururie	9
3-metielglutakoniensuururie	3
3-hidrokxi-isobottersuurdehidrogenase defek	1
Laktiese asidose	
Onopgelos	3
Piruvaatkarboksilase defek	1
Piruvaatdehidrogenase defek	1
Peroksisomale defekte	
Adrenoleukodistrofie	2
Zellweger se Sindroom	2
Abnormale gliserol metabolisme	
Gliserokinase	1
Gliserol intoleransie sindroom	1
Hiperoksalurie	
Tipe I	1
Tipe II	2
Ander sindrome	
Alkaptonurie	1
Glutaarsuururie Tipe I	1
Glutatioonsintetase defek	1

ORGANIESE SUURURIEë (1984-1991)

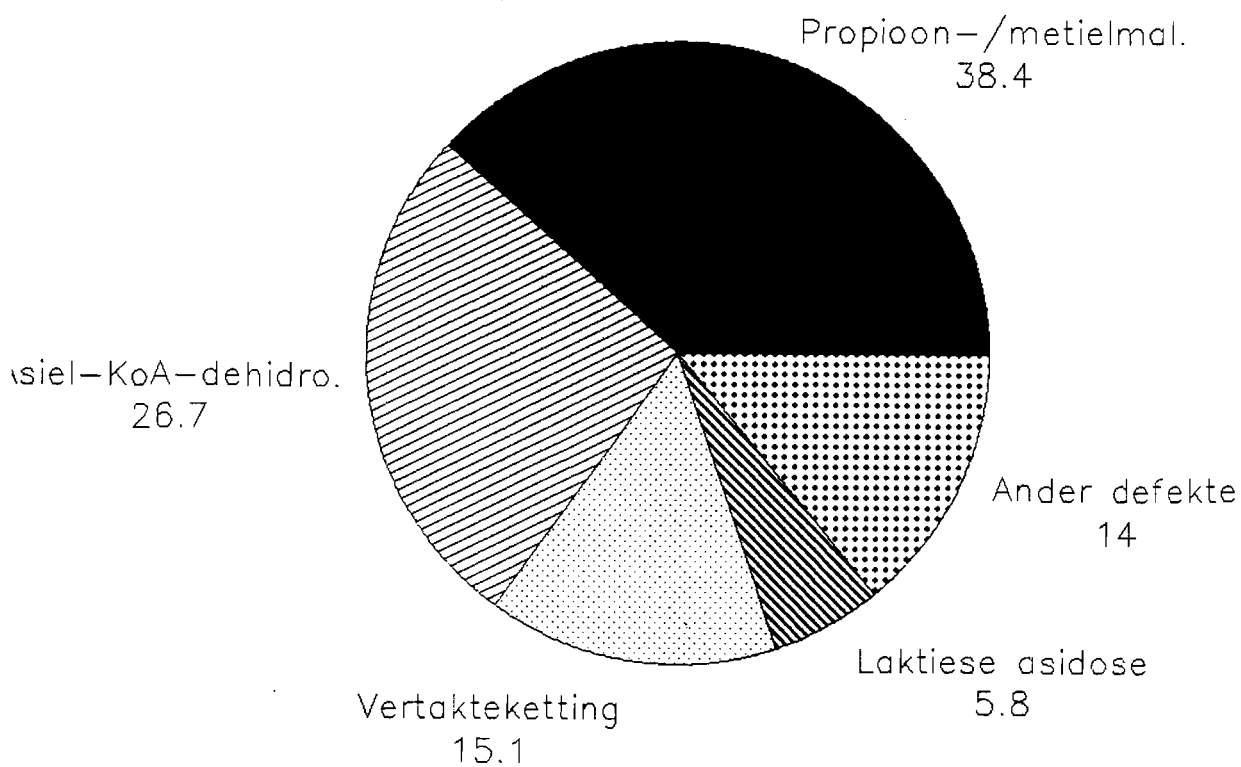


Fig 2.8 Gediagnoseerde organiese suururieë.
Propioonsuur- en metielmaloonsuur metabolisme defekte verteenwoordig 23% van die totale aantal siektes wat gediagnoseer is, terwyl 16,1% deur asiel-KoA dehidrogenase defekte verteenwoordig word. Meer organiese suururieë is gediagnoseer as aminosuururieë (60,2%).

AMINOSUURURIEë (1984-1991)

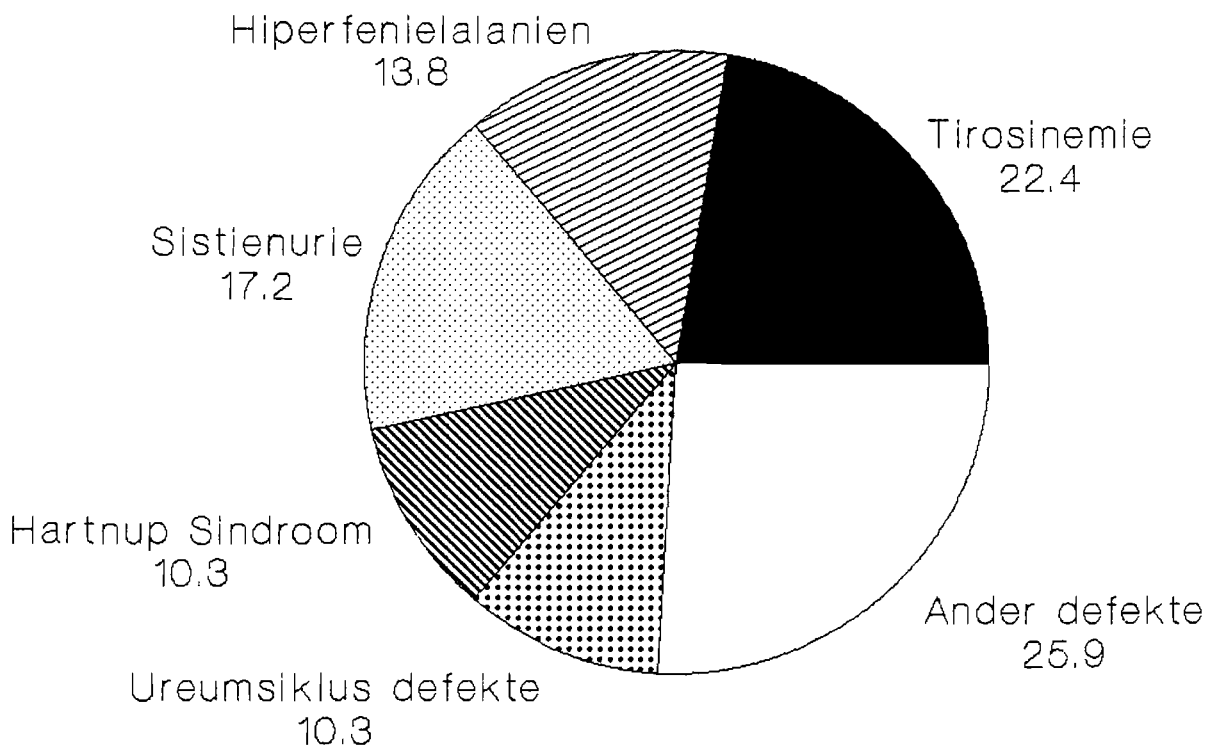


Fig 2.9 Gediagnoseerde aminosuururieë.
Die grootste individuele groep onder die aminosuururieë is tirosienemie. Hierdie siekte is by 9,1% van die pasiënte gediagnoseer. 39,9% Van die totale aantal pasiënte wat gediagnoseer is, is met aminosuururieë gediagnoseer.

Alhoewel die program nie 'n bevolkingsiftingsprogram is nie, vergelyk die resultate, soos in Tabel 2,3 en Fig 2.8 en 2.9 uiteengesit, met dié van soortgelyke programme elders. Blom et al (1989) noem in 'n publikasie dat die Sophia Kinderhospitaal in Rotterdam 'n voorkoms van 6,2% aangebore metaboliese siekte-toestande in hulle program gevind het en dat die gemiddelde voorkomssyfer van ander hospitale in Nederland 6,5% is.

Die probleme geassosieer met metaboliese sifting in Suid-Afrika is die volgende -

- i) toerusting is duur en nie maklik bekombaar vanaf die buiteland nie;
- ii) analises is duur en word nie deur mediese fondse gedek nie;
- iii) min kliniese data is beskikbaar en selektiewe toetsing gebasseer op hierdie data is nie moontlik nie;
- iv) opgeleide laboratoriumtegnici verwag hoë besoldiging;
- v) daar word dikwels meer monsters verwys as wat die laboratorium kan hanteer;
- vi) pasiënte word slegs vir kort tye gehospitaliseer; en
- vii) 'n groot sektor van die bevolking, die nie-blankes, word nie bereik nie.

Die bogenoemde probleme het gelei tot die evaluering van vinniger, eenvoudiger, meer koste-effektief en betroubare metodes wat vir metaboliese sifting van aangebore metaboliese siekte-toestande gebruik kan word.

2.5.5 Alternatiewe benadering

Die feit dat so 'n klein persentasie van die Suid-Afrikaanse bevolking werklik toegang tot metaboliese sifting het, is 'n wesenlike probleem. Die realiteite is egter dat die aard van die toetse wat tans by die Departement Biochemie uitgevoer word, nie vir meer as die aantal monsters wat hanteer word, geskik is nie. Die heersende ekonomiese toestande in Suid-Afrika bemoeilik die aankoop van meer apparatuur en die aantal monsters wat hanteer kan word, word beperk deur die beskikbare tyd vir analyses. Tyd-beskikbaarheid van laboratorium-personeel is ook van belang, aangesien nagskofte teen dubbele vergoeding nie vir werknemers óf werkgewers aanvaarbaar is nie. Dit is dus duidelik dat daar 'n aanvraag bestaan vir 'n apparaat wat "normale" monsters, dit wil sê monsters van pasiënte wat nie aan metaboliese defekte ly nie, vroeg in 'n siftingsprogram kan elimineer. As daar slegs monsters waarvan die moontlikheid groter is dat 'n metaboliese defek ter sprake is, verder geanaliseer hoef te word, kan baie meer monsters in 'n siftingsprogram hanteer word.

Die Divisie Waternavorsing by die Wetenskaplike en Nywerheidsnavorsingsraad (WNNR) het 'n apparaat ontwikkel wat vir die opsporing van organiese besoedeling in water gebruik is. Industrieë en die publiek is besonder bewus van die implikasies van besoedeling in beide varswaterbronne en in die see. Om hierdie rede word al hoe meer apparate beskikbaar gestel wat die totale organiese koolstofinhoud (TOK) van water bepaal. Die apparate word meestal gebaseer op die oksidatiewe en/of reduktiewe verbranding van organiese verbindings.

Kwantifisering vind op twee wyses plaas : die vrygestelde CO_2 word met behulp van infrarooispektrometrie gemeet; andersins word vlamionisasie gebruik om metaan te kwantifiseer (van Steenderen et al, 1979). Die metodes wat aangewend word vir TOK-bepalings moet 'n hoë mate van sensitiwiteit en betroubaarheid hê en moet ook prakties en werkbaar wees. Bestaande apparate het swak instrumentele herhaalbaarheid gehad en hul sensitiwiteitsgrense was baie laag. Hierdie faktore het gelei tot die omvorming van 'n bestaande apparaat tot 'n outomatiese analiseerder wat 'n heelwat hoër sensitiwiteitsgrens gehad het (Van Steenderen, 1979). Die metode wat ontwikkel is, het uitstekende resultate gelewer. Fig 2.10 wys 'n skrywersprofiel vir 'n reeks standaardoplossings en dit is duidelik dat die apparaat 'n goeie mate van herhaalbaarheid het. Oksidasie by 'n hoër temperatuur (90°C) as normaal ($20-50^\circ\text{C}$) het wel die oksidasie met 10% verbeter, maar die basislyn geruis was sodanig dat monsters met 'n lae koolstofinhoud nie geregistreer het nie (Van Steenderen, 1979).

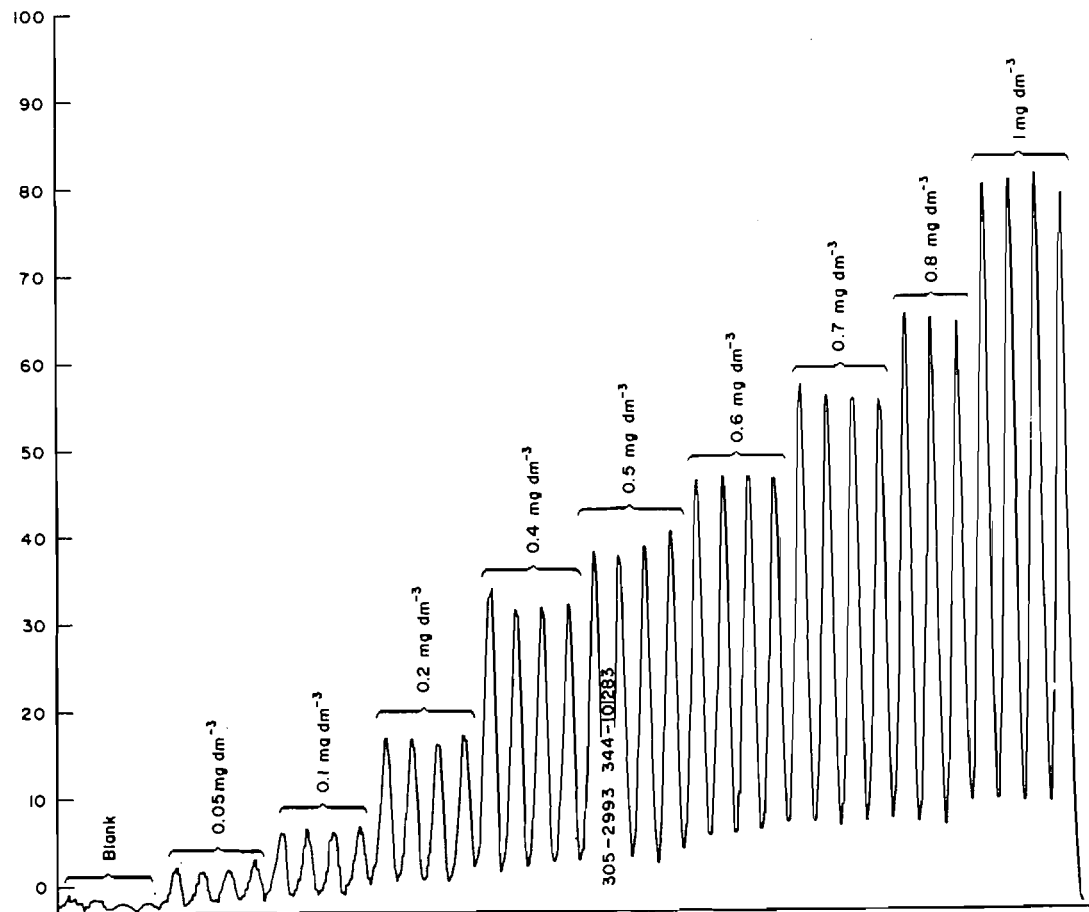


Fig 2.10 Skrywersprofiel van 'n reeks standaardoplossings, soos bepaal met 'n apparaat wat opgeloste organiese verbindings kwantifiseer. Goeie herhaalbaarheid is met dié prosedure verkry.

Verdere ontwikkeling van die apparaat het gelei tot die totstandkoming van die AquaDoc™. Die WNNR, in samewerking met 'n elektroniese maatskappy in Potchefstroom, het 'n apparaat gebou wat nou as die AquaDoc bekend staan. Die AquaDoc word gebruik vir prosesevaluering by water- en afvalsuiweringswerke, om die beheer van vrystelling van organiese materiaal na die omgewing selektief te monitor en ook om die absorptiewe kapasiteit van organiese materiaal aan geaktiveerde granulêre koolstof (GGK) te monitor. GGK word in die mynboubedryf gebruik om goud uit mynhope te herwin. Die werking van die apparaat sal in 'n latere afdeling bespreek word. Die voordele van hierdie apparaat is die volgende :

- i) lang invoertye word uitgeskakel aangesien die apparaat in Suid-Afrika vervaardig word;
- ii) die kapitaalluitleg is relatief klein;
- iii) instandhouding en kennis is albei geredelik beskikbaar;
- iv) presiesheid van 10%; en
- v) resultate word binne 5 minute verkry.

Die inspirasie van die gebruiksmoontlikheid van dié apparaat as 'n metode vir die opsporing van aangebore metaboliese siekte-toestande is aan Julius Ueckermann, wat voorheen aan die Departement Biochemie verbonde was, te danke. Urine is 'n waterige oplossing en by 'n persoon wat aan 'n metaboliese defek ly, hoort die aantal metaboliëte wat in die urine uitgeskei word, heelwat hoër te wees as by iemand wat nie aan so 'n siekte ly nie. Ueckermann en 'n kollega het vervolgens monsters van beide bevestigde pasiënte en pasiënte wat verwys is vir metaboliese sifting maar waar geen defek opgespoor is nie, geanaliseer (Botha & Ueckermann, 1990).*

* BOTHA, A & UECKERMAN, J (1990). Rapid screening method for metabolic diseases. Seed fund report. Project number 670/29371.

Die opgeloste organiese koolstofwaardes ("dissolved organic carbon" - DOC) wat hulle bepaal het, is met die kreatinienwaardes van die monsters verwerk om sodoende 'n meer beduidende resultaat te kry. Inderwaarheid het hulle die bruikbaarheid van twee eenvoudige toetse wat as eerstefase analises kan dien, evalueer. Die apparaat se sagteware maak voorsiening vir die aanduiding van verdunnings, asook elke monster se identiteit en die apparaat bereken self die DOC-waardes. Botha en Ueckermann het kreatinien gebruik omdat dit teen 'n konstante tempo in die urine uitgeskei word (sien Afdeling 2.3.1). 'n Kreatinienwaarde word standaard op elke urienmonster wat in die laboratorium ontvang word bepaal en die kreatinieninhoud van urine gee 'n aanduiding van die konsentrasie daarvan.

Die monsters wat Botha en Ueckermann (1990) gebruik het is 1 : 100 verdun aan die AquaDoc-prosedure onderwerp. Om tussen die monsters waar geen defek opgespoor is nie (kontroles) en die bevestigde pasiënte te onderskei, het die navorsers die DOC-waarde wat hulle verkry het, uitgedruk in verhouding tot die kreatinienwaarde wat vir elke monster bepaal is. Die resultate wat verkry is, word in Tabel 2.4 uiteengesit.

**TABEL 2.4 DOC- EN KREATINIENWAARDES, ASOOK DOC/KREATINIEN-
WAARDES VIR KONTROLES EN BEVESTIGDE PASIËNTE**

NOMMER	KONTROLES			PASIËNTE		
	Kreatinien	DOC	DOC/Kreat.	Kreatinien	DOC	DOC/Kreat.
1	1.7	1710	1105.9	0.75	1070	1426.7
2	1.1	2290	2081.9	0.89	1680	1887.6
3	1.0	1210	1210.0	0.26	420	1615.4
4	1.9	2500	1315.8	0.26	500	1923.1
5	2.4	2500	1041.7	0.62	830	1338.7
6	5.0	5830	1166.0	0.10	330	3300.0
7	4.8	4580	954.2	2.8	5220	1864.3
8	4.8	5330	1110.4	0.34	2160	6532.9
9	13.9	9170	659.7	0.32	670	2093.8
10	6.9	6800	985.5	2.8	6000	2142.9
11	5.1	2500	490.2	2.7	6980	2585.2
12	6.4	3440	537.5	0.26	330	1269.2
13	1.8	1550	861.1	4.7	8069	1716.8
14	6.4	3780	590.6	0.39	1131	2897.4
15	0.9	1240	1377.8			
16	7.2	5788	803.9			
17	7.1	7621	1073.4			
18	1.1	881	800.9			
19	4.8	3731	777.3			
20	1.9	1518	798.9			
21	0.5	518	1036.0			
22	1.3	1133	871.5			
23	0.26	1465	5634.6			
24	0.52	735	1413.5			
25	10.8	8650	800.9			
26	1.4	2260	1614.3			

Hoër DOC-waardes is onder die groep monsters waar geen metaboliese defekte opgespoor is nie, verkry. 'n Goeie onderskeid kon nie bloot op grond van die DOC-waardes verkry word nie en die DOC/kreatinienverhouding het 'n beter kontras gelewer. Die twee belangrikste doelwitte van die ondersoek was om te bepaal of daar 'n beduidende verskil tussen die twee stelle resultate bestaan, om sodoende ware pasiënte van kontrolemonsters te kan onderskei en om 'n afsnitwaarde te bepaal waarbo 'n monster as 'n moontlike pasiënt met 'n aangebore metaboliese siekte-toestand geïdentifiseer kan word.

Die navorsers het vervolgens die data aan 'n nulhipotese onderwerp (Wilcoxon two-sample test) en tot die gevolgtrekking gekom dat daar wel tussen die twee onderskei kan word. Alhoewel Botha en Ueckermann nie aandui hoë dit bepaal is nie, is 'n afsnypunt van 1100 vir die DOC/kreatinienverhouding as norm vasgestel. Die hoë DOC/kreatinienwaardes wat by sommige van die kontrolemonsters gemerk kan word, mag toegeskryf word aan die feit dat hierdie monsters afkomstig was van pasiënte wat kliniese simptome van aangebore metaboliese defekte getoon het. Daar is geen defek by hierdie monsters met die siftingsprogram wat tans in Departement Biochemie gebruik word opgespoor nie, maar daar mag wel sprake wees van so 'n siekte aangesien sommige siektes moontlik nie deur middel van die huidige siftingsprogram opgespoor word nie. Die slotsom waartoe Botha en Ueckermann gekom het, is dat die sisteem deur hulle ontwikkel, parallel met 'n bestaande siftingsprogram van 'n metaboliese laboratorium vergelyk word, om sodoende die voorgestelde metode te kalibreer en die betroubaarheid daarvan te bevestig.

2.6 **PROBLEEMSTELLING EN BENADERINGSWYSE**

2.6.1 **Probleemstelling**

Metaboliese sifting is duur en in Suid-Afrika is daar addisionele unieke probleme wat reeds genoem is. Dit is belangrik om daarop te let dat meeste siftingsprogramme net op sekere siekte-toestande gerig word.

In die meeste ontwikkelde lande word daar vir PKU en kongenitale hipotiroïedisme getoets (Holton, 1988); galaktosemie, kongenitale adrenale hiperplasie en hemoglobiedefekte word algemeen voor getoets (Burton, 1989); en verder word die voorkoms van MSUD, en 'n paar organiese suururieë nagegaan.

Die grootste probleem is egter die organiese suururieë. Alhoewel alle organiese suururieë 'n voorkoms soortgelyk aan dié van PKU het, is 'n massa siftingsprogram nie moontlik nie, omdat daar tans nie geskikte metodes vir die opsporing van hierdie siekte-toestande is nie (Lehnert & Niederhoff, 1984). Eerstefase toetse bestaan vir aminosuururieë, hoolhidraat-, purien- en pirimidien defekte, maar vir die opsporing van die meeste organiese-suururieë is volledige organiese suurekstraksie en GC-analise nodig. Indien 'n metode ontwikkel kan word wat bogenoemde probleme kan oplos, sal baie meer pasiënte bereik kan word; en as dié metode eenvoudig, betroubaar en 'n eerstefase toets is, sal meer monsters getoets kan word, aangesien 'n groot aantal tydens hierdie fase uitgeskakel kan word.

Die moontlike oplossing van hierdie probleme is die analise van opgeloste organiese koolstofverbindinge in die urine. Die AquaDoc blyk uit Botha en Ueckermann se baie voorlopige resultate om moontlik geskik te wees vir die aanduiding van pasiënte wat moontlik aan 'n aangebore metaboliese siekte-toestand ly. Na die nodige onderhandeling het die WNNR ingestem om 'n prototipe van dié apparaat aan die Departement Biochemie beskikbaar te stel, om die toepassing daarvan op die patologiese gebied na te vors.

Die probleemstellings van hierdie studie is dus tweeledig :

- i) Daar moet vasgestel word of die AquaDoc vir die betroubare kwantifisering van urinêre organiese materiaal aangewend kan word, sodat dit as eerstefase toets in die siftingsprogram kan dien.
- ii) Daar moet bepaal word of die voorkoms van urinêre organiese materiaal as 'n diskriminant by die identifisering van pasiënte met aangebore metaboliese siekte-toestande aangewend sal word.

2.6.2 Benaderingswyse

Die volgende benaderingswyse sal gevolg word :

- i) Aangesien die AquaDoc-prosedure tot dusver nog net op pasiëntmateriaal op 'n beperkte wyse getoets is, sal die grootste moontlike aantal urienmonsters van werklike kontrole persone aan die prosedure onderwerp word. Hierdeur behoort 'n beter normaalverdeling van 'n kontrolegroep se DOC/kreatinienwaardes verkry te word. Dié kontroles sal oor 'n breë reeks ouderdomsgrense getoets word.
- ii) Toetsing van die urienmonsters van bevestigde pasiënte met 'n verskeidenheid metaboliese siekte-toestande sal plaasvind.
- iii) Onbevestigde pasiënte sal in parallel met die huidige siftingsprogram getoets word.
- iv) Herhaalde toetsing van sommige van bogenoemde monsters sal gedoen word, om die herhaalbaarheid en betroubaarheid van dié apparaat na te gaan.

Die volgende hoofstuk (Hoofstuk 3) handel dus oor die standaardisering van die AquaDoc. Hierin word al die prosedures weergegee wat gevolg is om die apparaat vir dié doel en die omgewing te optimaliseer. Hoofstuk 4 behels die toepassing van die prosedure op urienmonsters van die drie bogenoemde groepe nl. kontroles, bevestigde pasiënte en onbevestigde pasiënte. Die bespreking van die resultate word in Hoofstuk 5 vervat.

H O O F S T U K 3

KWANTIFISERING VAN URINÊRE ORGANIESE MATERIAAL MET BEHULP VAN DIE AQUADOC™-METODE, OPTIMALISERING EN STANDAARDISERING

3.1 DIE AQUADOC APPARAAT

Dr R van Steenderen van die Divisie Watervnavorsing van die WNNR het 'n prototipe van die apparaat beskikbaar gestel. 'n Eenvoudige voorstelling van die samestelling van die apparaat word in Fig 3.1 weergegee, terwyl 'n gedetailleerde voorstelling van die oksidasiekamer in Fig 3.2 volg.

Die werking van die AquaDoc apparaat word volledig beskryf in die tegniese handleiding* en word kortliks as volg weergegee :

'n Presiese volume monster wat organiese materiaal bevat, is vanaf die monsterhouer in die outomatiese monsternemer (verkrygbaar van Hook & Tucker, Croydon, Engeland) vir 'n voorafbepaalde tyd na die oksidasiekamer gepomp. 'n Draergas, in hierdie geval suurstof, is bygevoeg en word met ortofosforsuur gemeng. Fosfuursuur is gebruik om die monster aan te suur. Die aangesuurde monster vloei deur die katalitiese reaksiespiraal (sien ook Fig 3.2) waar dit verhit word voordat dit die anorganiese stroper binnegaan. Die stroper bevat 'n interne tregterstruktuur wat inkomende gas na die onderkant van die eenheid kanaliseer. Hierdeur word anorganiese koolstofmateriaal, veral karbonate en bikarbonate, gestroop en die CO₂ vrygestel.

Die draergas, hetsy suurstof, stikstof, helium of argon, help met die vervlugtiging van die koolstofdiksied.

* AQUADOC INSTRUCTION MANUAL, DIVISION OF WATER TECHNOLOGY CSIR, February 1991, Pretoria

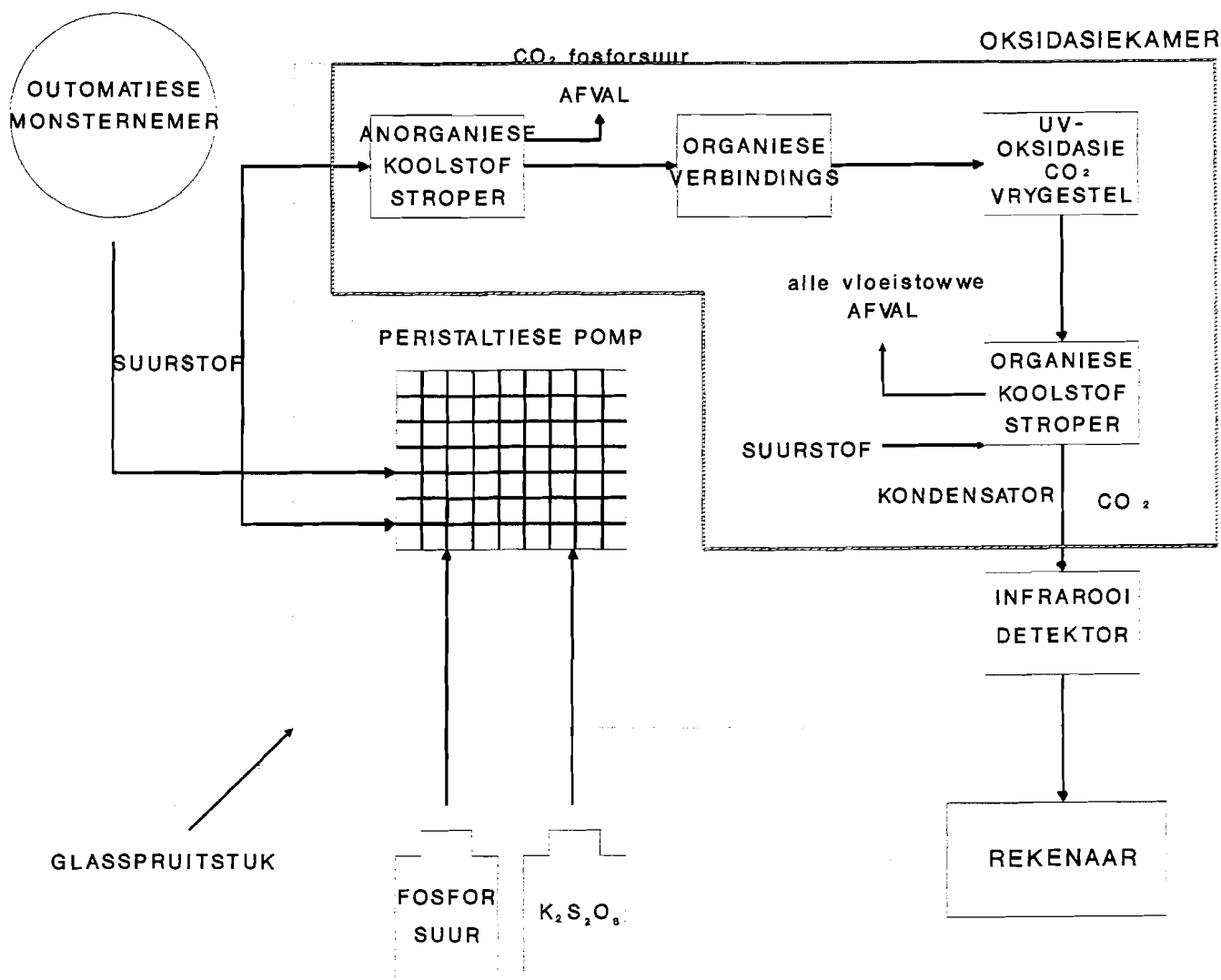


Fig 3.1 Eenvoudige voorstelling van die AquaDoc.
Organiese- en anorganiese afval word met afvoerpype verwyder. Twee groot reagenshouers bevat die fosforsuur en kaliumperoksididisulfaat.

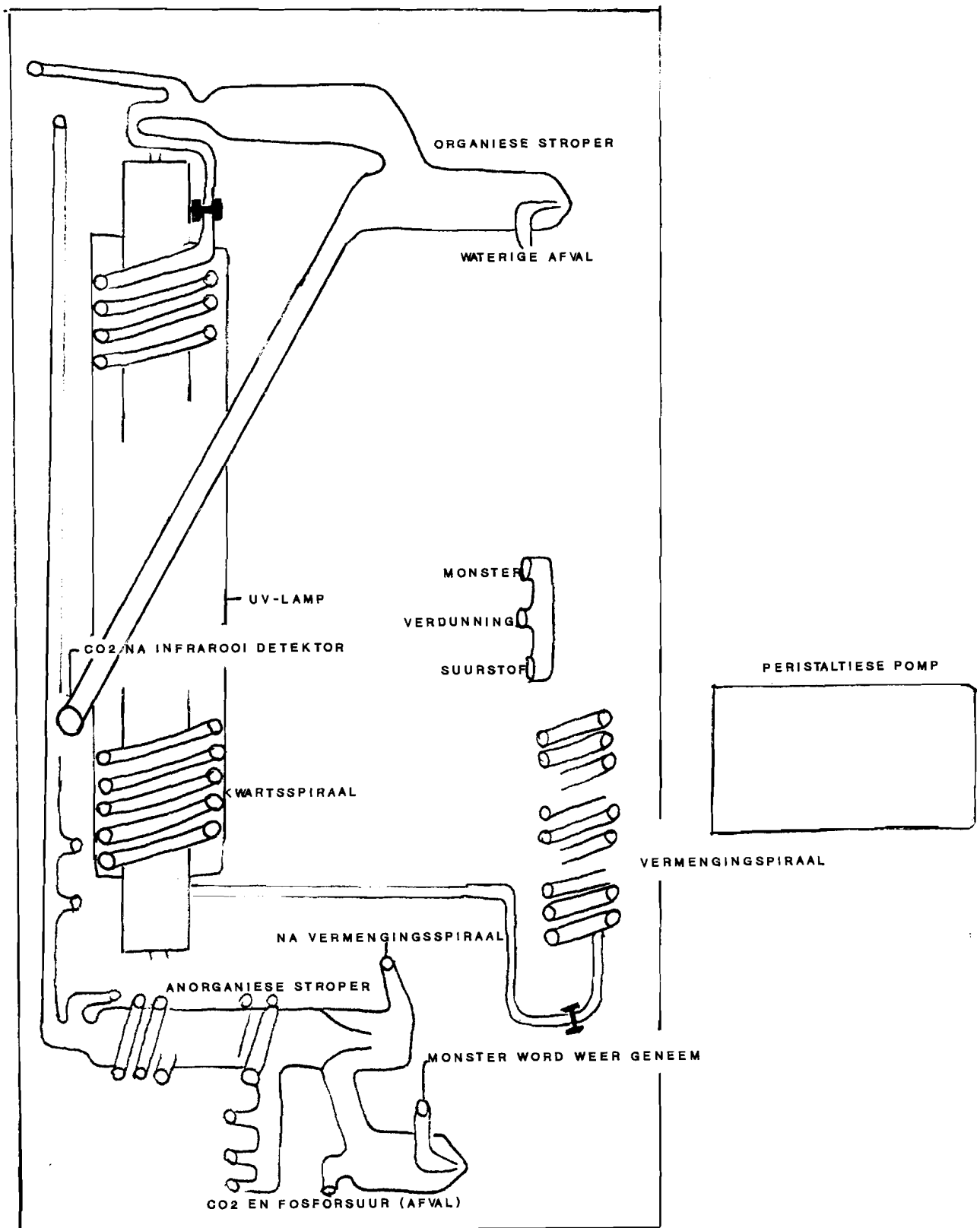


Fig 3.2 Gedetailleerde voorstelling van die AquaDoc se oksidasiekamer.

Die monster word vanaf die anorganiese stroper, deur die vermengingsspiraal, na die organiese stroper geneem. Hiervandaan beweeg die organiese verbindings deur die spiraal om die UV-lamp, waar hulle na CO_2 geoksideer word, na die infrarooi-detektor.

Hierna gaan die gestroopte monster na die vermengingspiraal. Kaliumperoksidisulfaat word bygevoeg, asook addisionele fosforsuur om die monster te verdun, alvorens dit die ultravioletoksiderings-eenheid binnegaan. Hierdie eenheid bestaan uit 'n langwerpige ultravioletlamp waarom 'n kwartsspiraal van ongeveer 2m gedraai is. Vir fotochemiese oksidasie moet die UV-lig 'n golflengte van tussen 220 en 260nm hê, verkieslik 254nm. Uiteraard moet die tydperk wat die monster deur die spiraal beweeg lank genoeg wees om al die organiese verbindings in die urine na CO₂ te omvorm. Fotoniese splyting, met die vorming van hidroksiradikale en osoon, verbeter die omskakeling van organiese koolstofmateriaal tot CO₂.

'n Eenheid wat gas- en vloeistoffases skei is in die organiese koolstofstroker vervat sodat slegs die gas wat gevorm is tesame met die onopgeloste draergas na die infrarooidektektor gaan. Om die suurstof/CO₂-mengsel te droog, word dit eers deur 'n kondensator en daarna deur 'n buis wat anhidriese kalsiumchloried bevat gestuur. Voordat die droë gasmengsel deur die infrarooidektektor beweeg, gaan dit eers deur 'n elektroniese watersensor en 'n oudiovisuele alarm word geaktiveer indien die gasmengsel met water gekontamineer is. Hierdie dektektor (LEKTRON-dektektor van Lektratek) is hoogs sensitief vir CO₂ en ander gasse beïnvloed nie die meting nie. 'n Vier tot twintig mikroampere sein, wat eweredig aan die CO₂-konsentrasie en dus die organiese koolstofinhoud is, word via die beheerbaanwerk na die rekenaar gestuur. Die rekenaar verwerk dan met behulp van die HEYDOC-rekenaarprogram wat deur die WNNR voorsien is, die koolstofkonsentrasie tot mg/l opgeloste organiese koolstof en vertoon die resultaat in die vorm van 'n DOC-waarde.

Soos reeds in Afdeling 2.6 beskryf is, handel hierdie hoofstuk oor die bepaling van die bruikbaarheid, effektiwiteit en betroubaarheid van die AquaDoc om organiese materiaal te kwantifiseer, om sodoende vas te stel of die apparaat wel vir die kwantifisering van urinêre organiese materiaal gebruik kan word. Om hierin te kan slaag is die volgende uitgevoer :

- (1) Die AquaDoc maak van 'n fotochemiese oksidasieproses gebruik wat deur kaliumperoksidisulfaat en ultravioletlig gekataliseer word. In die eerste plek is daar bepaal of hierdie oksidasie wel kwantitatief plaasvind.
- (2) Die werking van die apparaat is verander om optimale oksidasie te verkry.
- (3) Metaboliete wat algemeen in die urine voorkom is aan die prosedure onderwerp, om te bepaal of die AquaDoc geskik is vir die kwantifisering van urinêre organiese materiaal.
- (4) Ondersoek is ingestel na 'n konstante faktor wat gebruik kan word vir die verkryging van vergelykbare resultate tussen verskillende urinemonsters.

Die aanvanklike evaluering van die apparaat word in Afdeling 3.2 beskryf. Afdeling 3.3 handel oor die optimalisering en standaardisering van die AquaDoc en Afdeling 3.4 oor die ondersoek na die oksidering van urinêre metaboliete. Ondersoeke na konstante faktore in die urine volg in Afdeling 3.5.

3.2

AANVANKLIKE EVALUERING

Die effektiwiteit en herhaalbaarheid van die AquaDoc-apparaat moet noodwendig baie goed wees indien die metode moontlik as deel van 'n siftingsprogram aangewend sal word. Met die doel om die oksidasie-effektiwiteit te bepaal is twee soorte monsters gebruik. In die eerste plek is kaliumwaterstofftalaat ($C_8H_5KO_4$) as bron van organiese koolstowwe benut. In die tweede plek is die oksidering van urine van normale persone en van persone wat na die laboratorium verwys is vir 'n metaboliese analise, ondersoek.

'n Stokoplossing van kaliumwaterstofftalaat is opgemaak deur 2,125g tot 1 liter met vars gedistilleerde water op te los. Een milliliter van die kaliumwaterstofftalaatoplossing stem ooreen met 1mg koolstofekwivalente. Hiervandaan is daar onderskeidelik 0.5, 1.0, 2.5 en 4.0ml na 100ml verdun om 'n konsentrasiereeks van 5, 10, 25 en 40mg/l koolstofekwivalente te gee. Dit is as standaardoplossings gebruik. 'n Vyf persent ortofosforsuur- en 'n vier persent kaliumperoksidisulfaatoplossing is voorberei en onderskeidelik in die toepaslike reagenshouers van die apparaat aangebring (sien Fig 3.1). Dieselfde fosforsuuroplossing is in die eerste monsterhouer van die outomatiese monsternemer as blanko geplaas. Die volgende vier monsterhouers het die standaardoplossings in toenemende konsentrasies bevat. Telkens is vyf milliliters gebruik.

Die AquaDoc se sagteware-sisteem is gestel om die apparaat te kalibreer volgens die resultate van die vier standaarde en die koolstofinhoud van die daaropvolgende monsters is as 'n konsentrasie in mg koolstof/l direk van die skerm afgelees. Hierdie waarde staan bekend as die DOC-waarde. Vir die eerste aspek van die bepaling van die effektiwiteit van die oksidasieproses, is die kaliumwaterstof-ftalaatstandaarde netso as onbekendes in die proses gebruik en die resultate word in Fig 3.3 weergegee.

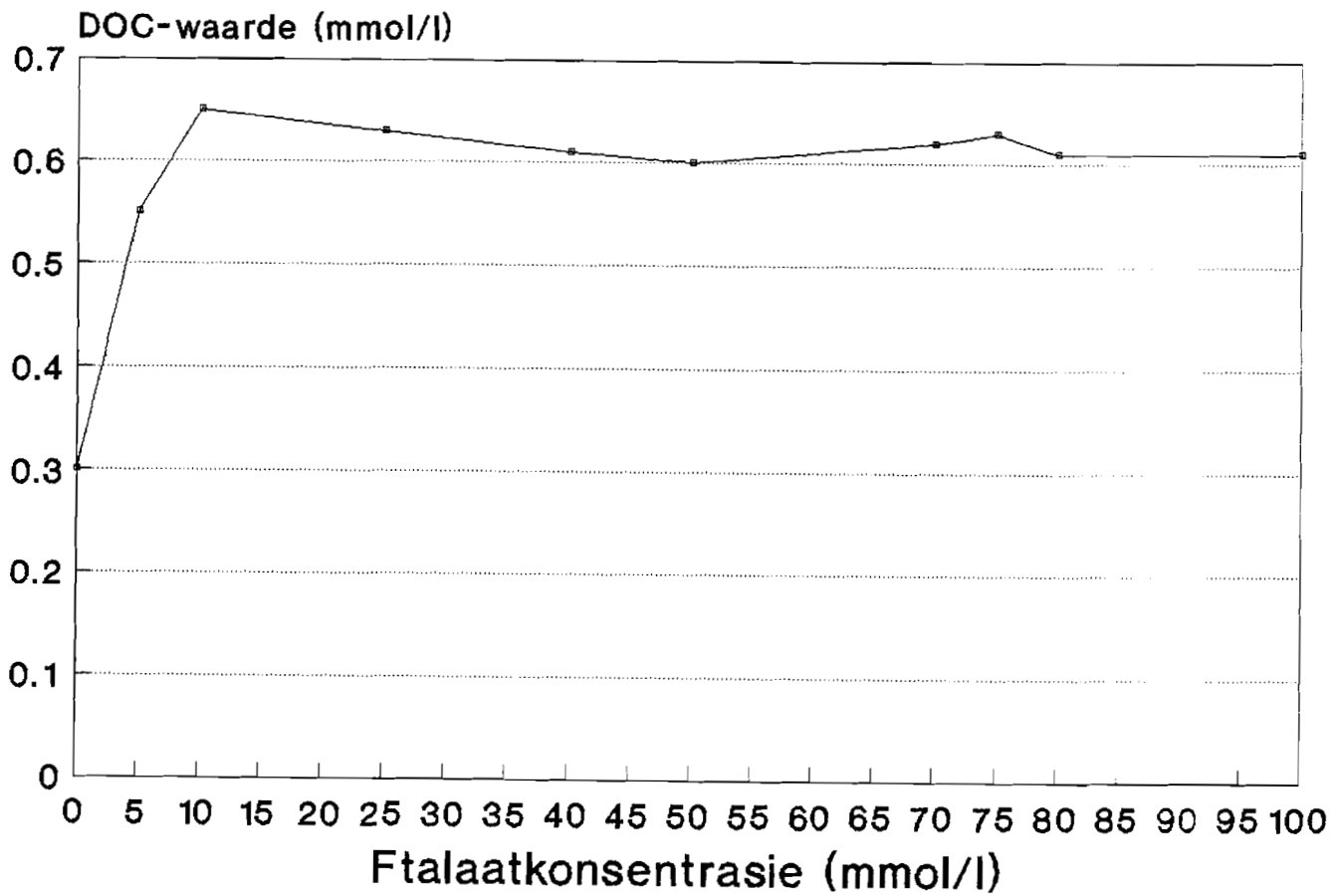
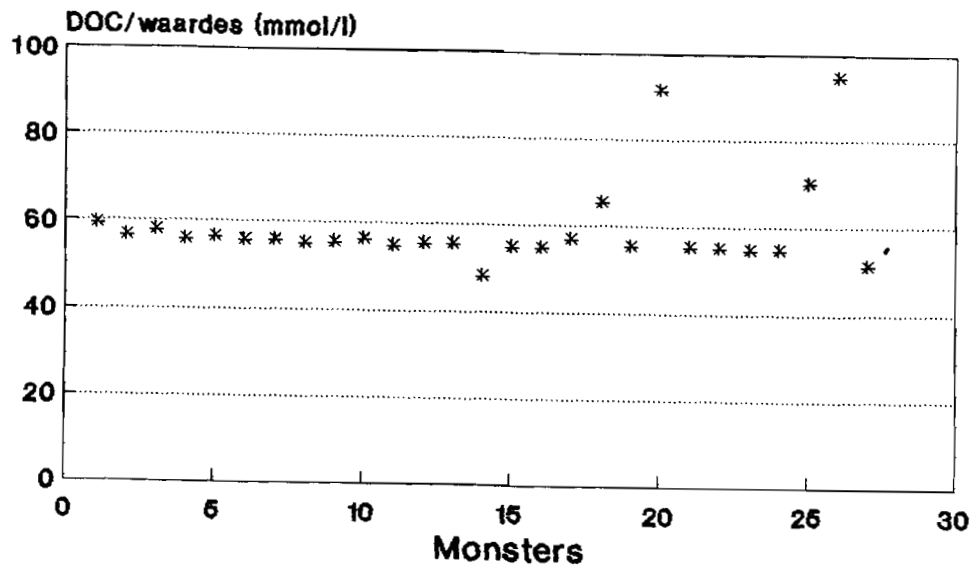


Fig 3.3 **Standaardkromme van die kaliumwaterstofftalaat-**
standaard.
Elke standaard is drie keer getoets en die gemiddelde
DOC-waarde word op die grafiek getoon.

Die DOC-waardes het gewissel vanaf 2 mmol/l tot 'n ftalaatkonsentrasie van 8.3 mmol/l. Dit is egter duidelik uit Fig 3.3 dat daar hoegenaamd geen verband tussen die werklike konsentrasies van die oplossings en die verkrygte DOC-waardes is nie. In die tweede deel van die ondersoek is urienmonsters 1 : 100 met vars gedistilleerde water verdun en 5ml van elke monster-verdunning is in die monsterhouers geplaas. Die HEYDOC-rekenaarprogram maak voorsiening vir die aanduiding van enige verdunnings wat aangebring is en neem dit in ag vir die berekening van die DOC-waarde. Eers is kontrolemonsters, van al die nagraadse studente en personeel van die Departement Biochemie, verkry en hul DOC-waardes word in Tabel 1 in Bylaag 1 uiteengesit en grafies in Fig 3.4A voorgestel. Vervolgs is 'n aantal van die monsters wat verwys is vir metaboliese sifting ook aan die prosedure onderwerp en hul DOC-waardes word in Fig 3.4B en ook in Tabel 2 in Bylaag 1 weergegee.

A.



B.

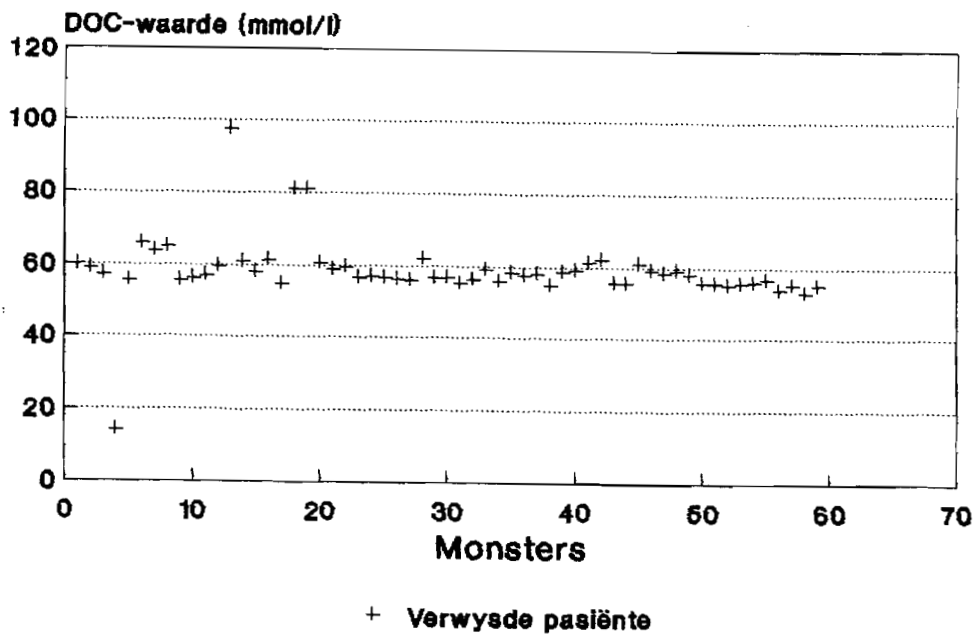


Fig 3.4A DOC-waardes van die kontrolemonsters.
 27 Monsters is getoets en die gemiddelde DOC-waarde was 59.0 ± 10.6

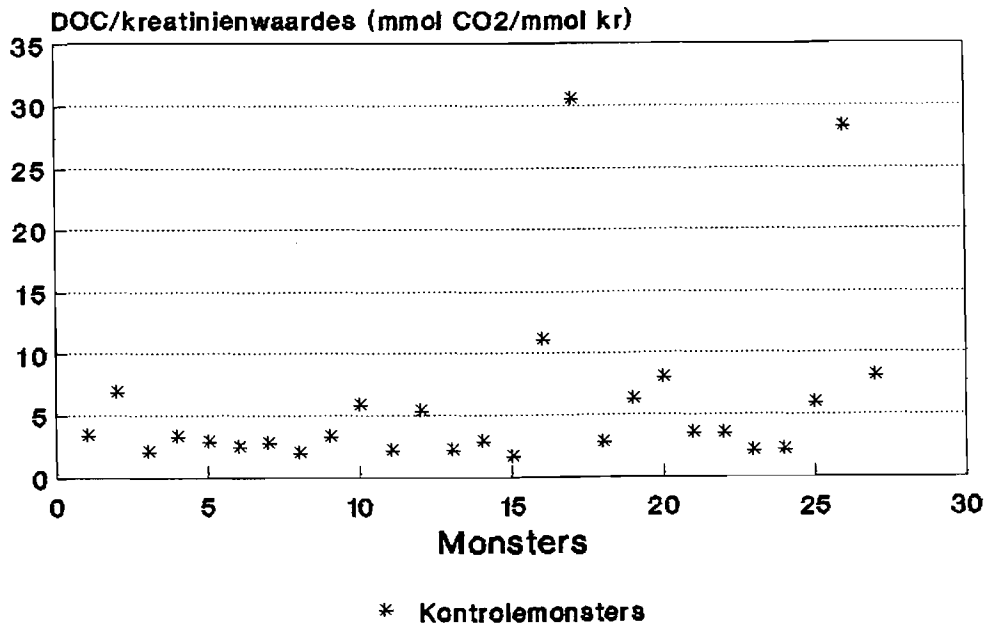
B DOC-waardes van die verwysde pasiënte.
 Daar is 63 van die pasiënte wat verwys is vir metaboliese sifting getoets en die gemiddelde DOC-waarde is 58.4 ± 8.7

'n Groot aantal monsters is aan die prosedure onderwerp, maar geen verskil kon aangedui word tussen die twee groepe nie. Die gemiddelde DOC-waarde van die kontrolemonsters was 59.0 ± 10.6 (n=27) mmol/l koolstofekwivalente en dié van die groep wat verwys is vir metaboliese sifting 58.4 ± 8.7 (n=72). Dit is opmerklik dat Botha en Ueckermann* (1990) DOC-waardes van twee soortgelyke groepe bepaal het wat gewissel het van so laag as 330 tot so hoog as 9170 (sien Tabel 2.4). Dit blyk weer eens asof die apparaat nie resultate lewer soos dié in die ondersoek deur Botha en Ueckermann* nie. Daar is byna geen interindividuele variasie nie.

Alhoewel bogenoemde outeurs gevind het dat daar normaalweg 'n groot variasie in die DOC-waardes van die individue in die groepe wat hulle getoets het voorkom, daar nie bloot op grond van hierdie waardes 'n onderskeid tussen kontroles en bevestigde pasiënte gemaak kon word nie. Om die probleem op te los het hulle die koolstofinhoud in verhouding met die kreatinienwaardes uitgedruk. Derhalwe is die kreatinienwaardes en die DOC/kreatinienverhoudings ook in Tabela 1 en 2 van Bylaag 1 aangedui en in Fig 3.5 grafies voorgestel. Dit was dadelik duidelik dat alhoewel daar min ooglopende verskil in die DOC-waardes van die onderlinge monsters was, die DOC/kreatinienverhoudings heelwat groter verskille getoon het. Die enigste werklike variërende faktor in die resultate wat vir hierdie gedeelte van die ondersoek verkry is, is dus die kreatinienwaardes, terwyl die koolstofinhoud van die groot groep kontrole- en verwysde monsters heelwat meer konstant was as wat daar verwag is.

* BOTHA, A & UECKERMAN, J (1990).
Rapid screening method for metabolic diseases. Seed Fund Report.
Project number 670/29371.

A.



B.

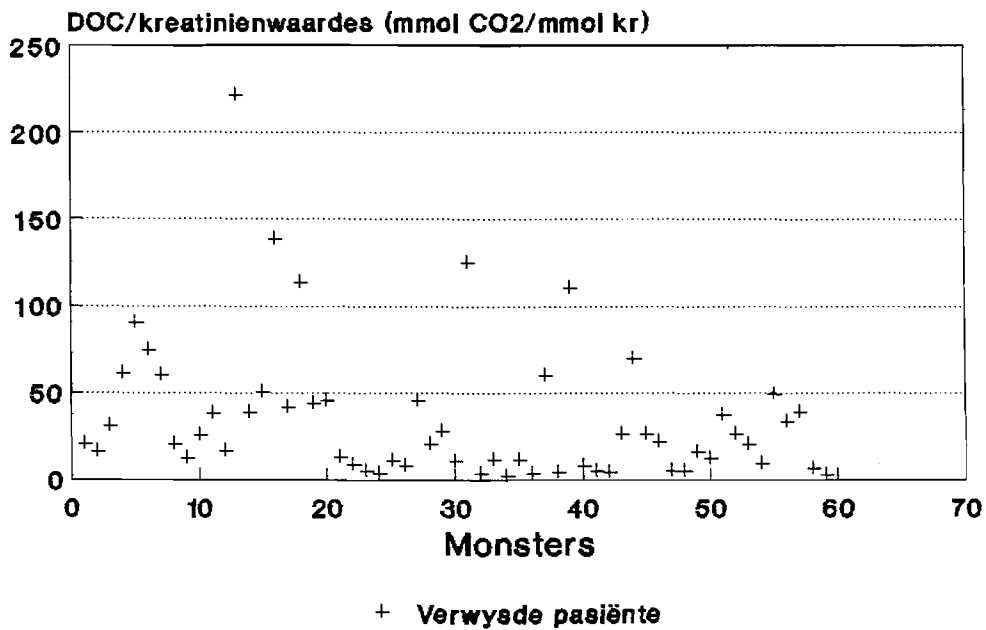


Fig 3.5 DOC/kreatinienwaardes van die kontrolegroep en die groep monsters wat verwys is vir metaboliese sifting. 'n Groter wisseling in die waardes word waargeneem, met gemiddelde DOC/kreatinienwaardes van 5.9 vir die kontrolegroep en 43.8 vir die verwysde pasiënte. Buiten die kreatinienwaardes is daar egter nie 'n onderskeid tussen die twee groepe nie.

Hierdie bevinding dat die DOC-waardes nie wesenlik verander nie, het die gedagte laat ontstaan dat daar moontlik 'n fout mag wees. Alhoewel die analises uitgevoer is volgens Botha en Ueckermann (1990) se voorskrifte, kon geen duidelike verskil tussen individuele monsters waargeneem word nie, alhoewel hul kreatinienwaardes aanmerklik verskil het. Selfs met die sintetiese standaard, is geen verband tussen die DOC-waarde en die kaliumwaterstof-ftalaatkonsentrasie gevind nie. Dit beteken dat die apparaat nie tussen monsters met verskillende inhoud van organiese materiaal kon onderskei nie. Tewens, 'n konstante vlak van ongeveer 2 mmol/l koolstofekwivalente is vir die verskillende ftalaatkonsentrasies gemeet. Indien die groot verdunningsfaktor wat by die urienmonsters in berekening gebring is, weggelaat word, verskil die gemiddelde waarde vir die urine en vir die ftalaatstandaarde verkry, nie veel nie. Dit dui waarskynlik op 'n basislynwaarde wat selfs verkry sou word indien 'n anorganiese, nie-koolstofbevattende monster aan die prosedure onderwerp sou word. Daar is drie moontlike verklarings vir die teleurstellende resultate :

- (1) Daar vind nie volledige oksidasie plaas nie. Afsonderlike komponente in die oksidasiekamer funksioneer dalk om die een of ander rede nie korrek nie en al die organiese verbindings word nie tot CO₂ geoksideer nie.
- (2) Die detektor is defek.
- (3) Die rekenaar, of veral die sagteware wat deur die WNNR voorsien is, is foutief.

3.3 VERBETERINGS AAN AQUADOC : OPTIMALISERING EN STANDAARDISERING

Die AquaDoc is ontwerp vir die opsporing van organiese besoedeling in watermonsters en word tans met groot sukses deur 'n aantal belangrike instansies gebruik. Alhoewel die AquaDoc besonder goed funksioneer vir die doeleindes waarvoor dit ontwerp is, het die apparaat ten spyte van verwagtings, nie die gewenste resultate gelewer nie. Om hierdie probleem op te los, is veranderinge aan die apparaat self aangebring.

Die eerste stap was om die gebruik van die HEYDOC-rekenaarprogram,* wat die integrasie van die piekoppervlaktes vir elke monster uitvoer, te staak. In plaas van die rekenaar wat die konsentrasie van die gevormde CO₂ aandui, is 'n BRYANT 28000 (Spectra Physics) skrywer as integreerder gekoppel. 'n Aantal monsters is toe weer getoets en pieke is verkry. Aangesien dit nie die geval was met die HEYDOC-rekenaarprogram nie, het dit geïmpliseer dat die HEYDOC-program glad nie geskik vir die registrasie van die detektorsein was nie. Ter kwantifisering van die piekoppervlaktes, is die pieke uitgesny en geweeg. Vir sommige van die urienmonsters, wat steeds soos in Afdeling 3.2 verdun is, was die pieke óf te groot óf te klein vir reikwydte van die skrywer. Só byvoorbeeld is deur 'n rowwe analise van vier urienmonsters met 'n breë spektrum kreatinienkonsentrasies, bloot waargeneem dat 'n duisendvoudige verdunning van 'n monster met 'n kreatinieninhoud van 175 mg% of 15.5 mmol/l 'n goeie gemiddelde piekhoogte van ongeveer twee-derdes van die reikwydte gelewer het.

* HEYMAN, J B; VAN STEENDEREN, R A & BOTHA, A.
HEYDOC (Version 1.0), Software for the AquaDoc,
February 1991.

Aangesien groot wisselinge in die urinêre kreatinienvlakke normaalweg 'n goeie refleksie van algemene inhoud van organiese materiaal is, het dit dus gebeur dat monsters met te hoë of te lae kreatinienvlakke na 'n konstante verdunning, waardes buite die normale reikwydte van die apparaat gegee het. Om hiervoor te kompenseer, is die aanvanklike verdunning van die urienmonsters sodanig gewysig dat die kreatinieninhoud van die goeie voorbeeld hierbo deurgaans gesimuleer kon word. Dit is dat 'n monster met 'n kreatinieninhoud van 175 mg% duisendvoudig verdun behoort te word, soos saamgevat in die volgende eenvoudige verband :

$$\frac{175}{\text{mg\% kreatinien}} \times 50 = \mu\text{l urine verdun tot 50ml}$$

Veranderinge in die oksidasiekamer van die apparaat is aangebring om die fotochemiese oksidasieproses moontlik te verbeter. Twee urienmonsters, een van 'n pasiënt met propioonsuururie en een van 'n persoon sonder 'n aangebore metaboliese siekte-toestand (kontrole), is tesame met die vier kaliumwaterstoftalaatstandaarde deurgaans getoets. Hierdie twee urienmonsters is getoets omdat daar aanvaar is dat meer metaboliëte by die propioonsuururie-pasiënt uitgeskei is en indien die oksidasie verbeter, behoort daar dus vinniger volledige oksidasie met die normale urienmonster bereik te word. 'n Waterbad, met 'n varieerbare temperatuur-stelling, is net voor die UV-lamp gekoppel (Fig 3.6). Die temperatuur waarby die UV/peroksiedoksidase plaasvind kon dus beheer word. Die twee gekose monsters is toe by 28, 35, 45 en 80°C aan die oksidasieproses onderwerp.

Die resultate van hierdie ondersoek kan in Fig 3.7 gesien word (Tabel 3 in Bylaag 1). 'n Reeks verskillende verdunnings van die twee monsters is voorberei en aan die prosedure onderwerp. Die pieke is uitgeknip en geweeg en die massas van die standaardpieke is gebruik om 'n standaardkromme op te stel. Die koolstofinhoud van elke monster is vanaf hierdie standaardkromme afgelees. Die apparaat is toegelaat om by elke verskillende temperatuur eers te stabiliseer, voordat die prosedure begin is. Die oksidasie van die monsters by hoër temperature is nie soveel beter as by 28°C nie, alhoewel daar tog 'n duidelike verbetering by laer konsentrasies aangetoon kan word. By die persoon met propioonsuururie is die verdubbeling van die DOC/kreatinienwaardes by hoër verdunnings meer opmerklik as by die persoon wat nie aan 'n aangebore metaboliese defek ly nie.

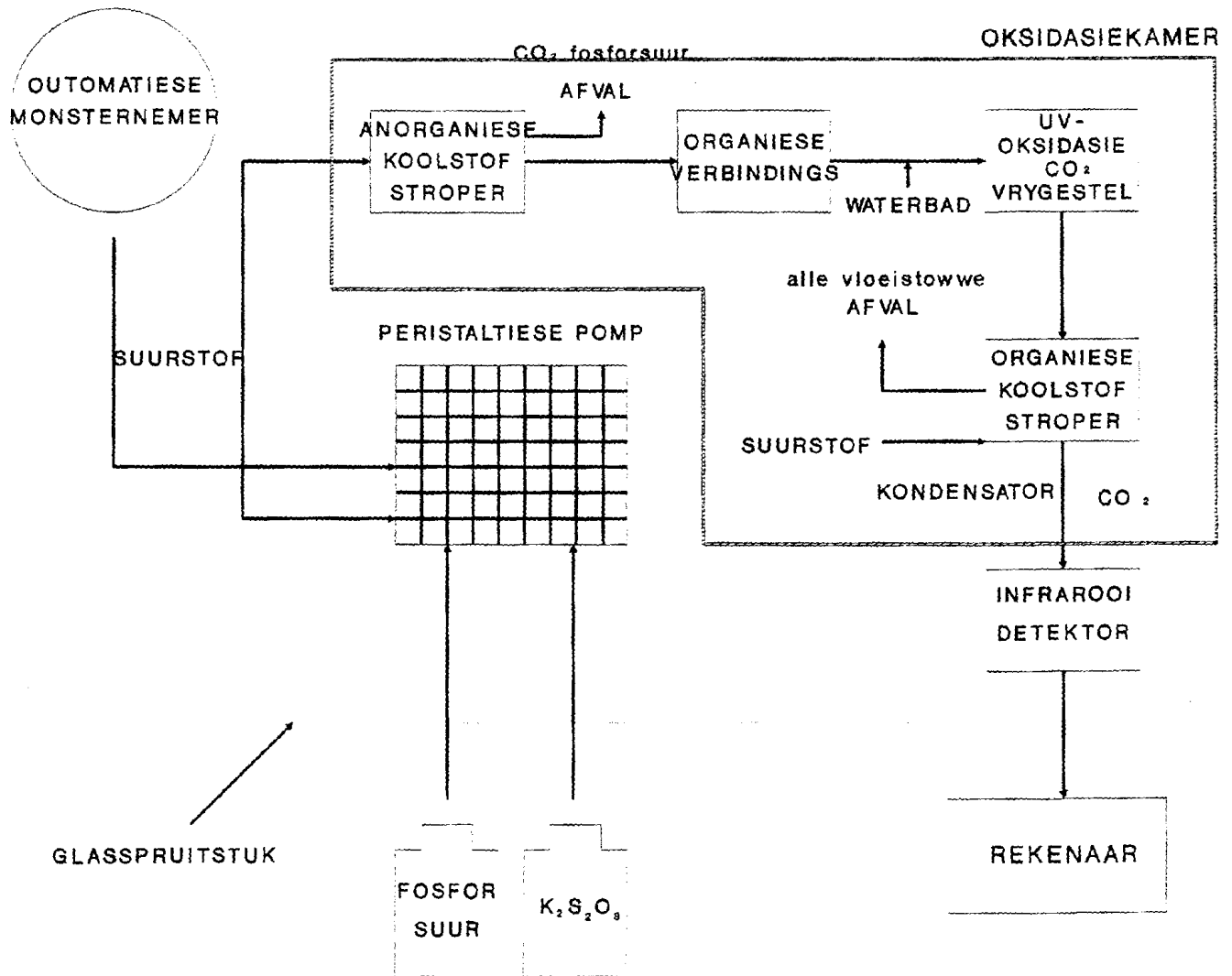


Fig 3.6 Die AquaDoc met 'n temperatuur verstelbare waterbad. Hierdie waterbad is net voor die UV-lamp geïnstalleer, om sodanig die monsters wat geoksideer word, eers te verhit.

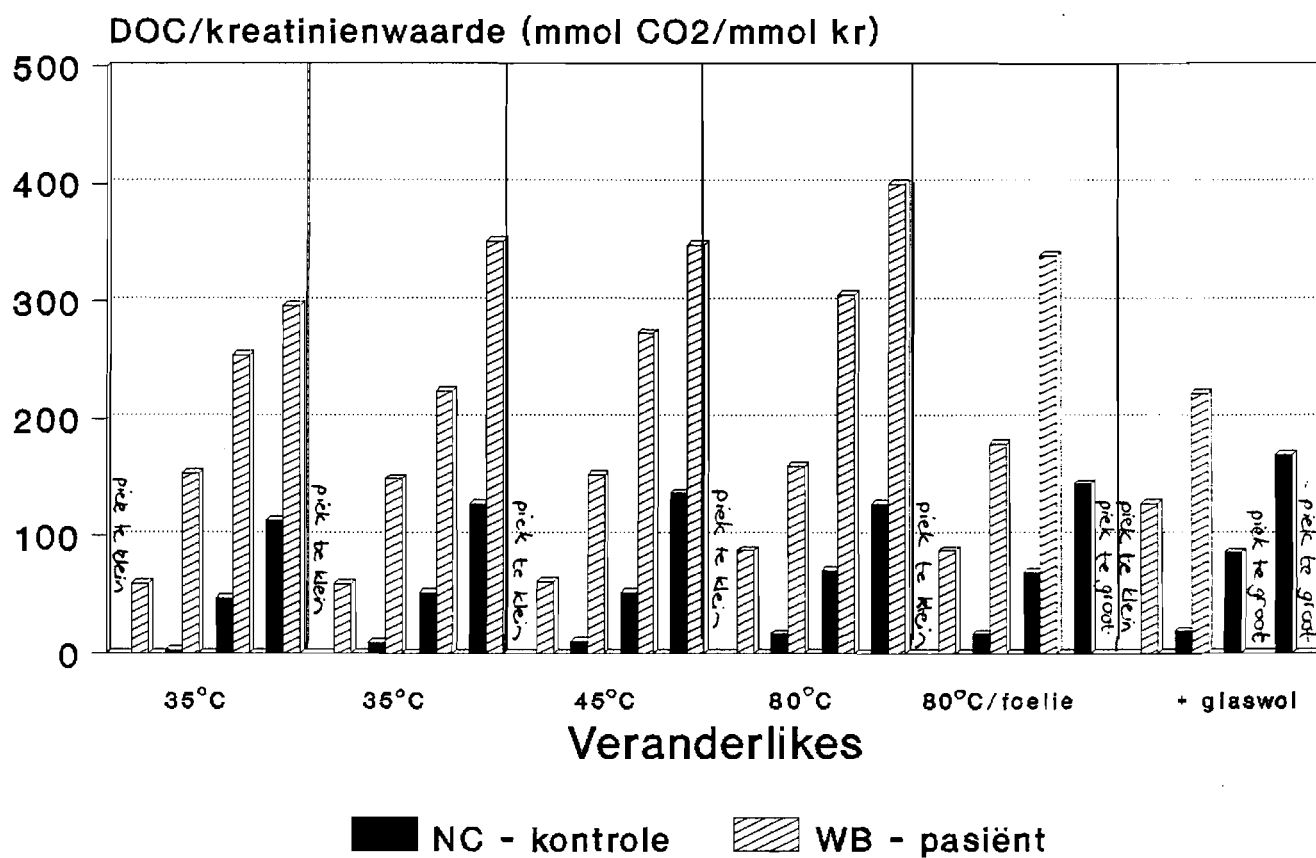


Fig 3.7 Die effek van hoër oksidasietemperature vir die oksidasie van twee monsters, 'n kontrollepersoon s'n en een van 'n pasiënt met propioonsuururie. Hierdie grafiese voorstelling toon die DOC/kreatinienwaardes verkry by 28, 35, 40 en 80°C aan, asook met die ander veranderinge.

In 'n poging om die oksidasie nog verder te verbeter, is aluminium-foelie om die UV-lamp gevou, met die gedagte dat die weerkaatsing van strale dié proses sou aanhelp. Hierna is daar glaswol in die organiese stroper gesit om die waterdruppels op te breek en die CO₂ wat deur die UV-oksidasie gevorm is, vry te stel. Al hierdie veranderinge word in Fig 3.8 getoon. Die resultate van hierdie veranderinge word in Tabel 4 (Bylaag 1) gewys en die oksidasie van die standaard by die verskillende omstandighede in Fig 3.9. Die grafiese voorstelling van die resultate van die veranderinge wat aangebring is, toon aan dat die kombinasie van 'n hoër oksidasietemperatuur, foelie om die UV-lamp en glaswol in die organiese stroper, 'n groot effek op die opbrengs van koolstof ná oksidasie gehad het. Die vorming van die fyn sproei veroorsaak dat heelwat meer CO₂ vrygestel word as sonder die glaswol.

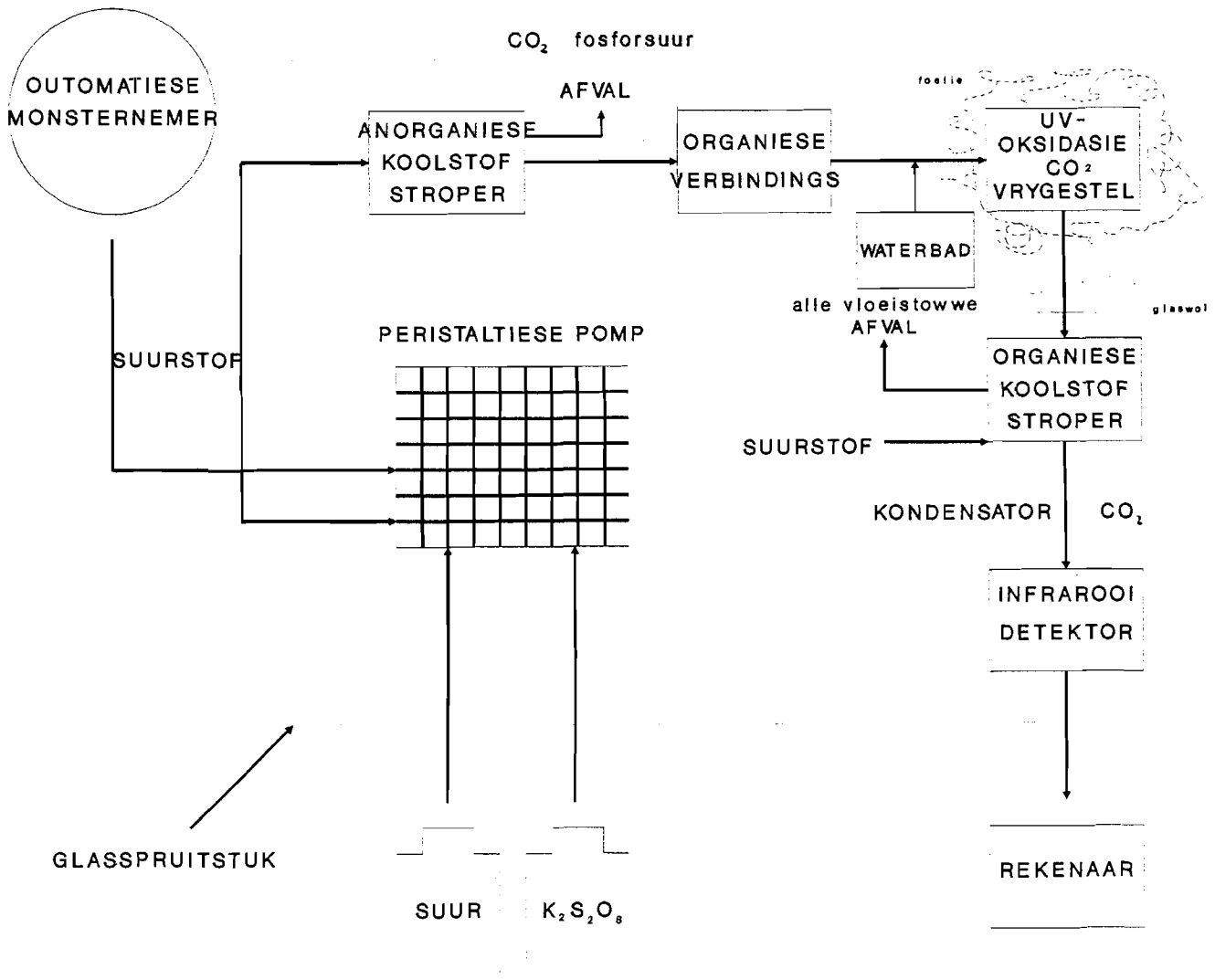


Fig 3.8 Aanduiding van alle veranderinge wat aan die AquaDoc aangebring is.

Buiten die waterbad wat die temperatuur van oksidasie verhoog, is daar ook aluminium-foelie om die lamp gevou om weerkaatsing van die lig te veroorsaak. Verder is daar glaswol in die organiese stroper geplaas om 'n fyn sproei te veroorsaak wat hopelik meer CO₂ sal vrystel.

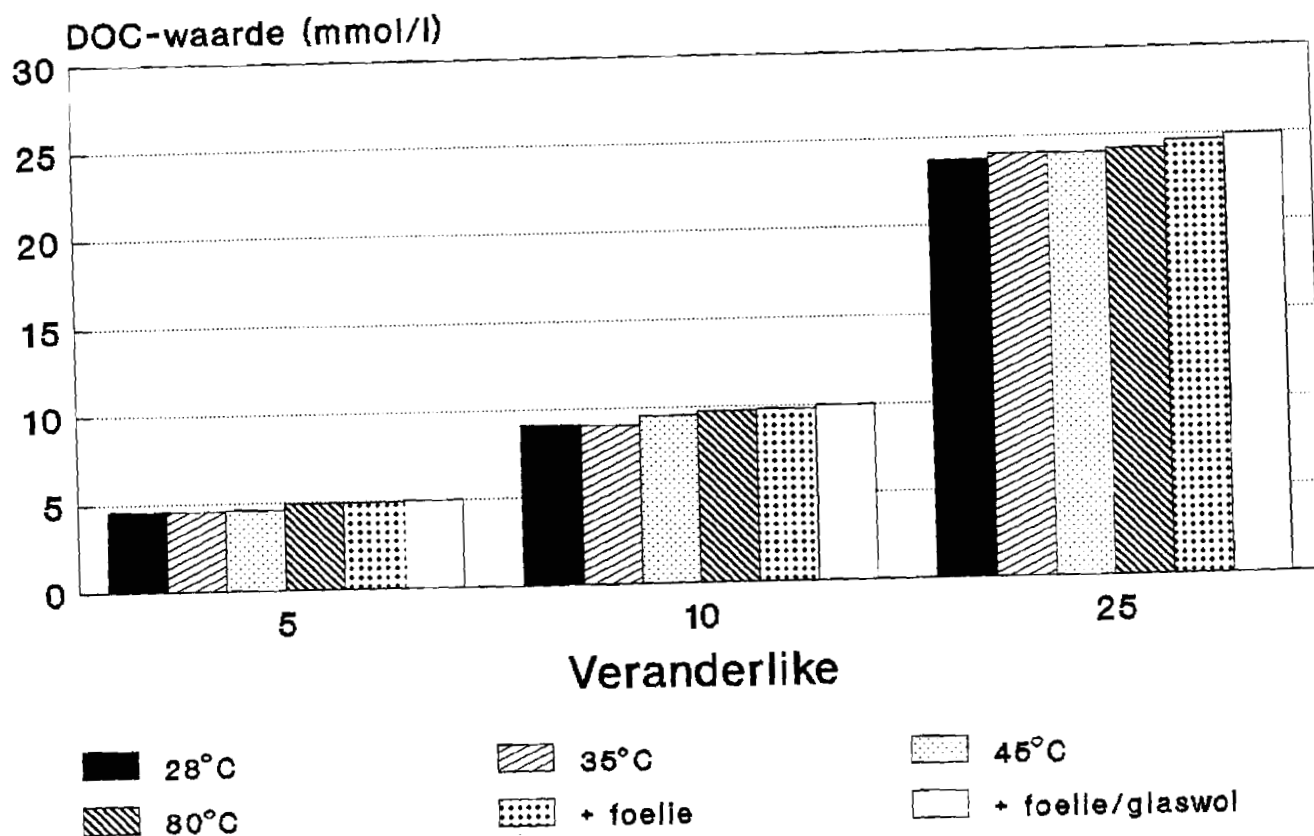


Fig 3.9 Oksidasie van kaliumwaterstoftalaatstandaarde.
'n Reeks van verskillende konsentrasies is voorberei en elke monster is drie keer getoets. Die verkrygte standaardkromme vergelyk goed met die verwagte resultate (Fig 3.10). Oksidasie van die monsters het verbeter.

Veranderinge van die $K_2S_2O_8$ -konsentrasie is ook nagegaan en die resultate van hierdie ondersoek verskyn in Tabel 5 (Bylaag 1). Buiten die monsters van die pasiënt met propioonsuururie en van die persoon sonder 'n metaboliese afwyking, is 'n derde monster ook by hierdie analise ingesluit, dié van 'n pasiënt met Hartnup se sindroom. Die monsters is nie by hoër $K_2S_2O_8$ -konsentrasies beter geoksideer nie : die algemene tendens was 'n verlaging van die DOC/kreatinienwaarde. Daar is gevolglik besluit om die konsentrasie van hierdie reagens by 4 persent te hou.

Die oksidasie van organiese verbindings in die urine vind na die veranderinge wat aangebring is, meer volledig plaas. 'n Moontlike verklaring vir die swak opbrengs selfs by die lae verwagte urinêre organiese inhoud van die persoon wat nie aan 'n aangebore metaboliese defek ly nie (Fig 3.7), is dat 'n sekere minimum hoeveelheid organiese verbindings nodig is voordat hulle na die organiese stroper gevoer word. Indien die konsentrasie urinêre organiese verbindings van die begin af laag is, word baie min stroper toe geneem en die opbrengs is laag.

3.4 OKSIDERING VAN METABOLIE TE

Daar is besluit om 'n integreerder aan die AquaDoc te koppel, om die kwantifisering van die pieke te vergemaklik. Vervolgens is die oksidasie van die kaliumwaterstoftalaatstandaard, nagegaan. 'n Kaliumwaterstoftalaat-konsentrasiereeks is voorberei en die pieke is uitgeknip en geweeg.

'n Grafiese voorstelling van hierdie resultaat word in Fig 3.10 getoon. Die resultate wat op hierdie manier verkry is stem goed ooreen met die werklike konsentrasies van die oplossings. Dit kom dus voor asof oksidasie van organiese verbindings byna volledig plaasvind, alhoewel daar afplatting van die kromme by hoë konsentrasies plaasvind.

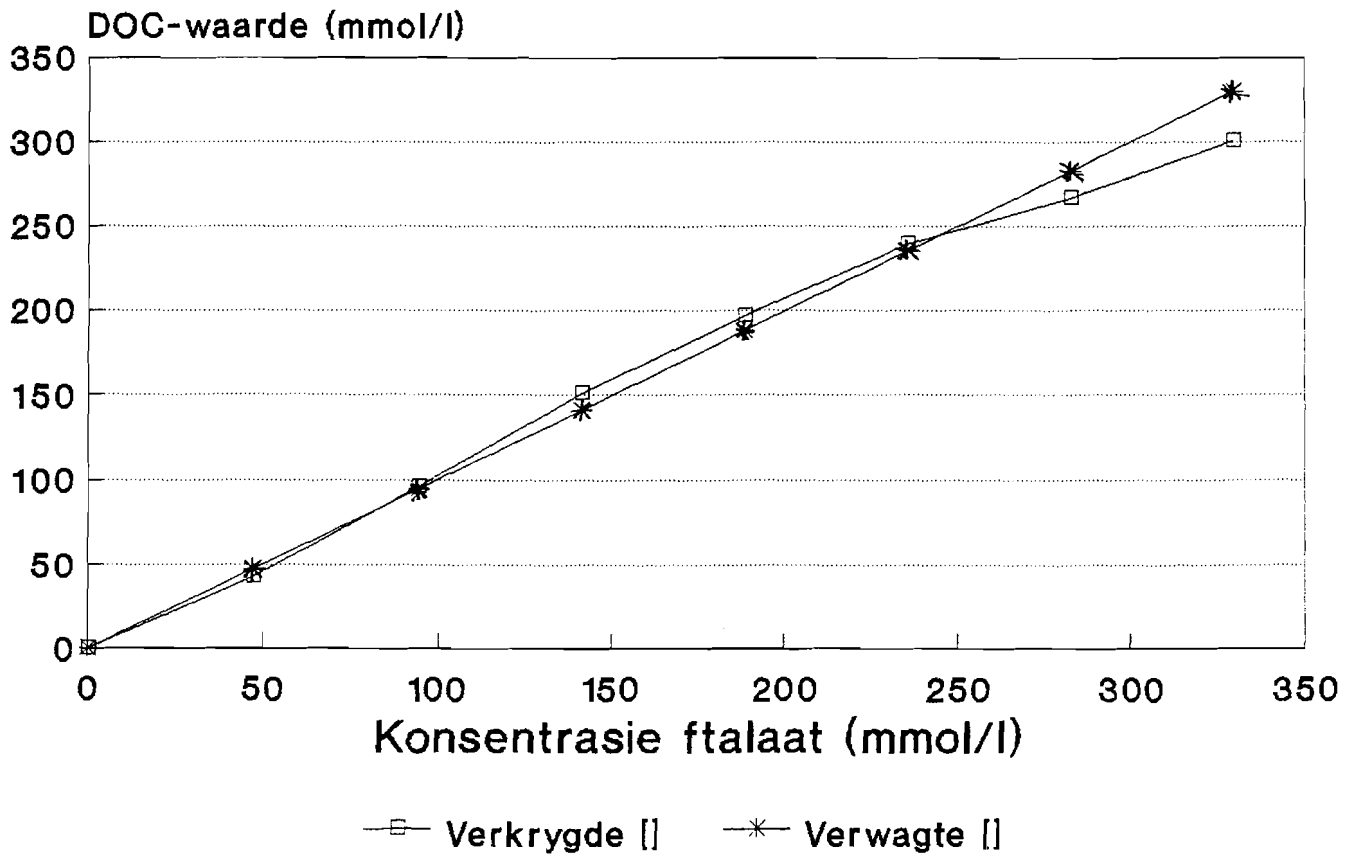


Fig 3.10 Kaliumwaterstoffftalaatstandaardkromme.

'n Wye reeks konsentrasies is drie keer getoets en die oksidasie van hierdie standaard lewer 'n kromme wat baie nou ooreenstem met die kromme wat opgestel is volgens die verwagte resultate.

'n Groot aantal en verskeidenheid metaboliëte word in die urine uitgeskei en sekere metaboliëte, soos langketting vetsure, is moontlik moeilik oplosbaar wat dan oksidasie benadeel. Konsentrasies van metaboliëte wat in urine uitgeskei word, word in mmol/mmol kreatinien uitgedruk. Om hierdie rede is 'n aanname gemaak dat die oplossings wat opgemaak moes word, kreatinienwaardes van 8,85 mmol (100 mg% kreatinien) het. Hierdie kreatinienwaardes is gebruik om oplossings voor te berei met 'n sekere konsentrasie (in mg% kreatinien). Twee verdere verdunnings van hierdie stokoplossing is gemaak. 'n Groot verskeidenheid aminosure, organiese sure, koolhidrate, asook sitidien en uriensuur is gebruik. Die organiese verbindings wat gebruik is, is gekies op grond van hul algemene voorkoms in urine en die resultate word in Tabela 6 (aminosure), 7 (organiese sure) en 8 (koolhidrate) in Bylaag 1 uiteengesit.

In die meeste gevalle het die metaboliëte wat aan die oksidasieproses onderwerp is, die vrwagte opbrengste gelewer. Slegs oktanoësuur het werklik 'n swak opbrengs gelewer. Beide heksanoë- en oktanoësuur moes met natriumhidroksied alkalies gemaak word voordat hulle in gedistilleerde water opgelos het en met die aansuring van die waterige oplossing wat deur die AquaDoc gevoer word, het oktanoësuur moontlik onoplosbaar geraak en slegs 'n klein gedeelte daarvan is toe beskikbaar vir oksidasie en kwantifisering. Oksidasie by die laagste en hoogste verdunnings was swakker as by die middelste oplossing in elke reeks en die redes hiervoor is reeds voorheen genoem.

By lae konsentrasies word alle organiese verbindings moontlik nie na die organiese stroper geneem nie, aangesien 'n sekere minimum konsentrasie nodig is om registrasie van 'n verbinding te veroorsaak. By hoë konsentrasies hierteenoor, is die apparaat moontlik nie daartoe in staat om die geweldige hoeveelheid metaboliëte volledig te oksideer nie.

'n Verdere verbetering is op hierdie stadium aangebring. Die gebrek aan afplatting van die grafieke van die pasiënt met propioonsuururie en die kontrole persoon toon onvolledige oksidasie aan (Fig 3.7). Die vervaardigers van die AquaDoc het 'n ultravioletoelamp geïnstalleer wat 'n oppervlak-intensiteit drie-maal hoër as die vorige een gehad het. Die oksidasie vind dus oor 'n groter oppervlakte plaas en die opbrengs behoort beter te wees. Dieselfde metaboliëtoplossings is weer eens gebruik en hierdie resultate kan in Tabela 9 (aminosure), 10 (organiese sure) en 11 (koolhidrate, sitidien en uriensuur) in Bylaag 1 gesien word. Grafiese voorstellings van hierdie resultate kan in Fig 3.11 gesien word.

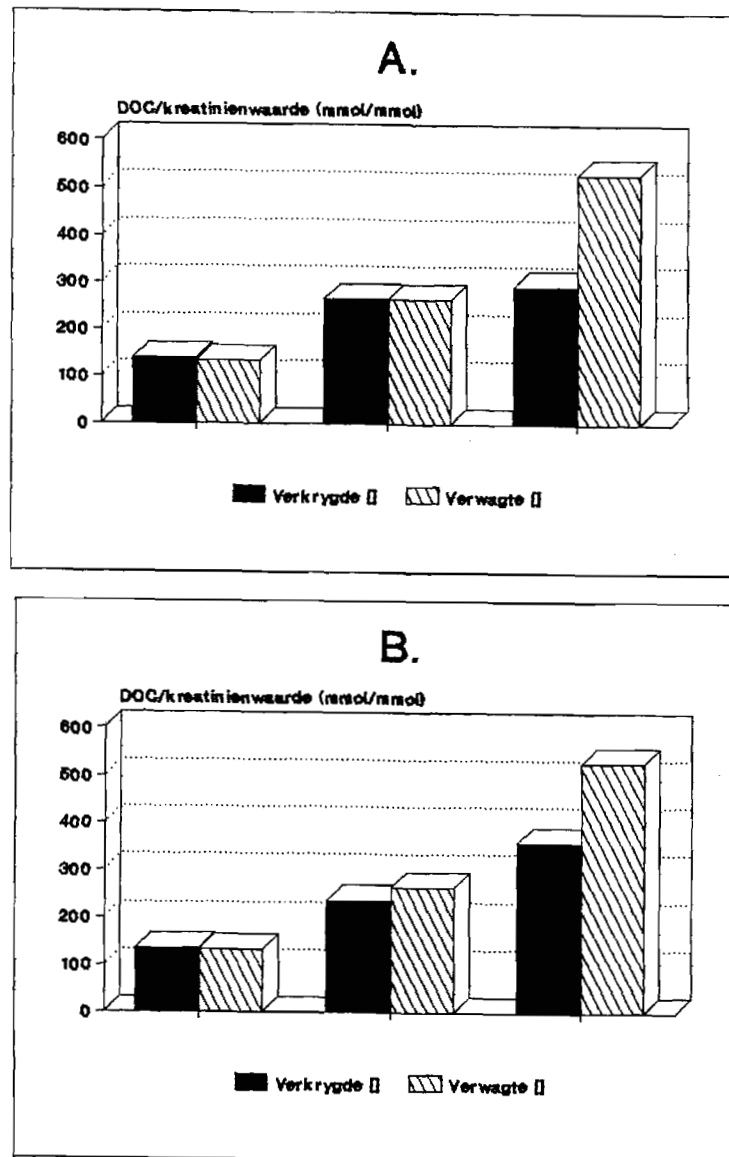
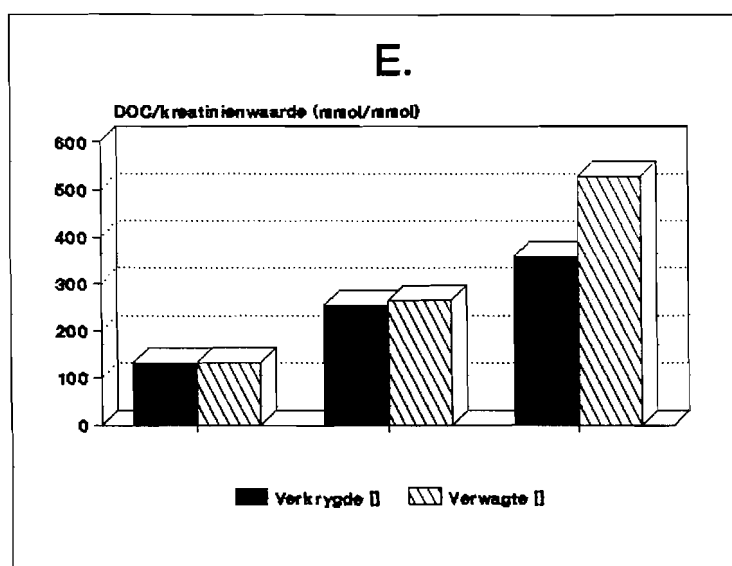
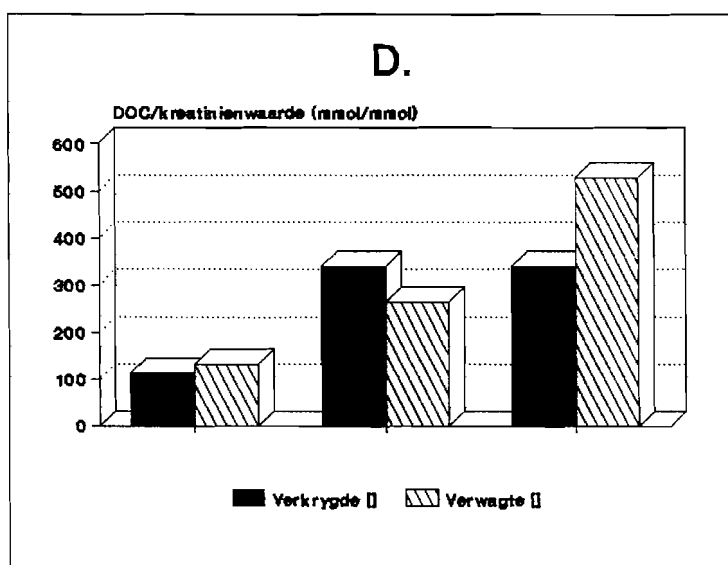
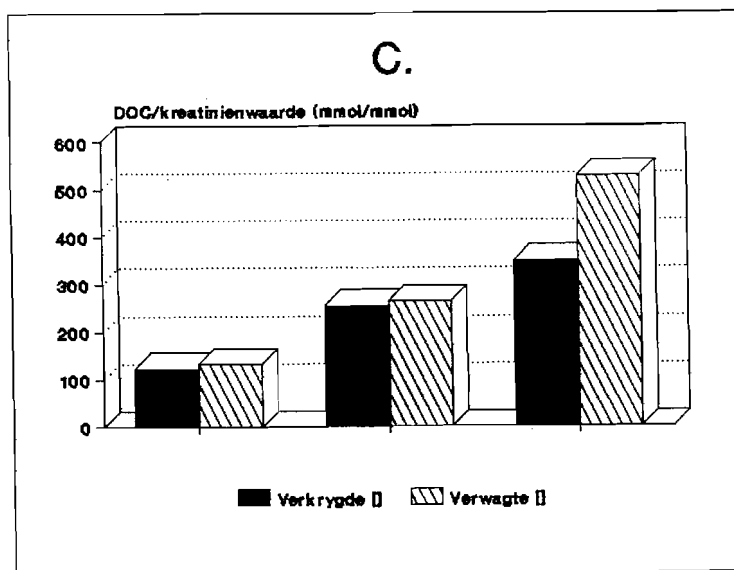
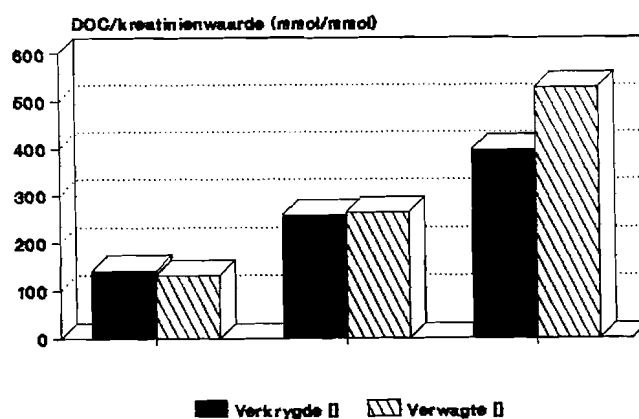


Fig 3.11 Grafiese voorstellings van aminosuur-, organiese suur- en koolhidraatoksidase.

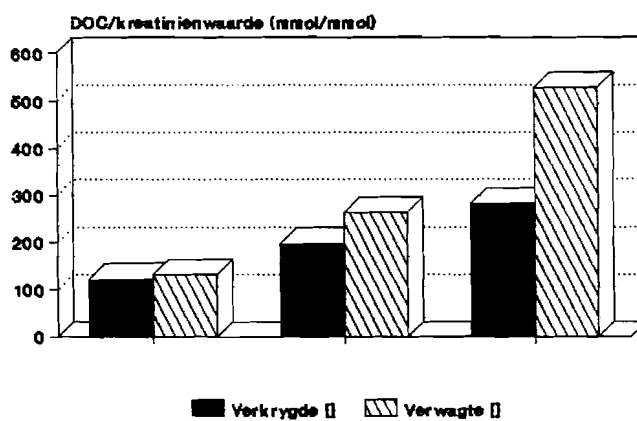
A) alanien; B) feniëlanien; C) glisien;
D) glutamien; E) glutamiensuur; F) histidien;
G) sitrullien; H) benzoësuur; I) heksanoësuur;
J) hippuursuur; K) α -ketoglutaarsuur; L) β -ketoglutaarsuur;
M) melksuur; N) oktanoësuur;
O) propioonsuur; P) sitroensuur; Q) suksiensuur;
R) fruktose; S) galaktose; T) glukose; U) laktose;
V) maltose; W) mannose; X) ribose; Y) xilose;
Z) sitidien; AA) uriensuur. Elke verdunning van elke metaboliet is drie keer getoets en die gemiddelde waardes word getoon.



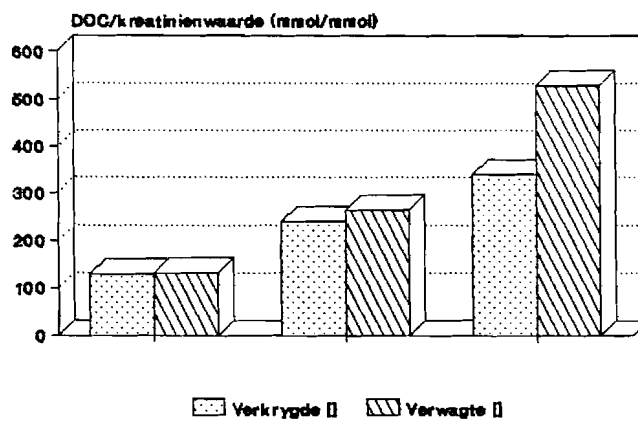
F.

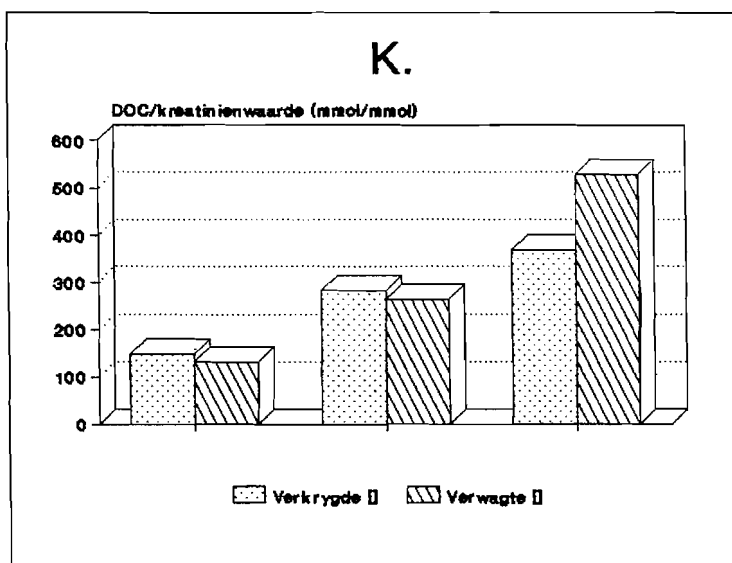
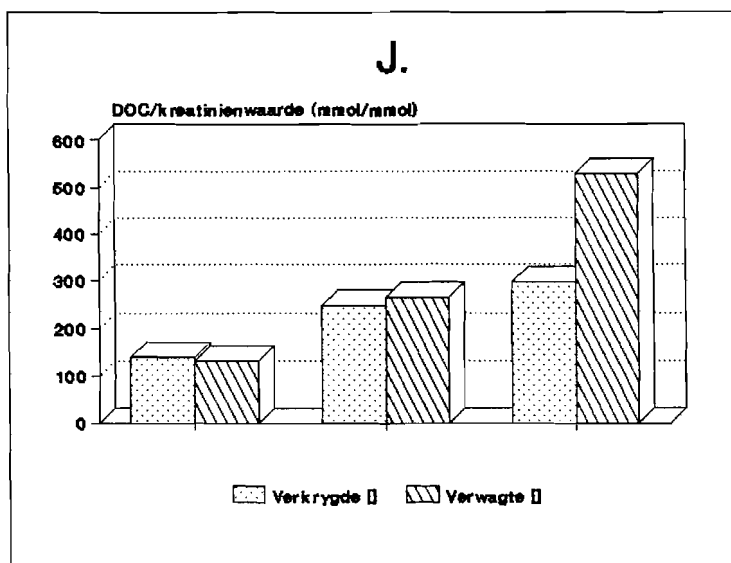
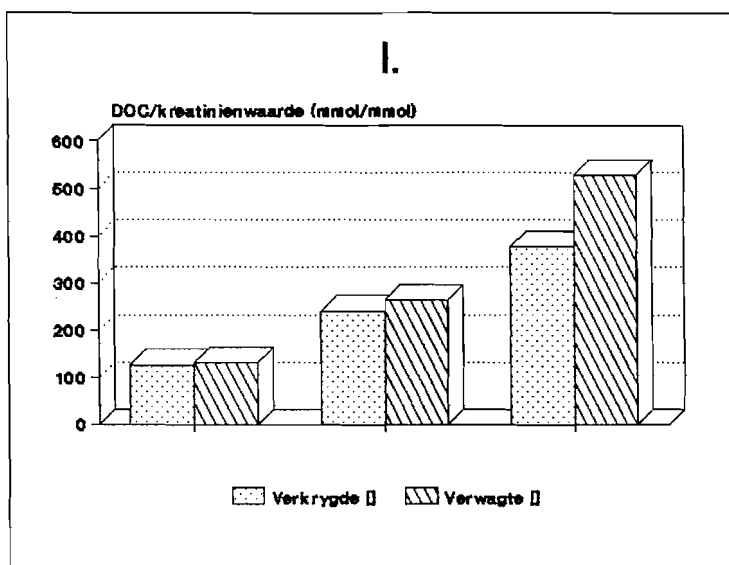


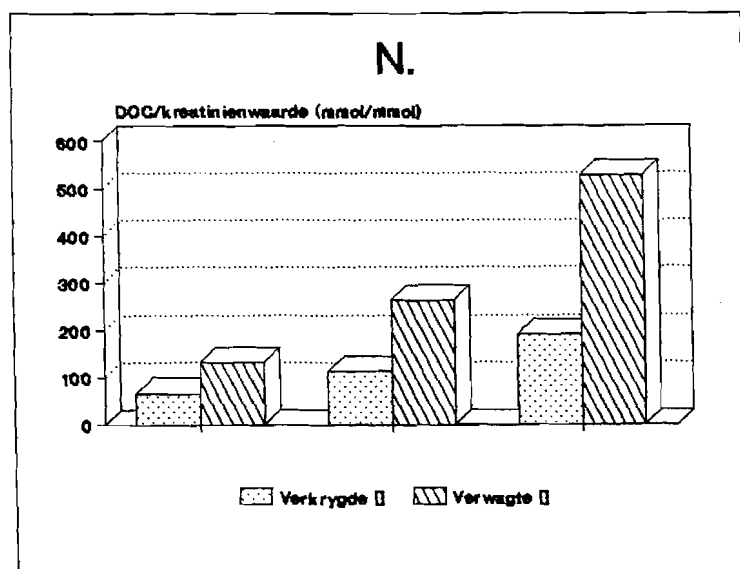
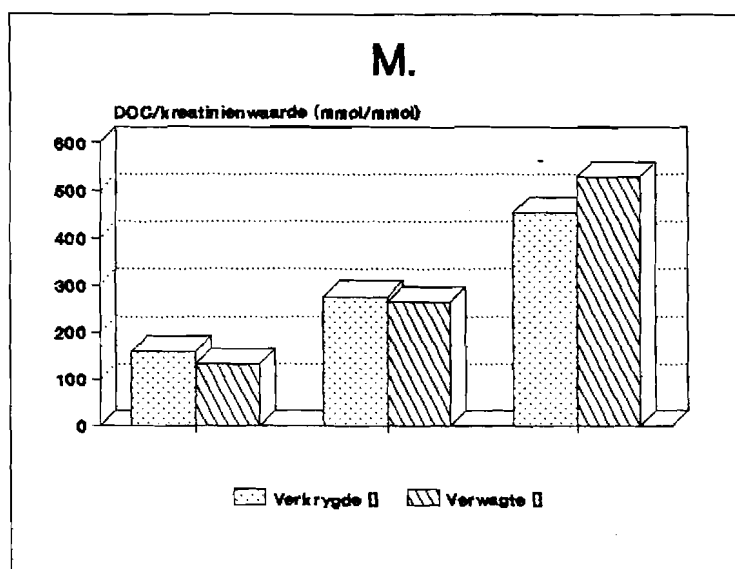
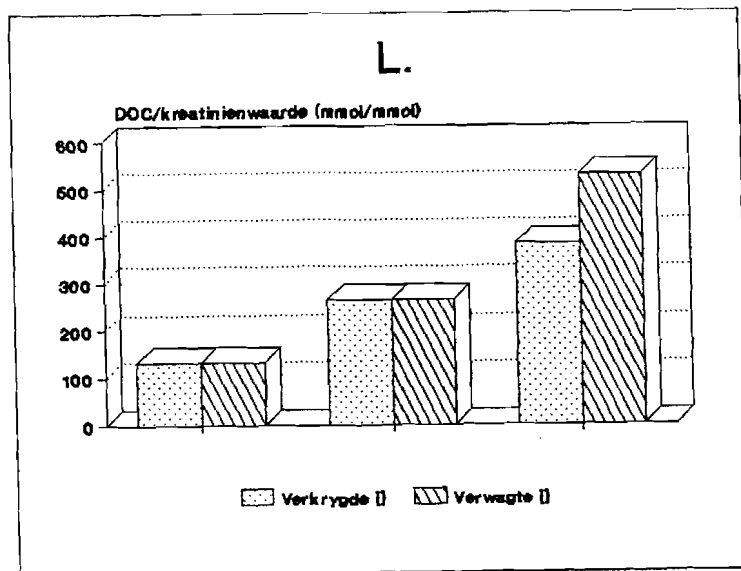
G.

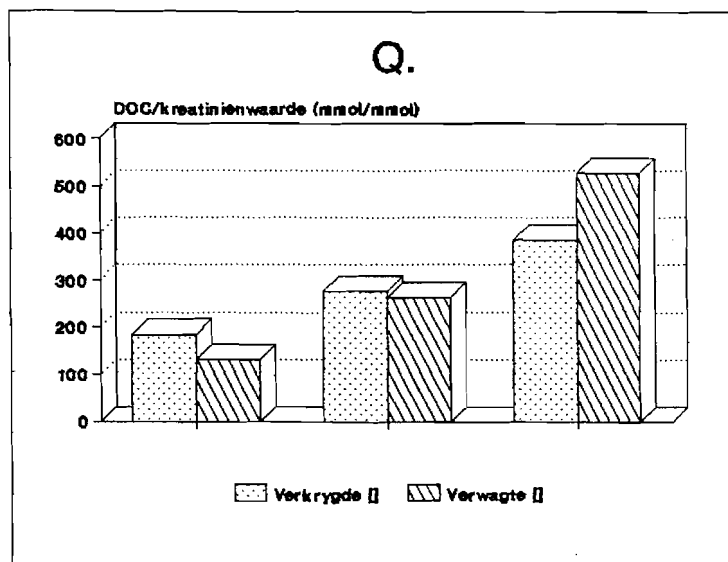
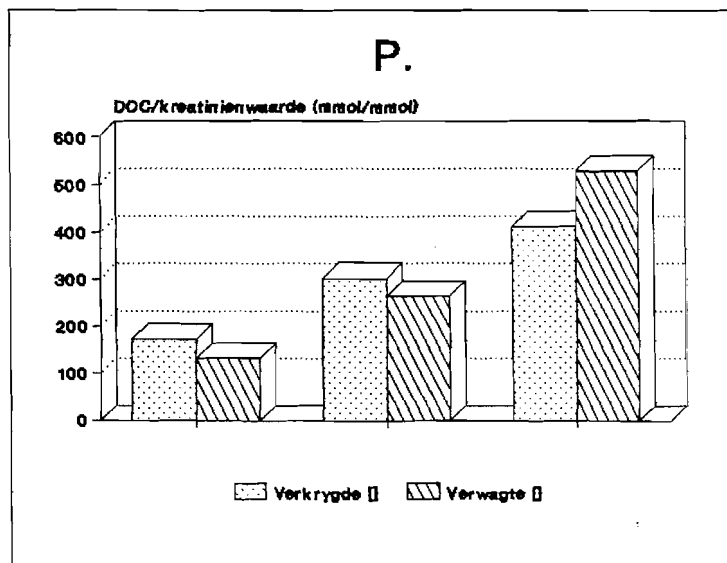
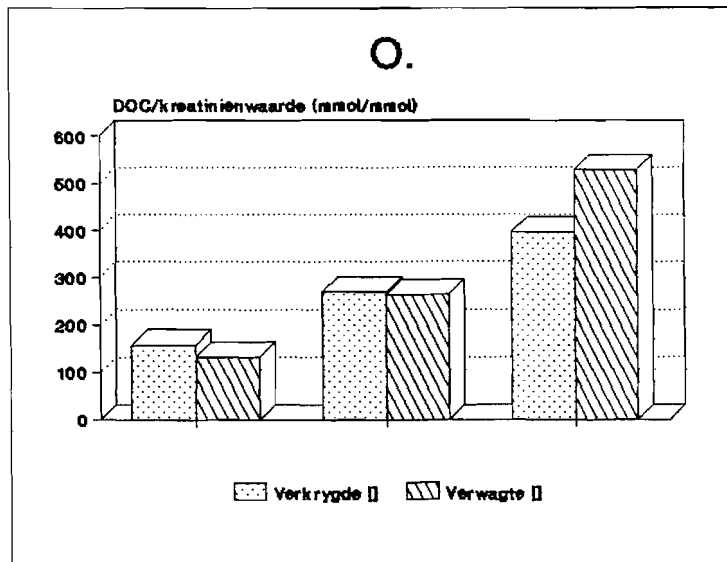


H.

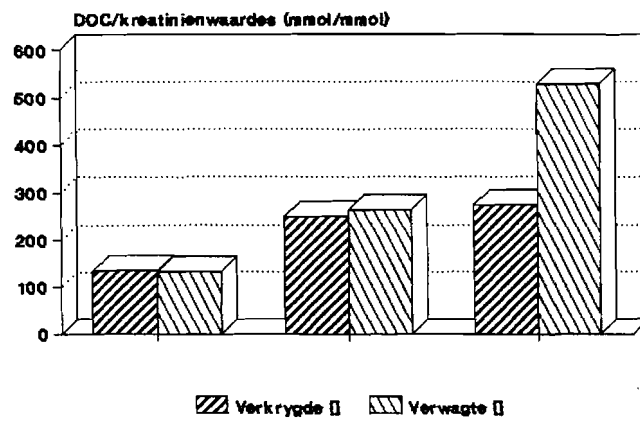




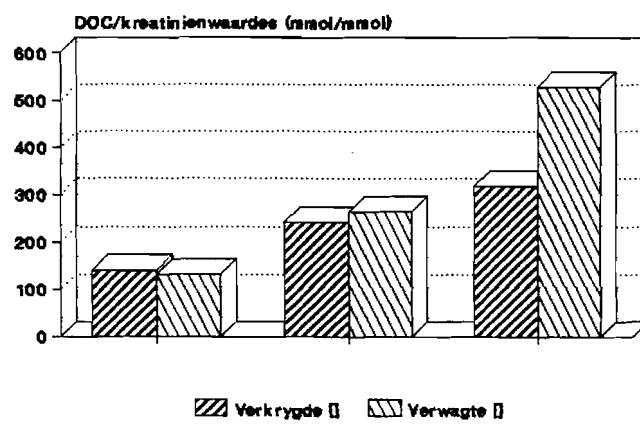




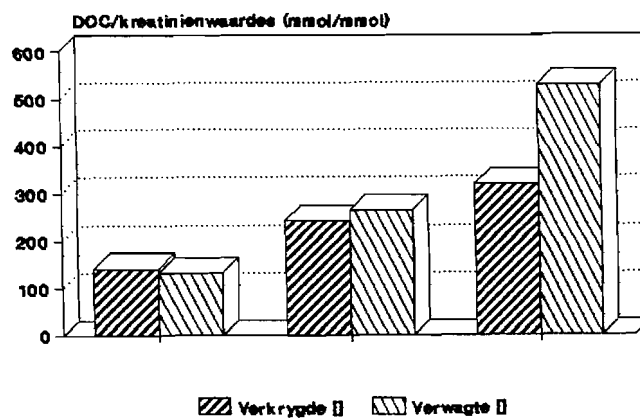
R.



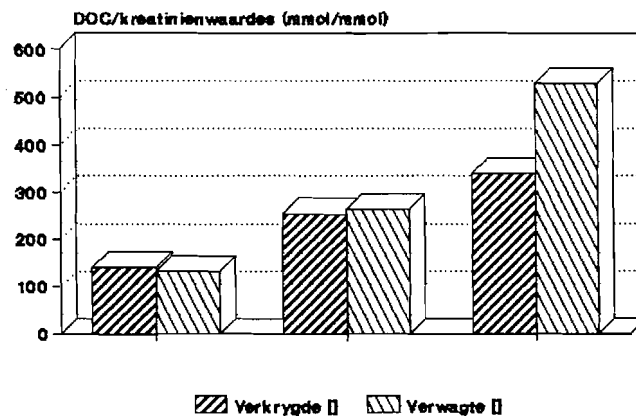
S.



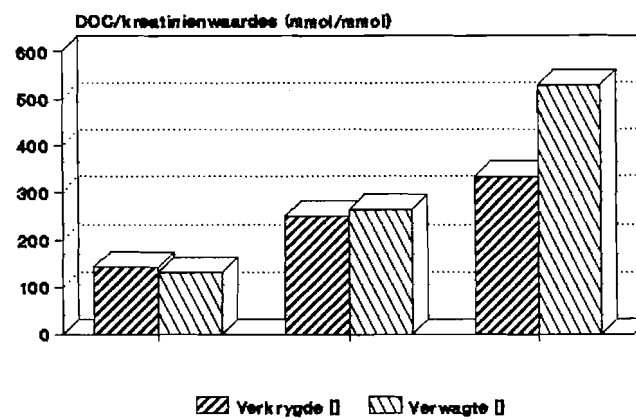
T.



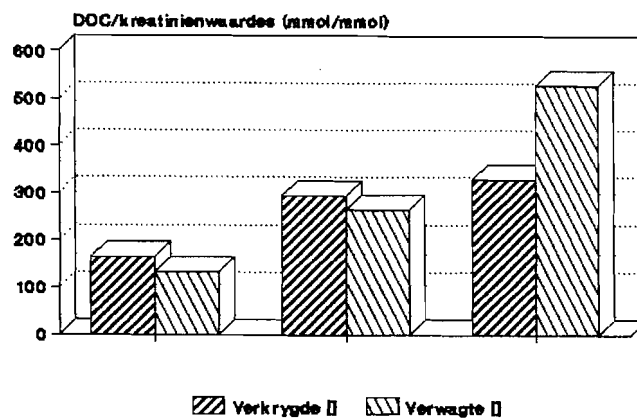
U.

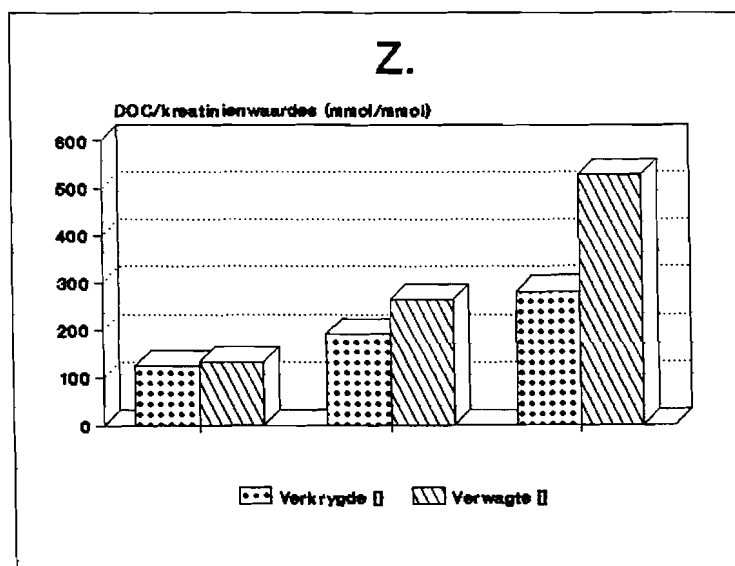
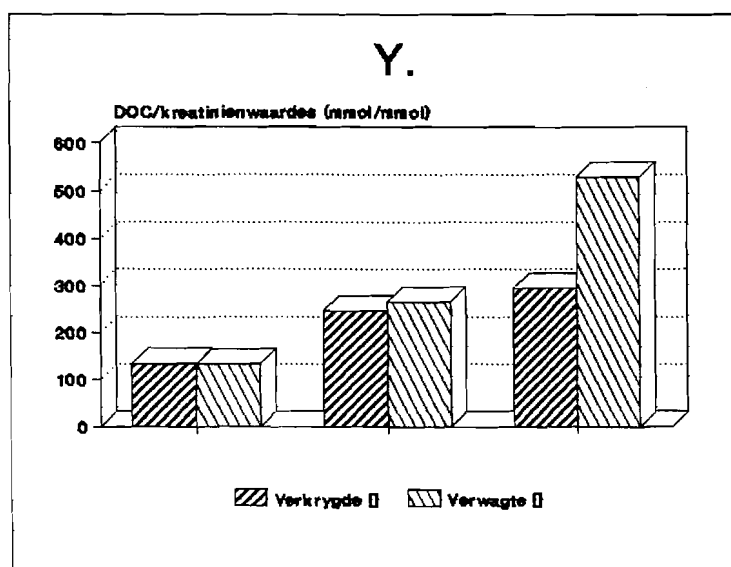
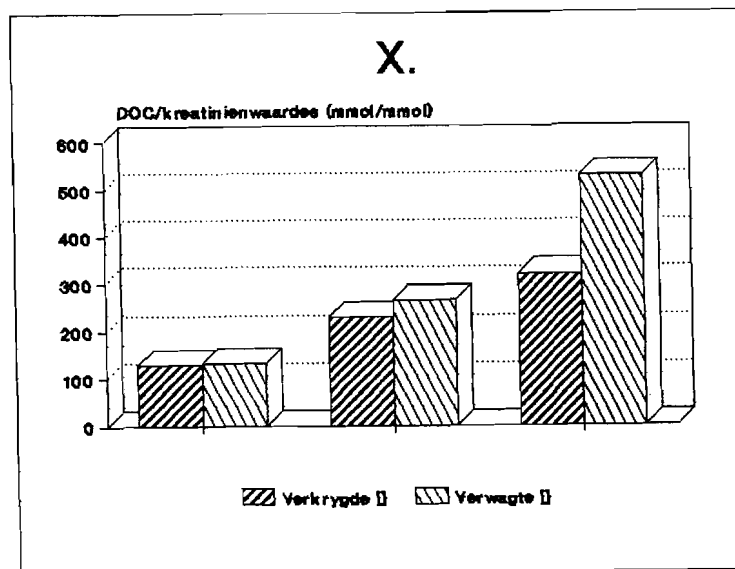


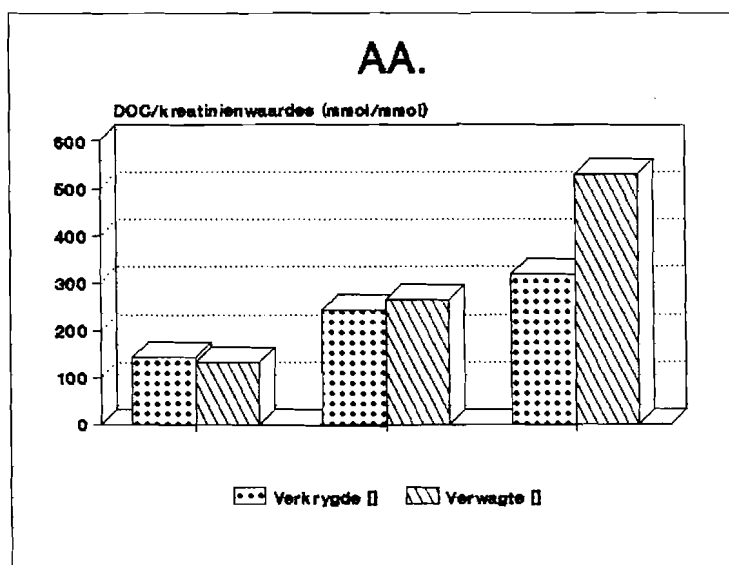
V.



W.







Oksidasie by beide lae en hoë konsentrasies is heelwat beter met die sterker UV-lamp. Volledige oksidasie is by byna al die metaboliëte verkry, selfs by die hoogste konsentrasies. Oktanoësuur het weer eens 'n swak opbrengs gelewer, vir dieselfde redes as wat voorheen gegee is. Al die groepe metaboliëte blyk ewe goed te oksideer en die geskiktheid van die AquaDoc om verskillende metaboliëte te oksideer is bevredigend.

Die resultate van bogenoemde eksperiment het met redelike sekerheid gewys dat die AquaDoc, met die veranderings soos genoem, nader aan die optimaal vir die Departement Biochemie aangepas is. Alhoewel die apparaat nog steeds nie baie hoë konsentrasies metaboliëte in oplossing volledig oksideer nie, behoort dit nie 'n probleem te skep nie, aangesien oplossings met groter verdunnings wel die verwagte konsentrasies weerspieël. In die geval van verbindings wat weens hul swak oplosbaarheid moeiliker oksideerbaar is as ander, was net een problematies. Oktanoësuur het 'n baie lae opbrengs gelewer en alhoewel dit beter was met 'n sterker UV-lamp (Tabel 10), is daar steeds hoogstens 50% van die verwagte opbrengs gelewer. Vetsure is bekend daarvoor dat hulle baie stabiele verbindings is en moeilik oplosbaar is, maar heksonoësuur het wel die verwagte opbrengs gelewer. Beide oktanoë- en heksonoësuur moes met natriumhidroksied alkalies gemaak word, voordat dit in water kon oplos. Met die verloop van die AquaDoc-prosedure kom die monsteroplossings met fosforsuur in aanraking en dit kon veroorsaak dat die oktanoësuur weer onoplosbaar raak en saam met die afvalvloeistowwe uit die apparaat gevoer is. Langketting vetsure is nie bestudeer nie.

KREATINIENBEPALING

Soos reeds genoem, is dit belangrik dat vergelykbare resultate vir die urinemonsters wat vir die ondersoek gebruik word, verkry word. Hiervoor moet die urine dieselfde behandeling ontvang en 'n konstante moet inkorpeer word. Hierdie maatstaf word dan gebruik óf vir die verdunning van die urine wat geoksideer moet word, óf om die finale koolstofkonsentrasie om te reken na 'n waarde wat 'n meer beduidende resultaat vir die betrokke monsters gee. Kreatinien is in hierdie geval gebruik om die funksie van 'n konstante te verrig. Daar vind 'n konstante uitskeiding van kreatinien plaas (Afdeling 2.3) en aangesien dit 'n aanduiding van die gekonsentreerdheid van urine gee, is dit besonder geskik vir die daarstelling van vergelykbare resultate.

Kreatinien word lank reeds as 'n maatstaf waarvolgens vergelykbare resultate in urienanalise verkry word gebruik. Hiervolgens kan verskille in die konsentrasies van verskillende urinemonsters uitgeskakel word. In Afdeling 2.3 word die uitskeiding van kreatinien en die rede waarom dit as maatstaf kan dien, beskryf. Die algemeenste metode wat gebruik word vir die kwantifisering van kreatinien in die urine, is die sogenaamde Jaffe-reaksie (Jaffe, 1886). Hierdie metode behels die reaksie van natriumhidroksied en pikriensuur met kreatinien, om 'n oranjegeel kleur te vorm wat spektrofotometries by 520nm gemeet kan word. 'n Pikriensuuroplossing (0,04M) is voorberei deur 9,16g pikriensuur met H₂O tot 1 liter te verdun. 15.0g Natriumhidroksied is ook tot 1 liter verdun en 'n 8,85 mmol/l kreatinienstandaard is voorberei. Die reaksiemengsel word saamgestel soos in Tabel 3.1 uiteengesit.

TABEL 3.1 REAKSIEMENGSEL VIR KREATINIENBEPALING

	BLANKO	STANDAARD	MONSTER
Water	3ml	3ml	3ml
NaOH	1ml	1ml	1ml
Kreatinien	-	60 μ l	-
Urine	-	-	60 μ l
Voeg 1ml pikriensuur by elke buis			
Lees A ₅₂₀ na presies 20 minute			

Die kreatinienwaarde word dan soos volg bereken :

$$\text{mmol/l kreatinien} = \frac{A_{\text{monster}}}{A_{\text{standaard}}} \times 100 \times \frac{10}{113}$$

Aangesien die kreatinienwaarde as deel van die sifting vir elke monster bepaal is, word net die resultaat van die bepaling van die standaardkromme gegee (Tabel 12 in Bylaag 1 en Fig 3.12). 'n Konsentrasiereeks van kreatinien is opgemaak en die kreatinienwaardes van elke oplossing is bereken.

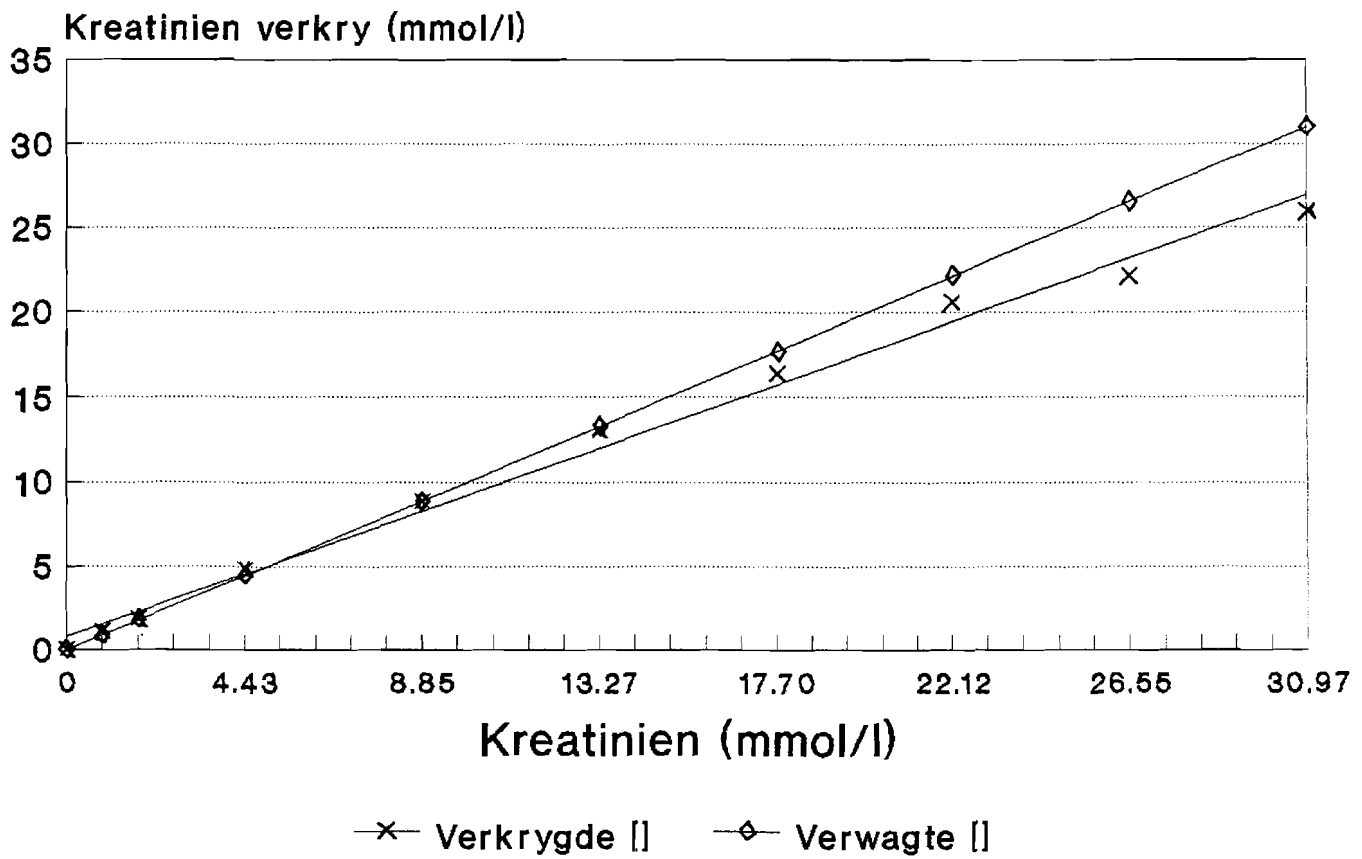


Fig 3.12 Standaardkromme vir kreatinien.
Die resultate verteenwoordig die gemiddeld van drie herhalings. Die verkrygte waardes wyk nie baie af van die opbrengste wat verwag word nie.

Die tempo van kreatinienverval is ook ondersoek. Dit is ondervind dat die kreatinienwaardes oor 'n lang tydperk effens laer word in teenstelling met die oorspronklike waardes. Indien die tempo van kreatinienverval bekend is en daar aangeteken is wanneer 'n urienmonster geneem is, kan die oorspronklike kreatinienwaarde bepaal word vir verdere gebruik. 'n Monster met 'n relatiewe hoë kreatinienwaarde, is met gereelde tussenposes oor 'n tydperk van meer as vier maande geanaliseer. Tabel 13 (Bylaag 1) toon hierdie kreatinienwaardes aan en die grafiese voorstelling word in Fig 3.13 getoon.

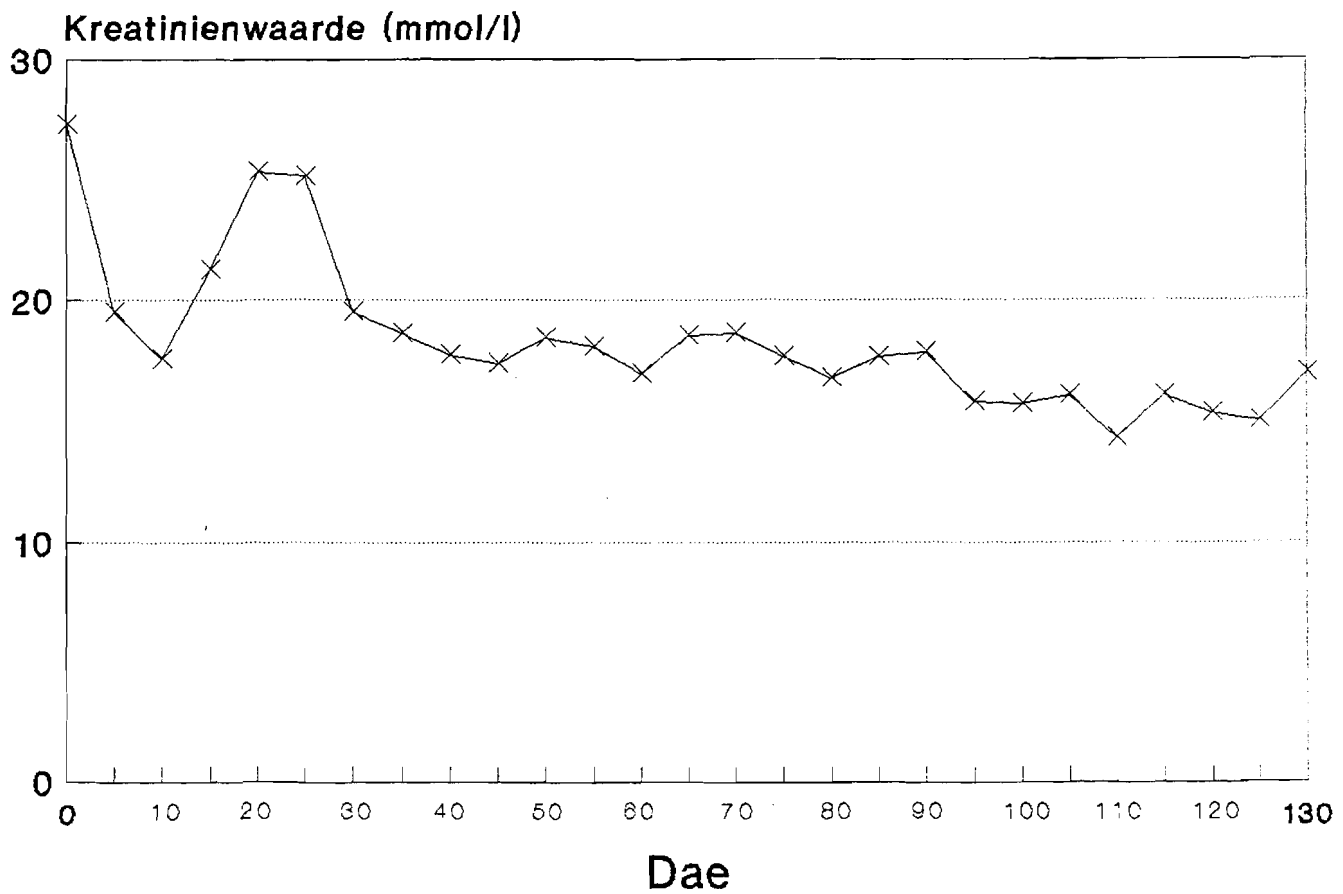


Fig 3.13 Verval van kreatinien in 'n urienmonster oor 'n periode van meer as vier maande.
'n Verlaging van ongeveer 38% oor die vier maande is ervaar. Herhaalde vries en ontdooi van die monster het moontlik veroorsaak dat die verval groter is as wat dit onder normale omstandighede sou gewees het.

Na aanleiding van die noemenswaardige daling in die kreatinienwaarde van die gekose monster, word daar voorgestel dat alle monsters wat gebruik word in die ondersoek na opgeloste organiese verbindings "vars" sal wees, dit wil sê die urinemonsters moet so gou as moontlik geanaliseer word. Indien dit nie moontlik is nie, behoort die oorspronklike kreatinienwaarde met behulp van die volgende vergelyking bereken te word :

huidige kreatinien + dae (1.5) = oorspronklike kreatinien
(dae verwys na die ouderdom van die monster)

3.6

SAMEVATTING

'n Vierledige probleemstelling is aan die begin van hierdie hoofstuk uiteengesit. Dit het ingesluit : die aanvanklike evaluering van die AquaDoc, optimalisering van oksidasie, kwantifisering van urinêre metaboliete en ondersoek na 'n konstante vir die verkryging van vergelykbare resultate. Gevolgtrekkings is gemaak en hier volg 'n samevatting van die resultate -

- i) Die rekenaar-sagteware van die AquaDoc is nie gebruik nie, aangesien sinnelose resultate geproduseer is. Die WNNR-skakelpersoneel het onderneem om ondersoek in te stel. Weens hierdie gebrek aan betroubaarheid, moes die kwantifisering van die resultate op 'n ander manier geskied en hiervoor is eers die skrywer en toe die integreerder gekoppel. Behalwe vir die sagteware, het die AquaDoc self nie probleme veroorsaak nie. Die veranderinge wat aangebring is, het wel die apparaat meer "lomp" gemaak, maar die verbetering in oksidasie was genoegsame regverdiging hiervoor. Die AquaDoc het nie veel onderhoud nodig nie en is maklik om te hanteer.

- ii) Die veranderinge wat aangebring is toon aan dat die AquaDoc so te sê optimale oksidasie van urinêre metaboliete lewer. Die strukturele veranderinge word reeds in die vervaardiging van die kommersiële apparaat geïnkorporeer wat daarop dui dat die vervaardigers ook vertrouwe het in die verkrygte resultate. Die metode wat gevolg is blyk betroubaar te wees en indien die monster-verdunning korrek uitgevoer word, lewer die apparaat die verwagte resultate. Soos reeds genoem, verg die apparaat min onderhoud en nadat monsters in die monsternemer gelaai is, word die analyses outomaties uitgevoer. Die herhaalbaarheid is goed.
- iii) Die ondersoek na die oksidasie van die metaboliete was noodsaaklik, aangesien die hele beginsel van die gebruik van die AquaDoc op die opsporing van urinêre metaboliete berus. Indien daar metaboliete sou wees wat baie swak, of glad nie oksideer nie, sou die opsporing van pasiënte met sekere aangebore metaboliese siekte-toestande nie moontlik wees nie. Oktanoësuur is die enigste metaboliet in die ondersoek wat werklik 'n swak opbrengs gelever het. Oktanoësuur kom onder andere voor by medium-ketting asiel-KoA-dehidrogenasedefek (MCAD), maar aangesien 'n aantal ander metaboliete uitgeskei word, behoort die swak opbrengs hiervan nie problematies te wees nie. Dit is reeds genoem dat die onoplosbaarheid van dié verbinding die oorsaak mag wees van die swak opbrengs. Die oksidasie van die meeste van die metaboliete is besonder goed en die verwagte opbrengs word verkry.

iv) Kreatinien gee 'n aanduiding van die gekonsentreerdheid van urine en daar is besluit om die kreatinien-verdunning soos dit uitgevoer word, net so te gebruik. Die finale koolstof-konsentrasie wat verkry word, is dus in werklikheid DOC/kreatinien en die onveranderlikheid van die uitskeiding van kreatinien, lewer 'n betroubare weerspieëling van die uitskeiding van urinêre metaboliete.

Die AquaDoc, wat nou 'n hele nuwe vorm het, sal hopelik as 'n eerstefase siftingstoets kan dien en die ondersoek na die toepassing van die metode op pasiënt- en kontrolemonsters sal in die volgende hoofstuk weergegee word.

H O O F S T U K 4

EVALUERING VAN DIE AQUADOC-METODE VIR DIE OPSPORING VAN ABNORMALE METABOLIETVLAKKE

4.1 INLEIDING

In Hoofstuk 3 is al die prosedures wat gevolg is om te verseker dat die apparaat optimaal funksioneer, weergegee. Nadat hierdie optimalisering- en standaardiseringsprosedures uitgevoer is, kon daar begin word met die werklike doel van die ondersoek : die vroeë identifisering van aangebore metaboliese siekte-toestande. Alhoewel dit voorkom asof die AquaDoc nie maksimum konsentrasies kan oksideer nie, blyk dit of die resultate by groter verdunnings wel betroubaar is. Indien 'n pasiënt opgespoor word, word daar verwag dat die metabolietvlak in die urine hoog genoeg sal wees om die toestand van die pasiënt te bevestig.

Die evaluering van die metode is soos volg aangepak :

- (1) Botha en Ueckermann het slegs "pasiëntmonsters" getoets, dit wil sê monsters wat verwys is vir metaboliese sifting. Vir bevestiging moet 'n genoegsame hoeveelheid kontrolemonsters aan die prosedure onderwerp word (sien Afdeling 4.2 hieronder). Die normaalverdeling van die koolstofinhoud word verwag om meer akkuraat te wees en 'n afsnitpunt vir normaal/abnormaal sal bereken kan word.

- (2) Vir verdere evaluering moes monsters van 'n noemenswaardige reeks bevestigde pasiënte getoets word en die resultate hiervan word in Afdeling 4.3 gegee. Pasiëntmateriaal van verskeie aangebore metaboliese siektetoestande was in die laboratorium van die Departement Biochemie beskikbaar.
- (3) Die herhaalbaarheid van hierdie prosedure is aan die hand van enkele monsters getoets. Beide herhaalde toetsing van dieselfde monster en toetsing van herhaalde monsters van dieselfde persoon is hier ter sprake. Die resultate word in Afdeling 4.4 gegee.
- (4) 'n Verdere belangrike aspek van dié ondersoek is die toetsing van onbevestigde pasiënte in parallel met die siftingsprogram wat in die Departement gedoen word. 'n Blinde analise is uitgevoer waar slegs die laboratoriumnommers gebruik is, waarna die resultate met dié van die siftingsprogram vergelyk is. Die vergelykende resultate word in Afdeling 4.5 vervat.

In die loop van die ondersoek was die volgende vrae ter sprake :

- (a) Wat is die persentasie vals positiewe metings?
- (b) Wat is die persentasie vals negatiewe metings?
- (c) In watter mater oorvleuel die koolstofinhoud van urine van pasiënte teenoor gesonde persone?
- (d) Is die AquaDoc betroubaar ten opsigte van herhaalde urinemonsters van dieselfde persoon en ook herhaalde toetsing van dieselfde monsters?
- (e) Het medikasie 'n invloed op die konsentrasie van metaboliete in die urine?

4.2 **ONDERSOEK NA METABOLIETVLAKKE IN DIE URINEMONSTERS VAN 'N KONTROLEGROEP**

Kontrolemonsters is hoofsaaklik vanaf twee bronne verkry, naamlik personeellede en nagraadse studente van die Departement Biochemie en van twee kleuterskole. Geeneen van dié persone het enige kliniese simptome van 'n metaboliese defek getoon nie. Koolhidraat-, kreatinien- en koolstofinhoudbepalings is op al die monsters uitgevoer. Die resultate word in Tabel 14 in Bylaag 1 vervat. Die DOC/kreatinienwaardes word grafies in Fig 4.1 getoon. Daar is 'n heelwat beter verspreiding van die waardes as dié wat bepaal is vir bykans dieselfde groep en waarvoor daar 'n grafiese voorstelling in Fig 3.5A getoon word. Waar die DOC/kreatinienwaardes in Fig 3.5A met slegs drie uitsonderings tussen 0 en 10 mmol CO₂/mmol kreatinien wissel, vertoon Fig 4.1 wydverspreide variasie tussen 0 en bykans 140 mmol CO₂/mmol kreatinien.

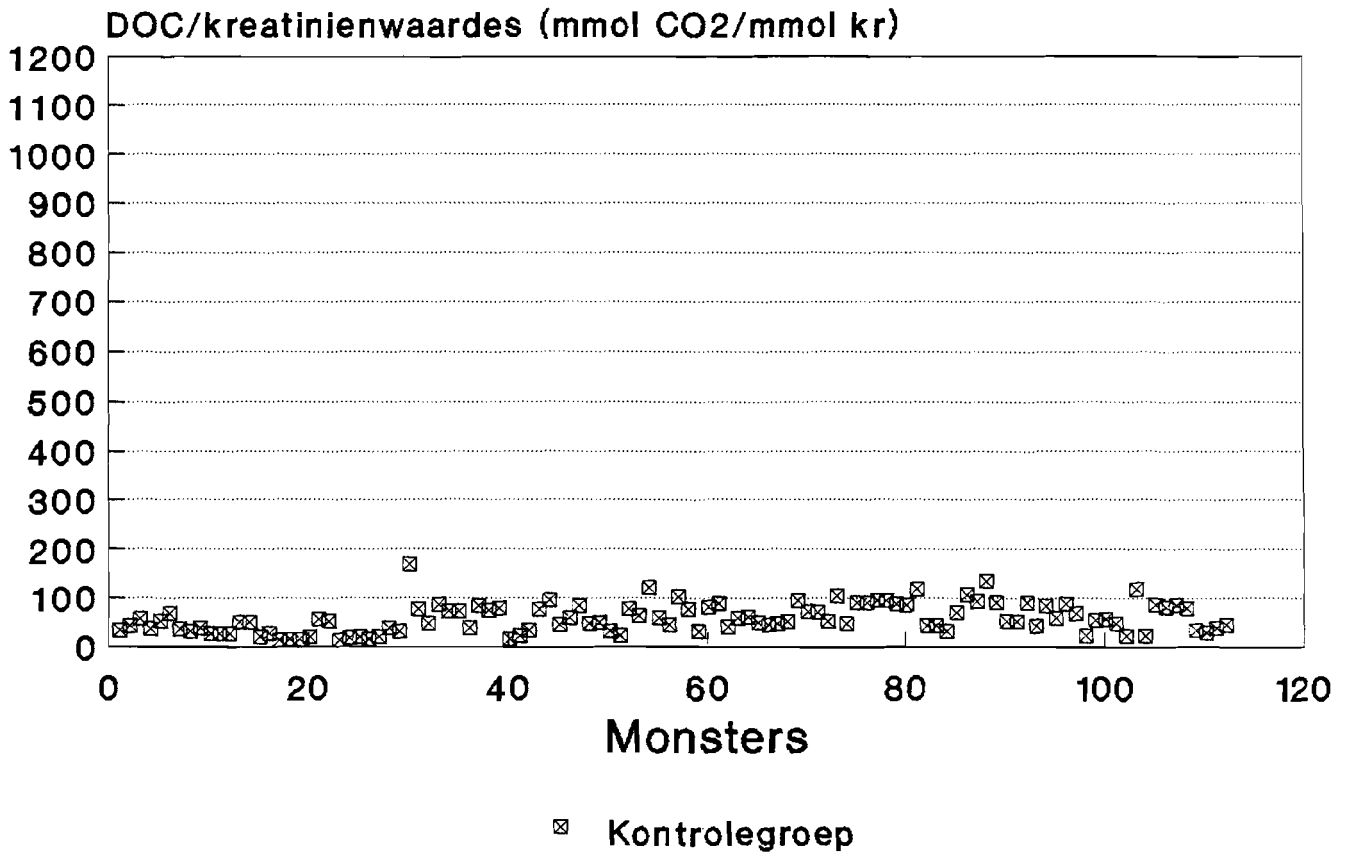
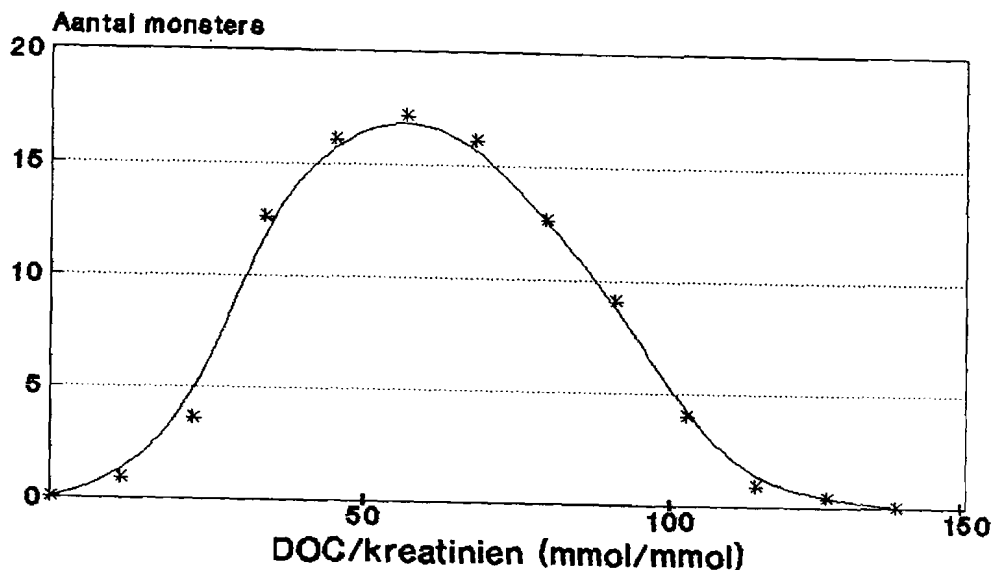


Fig 4.1 **Verspreiding van die DOC-waardes vir die persone in die kontrolegroep.**
112 Monsters is getoets. Die gemiddelde DOC/kreatinienwaarde vir hierdie groep was 56.0 ± 30.2 mmol CO₂/mmol kreatinien.

Die normaalverspreiding van die DOC/kreatinienwaardes word in Fig 4.2A weergegee. Dit blyk uit die verspreidingskromme asof daar moontlik 'n ouderdomsverwantskap voorkom, wat in Fig 4.2B voorgestel word. Tabel 4.1 hieronder toon die mediaan en persentielwaardes vir die groepe bo en onder vyfjarige ouderdom. Die mediaan van die ouer groep was 33.7% laer as dié van die ouderdomsgroep onder vyf jaar. Hierdie verskil tussen die twee ouderdomsgroepe sal moontlik veroorsaak dat twee afsnitpunte bereken sal moet word aangesien die variasie redelik groot is.

A.



B.

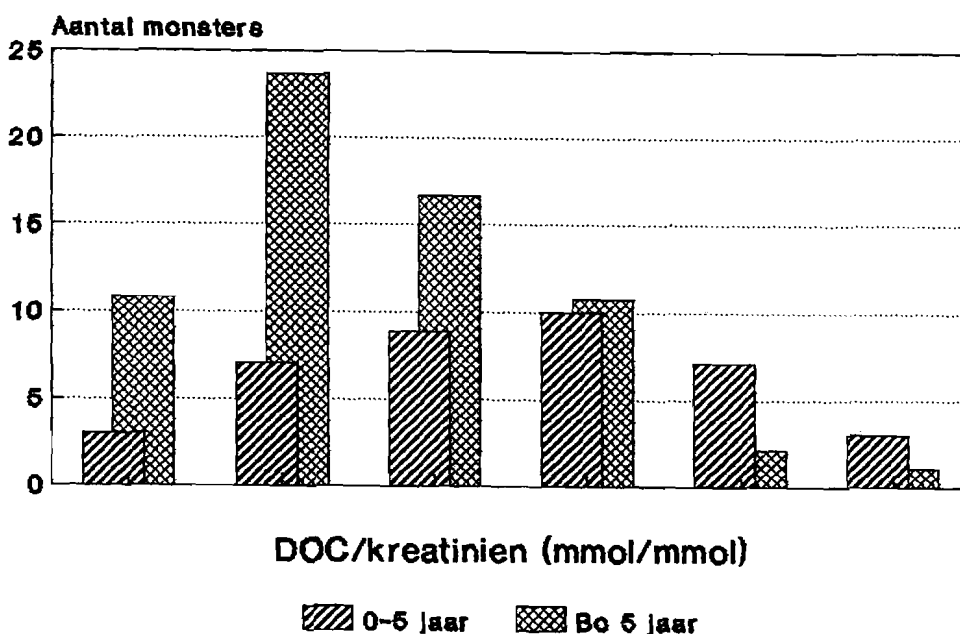


Fig 4.2 A Verspreiding van die DOC/kreatinienwaardes van die kontrolegroep.

'n Goeie Gaussian-verspreiding is verkry, met geen monster wat 'n DOC/Kreatinienwaarde bo 132.21 mmol CO₂/mmol Kreatinien het nie.

B Ouderdomsverwantskap wat getoon word in die normaalverspreiding van die kontrolegroep.

Dit kom kom voor asof die jonger persone hoër DOC/kreatinienwaardes het.

TABEL 4.1 VYF-EN-TWINTIGSTE, VYFTIGSTE (MEDIAAN) EN VYF-EN-SEWENTIGSTE PERSENTIELWAARDES VAN DOC/KREATINIEN IN DIE OUDERDOMSGROEPE ONDER VYF JAAR EN BO VYFJARIGE OUDERDOM

PERSENTIEL	DOC/KREATINIENWAARDE (mmol CO ₂ /mmol kreatinien)	
	ONDER VYF JAAR	BO VYF JAAR
25	41.81	29.40
50 (mediaan)	69.50	46.80
75	88.14	70.06

As die DOC/kreatinienwaardes met die ouderdomme van die persone vergelyk word, is dit duidelik dat daar sekere leemtes in die kontrolegroep is. 'n Grafiese voorstelling hiervan word in Fig 4.3 gegee. Veral tussen nul en vier jaar en tien en twintigjarige ouderdomme, is geen monsters vir die kontrolegroep getoets nie. Aangesien die monsters wat ontvang word vir metaboliese sifting gewoonlik onder eersgenoemde groep val, is dit belangrik dat kontrolemonsters verkry word wat hierdie ouderdomsgroep verteenwoordig.

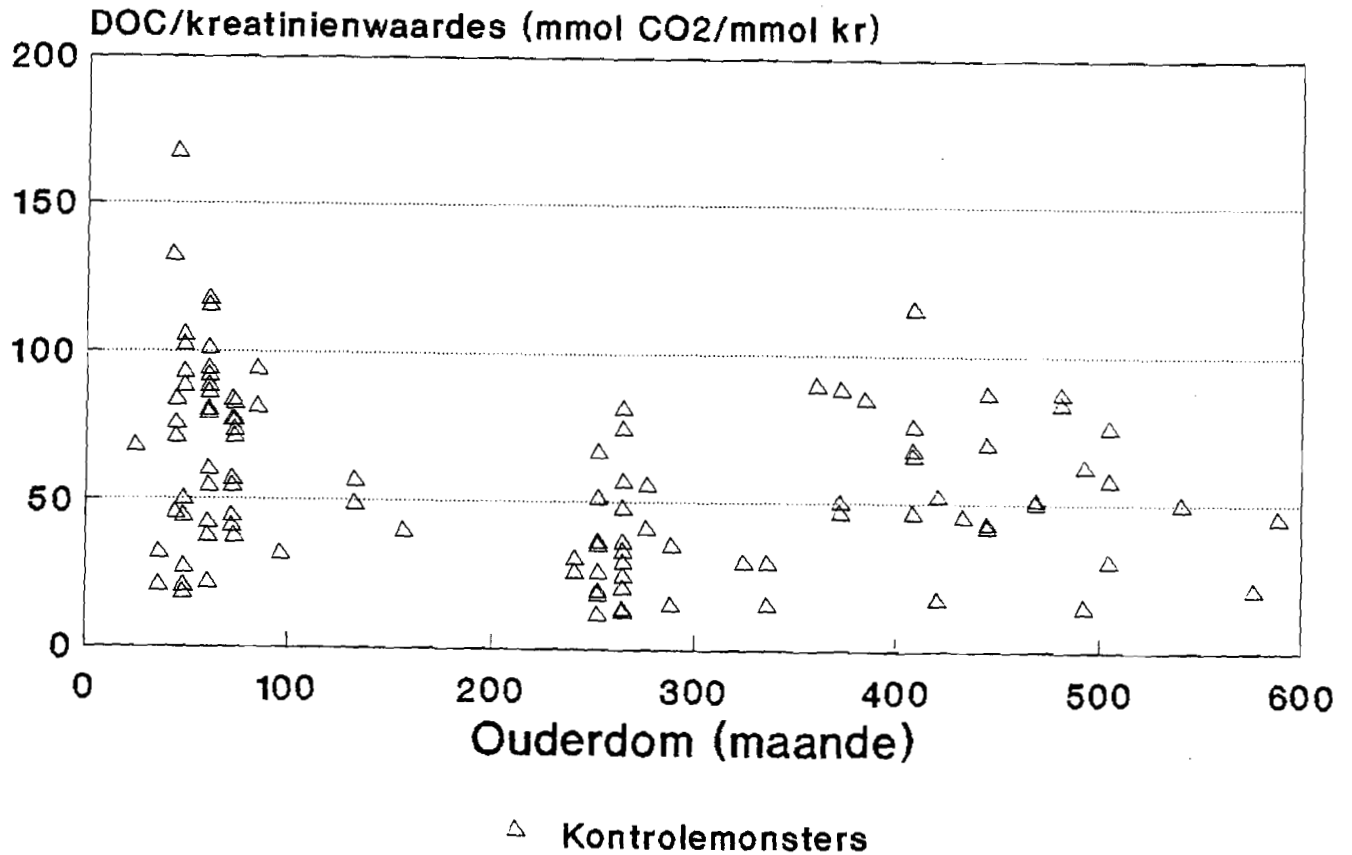


Fig 4.3 Ouderdomsverwantskap van die DOC/kreatinienwaardes.
Alhoewel byna 'n derde van die monsters afkomstig was van jong kinders, bly daar 'n leemte in die groep tussen nul en vierjarige ouderdom en dit is juis hoofsaaklik monsters uit hierdie groep wat ontvang word vir metaboliese sifting.

Aan die begin van hierdie afdeling is genoem dat al die persone wat gewerf is vir die kontrolegroep, klinies normaal voorgekom het. Dit gebeur egter dat ongeskiktheid om as kontrole te dien soms voorkom. Een tweejarige dogtertjie het konstant 'n buitengewoon hoë DOC/kreatinienverhouding getoon. Gedetailleerde ondersoek het gelei tot die opsporing van fruktose in haar urine en 'n voorlopige diagnose van 'n fruktose-absorpsie defek kon gemaak word. Sy is toe nie in die groep ingesluit nie.

Elke persoon by wie 'n monster vir die kontrolegroep ontvang is, het aangedui of hulle ten tye van monsterneming medikasie geneem het en indien wel, watter medikasie. Valse verhoging van waardes in sekere analitiese toetse, kan deur die teenwoordigheid van geneesmiddels veroorsaak word, bv. tydens toetsing vir vanilliemandeliensuur en 5-hidroksi-indoolasynsuur (Christofides et al, 1990). Of geneesmiddels 'n invloed het op die uitskeiding van opgeloste urinêre koolstof moes ook ondersoek word en die resultate van dié persone wat medikasie gebruik het, word grafies in Fig 4.4 voorgestel.

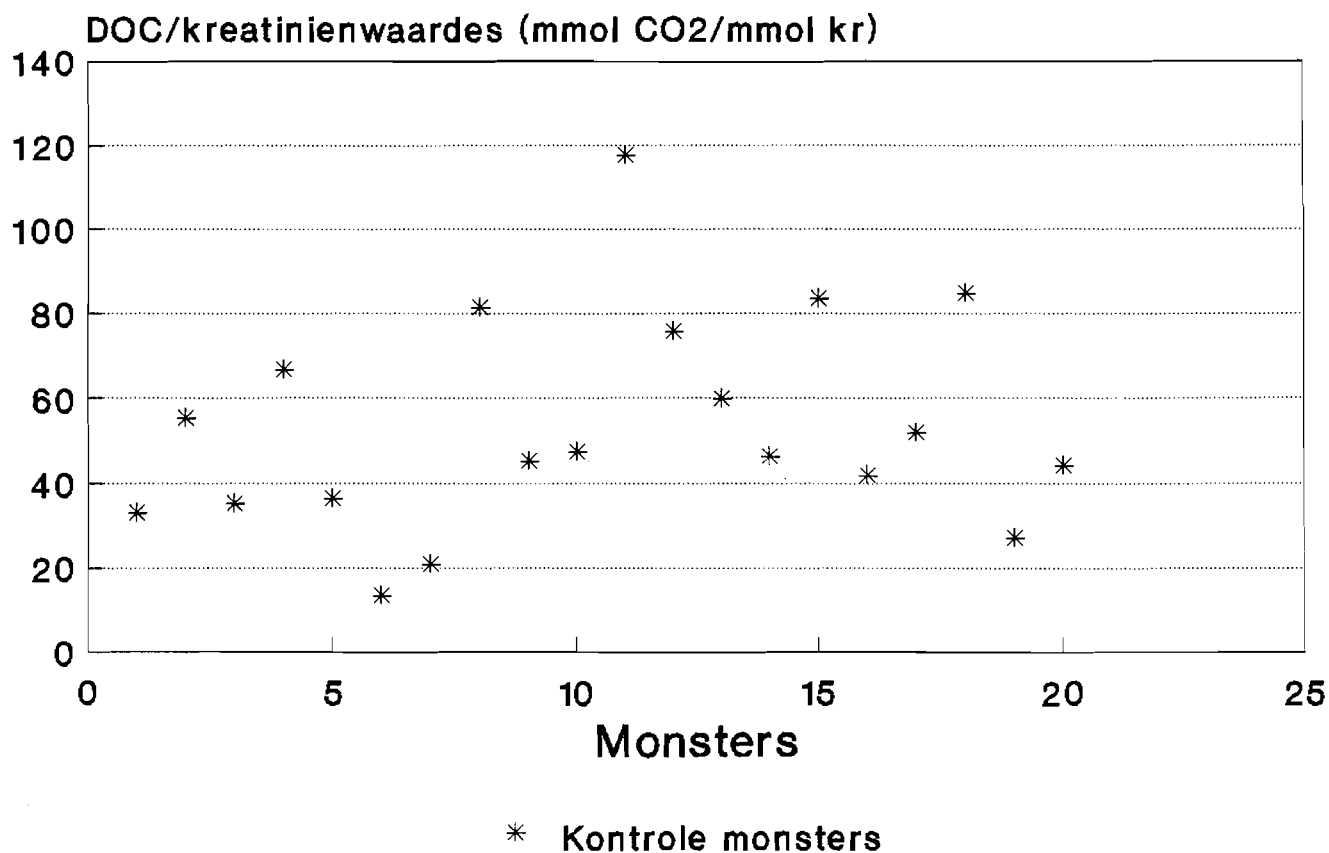


Fig 4.4 DOC/kreatinienwaardes van kontrolepersone wat medikasie neem.

17,9% van die monsters in die kontrolegroep het tydens toetsing medikasie van die een of ander aard geneem en die gemiddelde DOC/kreatinienwaarde was $51,4\% \pm 27,5$ mmol CO₂/mmol kreatinien.

Geeneen van hierdie persone se DOC/kreatinienwaardes was besonder hoog nie, inteendeel, heelwat van die monsters van persone wat geen medikasie neem nie, was hoër en dis maklik om die afleiding te maak dat geneesmiddels nie 'n invloed op die waardes het nie. Chronies-siek pasiënte word egter meer intensief behandel en die moontlike invloed moet onder geen omstandighede geïgnoreer word nie. Dit sal moontlik nodig wees om proefpersone en verskeie geneesmiddels te gebruik om hierdie faktor deeglik te ondersoek.

'n Laaste belangrike faktor wat in ag geneem moet word, is ook ouderdomsverwantskap. Kreatinieninhoud in die urine toon 'n redelike sterk ouderdomsverwantskap - dit neig om laer te wees by jonger persone. Die ouderdomsverspreiding van die kreatinienwaardes in die kontrolegroep word in Fig 4.5 geïllustreer.

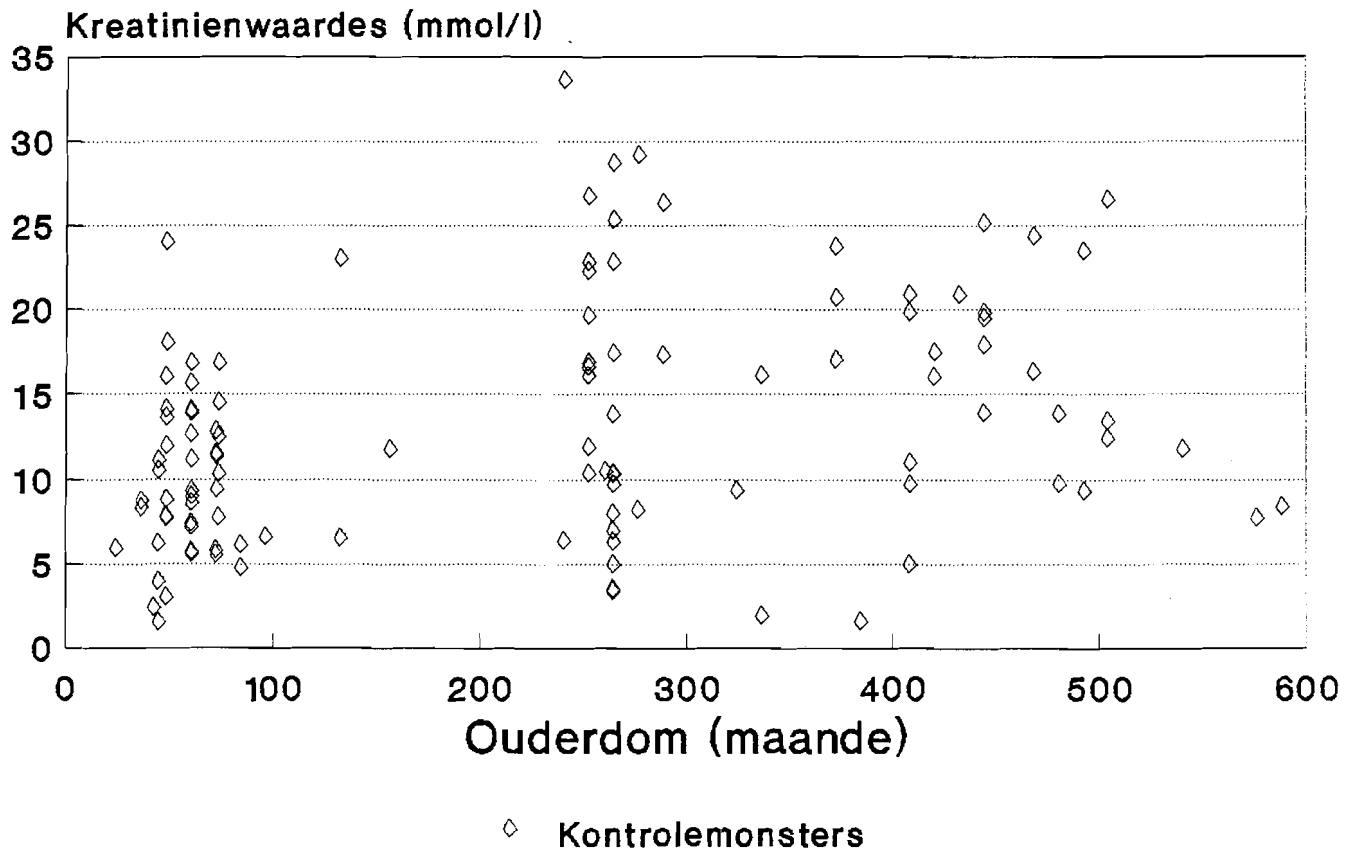


Fig 4.5 Voorstelling van die kreatinienwaardes van die kontrolepersone teenoor hul ouderdomme. Alhoewel die verskil nie groot is nie, kom dit tog voor asof jonger persone 'n geneigdheid toon om laer kreatinienwaardes te hê.

'n Gemiddelde kreatinienwaarde van $9,9 \pm 4,9$ mmol/l is by die groep onder vyf jaar gekry, terwyl die gemiddeld van die ouer groep $14,3 \pm 7,3$ mmol/l was. Alhoewel meer urine gebruik word vir monsters met laer kreatinienwaardes, verseker die kreatinienverdunning dat al die monsters dieselfde "konsentrasie" het en die goeie verspreiding wat in Fig 4.2 A gesien kan word, toon aan dat kreatinien nie noodwendig deur 'n ander parameter vervang hoef te word nie.

4.3 **BEPALING VAN DIE URINÊRE OPGELOSTE KOOLSTOFKONSENTRASIE IN PASIËNTE MET GEDIAGNOSEERDE AANGEBORE METABOLIESE DEFEEKTE**

In die jare wat die siftingsprogram in die Departement Biochemie bedryf was, is 'n groot getal persone met aangebore metaboliese defekte gediagnoseer. Amino- en organiese-suururieë, asook defekte in die koolhidraat-, vetsuur-, purien- en pirimidienmetabolismes is opgespoor. Soos reeds genoem (Afdeling 2.5), is die program wat tans in werking is, 'n omvattende een met beide eerste- en tweedefase toetse en ongeveer 6% van die monsters wat getoets word, word as dié van persone wat aan aangebore metaboliese defekte ly gediagnoseer.

Sewe-en-tagtig pasiënte is gebruik vir die bepaling van die DOC/kreatinien verhoudings van bekende pasiënte. Die defekte waaraan hierdie pasiënte ly word in Tabel 4.2 uiteengesit. In party gevalle is meer as een monster van dieselfde pasiënt gebruik.

TABEL 4.2 AANGEBORE METABOLIESE SIEKTES WAARVAN URIENE VIR DIE BEPALING VAN DIE ABNORMALE DOC/KREATINIEN VERHOUDING BESKIKBAAR WAS

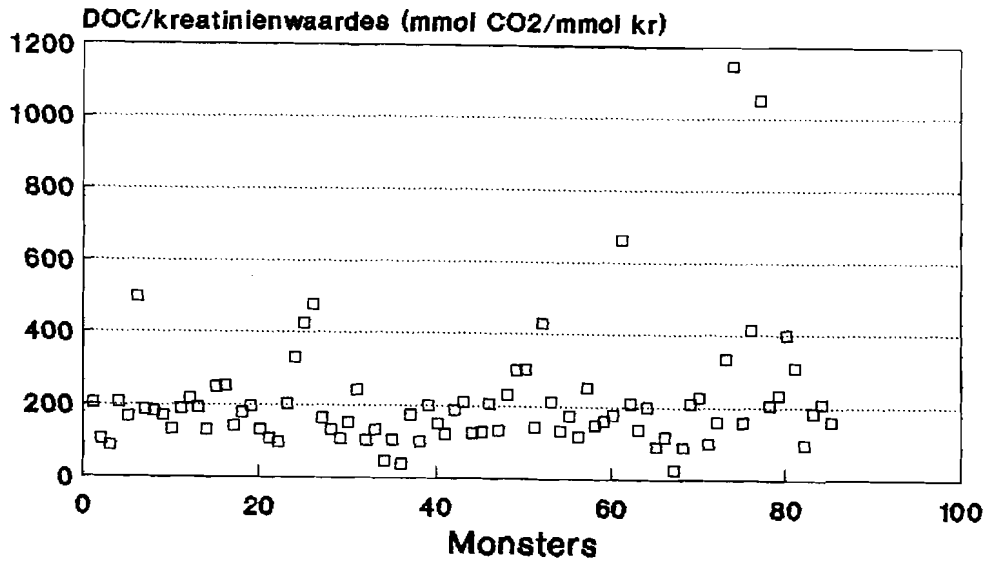
DEFEK	AANTAL PASIËNTE
Asetoasetaattiolase defek	1
Etielmaloniel-adapiensuururie *	2
Glutaarsuururie Tipe I *	3
Glutaarsuururie Tipe II	3
Hartnup se Sindroom *	2
3-Hidroksi-isobottersuurdehidrogenase defek	3
3-Hidroksi-3-metielglutaarsuururie	1
Hiperlisienemie	2
Histidienemie	2
Isovaleriaansuururie *	8
3-Ketotiolase defek (ketose)	6
Laktiese asidose	9
LCAD	1
MCAD	2
Meervoudige Karboksilase defek	5
3-Metielglutakoniensuururie Tipe I *	2
3-Metielglutakoniensuururie Tipe II	2
3-Metielkrotonielglisienurie	1
Metielmaloonsuururie	4
MSUD *	2
Piroglutamiensuururie	1
Piruvaatdehidrogenase defek	1
Piruvaatkarboksilase defek	1
PKU	5
Prolidase defek	1
Propioonsuururie *	9
Puriennukleosiedfosforilase defek	1
Sitrullienemie *	2
Sistienurie	4
Xantienoksidase defek	1

* Waar meer as een pasiënt vir 'n spesifieke aangebore metaboliese siekte-toestand aangedui word, beteken dit in sommige gevalle dat meer as een monster van dieselfde pasiënt gebruik is.

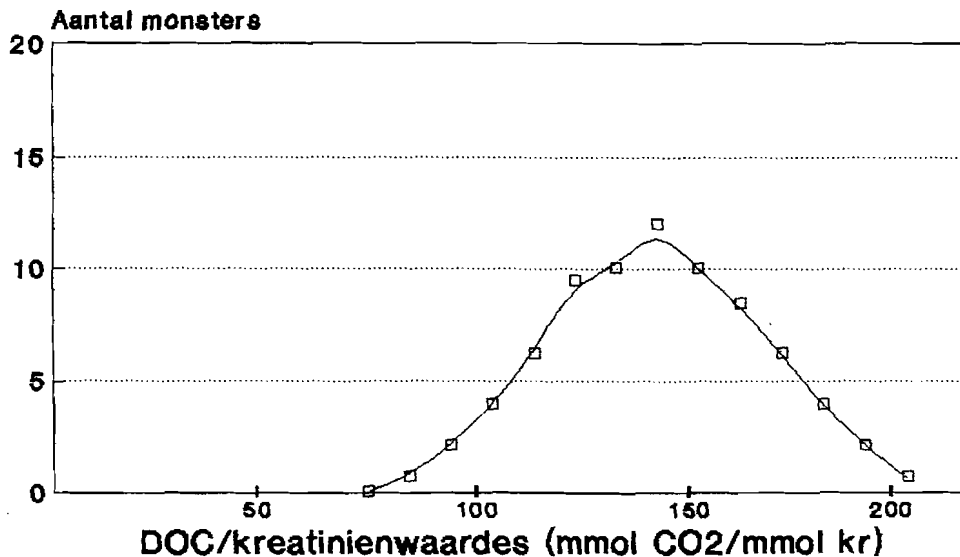
Dieselfde prosedure wat in Hoofstuk 3 beskryf word, is aangewend vir die koolstofinhoud bepaling van die pasiëntgroep. Tabel 15 (Bylaag 1) bevat die resultate van die ondersoek. In vergelyking met die DOC/kreatinienwaardes van die kontrolegroep, was dié van die pasiënte aansienlik hoër.

Die DOC/kreatinienwaardes van hierdie pasiënte word in Fig 4.6 A aangetoon en die verspreiding daarvan in Fig 4.6 B. Die maksimum waarde wat in hierdie groep aangetref was, was 1144,7 mmol CO₂/mmol kreatinien (teenoor 132,2 mmol CO₂/mmol kreatinien vir die kontrolegroep). Die 25, 50 (mediaan) en 75 persentielwaardes was onderskeidelik 47.5, 92.7 en 213.6 mmol CO₂/mmol kreatinien.

A.



B.



—□— Pasiënte

Fig 4.6 A DOC/kreatinienwaardes van bevestigde pasiënte wat getoets is.

Indien hierdie figuur met Fig 4.1 vergelyk word, is dit duidelik dat die algemene tendens 'n heelwat hoër DOC/kreatinienwaarde is.

B Verspreidingskurwe van die pasiënte met aangebore metaboliese siekte-toestande.

Minder monsters is getoets as vir die kontrolegroep, maar die verspreidingskromme het heelwat na regs geskuif (vergelyk Fig 4.2 B) wat die hoër DOC/kreatinienwaardes weerspieël. Weens die uitermatige hoë DOC/kreatinienwaardes van twee van die pasiënte is die "stert" van die kromme nie ingesluit nie.

'n Gemiddelde DOC/kreatinienwaarde van 211.6 ± 174.2 mmol CO_2 /mmol kreatinien is verkry, in teenstelling met 56.0 ± 30.2 vir die kontrolegroep - 'n viervoudige verhoging. Hiermee word duidelik aangedui dat pasiënte met aangebore metaboliese siekte-toestande groter konsentrasies urinêre metaboliëte uitskei as persone wat nie aan sulke siekte ly nie. Indien die AquaDoc-prosedure vir die twee verskillende groepe vergelyk word, blyk dit dat die kontrolegroep beter presteer in terme van die metode self. 'n Koëffisiënt van variasie (KV) van 53.9% word vir die kontrolegroep verkry, terwyl dié van die pasiëntgroep 81.9% is. Hierdie verskille in die KV maak dus die hoër gemiddeld van die pasiëntgroep minder geloofbaar, maar 'n definitiewe onderskeid kom steeds getref word tussen die verspreiding van die DOC/kreatinienwaardes van die kontrolegroep en dié van die pasiënte. Hierdie verskil word in Fig 4.7 aangetoon. Die doelwit van die toetsing van die pasiënt- en kontrolegroepe was die uiteindelijke keuse van 'n afsnitpunt tussen normale persone en dié met 'n moontlike aangebore metaboliese siekte-toestand. As die waarde te laag gekies word, bly die getal persone wat onnodig aan al die toetse van die siftingsprogram onderwerp moet word, te groot en sensitiwiteit gaan verlore. In hierdie geval sou die afsnitpunt by 22.6 mmol CO_2 /mmol kreatinien gewees het en al die pasiënte sou ingesluit wees in die groep wat verdere toetsing sal ondergaan. 'n DOC/kreatinienwaarde wat weer te hoog is, sal die persentasie vals-negatiewe diagnoses onaanvaarbaar verhoog en die spesifisiteit gaan verlore. 'n Afsnitpunt van 90.4 mmol CO_2 /mmol kreatinien is gekies waarby slegs 6 pasiënte (7%) vals negatief en 15% klinies normale persone as vals positief uitgewys word.

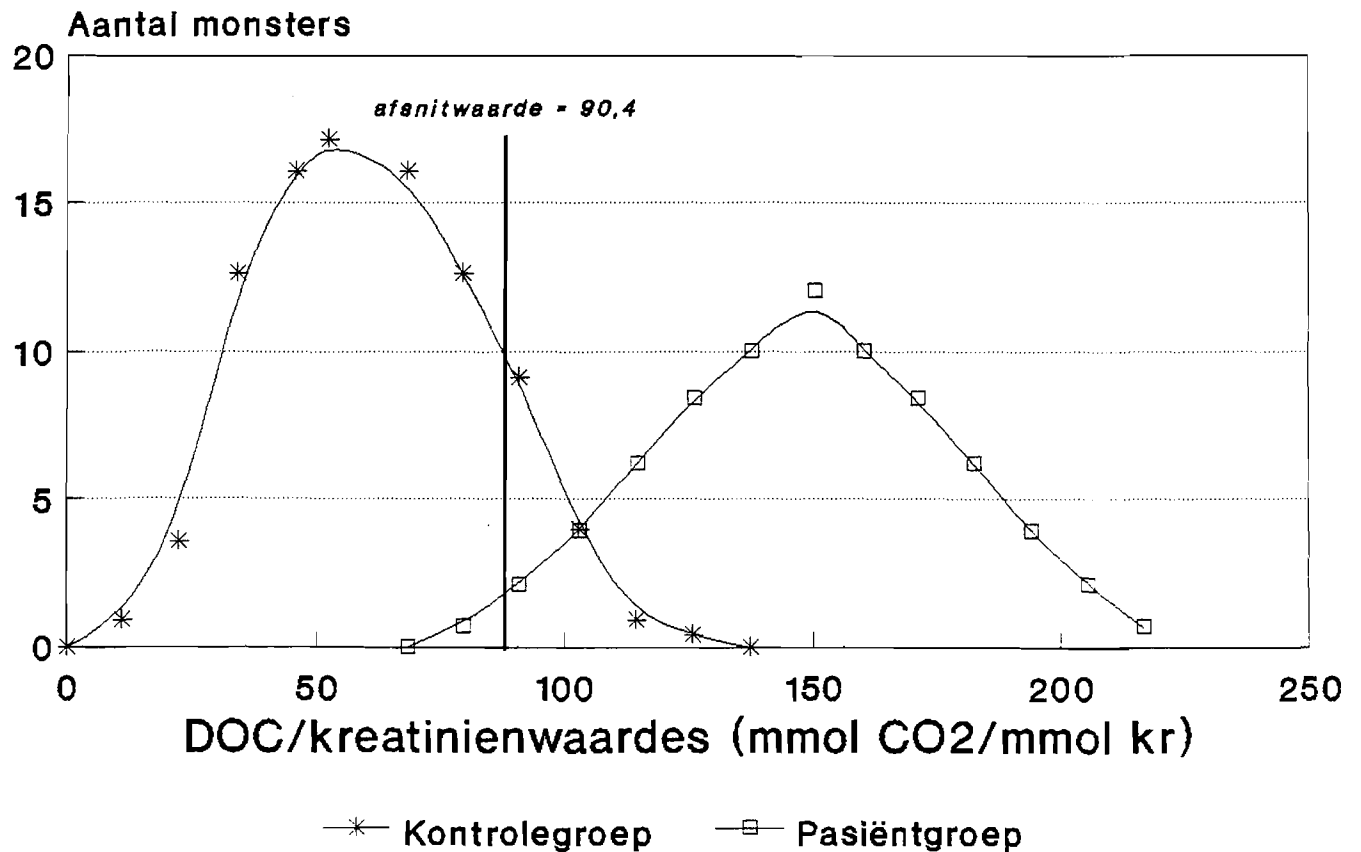


Fig 4.7 **Verspreidingskrommes van die kontrolegroep en pasiëntgroepe.**
 Die afsnitpunt by 90.4 mmol CO₂/mmol kreatinien word aangedui (A), asook die persentasie vals negatiewe toetsende pasiënte (B) en vals positiewe toetsende lede van die kontrolegroep (C). (D) dui die punt aan waar alle pasiënte opgespoor sou gewees het indien dit die afsnitpunt was en (E) waar alle kontroles ingesluit sou word indien dit die afsnitpunt was.

Oorvleueling van die twee groepe - normaal en abnormaal - vind wel plaas en moontlike redes in hierdie spesifieke geval kan die volgende wees :- met die uitsondering van twee pasiënte was al die pasiënte wat 'n laer waarde as die afsnitwaarde getoon het, tydens die verkryging van die urine onder mediese en farmakologiese behandeling. Daarom was dit verklaarbaar dat die relatiewe uitskeiding van die metaboliëte in die urine normaal voorgekom het. Een van die pasiënte waarvan die lae DOC/kreatinienwaarde nie aan behandeling toegeskryf kan word nie, is 'n onbehandelde 24-jarige PKU pasiënt. Die verskynsel dat die bepaling van die DOC/kreatinienwaardes 'n ouderdomsafhanklikheid toon, kan hiër die beslissende faktor wees. 'n Laer afsnitwaarde moet dus bepaal word en gebruik word vir persone wat ouer as vyf jaar is. Hierdie moontlikheid sal in die volgende hoofstuk behandel word. Met 'n laer afsnitpunt vir ouer persone, sal hierdie pasiënt dalk tog in die pasiëntgroep val.

Die tweede uitsondering was die pasiënt met 'n xantienoksidase defek. Die monster is uit Nederland afkomstig en die ouderdom van die pasiënt is onbekend, maar dit is moontlik dat hierdie een van die siektes is wat nie met die AquaDoc-tegniek opgespoor kan word nie. Hierdie aspek sal verder in die volgende hoofstuk bespreek word. Tydens verdere toetsing van die apparaat mag meer sulke siektes opgespoor word.

4.4

TOETSING VAN DIE HERHAALBAARHEID VAN DIE PROSEDURE

Een van die probleemstellings van hierdie hoofstuk behels die toetsing van die herhaalbaarheid van die AquaDoc ten opsigte van herhaalde urienmonsters van dieselfde persone.

Tabelle 4.3 tot 4.8 bevat die resultate van toetse uitgevoer op 'n aantal kontroles en pasiënte. (DOC-waarde sal voortaan in alle gevalle verwys na die DOC/kreatinienwaarde). Fig 4.8 toon die metabolietkonsentrasies van 'n propioonsuururie-pasiënt aan. Tydens die neem van die eerste vier monsters was sy nie onder enige behandeling nie, maar by al die ander wel. Hierdie pasiënt is die 6de Junie 1985 gebore. Aangesien 'n vorige kind in hierdie gesin twee weke na geboorte gesterf het en met propioonsuururie gediagnoseer is, is voorgeboortelike analyses tydens die moeder se volgende swangerskap uitgevoer en is die baba ook as 'n lyer aangewys. Sy ontvang tans detoksifiseringsbehandeling, dit wil sê die liggaam detoksifiseer die abnormale metaboliete wat gevorm word as gevolg van die siekte (sien Afdeling 2.4.1) en daar word dus nie noodwendig minder metaboliete in die urine uitgeskei nie. Behandeling vir die pasiënt behels : natriumbensoaat om abnormale verhoging in ammoniakkonsentrasies te verhoed, natriumbikarbonaat om metaboliese asidose te beheer, alanien om oksaloasetaatkonsentrasies te verhoog vir gebruik in die Krebsiklus, en karnitien. Die pasiënt vorder verder goed - sy woon 'n normale skool by, alhoewel haar IK slegs 80 is. Haar lae intelligensie blyk om 'n genetiese oorsprong te hê, eerder as gevolg van haar siekte-toestand. Vanuit die figuur kan gesien word dat die metabolietinhoud in die urine neig om relatief hoër te word hoe ouer die pasiënt word. Die rede hiervoor is dat meer voedsel ingeneem word omdat sy nog groei en aangesien meer metaboliete beskikbaar is, word meer uitgeskei. Verder is al die DOC-waardes van die monsters wat getoets is, hoër as die afsnitpunt. 'n Gemiddelde waarde van $355.9 \pm 240.6 \text{ mmol CO}_2/\text{mmol kreatinien}$ is bereken.

TABEL 4.3 PASIËNT WB (PROPIOONSUURURIE): MONSTERS GEBRUIK VIR DIE TOETSING VAN DIE HERHAALBAARHEID VAN DIE AQUADOC-PROSEDURE

OUERDOM (DAE)	KREATINIEN (mmol/l)	DOC-WAARDE (mmol CO ₂ /mmol kreat.)	OUERDOM (DAE)	KREATINIEN (mmol/l)	DOC-WAARDE (mmol CO ₂ /mmol kreat.)
1	1,94	178,54	307	0,97	169,50
3	1,94	146,90	310	2,30	303,97
4	0,62	223,74	312	0,80	320
4	0,18	77,99	319	0,53	472,34
8	5,04	87,01	322	0,62	476,86
9	0,97	204,53	323	0,71	499,46
10	4,77	155,94	370	5,92	395,50
11	1,77	158,20	612	0,97	325,44
12	0,53	212,11	793	0,88	463,30
17	2,92	279,11	793	0,44	888,18
47	1,24	223,74	845	0,62	194,36
53	4,51	220,35	866	1,24	187,58
128	0,80	328,83	907	1,24	337,87
165	0,18	336,74	980	0,27	367,25
166	0,27	238,43	980	0,71	381,94
203	4,59	331,09	980	0,62	247,47
210	6,01	411,32	1111	0,97	302,85
212	1,24	251,99	1131	0,44	1144,69
250	0,18	361,60	1320	5,83	171,76
251	0,71	177,41	1321	3,36	155,94
258	0,88	472,34	1378	1,77	296,06
274	0,35	511,89	1458	0,27	861,06
280	0,62	714,16	2197	1,59	1105,14

355.9 ± 240.6 (n=46)

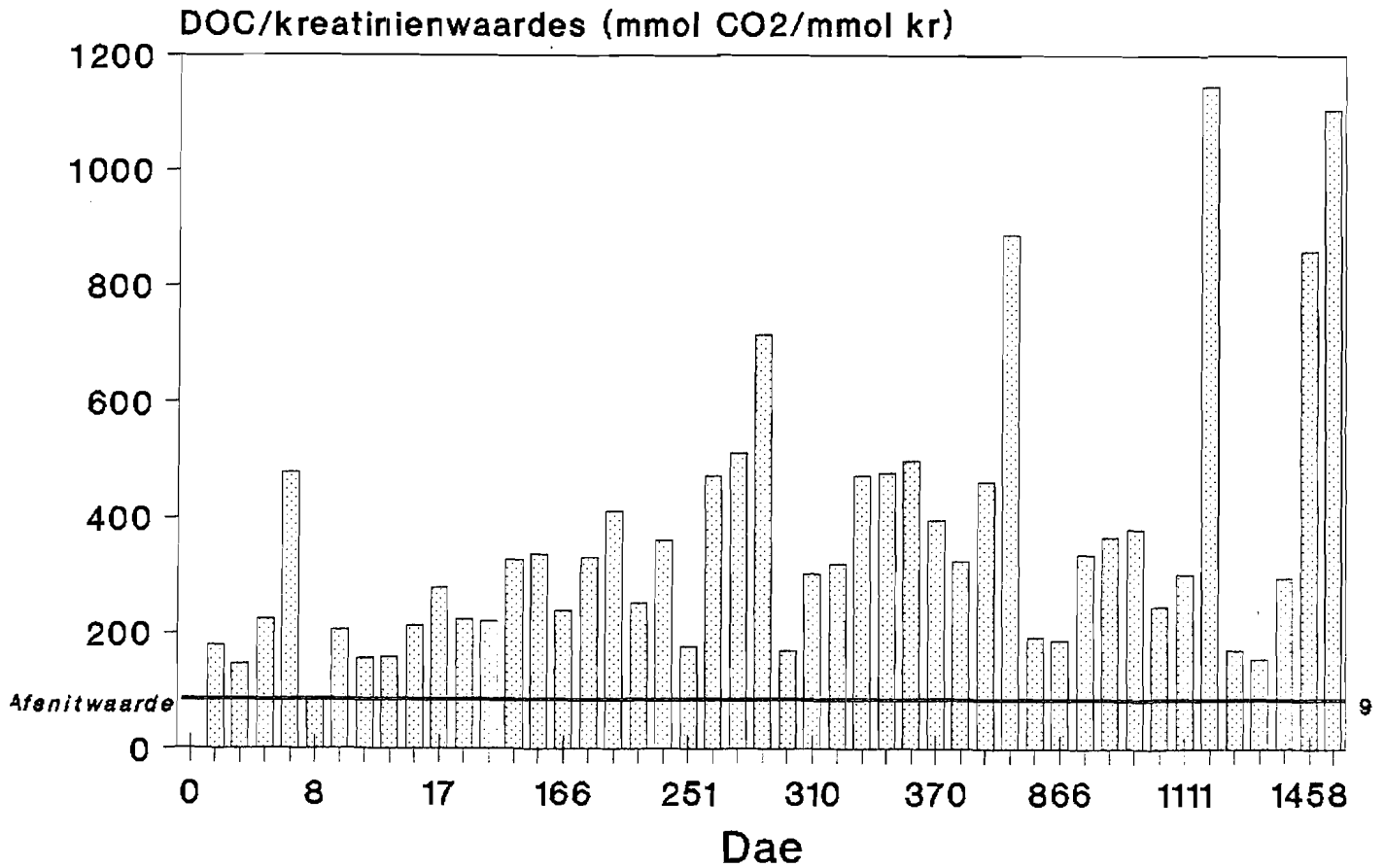


Fig 4.8 Toetsing van die herhaalbaarheid van die AquaDoc deur gebruik te maak van monsters van 'n propioonsuururiepasiënt.

Ses-en-veertig monsters is getoets met 'n gemiddelde DOC-waarde van 355.9 ± 240.6 mmol CO₂/mmol kreatinien. Monsters is oor 'n tydperk van meer as ses jaar geneem en getoets en alhoewel haar metabolietkonsentrasie nie laag is nie, woon sy 'n normale skool by en toon goeie vordering.

TABEL 4.4 PASIËNT DVS (HARTNUP SINDROOM) : MONSTERS GEBRUIK VIR DIE TOETSING VAN DIE HERHAALBAARHEID VAN DIE AQUADOC-PROSEDURE

OUDERDOM (DAE)	KREATINIEN (mmol/l)	DOC-WAARDE (mmol CO ₂ /mmol kreat.)
515	1,50	167,24
547	1,41	184,19
673	1,33	213,57
796	0,97	181,93
972	0,80	181,93
1250	0,62	176,28
1458	0,53	179,67

183.5 ± 14.4 (n=7)

'n Konstante beeld van die metaboliese toestand van hierdie pasiënt is verkry. Al die waardes is hoër as die afsnitwaarde en is verder ook relatief konstant. 'n Gemiddelde DOC-waarde van 183.5 ± 14.4 mmol CO₂/mmol kreatinien is bereken.

TABEL 4.5 PASIËNT EVR (3-METIELGLUTAKONIENSUURURIE TIEPE I) : MONSTERS GEBRUIK VIR DIE TOETSING VAN DIE HERHAALBAARHEID VAN DIE AQUADOC-PROSEDURE

OUDERDOM (DAE)	KREATINIEN (mmol/l)	DOC-WAARDE (mmol CO ₂ /mmol kreat.)
87	8,92	129,95
282	2,74	138,99
796	0,97	129,95
972	0,80	105,09
1250	0,62	327,70
1458	0,53	193,23
2917	0,27	228,26
2917	0,71	275,72

198.6 ± 83.4 (n=8)

Alhoewel 'n groter wisseling van die DOC-waardes by hierdie pasiënt verkry is, sou die monsters wat getoets is, almal deur middel van die AquaDoc-prosedure opgespoor word, aangesien al die DOC-waardes bo die afsnitwaarde gelê het. Die gemiddelde DOC-waarde is 198.6 ± 83.4.

TABEL 4.6 PASIËNT (GLUTAARSUURURIE TIPE I) : MONSTERS GEBRUIK VIR DIE TOETSING VAN DIE HERHAALBAARHEID VAN DIE AQUADOC-PROSEDURE

OUDERDOM (DAE)	KREATINIEN (mmol/l)	DOC-WAARDE (mmol CO ₂ /mmol kreat.)
60	2,21	11,30
133	5,83	463,30
186	4,15	200,01
224	3,45	148,03
313	2,47	128,82
438	1,77	196,62
461	1,68	39,55
673	1,15	131,08
972	0,80	108,48

158.6 ± 130.5 (n=9)

Waar al die monsters van die vorige twee pasiënte DOC-waardes hoër as die afsnitpunt gehad het, verskil hierdie pasiënt daarin dat twee van die nege monsters, DOC-waardes ver onder die afsnitpunt het. Alhoewel die gemiddeld van 158.6 ± 130.5 mmol CO₂/mmol kreatinien ver bo die afsnitpunt is, sou die pasiënt alleen op grond van die betrokke twee monsters nie geïdentifiseer word nie. 'n Moontlike verklaring vir hierdie lae DOC-waardes, kan wees dat die behandeling en die voedselinname die kind se metabolisme sodanig gerguleer het, dat 'n lae metaboliëtuitskeiding in die urine plaasgevind het. Verder is dit opmerklik dat 'n groot wisseling in die DOC-waardes van hierdie pasiënt voorkom. Dit opsigself dui daarop dat die metaboliëtuitskeiding van die pasiënt glad nie konstant is nie.

TABEL 4.7 PASIËNT L (SITRULLIENEMIE) : MONSTERS GEBRUIK VIR DIE TOETSING VAN DIE HERHAALBAARHEID VAN DIE AQUADOC-PROSEDURE

OUDERDOM (DAE)	KREATINIEN (mmol/l)	DOC-WAARDE (mmol CO ₂ /mmol kreat.)
62	12,46	229,39
75	0,34	206,79
104	7,42	204,53
146	5,30	125,43
148	5,21	293,80

212.0 ± 60.4 (n=5)

'n Hoë gemiddeld (212.0 ± 60.4 mmol CO₂/mmol kreatinien) en al die monsters bo die afsnitpunt, wys dat sitrullienemie waarskynlik onder alle omstandighede opgespoor sou word. Daar is wel groter wisseling van die waardes as by die pasiënt met bv. Hartnup Sindroom, maar die DOC-waardes is hoog en hierdie defek blyk opspoorbaar te wees.

TABEL 4.8 KONTROLEPERSONE : MONSTERS GEBRUIK VIR DIE TOETSING VAN DIE HERHAALBAARHEID VAN DIE AQUADOC-PROSEDURE

OUDERDOM (MAANDE)	KREATINIEN (mmol/l)	DOC-WAARDE (mmol CO ₂ /mmol kreat.)	OUDERDOM (MAANDE)	KREATINIEN (mmol/l)	DOC-WAARDE (mmol CO ₂ /mmol kreat.)
264	3,44	47,46	44	14,50	37,29
264	6,27	81,36	44	12,46	71,19
264	17,67	98,31	44	7,69	82,49
264	19,43	58,76	44	16,79	73,45
264	13,78	63,28	44	10,25	76,84
264	17,40	32,77	44	11,34	33,54
264	9,01	13,56	44	9,51	66,73

58.0 ± 31.0 (n=7)

63.1 ± 19.5 (n=7)

Beide die monsters toon groot variasie van hul DOC-waardes alhoewel die jonger kontrolepersoon se waardes effens meer konstant was. 'n Rede vir die groot wisseling van die waardes is dat die monsters op verskillende tye gedurende die dag geneem is en soos reeds genoem kan dieet die metabolietuitskeiding heelwat beïnvloed.

Een van die ouer persoon se monsters het 'n DOC-waarde hoër as die afsnitpunt gelewer. Hierdie persoon het medikasie gebruik en in Afdeling 4.2 is die vraag na die invloed van medikasie nie werklik beantwoord nie. Die gebruik van medikasie mag moontlik dus hierdie persoon se DOC-waarde beïnvloed het.

Bogenoemde resultate dui almal aan dat die prosedure wat gevolg word om opgeloste urinêre koolstof te gebruik by die opsporing van aangebore metaboliese siekte-toestande, effektief aangewend word. Buiten twee monsters van 'n pasiënt met glutaarsuururie wat DOC-waardes onder die afsnitpunt en een van die kontrolemonsters wat 'n hoë DOC-waarde gehad het, is die verwagte metaboliese beeld by al die monsters wat getoets is, getoon. Gediagnoseerde pasiënte het DOC-waardes getoon wat merkbaar hoër was as dié van die kontrole persone s'n en was ook in byna al die gevalle hoër as die afsnitwaarde. Suksesvolle herhaalde toetsing van monsters van dieselfde persoon is van soveel belang omdat faktore soos die voedingstoestand van 'n pasiënt moontlik die uitskeiding van metaboliete in die urine kan beïnvloed. Alhoewel hierdie spesifieke aspek vlugtig by van die kontrole persone ondersoek is, is daar egter nie sekerheid daaroor verkry nie. Die aard van die manier waarop die monsters (vir kontrole- en pasiëntgroepe) verkry is, het buitendien beheer oor die tyd van monsterneming verhinder.

Enige apparaat wat gebruik word vir die kwantifisering van 'n sekere parameter moet betroubare resultate lewer. Hierdie baie belangrike aspek van die ondersoek na die bruikbaarheid van die AquaDoc is nagegaan deur twee monsters te neem en herhaaldelik te toets.

Dieselfde prosedure is gevolg wat vir alle vorige bepalinge gebruik is en 'n kontrolemonster en een van 'n pasiënt met Glutaarsuururie Tipe I is gebruik. Die resultate word in Tabel 4.9 gegee.

TABEL 4.9 KONTROLE EN PASIËNT : HERHAALDE TOETSING VAN DIESELFDE MONSTER

DOC/KREATINIENWAARDES (mmol CO ₂ /mmol kreatinien)	
KONTROLEPERSOON	PASIËNT *
20,80	140,12
23,54	145,28
21,91	145,71
22,27	148,16
22,63	150,54
22,08	142,55

22.2 ± 0.9 (n=6)

145.4 ± 3.7 (n=6)

* Die monster wat vir hierdie deel van die ondersoek gebruik is, was van 'n pasiënt met Glutaarsuururie Tipe I

Die doel met herhaalde toetsing van dieselfde monster is om die herhaalbaarheid van die apparaat na te gaan. Alhoewel die wisseling van die DOC-waardes by beide die kontrole- en pasiëntmonsters goed was, kom dit vanuit die standaardafwykings voor asof die kontrolmonster s'n meer presies herhaal. Die koëffisiënt van variasie van die kontrolemonster is egter 4.1% teenoor 2.5% vir die pasiënt. Prestasie van die AquaDoc ten opsigte van hoë DOC-waardes is dus in der waarheid beter as vir lae DOC-waardes.

Hierdie bevinding ruim onsekerheid uit die weg oor die vermoë van die apparaat om hoë konsentrasies opgeloste metaboliëte betroubaar te kwantifiseer.

'n Moontlike rede vir die groter standaardafwyking van die pasiëntmonster mag tog wees dat oksidasie van die metaboliëte nie heeltemal volledig plaasvind nie en 'n gedeelte van die metaboliëte word dus nie omgeskakel na CO₂ nie. Goeie herhaalbaarheid van resultate word nogtans met die AquaDoc verkry.

Bogenoemde resultate toon dus dat die AquaDoc aangewend kan word vir die betroubare kwantifisering van opgeloste urinêre koolstofbevattende metaboliëte. Dit is seker onvermydelik dat sekere pasiënte nie met behulp van die prosedure opgespoor sal word nie en dat sommige monsters van persone wat geen aangebore metaboliese siekte-toestand het nie, 'n hoë DOC-waarde sal hê. Die volgende deel van die ondersoek, die parallelle toetsing van die AquaDoc en die laboratorium se siftingsprogram, sal die omvang van hierdie vals negatiewe en vals positiewe monsters uitwys.

4.5 **EVALUERING VAN MONSTERS IN PARALLEL MET DIE STANDAARD SIFTINGSPROGRAM**

Die aard van die metaboliese siftingsprogram wat tans in die Departement Biochemie gebruik word, is reeds in 'n vorige afdeling toegelig (Afdeling 2.4.3). Alhoewel sommige van die monsters afkomstig is van reeds gediagnoseerde pasiënte, is die meeste ongediagnoseerde monsters wat deur pediater verwys is. Daar is dus twee basiese doelwitte waarom metaboliese siftingstoetse gedoen word : diagnosering van 'n siekte, of om die beheer van 'n gediagnoseerde pasiënt na te gaan. Heelwat monsters word getoets sonder dat 'n finale diagnose gemaak kan word (Afdeling 2.5).

By veral die organiese suururieë is daar nie 'n eerstefase toets wat vir primêre sifting gebruik kan word nie en onnodige tyd en geld word gemors deur monsters te analiseer waar geen aangebore metaboliese siekte-toestand ter sprake is nie.

In Afdeling 4.3 is 'n afsnitwaarde bepaal waarmee 'n onderskeid gemaak kan word tussen gesonde persone en dié wat moontlik aan die een of ander metaboliese steuring ly. In die laaste fase van hierdie studie is die toepassing van die AquaDoc-metode vir die identifisering van pasiënte met metaboliese siektes in parallel met die huidige siftingsprogram getoets.

283 Monsters wat oor 'n periode van vier maande verwys is, is aan die parallele prosedures onderwerp en die resultate word in Tabel 4.10 weergegee. Daar moet gelet word dat selfs die geringste abnormaliteit in ag geneem is by die bepaling van 'n moontlike diagnose via die standaardprogram. 'n Klassifikasiestelsel word gebruik om die verwysde pasiënte vir vinnige identifisering te groepeer :

- A : *Normaal, geen abnormaliteite is opgespoor nie*
- B : *Definitiewe diagnose is gemaak*
- C : *Moontlike diagnose*
- D : *Medikasie*
- E : *Onbekende metaboliëte, abnormale profiele*
- F : *Opvolg van behandeling van gediagnoseerde pasiënte*

Die DOC-waardes van die verwysde pasiënte word ook in Fig 4.9 aangetoon.

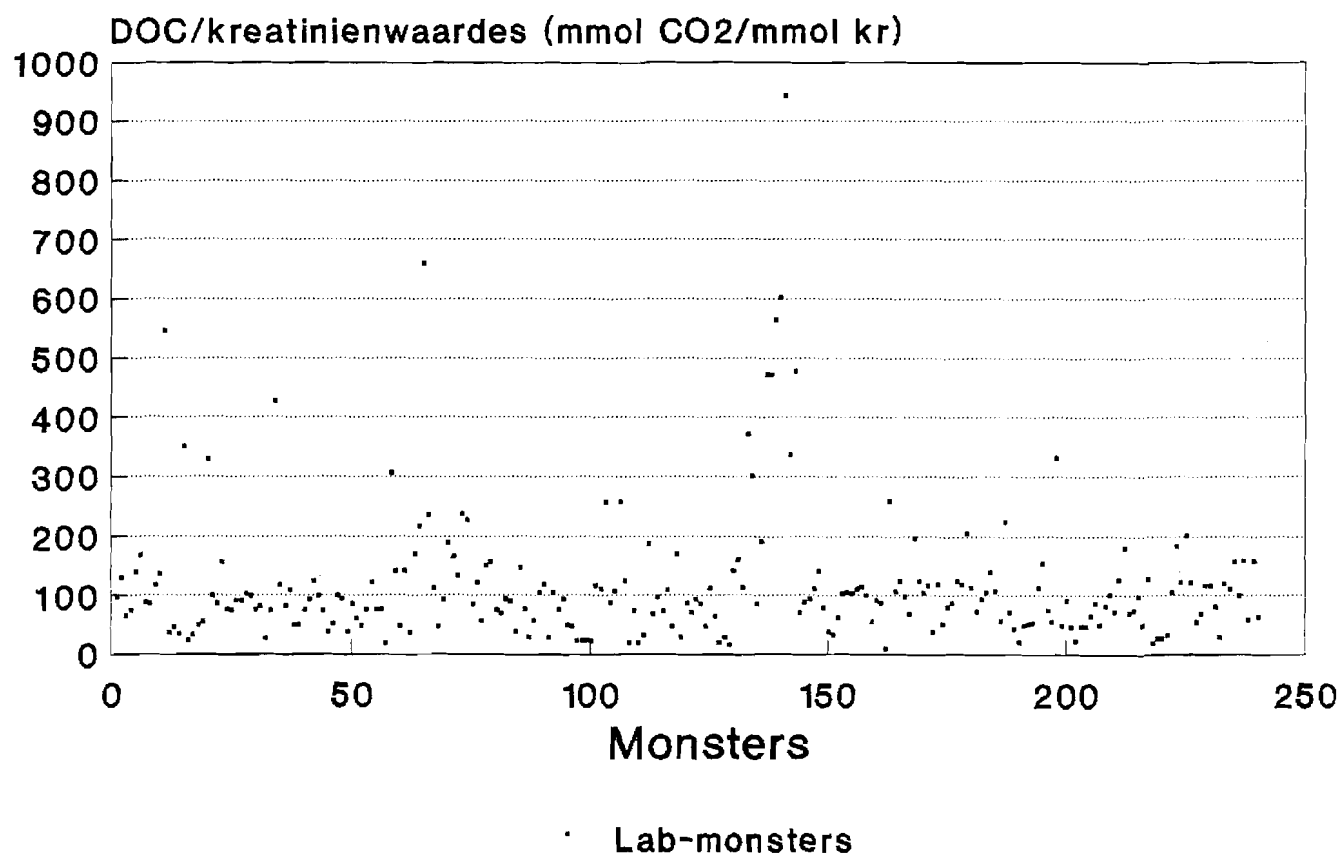


Fig 4.9 DOC-waardes van die monsters wat verwys is vir metaboliese sifting vanaf 1 Januarie 1991 tot 30 April 1991.
'n Totaal van 233 monsters is getoets met 'n gemiddelde DOC-waarde van 118.4 ± 56.9 mmol CO₂/mmol kreatinien.

52.3% Van die monsters wat getoets is, het DOC-waardes bo die afsnitwaarde van 90.4 mmol CO₂/mmol kreatinien gehad en die verspreiding van monsters vanaf relatiewe lae tot baie hoë DOC-waardes is goed. Oorvleueling met beide die kontrolegroep en die groep gediagnoseerde pasiënte vind plaas, wat die heterogeniteit van die groep weerspieël. As daar bloot op grond van die DOC-waardes afleidings gemaak word, kom dit voor asof 47.7% van die monsters onnodig verwys is vir metaboliese sifting. Aangesien die twee prosedures nog nie met mekaar vergelyk is nie, kan bogenoemde afleiding nie gemaak word nie.

TABEL 4.10 EVALUERING VAN DIE AQUADOC-METODE TEENOR DIE ROETINE-SIFTINGSPROGRAM VIR DIE IDENTIFISERING VAN PASIËNTE MET AANGEBORE METABOLIESE SIEKTE-TOESTANDE

MONSTER-NOMMER	DOC-WAARDE (mmol/mmol)	AQAUDOC-DIAGNOSE	RESULTAAT VAN SIFTINGSPROGRAM
1/7/1	96.05	Abnormaal	A
2/7/1	128.82	Abnormaal	A
3/7/1	65.54	Normaal	A
4/7/1	74.58	Normaal	A
5/7/1	138.99	Abnormaal	A
6/7/1	167.24	Abnormaal	A
7/7/1	88.14	Normaal	A
9/7/1	85.88	Normaal	E
1/14/1	115.26	Abnormaal	D
3/14/1	134.47	Abnormaal	A
4/14/1	545.79	Abnormaal	A
5/14/1	36.16	Normaal	A
6/14/1	46.33	Normaal	A
7/14/1	35.03	Normaal	A
8/14/1	349.17	Abnormaal	B
9/14/1	22.60	Normaal	A
10/14/1	32.77	Normaal	A
11/14/1	49.72	Normaal	E
12/14/1	54.24	Normaal	A
13/14/1	328.83	Abnormaal	D
14/14/1	98.31	Abnormaal	A
15/14/1	85.88	Normaal	A
16/14/1	155.94	Abnormaal	A
17/14/1	76.84	Normaal	A
20/14/1	73.45	Normaal	A
21/14/1	91.53	Abnormaal	A
22/14/1	91.53	Abnormaal	BF

MONSTER- NOMMER	DOC-WAARDE (mmol/mmol)	AQUADOC- DIAGNOSE	RESULTATE VAN SIFTINGSPROGRAM
23/14/1	101.70	Abnormaal	A
24/14/1	98.31	Abnormaal	E
25/14/1	76.84	Normaal	A
34/14/1	82.49	Normaal	A
35/14/1	27.12	Normaal	A
36/14/1	74.58	Normaal	A
37/14/1	427.14	Abnormaal	B
38/14/1	115.26	Abnormaal	D
39/14/1	82.49	Normaal	A
40/14/1	107.35	Abnormaal	A
41/14/1	49.72	Normaal	A
43/14/1	48.59	Normaal	A
44/14/1	76.84	Normaal	DE
45/14/1	93.79	Abnormaal	A
46/14/1	123.17	Abnormaal	A
47/14/1	99.44	Abnormaal	A
48/14/1	74.58	Normaal	A
51/14/1	37.29	Normaal	A
52/14/1	51.98	Normaal	A
53/14/1	99.44	Abnormaal	A
54/14/1	93.79	Abnormaal	A
57/14/1	37.29	Normaal	A
58/14/1	84.75	Normaal	A
59/14/1	61.02	Normaal	A
60/14/1	47.46	Normaal	A
61/14/1	75.71	Normaal	A
62/14/1	122.04	Abnormaal	D
64/14/1	75.71	Normaal	A
65/14/1	75.71	Normaal	E
1/21/1	19.21	Normaal	A
2/21/1	306.23	Abnormaal	A
1/23/1	141.25	Abnormaal	B
2/23/1	47.46	Normaal	C
3/23/1	141.25	Abnormaal	E
4/23/1	36.16	Normaal	A
5/23/1	169.50	Abnormaal	A
6/23/1	216.96	Abnormaal	D
7/23/1	658.79	Abnormaal	C
8/23/1	235.04	Abnormaal	A
9/23/1	113.00	Abnormaal	A
10/23/1	47.46	Normaal	A
11/23/1	93.79	Abnormaal	E
12/23/1	188.71	Abnormaal	CE
13/23/1	164.98	Abnormaal	A
14/23/1	132.21	Abnormaal	A
15/23/1	235.04	Abnormaal	E
19/23/1	226.00	Abnormaal	E
22/23/1	84.75	Normaal	A
23/23/1	122.04	Abnormaal	A

MONSTER-NOMMER	DOC-WAARDE (mmol/mmol)	AQUADOC-DIAGNOSE	RESULTATE VAN SIFTINGSPROGRAM
24/23/1	56.50	Normaal	E
25/23/1	150.29	Abnormaal	D
26/23/1	155.94	Abnormaal	A
33/23/1	75.71	Normaal	A
34/23/1	71.19	Normaal	A
1/31/1	93.79	Abnormaal	A
2/31/1	89.27	Normaal	A
3/31/1	37.29	Normaal	A
4/31/1	145.77	Abnormaal	C
6/31/1	75.71	Normaal	A
7/31/1	28.25	Normaal	A
8/31/1	56.50	Normaal	A
1/4/2	103.96	Abnormaal	D
1/11/2	117.52	Abnormaal	BE
2/11/2	28.25	Normaal	A
3/11/2	103.96	Abnormaal	A
4/11/2	75.71	Normaal	A
5/11/2	93.79	Abnormaal	A
7/11/2	49.72	Normaal	A
8/11/2	47.46	Normaal	A
9/11/2	22.60	Normaal	A
10/11/2	22.60	Normaal	A
11/11/2	22.60	Normaal	A
12/11/2	23.73	Normaal	A
13/11/2	19.21	Normaal	BF
14/11/2	23.73	Normaal	A
16/11/2	116.39	Abnormaal	A
17/11/2	109.61	Abnormaal	E
18/11/2	256.51	Abnormaal	A
19/11/2	88.14	Normaal	A
20/11/2	106.22	Abnormaal	A
21/11/2	256.51	Abnormaal	A
22/11/2	123.17	Abnormaal	E
23/11/2	19.21	Normaal	A
27/11/2	73.45	Normaal	A
29/11/2	19.21	Normaal	A
30/11/2	31.64	Normaal	A
31/11/2	185.32	Abnormaal	D
32/11/2	68.93	Normaal	E
33/11/2	96.05	Abnormaal	A
34/11/2	74.58	Normaal	A
35/11/2	108.48	Abnormaal	BF
37/11/2	47.46	Normaal	A
1/13/2	169.50	Abnormaal	D
2/13/2	28.25	Normaal	A
1/15/2	84.75	Normaal	A
2/15/2	71.19	Normaal	A
3/15/2	93.79	Abnormaal	A
4/15/2	84.75	Normaal	A
5/15/2	47.46	Normaal	A

MONSTER- NOMMER	DOC-WAARDE (mmol/mmol)	AQUADOC- DIAGNOSE	RESULTATE VAN SIFTINGSPROGRAM
6/15/2	113.00	Abnormaal	A
7/15/2	64.41	Normaal	A
10/15/2	19.21	Normaal	A
11/15/2	28.25	Normaal	A
12/15/2	14.69	Normaal	A
4/19/2	141.25	Abnormaal	A
5/19/2	160.46	Abnormaal	A
6/19/2	113.00	Abnormaal	A
1/20/2	369.51	Abnormaal	D
2/20/2	299.45	Abnormaal	DE
3/20/2	84.75	Normaal	DE
4/20/2	189.84	Abnormaal	DE
5/20/2	471.21	Abnormaal	DE
6/20/2	471.21	Abnormaal	DE
7/20/2	565.00	Abnormaal	DE
8/20/2	602.29	Abnormaal	DE
9/20/2	941.29	Abnormaal	DE
10/20/2	335.61	Abnormaal	DE
1/22/2	476.86	Abnormaal	B
3/22/2	71.49	Normaal	A
4/22/2	88.14	Normaal	A
5/22/2	93.79	Abnormaal	A
1/25/2	109.61	Abnormaal	E
2/25/2	141.25	Normaal	A
3/25/2	80.23	Normaal	E
4/25/2	37.29	Normaal	A
1/6/3	32.77	Abnormaal	A
2/6/3	62.15	Abnormaal	A
3/6/3	102.83	Abnormaal	A
4/6/3	103.96	Abnormaal	A
5/6/3	101.70	Abnormaal	A
6/6/3	109.61	Abnormaal	A
7/6/3	114.13	Normaal	A
8/6/3	98.31	Normaal	A
9/6/3	54.24	Normaal	A
10/6/3	90.40	Normaal	A
11/6/3	88.14	Abnormaal	A
13/6/3	9.04	Abnormaal	A
14/6/3	257.64	Abnormaal	A
15/6/3	106.22	Abnormaal	A
16/6/3	124.30	Normaal	A
17/6/3	97.18	Abnormaal	A
18/6/3	67.80	Normaal	A
19/6/3	195.49	Abnormaal	A
20/6/3	124.30	Abnormaal	B
21/6/3	105.09	Abnormaal	A
22/6/3	115.26	Abnormaal	A
23/6/3	37.29	Normaal	A
24/6/3	117.52	Abnormaal	A
25/6/3	50.85	Normaal	A

MONSTER- NOMMER	DOC-WAARDE (mmol/mmol)	AQUADOC- DIAGNOSE	RESULTATE VAN SIFTINGSPROGRAM
26/6/3	80.23	Normaal	B
27/6/3	88.14	Normaal	BF
28/6/3	123.17	Abnormaal	BF
29/6/3	117.52	Abnormaal	E
30/6/3	204.53	Abnormaal	D
31/6/3	113.00	Abnormaal	E
32/6/3	72.32	Normaal	DE
38/6/3	93.79	Abnormaal	A
39/6/3	103.96	Abnormaal	A
40/6/3	137.86	Abnormaal	A
41/6/3	106.22	Abnormaal	A
44/6/3	57.63	Normaal	B
45/6/3	223.74	Abnormaal	BC
1/7/3	72.32	Normaal	A
2/7/3	44.07	Normaal	A
1/8/3	21.47	Normaal	A
2/8/3	49.72	Normaal	A
3/8/3	51.98	Normaal	A
4/8/3	53.11	Normaal	A
1/11/3	111.87	Abnormaal	CE
2/11/3	153.68	Abnormaal	E
1/14/3	73.45	Normaal	BF
2/14/3	55.37	Normaal	A
4/14/3	331.09	Abnormaal	A
5/14/3	49.72	Normaal	A
6/14/3	90.40	Normaal	A
7/14/3	47.46	Normaal	A
8/14/3	23.73	Normaal	A
9/14/3	47.46	Normaal	A
10/14/3	47.46	Normaal	A
11/14/3	65.54	Normaal	A
14/14/3	85.88	Normaal	A
1/20/3	48.59	Normaal	A
2/20/3	82.49	Normaal	E
4/20/3	100.57	Abnormaal	A
5/20/3	72.32	Normaal	C
6/20/3	125.43	Abnormaal	E
7/20/3	180.80	Abnormaal	A
1/22/3	70.06	Normaal	A
1/25/3	93.73	Abnormaal	BF
2/25/3	93.05	Abnormaal	BF
3/25/3	48.59	Normaal	BF
4/25/3	127.69	Abnormaal	BF
1/2/4	19.21	Normaal	A
2/2/4	27.12	Normaal	A
3/2/4	27.12	Normaal	D
4/2/4	32.77	Normaal	A
5/2/4	103.96	Abnormaal	A
6/2/4	181.93	Abnormaal	E
7/2/4	120.91	Abnormaal	A
8/2/4	201.14	Abnormaal	A
9/2/4	122.04	Abnormaal	A
10/2/4	55.37	Normaal	A

MONSTER- NOMMER	DOC-WAARDE (mmol/mmol)	AQUADOC- DIAGNOSE	RESULTATE VAN SIFTINGSPROGRAM
11/2/4	68.93	Normaal	A
12/2/4	116.39	Abnormaal	BF
13/2/4	116.39	Abnormaal	A
14/2/4	79.10	Normaal	A
15/2/4	28.25	Normaal	A
17/2/4	119.78	Abnormaal	BF
18/2/4	109.61	Abnormaal	A
20/2/4	155.94	Abnormaal	B
1/4/4	99.44	Abnormaal	BF
1/10/4	158.20	Abnormaal	A
2/10/4	59.89	Normaal	A
3/10/4	157.07	Abnormaal	BF
4/10/4	62.15	Normaal	D
5/10/4	184.19	Abnormaal	A
6/10/4	134.47	Abnormaal	A
7/10/4	108.48	Abnormaal	E
8/10/4	109.61	Abnormaal	B
9/10/4	125.43	Abnormaal	A
10/10/4	116.39	Abnormaal	C
11/10/4	59.89	Normaal	A
12/10/4	211.31	Abnormaal	D
13/10/4	149.16	Abnormaal	A
14/10/4	88.14	Normaal	A
15/10/4	125.43	Abnormaal	A
16/10/4	126.56	Abnormaal	A
17/10/4	349.17	Abnormaal	A
18/10/4	125.43	Abnormaal	A
19/10/4	122.04	Abnormaal	A
20/10/4	183.06	Abnormaal	C
21/10/4	206.79	Abnormaal	B
22/10/4	169.50	Abnormaal	C
24/10/4	167.24	Abnormaal	A
26/10/4	97.18	Abnormaal	C
27/10/4	99.44	Abnormaal	D
28/10/4	63.28	Normaal	A
29/10/4	149.16	Abnormaal	E
30/10/4	133.34	Abnormaal	C
31/10/4	96.05	Abnormaal	C
1/11/4	98.31	Abnormaal	BF
1/12/4	172.89	Abnormaal	BF
2/15/4	172.89	Abnormaal	BF
1/19/4	19.21	Normaal	A
2/19/4	19.21	Normaal	A
3/19/4	19.21	Normaal	A
4/19/4	244.08	Abnormaal	A
5/19/4	19.21	Normaal	A
6/19/4	19.21	Normaal	A
1/23/7	46.33	Normaal	A
2/23/7	49.72	Normaal	A
3/23/7	65.54	Normaal	A
4/23/7	74.58	Normaal	A
5/23/7	67.80	Normaal	A
6/23/7	183.06	Abnormaal	B
7/23/7	132.21	Abnormaal	A

Die verdeling van die monsters met behulp van die klassifikasiestelsel van die laboratorium se siftingsprogram sien soos volg daaruit : 191 monsters normaal (A), 30 monsters van bevestigde pasiënte (B), 12 monsters van pasiënte met moontlike diagnoses (C), 26 van pasiënte wat medikasie neem (D), onbekende verbindings is by 24 opgespoor (E) en 15 monsters was dié van bevestigde pasiënte waarvan opvolg op behandeling gedoen is.

Heelwat meer monsters sonder abnormale metaboliëte is dus met behulp van die laboratorium se siftingsprogram uitgewys (67.5% teenoor 47.7% vir die AquaDoc-metode). Ongelukkig is dieselfde monsters nie altyd met albei metodes as normaal of abnormaal gediagnoseer nie. Daar is 26.8% van hierdie groep wat met die laboratorium se siftingsprogram as normaal gediagnoseer is, maar wat hoë DOC-waardes gelewer het. Die teenwoordigheid van 'n aangebore metaboliese siekte-toestand kan onder geen omstandighede in sulke gevalle uitgeskakel word nie. Dit is moontlik dat daar vals verhoogde DOC/kreatinienverhoudings voorkom wat nie deur die omvang van die standaardsiftingsprogram opgespoor kan word nie. Verder is 2.1% van die gediagnoseerde pasiënte (B) nie deur die AquaDoc-metode opgespoor nie en 0.4% van pasiënte met 'n moontlike diagnose (C), ook nie. Veral hierdie 2.5% van die monsters wat getoets is, wek groot kommer aangesien die korrekte- en vroeë diagnose van 'n aangebore metaboliese siekte-toestand so krities is. Van hierdie monsters is van pasiënte wat reeds behandeling ontvang en waarvan die metabolietuitskeiding ten tye van monsterneming moontlik sodanig gekontroleer is dat lae DOC-waardes verkry is. Hiperfenieleleniemie, Fanconi sindroom, 'n ketotiese pasiënt en een met isovaleriaansuururie is die siektes waaraan die ander gely het.

Moontlike redes waarom die DOC-waardes nie by hierdie pasiënte verhoog is nie kan wees : verlaagde metabolietuitskeiding as gevolg van lae voedselinname of aard van die defek, of dit mag (in die geval van Fanconi sindroom) een van die siektes wees wat nie met behulp van die metode opspoorbaar is nie. Dit mag ook gebeur dat sommige pasiënte nie so erg soos ander geaffekteer is deur 'n spesifieke siekte nie en die metabolietuitskeiding laer bly as wat verwag sou word. Daar is ook 1.8% van die monsters waar normale DOC-waardes verkry is, maar wat abnormale siftings getoon het, as gevolg van medikasie wat gebruik word (D). Abnormale metaboliete is by 3.5% van die monsters gevind maar geen verhoging van die DOC-waardes is veroorsaak nie. In Afdeling 4.2 is die vraag na die invloed van medikasie genoem. 'n Antwoord op die vraag is nog steeds nie verkry nie. Dit kom voor asof sommige medikamente wel verhoogde DOC-waardes kan veroorsaak, maar beslis nie almal nie. Dit is ook nie onwaarskynlik dat medikasie geen invloed het nie, maar dat dit slegs die voedingstoestand van die persoon is wat verhoogde waardes lewer. Die rede waarom monsters waarin onbekende verbindings tydens gaschromatografie opgespoor is, nie met behulp van die AquaDoc-metode abnormaal-hoë DOC-waardes gelewer het nie, is dat die betrokke metaboliet nie noodwendig in hoë konsentrasies uitgeskei word nie. 'n Hoër as normaal DOC-waarde sal dus nie verkry word nie.

Ten spyte van die gebrek aan ooreenstemming in die bogenoemde monsters, is iets wat nie geïgnoreer moet word nie, die feit dat 'n groot aantal monsters dieselfde resultaat met beide prosedures gelewer het. 40.3% Is met behulp van die laboratorium se siftingsprogram en die AquaDoc-metode as normaal, sonder enige abnormaliteite, uitgewys.

'n Verdere 25.1% het hoë DOC-waardes gelewer en die siftingsprosedure het die een of ander abnormaliteit getoon, hetsy 'n definitiewe diagnose of abnormale verbindings wat gevind is. Daar is dus in totaal 'n 65.4% mate van ooreenstemming in die spesifieke groep wat getoets is. In ag genome die nuutheid van die AquaDoc-metode, is hierdie oorvleueling van die twee prosedures goed en 'n verdere studie sal moontlik verfyning van die AquaDoc-metode en dus ook die ooreenstemming te weeg bring.

4.6

SAMEVATTING

Die gaping in die nul tot vier jaar groep is 'n jammerte, aangesien die monsters wat ontvang word vir metaboliese sifting en waar diagnose spoedig gedoen moet word, hoofsaaklik in hierdie ouderdomsgroep val. Tydens die voortsetting van die studie, sal hierdie probleem aangespreek word. Soos reeds genoem, moet die invloed van medikasie op die DOC/kreatinienwaardes meer deeglik nagegaan word. Daar is duidelik nog leemtes in die ondersoek van die kontrolegroep : ouderdom, medikasie, meer akkurate kreatinientoetsing en grootte van die groep sal, onder andere, nagegaan moet word voordat die studie afgehandel kan word.

Die persentasie monsters wat ingesluit is in die kontrolegroep en wat vals positiewe waardes gelewer het, is 15% (Afdeling 4.2). Toetsing van die monsters van die standaardsiftingsprogram het 'n hoër persentasie vals positiewe waardes, naamlik 26.8% gelewer, maar as daar inaggeneem word dat 40% van die monsters wat normaalweg getoets word (Afdeling 4.5), in die proses uitgeskakel word, is insluiting van hierdie monsters in die verdere toetsing nie onaanvaarbaar nie.

Slegs 6 pasiënte, of 7% van die groep bevestigde pasiënte, is nie met behulp van die prosedure opgespoor nie. Vier van hierdie pasiënte was ten tye van monsterneming onder behandeling gewees, 'n vyfde was van 'n twintig jaar oue PKU-pasiënt en die sesde was van 'n pasiënt met xantienoksidase defek. Redes waarom hulle nie hoë DOC-waardes gelewer het nie word in Afdeling 4.3 gegee. Alhoewel dit nie 'n hoë persentasie is nie, is enige inkorrekte diagnose kommerwekkend. Dit is nie onmoontlik dat die huidige siftingsprogram ook sommige pasiënte ongediagnoseer deurlaat nie, maar die persentasie monsters betrokke is nie so maklik om te bepaal nie. Tydens die parallele toetsing van die twee prosedures is daar 2.5% of 7 pasiënte nie met behulp van die AquaDoc opgespoor nie. Daar is weer eens 'n pasiënt met hiperfenielalanienemie onder hierdie sewe gewees. Verder is pasiënte met Fanconi sindroom, isovaleriaansuururie en ketose nie opgespoor nie. Die ander was pasiënte wat behandeling ontvang het vir metaboliese siekte-toestande. Dit is byna onmoontlik om vals negatiewe diagnoses uit te skakel, maar enige prosedure moet uitgevoer word met die gedagte dat so min as moontlik pasiënte ongediagnoseer gelaat moet word. Ongelukkig is daar nie data oor vals negatiewe diagnoses van ander siftingslaboratoriums beskikbaar nie en die resultate verkry vir die gebruik van die kwantifisering van urinêre organiese materiaal by die opsporing van aangebore metaboliese siekte-toestande kan nie vergelyk word nie.

Dit is nie ongewoon dat oorvleueling plaasvind van parameters wat twee groepe onderskei nie. Altesaam 43 of 22% van die monsters wat getoets is in die kontrole- en bevestigde pasiëntgroepe kon in enige van die twee groepe gewees het (Afdeling 4.3). Die oorvleueling is nie buitengewoon groot nie en 'n onderskeid tussen die twee groepe met behulp van die afsnitpunt is steeds moontlik.

Dit blyk verder dat die betroubaarheid van die apparaat soos gemeet aan die hand van herhaalbaarheid besonder goed is. 'n Konstante beeld van die persone by wie hierdie aspek nagegaan is, se metaboliese toestande is in byna alle gevalle verkry. Laer waardes as die afsnitwaarde is slegs by een van die bevestigde pasiënte aangetref. Hierdie pasiënt, wat glutaarsuururie tipe I het, se voedselinname en behandeling het die metabolietuitskeiding dalk sodanig gekontroleer dat lae DOC-waardes verkry is. Een van die persone uit die kontrolegroep by wie hierdie aspek nagegaan is, het 'n groot metabolietopbrengs gehad. Die hoër ouderdom van hierdie persoon en die gepaardgaande groter voedselinname mag 'n verklaring hiervoor wees. Die betroubaarheid van die apparaat is nagegaan deur herhaaldelike toetsing van dieselfde monster, een uit die kontrolegroep en een uit die pasiëntgroep. Goeie resultate is hiermee verkry, alhoewel die groter wisseling van die DOC-waardes by die pasiënt steeds 'n aanduiding mag wees van die apparaat se onvermoë om baie hoë konsentrasies metaboliete baie akkuraat te kwantifiseer.

Medikasie en ander faktore soos die voedingstoestand en dieet van persone by wie monsters verkry is, het moontlik 'n invloed op die DOC-waardes. 'n Definitiewe antwoord kon egter nie verkry word nie. Dit is belangrik dat die invloed van hierdie faktore bekend is om, indien hulle wel 'n invloed het, valse diagnoses tot 'n minimum te beperk. Dit kom voor asof die AquaDoc suksesvol aangewend kan word vir die doel waarvoor dit in hierdie ondersoek gebruik is : om aangebore metaboliese siekte-toestande op te spoor. 'n Volledige bespreking hiervan volg in die volgende hoofstuk.

H O O F S T U K 5

BESPREKING

5.1 INLEIDING

In die twee voorafgaande hoofstukke is die geskiktheid van die AquaDoc vir gebruik tydens metaboliese sifting ondersoek. Die apparaat en metode moes aan sekere standaarde en voorvereistes voldoen om aanvaarbaar vir gebruik te wees. Tegnies moet min probleme ondervind word en dit moet verkieslik ook oor 'n redelik eenvoudige metodiek beskik. Resultate wat met behulp van die AquaDoc verkry word moet betroubaar, herhaalbaar en diagnosties van waarde wees. Indien die kwantifisering van organiese koolstof deur middel van oksidering van urinêre metaboliëte suksesvol is, kan dit as 'n nuwe primêre siftingstoets dien.

5.2 VERBETERING VAN AQUADOC

Die AquaDoc wat ontvang is van die WNNR vir toepassing op metaboliese sifting, was 'n prototipe. Alle werkende dele was sigbaar en dit was eintlik 'n "lomp", onaanskoulike apparaat, maar juis hierdie eienskappe het modifiserings moontlik en maklik gemaak. Soos uit Afdeling 3.2 behoort te volg, was die aanvanklike resultate teleurstellend en het dit etlike modifiserings genoodsaak. Gedetailleerde beskrywings van die veranderinge wat aangebring is en die meegaande resultate word in Hoofstuk 3 weergegee.

'n Waterbad is voor die ultravioletlamp gekoppel, om sodoende 'n hoër oksidasie temperatuur moontlik te maak. By 80°C is 'n 6% verbetering in die opbrengs van CO₂ verkry indien dit vergelyk word met dié by 25°C. Daar is toe verder aluminium-foelie om die UV-lamp gevou om weerkaatsing van die strale te veroorsaak en glaswol is in die organiese stroper geplaas om 'n fyn sproei te vorm wat hopelik meer CO₂ sou vrystel. Hierdie twee veranderinge, by 80°C, het 'n 17% verbetering van die 25 mmol/l kaliumwaterstofftalaatstandaard te weeg gebring. Installering van 'n sterker lamp tydens toetsing van organiese metaboliëte het ook 'n verhoging van die CO₂-opbrengs gelever.

Een van die faktore wat 'n metode, of apparaat, prakties vir gebruik in laboratoriums maak, is die eenvoud daarvan. Die prosedure wat gevolg word om urinêre organiese verbindings te oksideer is eenvoudig en minimale opleiding sal vereis word om die AquaDoc te bedryf. 'n Verdere voordeel is die lae koste vir bedryf van die AquaDoc. In vergelyking met die volledige sifting wat ongeveer R600 per monster kos, sal die kostes van reagentie wat benodig word om byna 300 monsters op die AquaDoc te analiseer nie R400 beloop nie. Aangesien 40.3% van die monsters uitgeskakel word van dié van persone wat geen aangebore metaboliese siekte-toestande het nie (Afdeling 4.5), hoef 'n aansienlike getal monsters nie verder geanaliseer te word nie. Met minder monsters waarop aminosuur en organiese suur analyses uitgevoer word, verleng die leeftye van die betrokke apparate en verslae van pasiënte waarop hierdie toetse wel uitgevoer moet word, word vinniger uitgestuur. Meer monsters sal ook getoets kan word.

Moontlik die grootste probleem wat opgeklaar moet word voordat die apparaat in die mark vrygestel kan word, is die rekenaar sagteware. Tegnoloë behoort sonder om ingewikkelde berekeninge te doen, die apparaat in werking te kan stel en **finale** resultate aan die einde van die proses te verkry. Die integrasieprogram wat tans beskikbaar is, voldoen nie aan die vereistes vir die toepassing waarvoor die AquaDoc beoog word nie, nl. die vroeë identifikasie van persone wat aan aangebore metaboliese siekte-toestande ly. 'n Program is noodsaaklik wat presiese identifikasie en akkurate integrasie van die monsters toelaat. Spesifieke waardes moet aan die standaard toegeskryf word, sodat hulle ook as kontroles kan dien; andersins moet kontroles gekies word wat ook geoksideer word en waarmee die korrekte kalibrasie van die apparaat nagegaan kan word. Indien die program so gewysig kan word om kalibrasie- en integrasiefoute op te spoor en onder aandag van die verbruiker te bring, sal die gebruikersvriendelikheid van die AquaDoc verhoog.

Wat die waarneembaarheid van die geoksideerde verbindings betref, is 'n veiligheidsmeganisme vir die infrarooi detektor uiters noodsaaklik. Dit het eenmaal gebeur dat daar water deur al die dehidreringspoorte beweeg het, sonder dat dit agtergekom is en die detektor was 'n paar dae lank buite werking terwyl dit moes uitdroog. Die huidige apparaat het 'n oudiovisuele alarm wat hierdie funksie verrig, maar aangesien die rekenaarprogram wat verskaf is nie bruikbaar was nie, kon die effektiwiteit daarvan nie getoets word nie. Vroeë waarskuwing sal beslis geïnkorporeer moet word; ondervinding het geleer dat analiste en tegnoloë te laat gebrekkige instandhouding en verkeerde gebruik agterkom.

Die eenvoud van die apparaat en die metode maak dit ideaal vir gebruik in 'n laboratorium. Herhaalde kwantifisering van dieselfde monster, asook kwantifisering van verskillende monsters van dieselfde persoon (Afdeling 4.4), toon dat die herhaalbaarheid van die apparaat en die prosedure goed is. Waar verskillende monsters van dieselfde persoon getoets is, het slegs drie van die 89 (3.4%) monsters, van bevestigde pasiënte en persone sonder aangebore siekte-toestande, DOC-waardes gelewer wat nie inpas by die klinieniese beeld van die persoon nie. Moontlike verklarings vir die afwykings word in Afdeling 4.6 gegee. Herhaalde toetsing van dieselfde monster het ook bevredigende resultate gelewer. 'n Koëffisiënt van variasie van 4.1% is vir die kontrolemonster en van 2.5% vir die pasiëntmonster verkry, wat toon dat die apparaat relatief beter presteer ten opsigte van kwantifisering van hoë konsentrasies metaboliete as vir laer konsentrasies.

In Afdeling 3.4 is 'n ondersoek na die oksidering van metaboliete wat geredelik uitgeskei word geloods. Slegs oktanoësuur het 'n swak opbrengs gelewer en het op sy beste slegs 'n 35% opbrengs gehad. Daar is genoem dat die swak oplosbaarheid van hierdie metaboliet in 'n waterige oplossing die oorsaak mag gewees het hiervoor. Puriene en pirimidien is ook weens swak oplosbaarheid nie getoets nie en hierdie onoplosbaarheid mag dalk veroorsaak dat defekte in hul metabolisme weë nie deur middel van kwantifisering van opgeloste organiese verbindings in die urine kan geskied nie. 'n Wye reeks metaboliete is egter getoets en 'n groot verskeidenheid siektes behoort deur middel van die AquaDoc-prosedure opspoorbaar te wees.

5.3 **DOC-WAARDES VAN NORMALE KONTROLES EN BEVESTIGDE
PASIËNTE**

Twee stalle urinemonsters is in Afdelings 4.2 en 4.3 ondersoek : dié van 'n groep klinies normale persone en van gediagnoseerde pasiënte. Hierdie twee stalle resultate was gebruik om die normaalverspreiding, asook 'n afsnitpunt tussen die DOC-waardes van normale en abnormale monsters te bereken. Botha en Ueckermann (1990) het in hulle ondersoek 'n afsnitpunt van 1100mgC/mmol kreatinien bereken. Dit stem ooreen met 'n DOC-waarde van 91,7. Die waarde wat in hierdie ondersoek as die afsnitwaarde bepaal is, is 90,4.

Met die samestelling van die kontrolegroep is daar sekere leemtes besef. Die belangrikste hiervan is die onvolledige reeks wat betref die ouderdomme van die persone. Opsporing van aangebore metaboliese siekte-toestande is binne die eerste twee jaar na geboorte van kritiese belang en juis hierdie groep word nie by die kontroles verteenwoordig nie. Veral die afwesigheid van hierdie spesifieke ouderdomsgroep veroorsaak dat die moontlike verband tussen die DOC-waardes en die ouderdom van die pasiënte ook nie na behore nagegaan kon word nie. Dit sal nodig wees om by hospitale en klinieke toestemming te kry om urinemonsters van babas te ontvang. Daar moet moontlik klem daarop gelê word dat die kinders klinies **nie**, soos in die geval van hierdie ondersoek, gesond moet wees nie, maar wel siek **sonder** 'n aangebore metaboliese siekte-toestand, sodat die resultate wat verkry word vergelykbaar is met dié van die babas waarvan monsters vir metaboliese sifting ingestuur word.

'n Ideale groep vir die kontrolegroep vir hierdie ondersoek sou wees monsters soos die A-groep wat in Afdeling 4.5 beskryf word, dit wil sê klinies ongesond maar geen abnormaliteite word met behulp van die laboratorium se siftingsprogram opgespoor nie. Die groep wat deur Botha en Ueckermann (1990) as 'n kontrolegroep getoets is, is dus juis die korrekte een.

Klassifisering van die aangebore metaboliese siekte-toestande wat ondersoek is as deel van die pasiëntgroep word in Tabel 5.1 getoon.

TABEL 5.1 AQUADOC-DIAGNOSE VAN BEVESTIGDE AANGEBORE METABOLIESE SIEKTE-TOESTANDE

TIPE SIEKTE-TOESTAND	DIAGNOSE
AMINOSUURURIEë	
Hartnup se sindroom	2 bevestig
Hiperlisienemie	2 bevestig
Histidienemie	2 bevestig
Maple Syrup uriensiekte (MSUD)	2 bevestig
Fenielketonurie (PKU)	4 bevestig
	1 onbevestig
Prolidase	1 bevestig
Sistienurie	1 bevestig
Sitrullienemie	4 bevestig
	2 bevestig
ORGANIESE SUURURIEë	
Asetoasetaatliolase defek	
Etielmalonieladipiensuururie	1 bevestig
Glutaarsuururie Tipe I	2 bevestig
	1 bevestig
Glutaarsuururie Tipe II	2 onbevestig
3-Hidroksi-isobottersuurdehidrogenase defek	3 bevestig
3-Hidroksi-3-metielglutaarsuururie	3 bevestig
Isovaleriaansuururie	1 bevestig
3-Ketothiolase defek	8 bevestig
Laktiese asidose	6 bevestig
Meervoudige karboksilase defek	9 bevestig
3-Metielglutakoniensuururie Tipe I	5 bevestig
3-Metielglutakoniensuururie Tipe II	2 bevestig
3-Metielkrotonielglisienurie	2 bevestig
Metielmaloonsuururie	1 bevestig
	2 bevestig
Piruvaatdehidrogenase defek	2 onbevestig
Piruvaatkarboksilase defek	1 bevestig
Piroglutamiensuururie	1 bevestig
Propioonsuururie	1 bevestig
	9 bevestig
DEFEKTE IN DIE LIPIED-METABOLISME	
LCAD	
MCAD	1 bevestig
	2 bevestig
DEFEKTE IN DIE PURIEN- EN PIRIMIDIEN METABOLISME	
Puriennukleosiedfosforilase defek	1 bevestig
Xantienoksidase defek	1 onbevestig

(Aminosuur en organiese suur klassifikasie volgens Zubay, 1983).

Deur gebruik te maak van die afsnitwaarde wat tydens die ondersoek bepaal is, is ses gediagnoseerde pasiënte uitgewys met DOC-waardes laer as die afsnitpunt. Dit is in Hoofstuk 4 genoem dat vier van hierdie pasiënte onder behandeling was, die vyfde pasiënt was 'n twintig jaar oue PKU-pasiënt en die laaste pasiënt was 'n persoon met xantienoksidase defek. Pasiënte wat aan 'n redelike groot verskeidenheid siektes gely het, is in die pasiëntgroep ingesluit, maar daar is heelwat siektes wat nie getoets is nie. Dit mag 'n goeie idee wees om in 'n voortsetting van hierdie studie nog meer te toets aangesien dit moontlik is dat daar siektes is wat nie geïdentifiseer kan word met behulp van die AquaDoc-prosedure nie. Xantienoksidase defek is moontlik een só 'n siekte. Hierdie siekte, wat ook as Molibdeen-kofaktor defek bekend staan, is nog net by vyftien pasiënte gediagnoseer (Johnson & Wadman, 1989). Daar is tans geen behandeling vir die siekte nie en pasiënte wat nie kort na geboorte sterf nie, word in inrigtings voor gesorg. Figuur 5.1 toon 'n vereenvoudigde metaboliese weg van xantienoksidase aan (Zubay, 1986). 'n Gebrek aan die ensiem sal dus geen verandering in die konsentrasie van uitgeskeide metaboliete veroorsaak nie. Waar uriensuur normaalweg uitgeskei sou word, sou foutiewe werking van xantienoksidase veroorsaak dat xantien of hipoxantien eerder uitgeskei word. 'n Verhoging in die konsentrasie van metaboliete in die urine kom dus nie voor nie, maar net 'n veranderde samestelling. Dit is dus heel moontlik dat xantienoksidase defek nie opgespoor wou word nie. Merk ook op dat persone wat aan jig ("gout") ly, dikwels XYLOPRIMTM (Allopurinol) as medikasie gebruik. Hierdie is 'n profilaktiese middel wat die ensiem allopurinase, wat ook xantien na uriensuur omskakel, inhibeer.

Die rede vir die gebruik is dat uriensuur in hoë konsentrasies uitkristalliseer, wat jigs tot gevolg het, terwyl xantien wateroplosbaar is en nie kristalle vorm nie. Xantien word dan in die urine uitgeskei en iemand wat XYLOPRIMTM drink sal dus hoër as normaal vlakke xantien en hipoxantien in sy/haar urine uitskei.

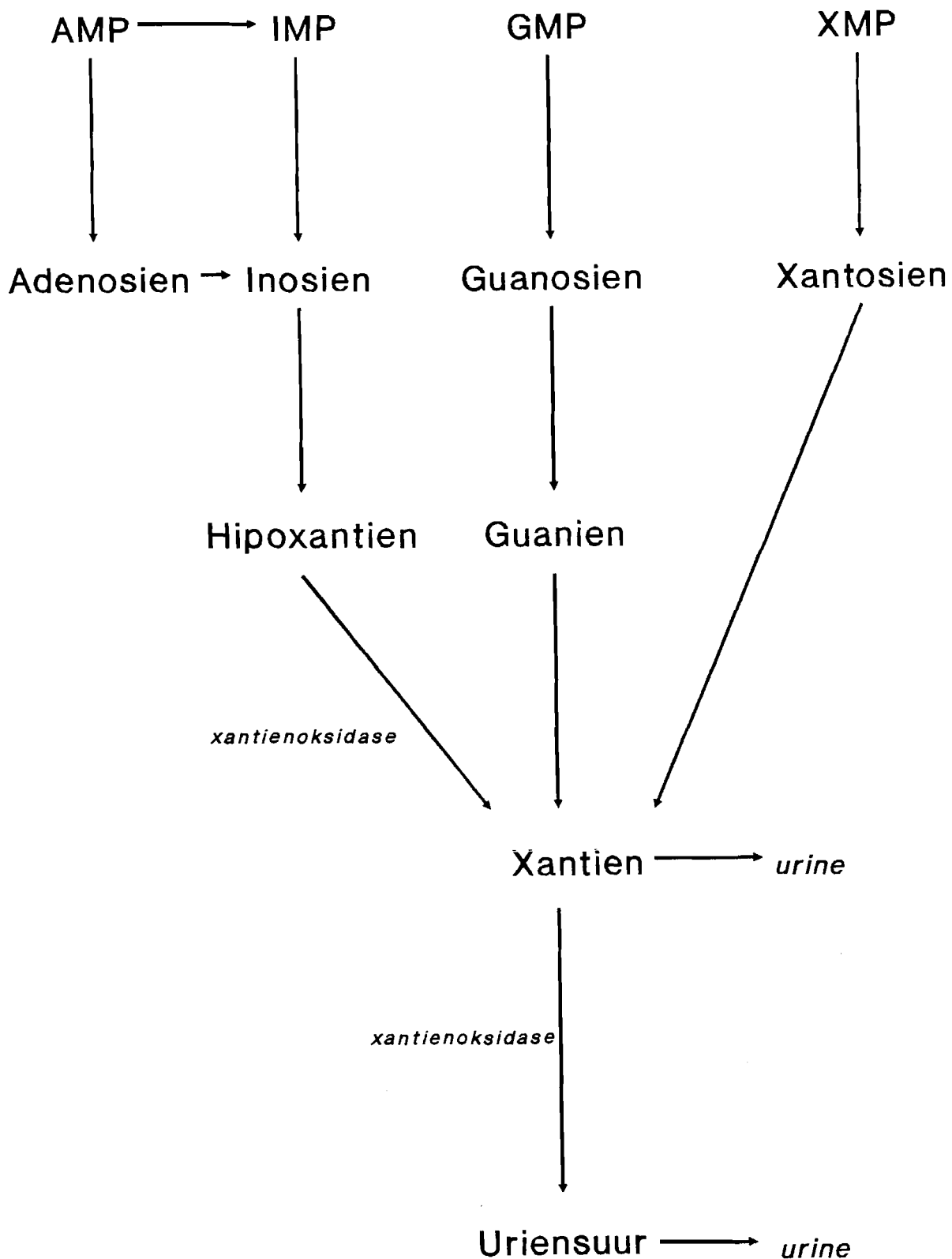


Fig 5.1 Vereenvoudigde metaboliese weg vir die ensien xantienoksidase.

Adenosien-, inosien-, guanien- en xantosienmonofosfaat het die vorming van xantien tot gevolg en die ensiem is dan onder andere verantwoordelik vir die omskakeling van xantien na uriensuur. 'n Defek in die ensiem sou veroorsaak dat xantien of hipoxantien in die plek van uriensuur uitgeskei word.

Bykans 7% van die groep van bevestigde pasiënte is dus nie met behulp van die AquaDoc-prosedure opgespoornie. Aangesien vroeë diagnose van aangebore metaboliese siekte-toestande kan verhoed dat die pasiënt byvoorbeeld erge breinskade opdoen of selfs doodgaan. Om hierdie rede is dit uiters noodsaaklik dat die persentasie vals negatiewe diagnoses so laag as moontlik is. Toetsing van die apparaat saam met die standaard siftingsprogram het verder ondersoek ingestel op die persentasie vals negatiewe diagnoses en hierdie resultate sal later in dié afdeling bespreek word.

Die Jaffe reaksie (Jaffe, 1886) is gebruik om die kreatinienwaardes wat in hierdie ondersoek gebruik is, te bepaal, maar die metode is omslagtig en die herhaalbaarheid is nie goed nie. Alternatiewelik moet ander metodes om die kreatinienwaardes te verkry, gebruik word. Om dit te toets is elf monsters na 'n patologiese laboratorium gestuur om te bepaal hoe die waardes vergelyk en die gemiddelde afwyking van dié wat in die Departement Biochemie bepaal is, was 9%. Ongelukkig is die apparaat vir die geoutomatiseerde bepaling van kreatinien, soos dié wat deur die meeste patologiese laboratoria's gebruik word, nie tot die onmiddellike beskikking van die Departement Biochemie nie. Indien een van die patologiese laboratoria's instem om met die bepaling te help, sal die sekerheid oor die kreatinienwaardes wat gebruik word, verbeter. Kreatinienuitskeiding gee 'n aanduiding van die "konsentrasie" van urine (Afdeling 2.3) en aangesien dit reeds by die verdunning van die monsters in berekening gebring word, vereenvoudig dit latere berekeninge. Deur die kreatinienwaardes te gebruik in die berekening van die DOC-waardes, word daar dus vergelykbare resultate verkry, al is die urine hoë gekonsentreerd.

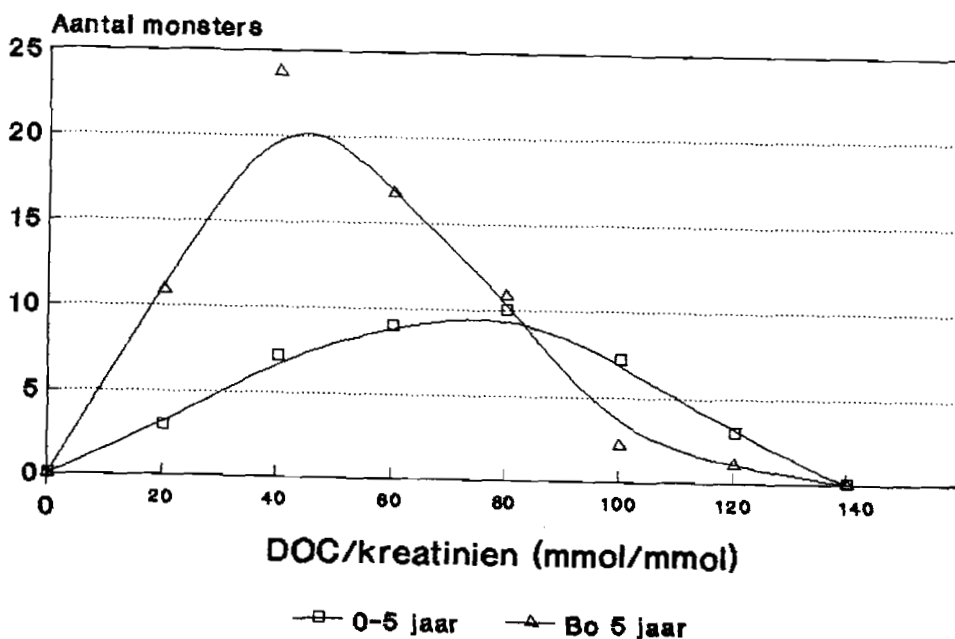
Een van die spesifieke probleme wat ondervind is met die huidige standaardsiftingsprogram, is die gebrek aan primêre sifting vir die organiese suururieë. Kwantifisering van urinêre organiese materiaal met behulp van die AquaDoc-metode mag hierdie probleem oplos omrede die totale metabolietinhoud van die urine gemeet word en nie net 'n spesifieke groep metaboliëte nie. Die resultate wat verkry is met die oksidering van die reekse metaboliëte (Afdeling 3.4) toon aan dat aminosure nie moeiliker as organiese sure oksideer nie en daar hoort dus nie moeiliker opsporing van defekte in die aminosuur metabolisme te wees nie. Slegs oktanoësuur het skynbaar sleg geoksideer, maar die rede hiervoor is waarskynlik die water-onoplosbaarheid daarvan. Indien aminosuur defekte moeiliker geïdentifiseer sou word met die AquaDoc, bestaan daar 'n alternatiewe primêre siftingstoets, een dimensionele dunlaagchromatografie. Dunlaagchromatografie is in die verlede met sekerheid gebruik om aminosuururieë op te spoor, maar bykans 50% van aminosuururieë word nie met behulp van die metode gediagnoseer nie.*

Die onoplosbaarheid van sekere metaboliëte in water mag moontlik 'n belangrike faktor wees om te bepaal watter aangebore metaboliese siekte-toestande deur die AquaDoc opgespoor kan word. Sekere defekte in die metabolisme van komplekse lipiede, soos Niemann-Pick siekte, metachromatiese leukodistrofie en Farber se lipogranulomatose sal dus moontlik nie opgespoor kan word nie. Sommige aangebore defekte kan egter in elk geval nie deur urinêre analise opgespoor word nie en ander deteksie metodes sal gebruik moet word.

* (Ongepubliseerde resultate van mnr L.J. Mienie, Departement Biochemie, PU vir CHO).

Behalwe vir die 7% (6 monsters) vals negatiewe pasiënte wat uitgelig is, het daar 15% (13 monsters) vals positiewe gevalle onder die kontrolegroep voorgekom. Verskillende verklarings kan hiervoor aangevoer word. Twee van hierdie 13 persone het tydens monsterneming medikasie gebruik. 'n Onderzoek na die invloed van medikasie op die DOC/kreatinienwaardes (Afdeling 4.2) het egter nie getoon dat persone wat medikasie neem noodwendig meer metaboliete in hul urine uitskei nie. Die organiese aard van homeopatiese middels het dalk veroorsaak dat die persoon wat dit geneem het, 'n groter hoeveelheid metaboliete in sy urine uitgeskei het as wat moontlik normaalweg die geval sou gewees het. 'n Verdere betekenisvolle faktor is die feit dat 67% van hulle onder vyf jaar oud is. 'n Duidelike onderskeid tussen die twee verskillende ouderdomsgroepe is noodsaaklik en die afsnitpunt behoort ooreenstemmend aangepas te word. Toe daar ondersoek ingestel is na die ouderdomsafhanklikheid van die urinêre organiese inhoud (Afdeling 4.2), is die moontlikheid van 'n laer afsnitpunt genoem, maar nie bereken nie. Fig 5.2 A toon die verspreiding van die DOC-waardes van die twee ouderdomsgroepe en dit is duidelik dat die jonger groep 'n verskuiwing na 'n hoër afsnitpunt toon. Die twee verspreidingskrommes, tesame met dié van die pasiëntgroep, word in Fig 5.2 B getoon. 'n Laer afsnitpunt vir die ouer groep volg ook uit hierdie figuur.

A.



B.

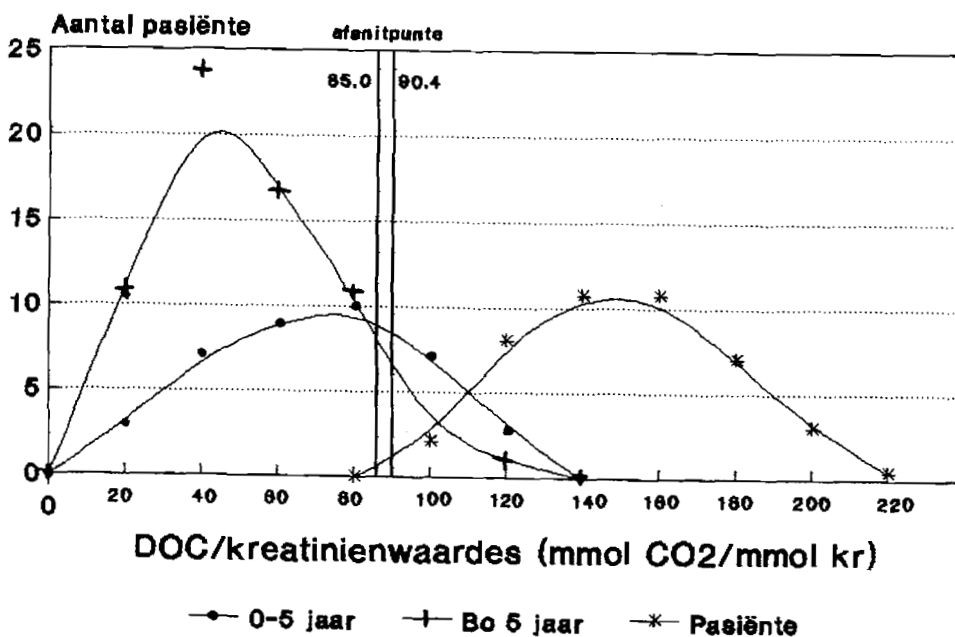


Fig 5.2 A Verspreiding van die DOC-waardes van twee verskillende ouderdomsgroepe in die kontrolegroep : die een groep onder vyf jaar en die ander groep bo vyfjarige ouderdom.

Dit volg uit die figuur dat die ouer groep relatief minder metaboliëte/kreatinien uitskei as die jonger groep en dit dui op die moontlikheid vir 'n laer afsnitpunt vir die ouer groep.

B Verspreidingskrommes vir die twee groepe, asook dié van die bevestigde pasiënte.

Met hierdie laer afsnitpunt vir die ouer persone, sal die 20-jarige PKU-pasiënt nou wel in die pasiëntgroep val. Terselfdertyd verlaag die aantal persone in die kontrolegroep wat vals verhoogde DOC/kreatinienwaardes het. 'n Ander moontlike rede wat nie uitgesluit kan word nie, is dat van die vals negatiewe persone aan een of ander ongediagnoseerde of selfs ondiagnoseerbare aangebore metaboliese siekte-toestand ly. Sekere siektes manifesteer eers op 'n latere ouderdom en vroeë opsporing is dus nie geredelik moontlik nie, byvoorbeeld porfirie. Ander weer veroorsaak nie noemenswaardige kliniese simptome nie, byvoorbeeld β -aminoisobottersuururie. Weer eens moet die toetsing van 'n groter verskeidenheid defekte beklemtoon word. Daar is moontlik 'n spesifieke groep aangebore metaboliese siekte-toestande wat nie met behulp van die AquaDoc opgespoor kan word nie. Vasstelling hiervan, as dit die geval is, mag siftingsprosedures wysig om wel ook hierdie defekte op te kan spoor.

Of die prosedure geskik sal wees om draers van aangebore metaboliese siekte-toestande op te spoor, is dalk die moeite werd om na te gaan. By sommige van hierdie aangebore siekte-toestande, byvoorbeeld PKU, skei die draers ook effens hoër konsentrasies van sekere metaboliëte uit. Die metode kan dan gebruik word om die resultate van genetiese analyses te ondersteun, of om aanleiding te gee daartoe.

5.4 BRUIKBAARHEID VAN DIE AQUADOC-APPARAAT VIR METABOLIESE SIFTING

5.4.1 Aanvanklike probleemstelling

In Afdeling 2.6 is 'n tweeledige probleemstelling geformuleer wat soos volg lui :

- i) Daar moet vasgestel word of die AquaDoc vir die betroubare kwantifisering van urinêre organiese materiaal aangewend kan word, sodat dit as 'n eerstefase toets in die siftingsprogram kan dien; en
- ii) daar moet bepaal word of die voorkoms van urinêre organiese materiaal as diskriminant vir die identifisering van pasiënte met aangebore metaboliese siekte-toestande aangewend sal kan word.

5.4.2 Betroubaarheid van die AquaDoc

Hierdie apparaat se eenvoudige metodiek en werking maak dit hoogs geskik vir gebruik tydens metaboliese sifting. Metaboliëte word verder voldoende geoksideer om 'n aanvaarbare profiel van die metabolië-uitskeiding en dus die metaboliese toestand van die persoon te verkry (Afdelings 3.4, 4.4 en 4.5). Herhaalbaarheid ten opsigte van herhaalde toetsing van dieselfde monster, asook toetsing van 'n paar monsters van dieselfde persoon, het goeie resultate getoon. Daar is by slegs 3 (3.4%) van die 89 monsters wat getoets is om die prosedure se herhaalbaarheid en betroubaarheid na te gaan, resultate gekry wat nie ooreenstem met die metaboliese toestand van die persoon nie. Twee van hierdie was van 'n pasiënt waar die DOC-waardes laag was en die derde een van een van die kontrolemonsters wat 'n hoë DOC-waarde gelewer het.

Toetsing van die apparaat se herhaalbaarheid deur herhaalde toetsing van dieselfde monster het ook bevredigende resultate gelewer. Koëffisiënte van variasie van 4.1% vir die kontrolemonster en 2.5% vir die pasiëntmonster is verkry. Hierdie waardes dui ook daarop dat die apparaat wel geskik is vir die betroubare kwantifisering van hoë konsentrasies metaboliete aangesien die koëffisiënt van variasie laer is vir die pasiëntmonster. Die apparaat presteer as't ware beter by hoë konsentrasies metaboliete. Die vinniger toetsing wat met behulp van die apparaat verkry word, sal veroorsaak dat verdere toetsing, indien nodig, vinniger sal geskied. Die basiese voordele van die apparaat is dus, soos reeds in Hoofstuk 2 genoem word :

- i) dit word binnelands vervaardig en lang invoertye, asook buitelandse valuta wisselkoersrisiko's word uitgeskakel;
- ii) kapitaalluitleg is klein;
- iii) instandhouding en kennis is plaaslik beskikbaar;
- iv) resultate word binne vier minute verkry;
- v) apparaat is maklik om mee te werk.

Aangesien die AquaDoc betroubare en herhaalbare resultate lewer, behoort die metode aangewend te kan word as 'n eerstefase toets in die opsporing van aangebore metaboliese siekte-toestande.

5.4.3 Urinêre organiese materiaal as diskriminant by die opsporing van aangebore metaboliese siekte-toestande

Aan die begin van die ondersoek is daar aangeneem dat die kwantifisering van opgeloste urinêre organiese materiaal geskik sal wees in die opsporing van aangebore metaboliese siekte-toestande.

Persone met steurings in hul metabolisme skei heelwat hoër konsentrasies metaboliëte uit as persone wat gesond is. Hierdie metaboliëte word al jare lank op verskillende wyses gekwantifiseer en gebruik om die betrokke persone te diagnoseer. Normaalwaardes word bereken en afwykings van die normaal dui op 'n probleem. Aangesien hierdie metaboliëte in die urine oplos, kan opgeloste organiese materiaal as diskriminant by die opsporing van aangebore metaboliëse siekte-toestande gebruik word.

Die goeie resultate wat verkry is met die opsporing van aangebore metaboliëse siekte-toestande tydens parallele toetsing met die roetine-siftingsprogram toon aan dat die AquaDoc moontlik baie effektief mag wees. 40.3% Van die monsters is uitgeskakel waarop verdere toetsing nie sou nodig wees nie. Dit is 'n belangrike rol van 'n eerstefase toets. Een-dimensionele dunlaagchromatografie word gebruik om dieselfde funksie vir aminosure te verrig: alle monsters waarvoor abnormale dunlae verkry word, ondergaan dan kwantitatiewe aminosuuranalise om die oorsaak van die abnormaliteit op te spoor. Daar moet net onthou word dat dunlaagchromatografie nie 'n onfeilbare metode vir die opsporing van afwykings in die aminosuurmetabolisme is nie. Die AquaDoc kan moontlik vir dieselfde doel aangewend word, met die bykomende voordeel dat dit nie net op 'n spesifieke reeds aangebore metaboliëse siekte-toestande gemik is nie. 'n Groot verskeidenheid metaboliëse defekte word met behulp van die AquaDoc opgespoor en daarom kan ten gunste daarvan beoordeel word. 'n Verdere 25.1% van die monsters wat getoets is het met beide metodes abnormale resultate gelewer. Alhoewel daar 26.8% vals positiewe resultate met die AquaDoc-metode verkry is, was die persentasie vals negatiewe diagnoses 7.8%.

Hierdie monsters het dié ingesluit waar selfs net abnormale verbindings tydens die laboratorium se siftingsprogram opgespoor is. Redes vir die afwykende resultate vir beide vals positiewe en vals negatiewe resultate word in Afdeling 4.5 gegee. Alhoewel die aantal monsters waarvan die resultate hoog voorkom, veral ook in vergelyking met die aantal vals positiewe en negatiewe diagnoses vanuit die kontrole- en pasiëntgroepe, moet daar onthou word dat die siftingsprogram ook inkorrekte diagnoses mag oplewer. Verder mag daar sekere omstandighede wees waaronder die AquaDoc-metode nie geskik is nie, byvoorbeeld by siektes soos xantienoksidase defek. Spesifieke elemente in die roetine-program sal dus nie heeltemal uitgefaseer word nie. Ander eerstefase toetse moet nog uitgevoer word en totdat die apparaat sodanig verbeter is dat beter resultate verkry word, sal organiese suurekstraksies steeds uitgevoer moet word.

'n Voordeel van die AquaDoc bo enige ander metode om metaboliëte in die urine te kwantifiseer, is dat byna alle organiese materiaal geoksideer en gevolglik gekwantifiseer kan word. Met slegs 'n baie klein hoeveelheid urine kan die totale organiese inhoud bepaal word. Deur die totale metabolietinhoud te kwantifiseer, word 'n geheelbeeld verkry wat onontbeerlik kan wees vir die diagnose van 'n pasiënt. Soos hierbo gemotiveer, is kwantifisering van urinêre organiese materiaal beslis geskik vir die gebruik as 'n diskriminant tydens metaboliese sifting.

Die vervaardigers van die apparaat, wat deurlopend baie behulpzaam was, asook die betrokke personeel van die WNNR, het besluit om die modifiserings wat tydens hierdie ondersoek aangebring is, in te bou in 'n siftingslaboratorium-apparaat wat waarskynlik as die LabDoc bekend sal staan. 'n Prototipe van hierdie apparaat word in Fig 5.3 getoon.

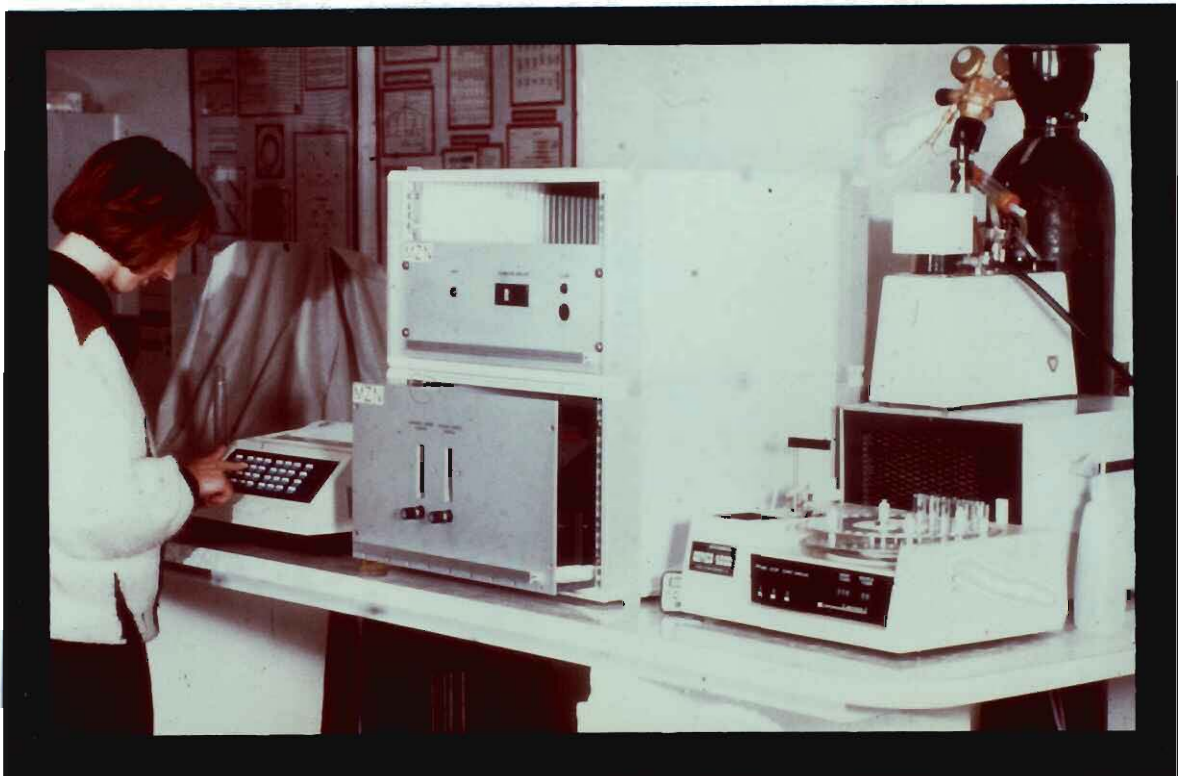


Fig 5.3 Die LabDoc.

Hierdie apparaat is ontwerp met die veranderinge wat tydens hierdie studie aanbeveel is, as deel van die basiese struktuur. Alhoewel dit nie noodwendig die finale apparaat is nie, word daar verwag dat dit binnekort aan laboratoriums beskikbaar gestel sal word.

Inligting oor die voedingstoestand, dieet, geskiedenis en kliniese simptome van persone by wie monsters ontvang is, is van uiterste belang. Inligting sodoende verkry, help om 'n beeld van die persoon se metaboliese toestand te skep. Hierdie beeld behoort heelwat te help wanneer dit kom by interpretering van resultate en diagnosering van die pasiënt. Tydens die toetsing van die AquaDoc in Nederland aan die einde van 1992, sal soveel as moontlik verskillende siektes met behulp van die prosedure getoets word. Deur hierdie spesifieke opsporingsmetode vir aangebore metaboliese siekte-toestande te gebruik, sal dit moontlik gebeur dat slegs 'n sekere groep afwykings nie uitgewys word nie. Indien dit die geval is, sal 'n bykomende (of bestaande?) toets tesame met die AquaDoc gebruik word vir primêre sifting.

Resultate wat verkry is tydens hierdie studie het dus albei onderafdelings van die aanvanklike probleemstelling bevestigend beantwoord. Die apparaat kan aangewend word as 'n betroubare eerstefase toets in 'n siftingsprogram en urinêre organiese materiaal kan as 'n diskriminant vir die opsporing van aangebore metaboliese siekte-toestande aangewend word. Die AquaDoc is ontwikkel om behulpsaam te wees met die opsporing van organiese besoedeling in water. Hierdie ondersoek het getoon dat dit gebruik kan word om 'n ander soort besoedeling te bekamp : dié wat in die liggaam voorkom wanneer 'n defek in 'n metaboliese weg voorkom. Die AquaDoc kan help om navorsers en personeel in siftingslaboratoriums op die regte spoor te plaas.

BYLAAG 1 : RESULTAATTABELLE

TABEL 1 DOC-, KREATINIEN- EN DOC/KREATINIENWAARDES VAN KONTROLEGROEP

KONTROLE-NOMMER	DOC-WAARDE (mmol CO ₂ /l)	KREATINIENWAARDE (mmol/l)	DOC/KREATINIENWAARDE (mmol CO ₂ /mmol kreat.)
D1/13/3	59.27	71.43	3.40
D2/13/3	57.68	8.23	6.89
D3/13/3	57.84	29.20	1.98
D4/13/3	55.61	17.35	3.21
D5/13/3	56.18	19.65	2.86
D6/13/3	55.66	22.83	2.44
D7/13/3	55.64	20.53	2.71
D8/13/3	55.25	28.76	1.92
D9/13/3	55.45	16.90	3.28
D10/13/3	56.23	9.73	5.78
D11/13/1	54.91	25.31	2.17
D12/13/3	55.45	10.44	5.31
D13/13/3	55.45	26.02	2.13
D15/13/3	47.95	16.64	2.88
D16/13/3	54.98	33.63	1.63
D17/13/3	54.77	4.96	11.04
D18/13/3	56.82	1.86	30.55
D20/13/3	65.32	23.54	2.77
D21/13/3	55.32	8.85	6.25
D22/13/3	91.50	11.50	7.96
D25/13/3	55.39	16.11	3.44
D26/13/3	55.27	16.02	3.45
D27/13/3	54.98	26.73	2.06
D28/13/3	54.89	26.37	2.08
D1/19/3	70.16	11.85	5.92
D2/19/3	94.86	3.36	28.23
D1/21/3	51.32	6.37	8.06

**TABEL 2 DOC-, KREATINIEN- EN DOC/KREATINIENWAARDES VAN MONSTERS WAT
VERWYS IS VIR METABOLIESE SIFTING**

PASIËNT NOMMER	DOC-WAARDE (mmol CO₂/l)	KREATINIENWAARDE (mmol/l)	DOC/KREATINIENWAARDE (mmol CO₂/mmol kreat.)
1/6/3	60.00	2.92	20.55
2/6/3	58.64	3.72	15.76
3/6/3	57.05	1.86	30.67
4/6/3	13.88	4.42	61.36
5/6/3	55.68	0.62	89.81
6/6/3	65.91	0.88	74.90
7/6/3	63.86	1.06	60.25
8/6/3	64.77	3.19	20.30
9/6/3	55.45	4.51	12.29
10/6/3	56.14	2.21	25.40
11/6/3	57.05	1.50	38.03
12/6/3	59.32	3.63	16.34
14/6/3	97.50	0.44	221.59
15/6/3	60.91	1.59	38.31
16/6/3	58.18	1.15	50.59
17/6/3	61.14	0.44	138.95
18/6/3	55.00	1.33	41.35
20/6/3	80.91	0.71	113.90
21/6/3	80.91	1.86	43.50
22/6/3	60.45	1.33	45.45
23/6/3	58.86	4.60	12.80
24/6/3	59.55	7.08	8.41
25/6/3	56.82	12.30	4.62
26/6/3	57.05	18.67	3.06
27/6/3	56.82	5.40	10.52
28/6/3	56.36	7.43	7.59
29/6/3	55.91	1.24	45.09
30/6/3	62.05	3.10	20.02
31/6/3	56.59	2.04	27.74
44/6/3	56.80	5.13	11.07
45/6/3	55.25	0.44	125.57
1/7/3	56.25	15.22	3.70
2/7/3	59.16	5.22	11.33
1/8/3	56.02	34.51	1.62
2/8/3	58.59	4.96	11.81
3/8/3	57.57	18.32	3.14

TABEL 2 DOC-, KREATINIEN- EN DOC/KREATINIENWAARDES VAN MONSTERS WAT VERWYS IS VIR METABOLIESE SIFTING (vervolg)

PASIËNT NOMMER	DOC-WAARDE (mmol CO ₂ /l)	KREATINIENWAARDE (mmol/l)	DOC/KREATINIENWAARDE (mmol CO ₂ /mmol kreat.)
4/8/3	57.93	0.97	59.72
1/11/3	54.82	13.27	4.13
2/11/3	58.73	0.53	110.81
1/14/3	58.95	7.43	7.93
2/14/3	61.07	13.54	4.51
4/14/3	62.09	16.02	3.88
5/14/3	55.47	2.12	26.17
6/14/3	55.64	0.80	69.55
7/14/3	60.84	2.30	26.45
8/14/3	59.18	2.74	21.60
9/14/3	58.25	11.59	5.03
10/14/3	59.20	12.04	4.92
11/14/3	58.18	3.63	16.03
14/14/3	55.64	4.51	12.34
1/20/3	55.52	1.50	37.01
2/20/3	55.36	2.12	26.11
3/20/3	55.61	2.74	20.30
4/20/3	56.02	6.02	9.31
5/20/3	56.50	1.15	49.13
6/20/3	53.75	1.59	33.81
7/20/3	55.39	1.42	39.01
1/22/3	53.16	8.50	6.25
1/25/3	55.14	23.01	2.40
2/25/3	56.30	14.96	3.76
3/25/3	56.27	0.97	58.01
4/25/3	55.05	8.76	6.28
1/2/4	55.14	0.53	104.04
2/2/4	56.50	0.97	58.25
3/2/4	56.18	0.35	160.51
4/2/4	56.11	1.24	45.25
5/2/4	56.16	1.15	48.83
6/2/4	55.16	0.71	77.69
7/2/4	56.07	0.35	160.20
8/2/4	55.55	0.18	308.61
9/2/4	75.96	0.73	55.45
10/2/4	55.64	10.27	5.42

TABEL 3 EFFEK VAN TEMPERATUUR OP DIE OKSIDASIE VAN METABOLIE TE WAT IN DIE URINE TEENWOORDIG IS

TYPE MONSTER	VERDUN- NING	DOC-WAARDE BY TEMPERATUUR			
		28°C	35°C	45°C	80°C
WB *	1 : 4	59.33	59.33	61.21	87.58
	1 : 2	153.49	148.78	152.55	160.08
	1 : 1	254.25	224.12	273.08	306.04
	1	296.63	351.24	384.2	400.21
NC **	1 : 4	-	-	-	-
	1 : 2	2.83	9.42	10.36	16.95
	1 : 1	47.08	51.79	51.79	70.63
	1	113.00	127.13	136.54	127.13

* Pasiënt met propioonsuururie

** Kontrole

- Piek te klein om vanaf standaardkurwe te lees

TABEL 4 VERDERE VERANDERING AAN DIE AQUADOC

TYPE MONSTER	VERDUNNING	DOC-WAARDE BY VERANDERING	
		80°C foelie	80°C glaswol
WB *	1 : 4	87.58	127.13
	1 : 2	178.92	222.23
	1 : 1	339.00	--
	1	--	--
NC **	1 : 4	-	-
	1 : 2	16.95	18.83
	1 : 1	68.74	85.69
	1	144.08	169.50

* Pasiënt met propioonsuururie

** Kontrole

- Piek te klein om vanaf die standaardkurwe te lees

-- Piek het bo teen die skrywer vasgeslaan en die konsentrasie kon nie akkuraat bereken word nie

TABEL 5 EFFEK VAN $K_2S_2O_8$ -KONSENTRASIE OP DIE DOC-WAARDE

TIPE MONSTER	VERDUNNING	DOC-WAARDE BY [$K_2S_2O_8$]		
		4%	4.5%	5%
WB *	1 : 4	94.17	84.75	82.87
	1 : 2	221.29	177.03	167.62
	1 : 1	--	--	--
	1	--	--	--
DvS **	1 : 4	32.96	18.83	21.66
	1 : 2	115.83	74.39	94.17
	1 : 1	200.58	177.98	200.58
	1	--	--	--
NC ***	1 : 4	-	-	-
	1 : 2	18.83	20.72	35.78
	1 : 1	84.75	56.50	68.74
	1	172.33	158.20	136.54

* Pasiënt met propioonsuururie

** Pasiënt met Hartnup se Sindroom

*** Kontrole

- Piek te klein om vanaf die standaardkurwe te lees

-- Piek het so teen die skrywer vasgeslaan en konsentrasie kon nie akkuraat bereken word nie

TABEL 6 OKSIDASIE VAN AMINOSURE

AMINOSUUR	VERKRYGDE KONSENTRASIE (mmol CO_2 /l)	VERWAGTE KONSENTRASIE (mmol CO_2 /l)
Alanien	112.12	131.83
	207.17	263.67
	--	527.33
Fenielalanien	47.08	70.63
	103.58	141.25
	195.87	282.50
Glisien	136.54	131.83
	254.25	263.67
	--	527.33
Glutamien	45.20	70.63
	101.70	141.25
	252.37	282.50
Glutamiensuur	45.20	70.63
	158.20	141.25
	193.04	282.50
Histidien	49.91	70.63
	120.53	141.25
	205.28	282.50
Sitrullien	35.78	70.63
	131.83	141.25
	188.33	282.50

TABEL 7 OKSIDASIE VAN ORGANIESE SURE

ORGANIESE SUUR	VERKRYGDE KONSENTRASIE (mmol CO ₂ /l)	VERWAGTE KONSENTRASIE (mmol CO ₂ /l)
Benzoësuur	3.77	26.37
	32.02	52.73
	102.64	105.47
Heksanoësuur	8.48	26.37
	35.78	52.73
	94.17	105.47
Hippuursuur	10.36	26.37
	49.91	52.73
	92.28	105.47
α-ketogluteraat	8.48	26.37
	51.79	52.73
	83.81	105.47
β-ketogluteraat	17.89	26.37
	44.26	52.73
	71.57	105.47
Melksuur	16.95	26.37
	44.26	52.73
	81.93	105.47
Oktanoësuur	-	26.37
	-	52.73
	14.13	105.47
Propioonsuur	16.95	26.37
	51.79	52.73
	109.23	105.47
Sitroensuur	10.36	26.37
	60.27	52.73
	98.88	105.47
Suksiensuur	8.48	26.37
	54.62	52.73
	106.41	105.47

TABEL 8 OKSIDASIE VAN KOOLHIDRATE, SITIDIEN EN URIENSUUR

KOOLHIDRAAT	VERKRYGDE KONSENTRASIE (mmol CO ₂ /l)	VERWAGTE KONSENTRASIE (mmol CO ₂ /l)
Fruktose	127.13	131.83
	224.12	263.67
	306.98	527.33
Galaktose	32.96	131.83
	103.58	263.67
	--	527.33
Glukose	140.31	131.83
	276.85	263.67
	--	527.33
Laktose	131.83	131.83
	226.00	263.67
	--	527.33
Maltose	150.67	131.83
	250.48	263.67
	--	527.33
Mannose	153.49	131.83
	301.33	263.67
	--	527.33
Ribose	127.13	131.83
	235.42	263.67
	--	527.33
Xilose	131.83	131.83
	219.41	263.67
	--	527.33
Sitidien	120.53	131.83
	179.86	263.67
	254.25	527.33
Uriensuur	131.83	131.83
	234.48	263.67
	305.1	527.33

TABEL 9 OKSIDASIE VAN AMINOSURE

AMINOSUUR	VERKRYGDE KONSENTRASIE (mmol CO ₂ /l)	VERWAGTE KONSENTRASIE (mmol CO ₂ /l)
Alanien	136.54	131.83
	263.67	263.67
	291.92	527.33
Fenielalanien	134.66	131.83
	235.42	263.67
	357.83	527.33
Glisien	122.42	131.83
	254.25	263.67
	348.42	527.33
Glutamien	113.00	131.83
	339.00	263.67
	339.00	527.33
Glutamiensuur	131.83	131.83
	252.37	263.67
	357.83	527.33
Histidien	141.25	131.83
	258.96	263.67
	395.50	527.33
Sitrullien	122.42	131.83
	197.75	263.67
	282.50	527.33

TABEL 10 OKSIDASIE VAN ORGANIESE SURE

ORGANIESE SUUR	VERKRYGDE KONSENTRASIE (mmol CO ₂ /l)	VERWAGTE KONSENTRASIE (mmol CO ₂ /l)
Benzoësuur	129.95	131.83
	239.18	263.67
	339.94	527.33
Heksanoësuur	128.07	131.83
	241.07	263.67
	377.61	527.33
Hippuursuur	139.37	131.83
	247.66	263.67
	295.68	527.33
α -Ketogluteraat	148.78	131.83
	283.44	263.67
	368.19	527.33
β -Ketogluteraat	131.83	131.83
	264.61	263.67
	383.26	527.33
Melksuur	159.14	131.83
	275.91	263.67
	452.94	527.33
Oktanoësuur	65.92	131.83
	112.06	263.67
	191.16	527.33
Propioonsuur	157.26	131.83
	269.32	263.67
	395.50	527.33
Sitroensuur	172.33	131.83
	303.22	263.67
	411.51	527.33
Suksiensuur	184.57	131.83
	277.79	263.67
	385.14	527.33

TABEL 11 OKSIDASIE VAN KOOLHIDRAAT, SITIDIEN EN URIENSUUR

KOOLHIDRAAT	VERKRYGDE KONSENTRASIE (mmol CO₂/l)	VERWAGTE KONSENTRASIE (mmol CO₂/l)
Fruktose	133.72	131.83
	247.54	263.67
	274.03	527.33
Galaktose	141.25	131.83
	242.95	263.67
	337.12	527.33
Glukose	141.25	131.83
	242.95	263.67
	317.34	527.33
Laktose	139.37	131.83
	254.25	263.67
	339.00	527.33
Maltose	142.19	131.83
	250.48	263.67
	332.41	527.33
Mannose	163.85	131.83
	292.86	263.67
	327.70	527.33
Ribose	129.01	131.83
	227.88	263.67
	319.23	527.33
Xilose	132.78	131.83
	245.78	263.67
	293.80	527.33
Sitidien	124.30	131.83
	190.22	263.67
	281.56	527.33
Uriensuur	142.19	131.83
	242.95	263.67
	318.28	527.33

TABEL 12 STANDAARDKROMMEBEPALING VAN KREATINIEN

[KREATINIEN] (mmol/l)	BEREKENDE [KREATINIEN] (mmol/l)
0	0
0.89	1.08
1.77	1.88
4.43	4.77
8.85	8.85
13.27	13.00
17.70	16.42
22.12	20.63
26.55	22.12
30.97	25.97

TABEL 13 KREATINIENVERVAL

DAG	KREATINIENWAARDE (mmol/l)
0	27.26
1	19.47
2	17.52
5	21.24
6	25.31
10	25.13
11	19.47
12	18.58
13	17.70
17	17.35
22	18.41
27	18.05
29	16.90
38	18.50
44	18.58
49	17.61
53	16.73
59	17.61
71	17.79
75	15.75
77	15.66
83	16.02
94	14.25
99	16.02
109	15.31
120	14.96
130	16.90

TABEL 14 KONTROLEGROEP

MONSTER	KREATINIEN (mmol/l)	DOC/KREATINIEN (mmol/mmol)	MEDIKASIE EN ANDER FAKTORE
D1/13/1	17.4	32.96	Epanutin
D2/13/3	8.2	40.49	-
D3/13/3	29.2	55.37	Naprosyn
D4/13/3	17.3	35.03	Beconal
D5/13/3	19.6	50.85	-
D6/13/3	22.8	66.67	Roaccutane
D7/13/3	22.3	35.03	-
D8/13/3	28.7	29.38	-
D9/13/3	16.9	36.16	Modural
D10/13/3	9.7	24.86	Porfirie in familie
D11/13/3	25.3	24.86	-
D12/13/3	10.4	25.99	-
D13/13/3	22.8	47.46	Ekseem
D14/13/3	10.4	47.46	-
D15/13/3	16.6	18.08	-
D16/13/3	33.6	25.99	-
D17/13/3	5.0	12.43	-
D18/13/3	1.9	14.69	-
D20/13/3	23.5	14.69	-
D21/13/3	8.8	18.08	-
D22/13/3	11.5	54.24	-
D23/13/3	11.8	49.72	-
D25/13/3	16.1	11.30	Tiroieditis in familie
D26/13/3	16.0	16.95	-
D27/13/3	26.7	19.21	-
D28/13/3	26.3	14.69	-
D1/19/3	11.9	19.21	-
D2/19/3	3.4	36.16	-
D1/21/3	6.4	30.51	Outo-immuniteit
D6/29/4	1.5	167.24	-
D7/29/4	3.9	75.71	-
D8/29/4	11.1	45.20	-
D9/29/4	10.5	83.62	-
D10/29/4	6.2	71.19	-
D11/29/4	14.5	71.19	-
D12/29/4	12.5	37.29	-
D13/29/4	7.7	82.49	-
D14/29/4	16.8	73.45	-
D15/29/4	10.3	76.84	-
D16/29/4	13.8	13.40	Epanutin
D1/25/5	7.7	20.80	Epanutin
D2/29/5	6.6	31.64	-
D3/29/5	10.3	74.58	-
D1/10/6	4.8	93.79	-
D2/10/6	18.0	44.07	-
D3/10/6	7.0	56.50	-
D1/12/6	6.3	81.36	Epanutin
D1/17/6	8.4	45.20	Colchicine
D1/24/6	3.5	47.46	Epanutin

TABEL 14 KONTROLEGROEP (vervolg)

MONSTER	KREATINIEN (mmol/l)	DOC/KREATINIEN (mmol/mmol)	MEDIKASIE EN ANDER FAKTORE
D1/26/6	16.1	29.38	-
Dtoets	8.0	20.34	-
D1/20/9	12.4	75.71	-
D2/20/9	9.3	62.15	-
D3/20/9	8.6	117.52	Homeopatiese geneesmiddel
D4/20/9	6.5	56.50	-
D5/20/9	17.9	42.94	-
D6/20/9	5.6	100.57	-
D7/20/9	5.0	75.71	Normopress
D8/20/9	9.3	29.38	-
D9/20/9	7.2	80.23	-
D10/20/9	9.3	85.88	-
D11/20/9	11.8	39.55	-
D12/20/9	13.4	57.63	-
D13/20/9	14.0	59.89	Medikasie
D14/20/9	23.0	48.59	-
D15/20/9	25.1	42.94	-
D16/20/9	20.9	45.20	-
D17/20/9	12.0	49.72	-
D18/20/9	13.6	92.66	-
D19/20/9	19.5	70.06	-
D20/20/9	20.9	67.80	-
D21/20/9	20.7	49.72	-
D22/20/9	16.0	101.70	-
D23/20/9	17.0	6.33	Noroxin
D24/20/9	10.5	89.27	-
D25/20/9	23.7	88.14	-
D26/20/9	14.1	92.66	-
D27/20/9	12.6	93.79	-
D28/20/9	9.7	87.01	-
D29/20/9	13.8	83.62	Tagamet
D30/20/9	16.8	115.26	-
D31/20/9	11.4	40.68	-
D32/20/9	15.6	41.81	Ritalin
D33/20/9	26.5	30.51	-
D34/20/9	5.9	67.80	-
D35/20/9	7.7	105.09	-
D36/20/9	7.4	91.53	-
D37/20/9	2.4	132.21	-
D38/20/9	7.8	88.14	-
D39/20/9	16.3	49.72	-
D40/20/9	24.3	50.85	-
D41/20/9	5.7	88.14	-
D42/20/9	13.9	41.81	-
D43/20/9	6.1	81.36	-
D44/20/9	12.8	56.50	-
D45/20/9	19.8	87.01	-
D46/20/9	9.7	65.54	Swanger

TABEL 14 KONTROLEGROEP (vervolg)

MONSTER	KREATINIEN (mmol/l)	DOC/KREATINIEN (mmol/mmol)	MEDIKASIE EN ANDER FAKTORE
D47/20/9	24.0	20.34	-
D48/20/9	17.5	51.98	Medikasio
D49/20/9	11.2	54.24	-
D50/20/9	11.0	46.33	-
D51/20/9	13.9	21.47	-
D52/20/9	19.8	115.26	-
D53/20/9	8.7	20.34	-
D54/20/9	1.6	84.75	Medikasio
D55/20/9	9.0	79.10	-
D56/20/9	5.8	83.62	Asma
D57/20/9	9.4	76.84	Asma
D58/20/9	8.3	31.64	-
D59/20/9	3.0	27.12	Medikasio
D60/20/9	7.4	37.29	-
D61/20/9	5.5	44.07	Medikasio

TABEL 15 PASIËNTGROEP

MONSTER	KREATINIE (mmol/l)	DOC/KREATINIE (mmol/mmol)	DIAGNOSE
BRO	2.04	201.14	Hiperlisienemie
BU	13.10	99.44	PKU
BW	6.99	83.62	Xantienoksidase defek
DI	3.72	162.72	Puriennukleosiedfosforilase defek
6	2.83	491.55	3-ketotiolase defek
DVS	0.97	181.93	Hartnup se Sindroom
DVS	0.53	179.67	Hartnup se Sindroom
1	1.50	167.24	3-ketotiolase defek
MG	1.15	127.69	3-OH-3-metielglutaarsuururie
EM	1.42	184.19	Etielmalonieladiapiensuururie
EM	1.15	213.57	Etielmalonieladiapiensuururie
EVR	0.80	189.84	3-Metielglutakoniensuururie Tipe I
EVR	8.94	129.95	3-Metielglutakoniensuururie Tipe I
B	0.18	246.34	MCAD
PK	0.97	247.67	Piruvaatkarboksilase defek
7	2.74	138.99	Laktiese asidose
2	1.50	176.28	3-ketotiolase defek
SU	0.53	193.23	Sistienurie
IB	0.97	129.95	3-OH-isobottersuurdehidrogenase defek
8	0.80	105.09	Laktiese asidose
JG	23.01	93.79	3-OH-isobottersuurdehidrogenase defek
JG	0.80	201.14	3-OH-isobottersuurdehidrogenase defek
LC	0.62	327.70	LCAD
F252	0.71	420.36	Metielmaloonsuururie
9	0.80	474.60	Laktiese asidose
HD	12.21	160.46	Histidienemie
10	0.53	129.95	Laktiese asidose
CAE	0.53	105.09	Meervoudige karboksilase defek
ME	1.59	150.29	Meervoudige karboksilase defek
11	0.53	239.56	Laktiese asidose
ST	1.59	99.44	Sistienurie
JH	2.48	128.82	Glutaarsuururie Tipe I
JH	1.68	39.55	Glutaarsuururie Tipe I
JH	3.45	99.44	Glutaarsuururie Tipe I
SUR	1.68	32.77	Sistienurie
3	2.48	172.89	3-ketotiolase defek
12	0.80	98.31	Laktiese asidose
HL	1.77	196.62	Hiperlisienemie
4	3.45	148.03	3-ketotiolase defek
13	1.15	117.52	Laktiese asidose
KN	2.92	185.32	Metielmaloonsuururie
PKU	2.17	204.53	PKU
DJvdK	5.22	206.79	Sitrullienemie
DJvdK	7.43	123.17	Sitrullienemie
IV	12.48	125.43	Isovaleriaansuururie
IV	5.31	204.53	Isovaleriaansuururie
IV	7.43	127.69	Isovaleriaansuururie
IV	10.35	229.39	Isovaleriaansuururie

TABEL 15 PASIËNTGROEP (vervolg)

MONSTER	KREATINIE (mmol/l)	DOC/KREATINIE (mmol/mmol)	DIAGNOSE
S	0.53	292.80	3-ketotiolase defek
LAU	0.71	297.19	Glutaarsuururie Tipe II
MO	0.80	138.99	MSUD
MAH	0.18	427.14	Meervoudige karboksilase defek
MAN	2.74	210.18	Prolidase defek
14	2.21	127.69	Laktiese asidose
ME	1.68	172.89	Glutaarsuururie Tipe II
MK	6.02	116.39	3-Metielkrotonielglisienurie
MO	1.33	249.73	MSUD
MCK	0.80	145.77	Histidienemie
NKO	2.39	155.94	Meervoudige karboksilase defek
O	0.53	175.15	Isovaleriaansuururie
RG	1.68	658.79	Piroglutamienuria
15	5.13	206.79	Laktiese asidose
S	0.35	136.73	Isovaleriaansuururie
S	1.06	196.62	Isovaleriaansuururie
SA	3.36	87.01	PKU
SIB	7.61	116.39	Meervoudige karboksilase defek
SM	4.69	22.60	Metielmaloonsuururie
SM	5.40	88.14	Metielmaloonsuururie
TAY	1.33	206.79	Piruvaatdehydrogenase defek
VEN	0.44	223.74	3-Metielglutakoniensuururie Tipe II
W	1.33	98.31	Glutaarsuururie Tipe II
SIS	0.35	155.94	Sistienurie
WB	4.60	331.09	Propioonsuururie
WB	0.44	1144.69	Propioonsuururie
WB	1.50	157.07	Propioonsuururie
WB	6.02	411.32	Propioonsuururie
WB	1.59	1050.90	Propioonsuururie
WB	0.71	203.40	Propioonsuururie
WB	0.71	232.78	Propioonsuururie
WB	5.93	395.50	Propioonsuururie
WB	2.30	303.97	Propioonsuururie
RB	3.41	93.79	Isovaleriaansuururie
XX	2.39	183.06	Asetoasetaattiolase defek
M	1.18	206.79	PKU
T	2.74	155.92	PKU

LYS VAN AFKORTINGS

$C_8H_5KO_4$	kaliumwaterstofftalaat
DOC	opgeloste organiese koolstof
FAB-MS	vinnige atoombombardement-massaspektrometrie
GC-MS	gaschromatografie-massaspektrometrie
GGK	geaktiveerde granulêre koolstof
HPLC	hoë-druk vloeistofchromatografie
KoA	koensiem-A
$K_2S_2O_8$	kaliumperoksidisulfaat
KV	koëffisiënt van variasie
LCAD	langketting asiel-KoA-dehidrogenase defek
MCAD	mediumketting asiel-KoA-dehidrogenase defek
MSUD	Maple Syrup Uriensiekte
NMR	kernmagnetiese resonansie
PKU	fenielketonurie
SCAD	kortketting asiel-KoA-dehidrogenase defek
TOK	totale opgeloste koolstofmateriaal
UV	ultraviolet

BEDANKINGS

Ek wil eerstens my Hemelse Vader dank daarvoor dat ek die geleentheid en die vermoë ontvang het om hierdie studie te kon voltooi. Sonder Sy leiding, kon ek dit nie gedoen het nie.

Louis, my man, het ook 'n groot dankie nodig. Hy moes geduldig luister en moed inpraat en moeilik-wees hanteer. Jy het dit wonderlik gedoen!!

Sonder die hulp en leiding van Mnr Japie Mienie en Prof Wouter de Wet, sou hierdie studie ook nie kon geslaag het nie. Ons drie het baie ure spandeer aan die beplanning en verandering van ALLES!! maar dit is nou klaar. Baie, baie dankie.

Mike Steytler en Lettie Visser, wat my taalversorging gedoen het, het 'n groot werk gehad. Dankie vir julle moeite en die oor en oor lees.

Byna 'n groter werk was dié van Lynnette Braack, wat die finale tik en uitleg gedoen het. Baie dankie vir die moeite en goeie eindprodruk.

Aan Ronnie van Steenderen van die WNNR en Henning Els van Lektratek, dankie vir die ondersteuning. Henning het altyd 'n glimlag en 'n vriendelike woord gehad, dit maak nie saak wat die probleem was nie.

Ek wil dan ook vir my pa, ma, susters en skoonfamilie dankie sê vir die belangstelling en ondersteuning. Sonder sulke mense, kan mens nie rekóm nie. Dankie ook aan my ouers dat ek hulle rekenaar so lank ge-"hijack" het.

LITERATUURLYS

BEAUDET, A.L., SCRIVER, C.R., SLY, W.S., VALLE, D., COOPER, D.N. McKUSICK, V.A. & SCHMIDKE, J. Genetics and Biochemistry of Variant Human Phenotypes. p3-53. (in SCRIVER, C.A., BEAUDET, A.L., SLY, W.S. & VALLE, D. (1989). The Metabolic Basis of Inherited Disease. 6th ed. McGraw-Hill Information Services Company, New York. 3006pp).

BICKEL, H., BACHMANN, C., BECKERS, R., BRANDT, N.J., CLAYTON, B.E., CORRADO, G., FEINGOLD, H.G., GIARDINI, O., HAMMERSTEIN, G. & SCHÖNBERG, D. (1981). Neonatal mass screening for metabolic disorders. European Journal of Pediatrics 137, 133-139.

BLOM, W., HUUMANS, J.G.M. & VAN DER BERG, G.B. (1989). A clinical biochemist's view of the investigation of suspected inherited metabolic disease. Journal of Inherited Metabolic Disease 12 suppl 1, 64-88.

BOTHA, A. & UECKERMAN, J. (1990). Rapid screening method for metabolic diseases. Seed fund report. Project number 670/29371.

BURTON, B.K. (1987). Inborn errors of metabolism. The clinical diagnosis in early infancy. Pediatrics 79 no. 3, 359-369.

CANN, N., KRUGER, N., KNOLL, D.P., WILLEMSE, R., ERASMUS, E. & MIENIE, L.J. (1991). Screening for metabolic defects in South Africa. Poster for 10th Annual South African Biochemical Society Congress, Pietermaritzburg.

CHALMERS, R.A. & LAWSON, A.M. (1982). Organic acids in man Analytical chemistry, biochemistry and diagnosis of the organic acidurias. Chapman and Hall, London, 372-376.

CONSOLAZIO, C.F., JOHNSON, R.E. & PECORA, L.J. (1963). Physiological Measurements of Metabolic Functions in Man. McGraw-Hill Book Company, New York, p453.

CRISTOFIDES, J.A., EFFERTON, M., HOLLAND, L.J. & DAWKINS, S.J. ed. Urine Specimens : Hormones. (in SALWAY, J.G. ed. (1990). Drug-Test Interactions Handbook. Chapman & Hall Medical, London, 924-927, 929-933).

DIVREY, P., VIANEY-LIAUD, C.N., COTTE, J. (1987). Routine gas chromatographic - Mass spectrometric analysis of urinary organic acids. Revolts over a 3 year period. Biomedical and environmental mass spectrometry. 14, 663-668.

DURAN, M., GOMPERTZ, D., BRUINGIS, L., KETTING, D., WADMAN, S.K. (1978). The variability of metabolite excretions in propionic acidemia. CLIN, CHIM, ACTA, 82, 93-99.

DURAN, M. & WADMAN, S.K. Organic Acidurias. (in ALBERTI, K.G.M.M. & PRICE, C.P. ed. (1981). Recent Advances in Clinical Biochemistry No. 2. Churchill & Livingstone, Edinburgh, 103-127).

GIUGLIANI, R., DUTRA-FILHO, C.S., BARTH, M.L., DUTRA, J.C., WAJNER, M., WANNMACHER, C.M.D. & MONTAGNER, L.T. (1989). Inborn errors of metabolism Sensitivity of screening tests in high risk patients. Clinical Pediatrics 28 no. 11, 494-497.

GRAGEL, R.A., LAM, K.F., SCULLY, K.J. & HSIA, Y.E. (1977). Genetic complementation of propionyl-CoA carboxylase deficiency in cultured fibroblast. American Journal of Human Genetics 29, 378-388.

GUYTON, A.D. Disorders of the kidneys and urinary tract. p103-130. (in GORNALL, A.G. ed. (1986). Applied biochemistry of clinical disorders. Harper & Row Publishers, Hagerstown.)

HOLLAND, J.F., LEARY, J.J. & SWEeley, C.C. (1986). Advanced instrumentation and strategies for metabolic profiling. Journal of Chromatography 379, 3-26.

HOLTON, J.B. (1988). Neonatal screening for biochemical disorders. British Journal of Hospital Medicine April, 317-324.

HOLTZMAN, N.A. (1978). Newborn screening for inborn errors of metabolism. Pediatric clinics of North America 25 no. 3, 411-423.

JAFFE, M. (1886). Über den Niederschlag welchen Pikrinsäure in normalen Harn erzeugt and Über eine neue Reaktion des Kreatinins. Z. Physiol. Chem. 10 no. 391.

JOHNSON, J.L. & WADMAN, S.K. Molybdenum cofactor deficiency. p1463-1475. (in SCRIVER, C.A., BEAUDET, A.L., SLY, W.S. & VALLE, D. (1989). The Metabolic Basis of Inherited Disease. 6th ed. McGraw-Hill Information Services Company, New York. 3006pp)

LEHNERT, W. & NIEDERHOFF, H. (1984). Seven years of experience with selective screening for organic acidurias. European Journal of Pediatrics 142, 208-210.

LEVY, H.L. Disorders of histidine metabolism. p563-576. (in SCRIVER, C.A., BEAUDET, A.L., SLY, W.S. & VALLE, D. (1989). The Metabolic Basis of Inherited Disease. 6th ed. McGraw-Hill Information Services Company, New York. 3006pp).

KURTZMAN, N.A. (1974). A handbook of urinalysis and urinary sediments. Charles C. Thomas, Springfield, 103pp.

McMURRAY, W.C. (1977). Essentials of Human Metabolism The Relationship of Biochemistry to Human Physiology and Disease. Harper & Row Publishers, Hagerstown, 308pp.

NEWSHOLME, E.A. & START, C. (1973). Regulation in Metabolism. John Wiley & Sons, London, 349pp.

NYHAN, W.L. & SAKATI, N. Galactosemia. p30-32. (in Genetic and Malformation Syndromes in Clinical Medicine. (1976). Year Book Medical Publishers, Chicago, 198pp.)

PLUMMER, D.T. (1978). An introduction to practical biochemistry. 2nd ed. McGraw-Hill Book Company, London, p144.

ROSENBERG, L.E. & FENTON, W.A. Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. p821-844. (in SCRIVER, C.A., BEAUDET, A.L., SLY, W.S. & VALLE, D. (1989). The Metabolic Basis of Inherited Disease. 6th ed. McGraw-Hill Information Services Company, New York. 3006pp).

SARDHARWALLA, I.B. & WRAITH, J.E. (1989). A clinicians view of the mass screening of the newborn for inherited diseases Current practice and future consideration. Journal of Inherited Metabolic Diseases 12 suppl.1, 55-63.

SAUDUBRAY, J.M., NARCY, C., LYONNET, L., BONNEFONT, J.P., POLL THE, B.T. & MUNNICH, A. (1990). Clinical approach to inherited metabolic disorders in neonates. Biol. Neonate 58 suppl.1, 44-53.

STEVENS, M.B., RIGILANO, J.C. & WILSON, C.C. (1988). State screening for metabolic disorders in newborns. AFP 37 no. 4, 223-228.

SWEETMAN, L. Branched chain organic acidurias. (in SCRIVER, C.A., BEAUDET, A.L., SLY, W.S. & VALLE, D. (1989). The Metabolic Basis of Inherited Disease. 6th ed. McGraw-Hill Information Services Company, New York. 3006pp).

TIWARY, C.M. (1987). Proposed guidelines for screening of metabolic and endocrine diseases of dependent neonates of the U.S. Armed Forces. Clinical Pediatrics 26 no. 7, 349-354.

VAN STEENDEREN, R.A. (1979). Automated procedures for determining dissolved organic carbon and halogenated organic compound concentrations in surface waters. Proefschrift (D.Sc) Universiteit van Pretoria.

VAN STEENDEREN, R.A., BASSON, W.D. & VAN DUUREN, F.A. (1979). Automated chemical analysis for measuring microgram levels of organic carbon in potable waters. Water Research 13, 539-543.

WHITE, A., HANDLER, P., SMITH, E.L., HILL, R.L. & LEHMAN, I.R. (1978). Principles of Biochemistry. 6th ed. McGraw-Hill Kogakusha, Ltd., Tokyo, p1064-1084

ZUBAY, G.P. (1986). Biochemistry. The Benjamin-Cummings Publishing Co., Inc., New York, 1268pp.

