

PEWUJUDAN DAN PENGESAHAN KAEDAH PENYARINGAN BAGI
PENYAKIT GALAKTOSEMIA KLASIK DI KALANGAN
BAYI YANG MENGALAMI JAUNDIS



AFFANDI BIN OMAR

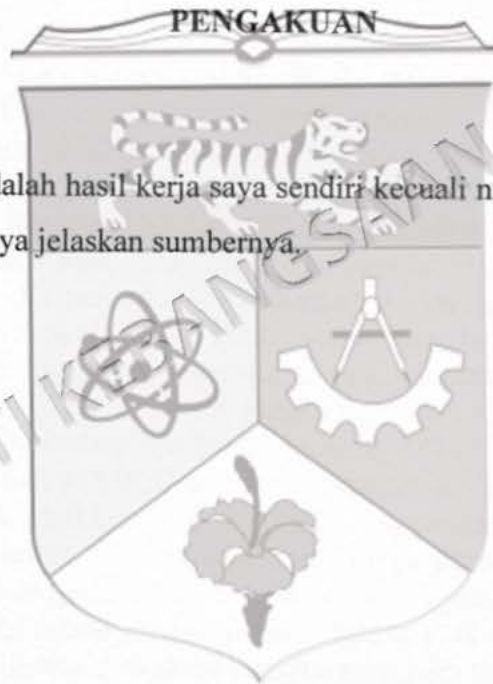
PPPUKM



TESIS YANG DIKEMUKAKAN UNTUK MEMPEROLEH IJAZAH
SARJANA SAINS PERUBATAN



FAKULTI PERUBATAN
UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA
KUALA LUMPUR



Saya akui karya ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan dan ringkasan yang setiap satunya telah saya jelaskan sumbernya.

30 Ogos 2012

AFFANDI BIN OMAR
P41122

PENGHARGAAN

Syukur Alhamdulillah kepada Allah S.W.T kerana memberikan saya kesihatan yang cukup, masa dan kematangan fikiran untuk menyiapkan kajian ini dalam bentuk sebegini rupa. Jutaan terima kasih yang rasanya tidak mampu saya balas kembali hingga ke akhir hayat kepada penyelia utama Dr. Zakiah Jubri@Mohd Zufri, Jabatan Biokimia, Fakulti Perubatan, Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM), di atas bantuan yang begitu besar, bimbingan, teguran dan nasihat yang begitu berguna sepanjang kajian ini. Tidak lupa juga kepada penyelia bersama saya iaitu Dr. Zabedah Md Yunus, Ketua Unit Biokimia, Unit Biokimia, Pusat Diagnostik Khas, Institut Penyelidikan Perubatan (IMR) dengan kepakaran dan bimbingan yang banyak membantu menguatkan lagi semangat saya untuk menyiapkan kajian ini. Terima kasih juga saya ucapkan kepada Jabatan Perkhidmatan Awam (JPA) di atas Hadiah Latihan Persekutuan (Separa Penuh) yang banyak membantu dari segi kewangan pada awal kajian ini.

Banyak data bagi penulisan ini telah diperolehi dari IMR. Saya ingin merakamkan ucapan penghargaan yang tidak terhingga kepada mantan Ketua Pengarah Kesihatan, Tan Sri Dato' Dr. Ismail Merican; Ketua Pengarah Kesihatan, Dato' Dr. Hasan bin Abdul Rahman; Timbalan Ketua Pengarah Kesihatan (Penyelidikan dan Sokongan Teknikal), Dato' Dr. Maimunah bt A. Hamid dan Pengarah IMR, Dr Shahnaz Murad di atas kebenaran yang diberikan untuk menjalankan kajian ini. Tidak dilupakan juga kepada Sekretariat Institut Kesihatan Kebangsaan (NIH), Kementerian Kesihatan Malaysia melalui Jawatankuasa Pemantauan Projek Penyelidikan IMR yang memberikan peruntukan untuk menjalankan kajian ini. Ucapan setinggi-tinggi penghargaan kepada pegawai-pegawai dan kakitangan di dalam Unit Biokimia, Pusat Diagnostik Khas terutama kepada Puan Dayang Pertiwi, Puan Norashareena Mohd Shakrin, JTMP Rosliza Daapit, JTMP Siti Rozilah Abdul Kadir dan JTMP Hema a/p Arunagiri di atas bantuan dan sokongan yang tidak berbelah bahagi. Begitu juga pegawai dan kakitangan yang bertanggungjawab terhadap sumber maklumat di perpustakaan IMR. Penghargaan juga dibuat ke atas para pensyarah, pelajar serta kakitangan di Jabatan Biokimia, Fakulti Perubatan, Universiti Kebangsaan Malaysia di atas pertolongan secara langsung atau tidak langsung. Sekalung penghargaan juga tidak saya lupakan buat Cik Emilia Zainal Abidin yang telah banyak memberi input dari segi data dan maklumat terkini dari luar negara.

Akhir sekali, kajian ini tidak mungkin dapat disiapkan tanpa sokongan, dorongan dan kekuatan daripada ahli keluarga terutama ibu dan bapa yang dikasihi, Jamayah Yahya dan Omar Puyun, serta isteri dan anak yang tercinta, Imilia binti Ismail dan Aira Insyirah. Buat rakan karib saya, Mohd Nasrul bin Che' Hussin, Mohd Faizal bin Lampam dan Aziz bin Tahir, terima kasih atas kritikan, teguran dan pertolongan yang tidak terhingga. Hanya Allah S.W.T yang mampu membalas jasa dan pertolongan kalian.

ABSTRAK

Galaktosemia klasik adalah penyakit yang disebabkan kekurangan enzim galaktosa-1-fosfat uridil transferase (GALT) dan mempunyai simptom jaundis dan septisemia. Tujuan kajian ini adalah untuk mewujudkan dan mengesahkan kaedah penyaringan galaktosemia klasik melalui asai galaktosa jumlah (TG) dan GALT dalam tompok darah kering. Pengesanan dan perakuan kaedah dibuat ke atas kedua-dua asai sebelum julat rujukan dibentuk daripada bayi normal. Penyaringan dilakukan terhadap bayi yang jaundis menggunakan kedua-dua asai tersebut sebelum ujian diagnostik dan nilai prevalen dikira. Keputusan pengesanan asai TG mendapati piawainya tidak linear; purata kepersisan ialah 8.27% (kebolehlulangan) dan 6.61% (kebolehhhasilan semula); had pengosong, had pengesanan biologi dan had pengiraan masing-masing 91, 157 dan 188 $\mu\text{mol/L}$; ketepatan ialah +8.9% (bias) dan 107.3% (kembaliannya semula). Kajian gangguan mendapati glukosa dan asid askorbik mengganggu TG ($p < 0.05$). Perbandingan kaedah asai TG dengan kit komersil mendapati pekali korelasi Spearman, pekali penentuan dan regresi Deming ialah masing-masing 0.639, 0.685 dan $y = 0.8741x + 165.4728$ iaitu terdapat perhubungan yang sederhana tetapi signifikan ($p = 0.000$). Keputusan 100% memuaskan dicapai dalam perbandingan antara makmal. Perakuan kaedah GALT pula mendapati kelinearan dicapai, purata kepersisan ialah 4.89% (kebolehlulangan) dan 10.25% (kebolehhhasilan semula), had pengesanan dan had pengiraan ialah 0.323 dan 0.91 U/g Hb. Julat rujukan dan had pemutus teratas asai TG ialah 4–482 $\mu\text{mol/L}$ dan 528 $\mu\text{mol/L}$ manakala bagi asai GALT ialah 2.4–6.1 U/g Hb dan 1.4 U/g Hb (had pemutus terendah). Sistem kawalan kualiti dalaman kedua-dua asai memuaskan. Seramai 5313 bayi yang mengalami jaundis telah disaring. Gabungan dua asai ini sebagai kaedah penyaringan mencatatkan kesensitifan (100%) dan kespesifikan (99.9%) yang tinggi. Nilai anggaran positif dan negatif mencatatkan 50% dan 100%. Nisbah kebolehjadian positif dan negatif ialah 5312 dan 0. Kawasan di bawah lengkung ciri operasi penerima adalah 0.997 bagi asai TG dan 0.993 bagi asai GALT. Kadar prevalens ialah 0.02%. Kesimpulannya, kaedah saringan galaktosemia klasik berjaya diwujudkan dan disahkan serta mampu menyaring penyakit ini secara tepat dan berkesan.

ESTABLISHMENT AND VALIDATION OF METHODS FOR SCREENING OF CLASSICAL GALACTOSEMIA AMONG JAUNDICED BABIES

ABSTRACT

Classical galactosemia is caused by deficiency of galactose-1-phosphate uridyl transferase (GALT) with symptoms of jaundice and septicaemia. The objective of this study was to establish and validate screening methods for classical galactosemia among jaundiced babies using total galactose (TG) and GALT assay in dried blood spots. Method validation and verification were carried out for both assays and reference ranges were obtained from normal babies. Screening among jaundiced babies was conducted using TG and GALT assay before diagnostics tests and prevalence calculated. Validation results showed non linearity in TG calibrators with precision of 8.27% (repeatability) and 6.61% (reproducibility). Limit of blank, detection and quantitation were 91, 157 and 188 $\mu\text{mol/L}$ respectively. Accuracy were +8.9% (bias) and 107.3% (recovery). Interference study demonstrated that glucose and ascorbic acids interfered with TG assay ($p < 0.05$). Comparison TG assay with commercial kit showed that Spearman correlation coefficient, coefficient determination and Deming regression were 0.639, 0.685 and $y = 0.8741x + 165.4728$ suggesting moderate yet significant relationship ($p = 0.000$). Result of 100% satisfactory was achieved in the inter laboratory comparison study. Verification for GALT assay found that linearity was achieved; precision were 4.89% (repeatability) and 10.25% (reproducibility) and limit of detection and quantitation were 0.323 and 0.91 U/g Hb respectively. Reference ranges and upper cut-off for TG assay were 4 – 482 $\mu\text{mol/L}$ and 528 $\mu\text{mol/L}$ while for GALT assay were 2.4 – 6.1 U/g Hb and 1.4 U/g Hb (lower cut-off). Internal quality control for both assays showed satisfactory results. A total of 5313 jaundiced babies were screened. Combination of TG and GALT assay as screening methods produced high sensitivity (100%) and specificity (99.9%). Positive and negative predicted values showed 50% and 100% respectively. Positive and negative likelihood ratio were 5312 and 0. Area under the receivers' operating characteristics curve showed 0.997 for TG assay and 0.993 for GALT assay. Prevalence was calculated as 0.02%. In conclusion, methods for determination of classical galactosemia have been successfully established and validated hence, screening for this disease was found to be effective and accurate.

KANDUNGAN

	Halaman
PENGAKUAN	ii
PENGHARGAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KANDUNGAN	vi
SENARAI JADUAL	xi
SENARAI ILUSTRASI	xii
SENARAI SIMBOL	xiii
SENARAI SINGKATAN	xiv

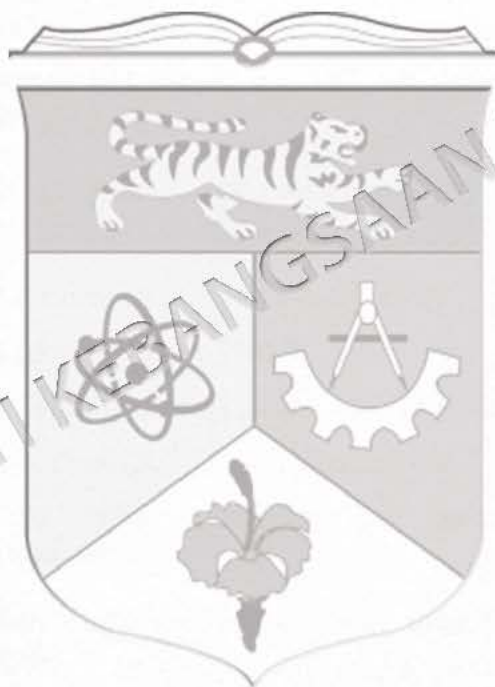
BAB I	PENDAHULUAN	1
1.1	Pengenalan	1
1.2	Objektif Kajian	3
	1.2.1 Objektif umum	3
	1.2.2 Objektif khusus	3
1.3	Hipotesis	4
BAB II	KAJIAN PERPUSTAKAAN	5
2.1	Galaktosemia	5
	2.1.1 Metabolisme galaktosa	6
	2.1.2 Tapak jalan alternatif	8
	2.1.3 Galaktosemia klasik	10
	2.1.4 Profil biokimia bagi Galaktosemia Klasik	12
	2.1.5 Rawatan	13
	2.1.6 Penyaringan Galaktosemia Klasik	14
	2.1.7 Pemilihan kaedah ujian (<i>test method selection</i>)	19
2.2	Pengesahan dan Perakuan Kaedah	21
	2.2.1 Pemilihan kaedah	21
	2.2.2 Pengesahan kaedah analisis	22
	2.2.3 Perakuan kaedah	25
	2.2.4 Perbezaan di antara pengesahan dan perakuan kaedah	25

2.3	Julat Rujukan	27
	2.3.1 Pemilihan sampel populasi	27
	2.3.2 Pengiraan/penentuan julat rujukan	28
2.4	Analisis Ujian Diagnostik	28
BAB III	BAHAN DAN KAEDAH	30
3.1	Bahan Kimia	30
	3.1.1 Ujian asai galaktosa jumlah	30
	3.1.2 Ujian asai GALT	30
	3.1.3 Kajian gangguan	31
	3.1.4 Kajian perbandingan kaedah	31
3.2	Alat Radas	31
	3.2.1 Penyediaan piawai tempok darah kering dan kawalan kualiti dalaman bagi asai galaktosa jumlah	31
	3.2.2 Ujian asai galaktosa Jumlah	32
	3.2.3 Ujian Asai GALT	32
3.3	Metodologi	33
	3.3.1 Reka bentuk eksperimen	33
	3.3.2 Subjek kawalan normal	35
	3.3.3 Subjek populasi saringan	36
	3.3.4 Penyediaan sampel tempok darah kering	37
3.4	Kaedah	37
	3.4.1 Ujian asai galaktosa jumlah	37
	3.4.2 Ujian asai GALT	39
	3.4.3 Pengesanan kaedah asai galaktosa jumlah	40
	3.4.4 Perakuan kaedah asai GALT	45
	3.4.5 Perbandingan kaedah asai galaktosa jumlah dengan kit komersil	47
	3.4.6 Program kawalan kualiti dalaman	48
	3.4.7 Penentuan julat rujukan	48
	3.4.8 Ujian diagnostik	49
3.5	Analisis Statistik	50
BAB IV	HASIL	52
4.1	Kajian Pengesanan Kaedah Asai Galaktosa Jumlah	52
	4.1.1 Kelinearan julat operasi	52
	4.1.2 Had pengosong, had pengesanan biologi dan had pengiraan	52
	4.1.3 Kepersisan	55
	4.1.4 Ketepatan	55

4.1.5	Kajian gangguan	55
4.1.6	Perbandingan antara makmal	57
4.2	Kajian Perbandingan Kaedah Bagi Asai Galaktosa Jumlah dan Kit Komersil Galaktosa Jumlah Perkin Elmer	60
4.3	Kajian Perakuan Kaedah Asai GALT	62
4.3.1	Kelinearan julat operasi	62
4.3.2	Kepersisan	64
4.3.3	Had pengesanan dan had pengiraan	64
4.4	Penentuan Julat Rujukan	64
4.4.1	Analisis data populasi rujukan	64
4.4.2	Julat rujukan asai galaktosa jumlah	65
4.4.3	Julat rujukan asai GALT	65
4.5	Program Kawalan Kualiti Dalam	68
4.5.1	Asai galaktosa jumlah	68
4.5.2	Asai GALT	68
4.6	Penyaringan Galaktosemia	73
4.6.1	Demografik populasi saringan	73
4.6.2	Analisis ujian diagnostik bagi populasi saringan	75
4.6.3	Prevalens galaktosemia klasik	77
BAB V	PERBINCANGAN	80
5.1	Kajian Pengesanan Kaedah Asai Galaktosa Jumlah	80
5.1.1	Kelinearan julat operasi	80
5.1.2	Had pengosong, had pengesanan biologi dan had pengiraan	82
5.1.3	Kepersisan	84
5.1.4	Ketepatan	85
5.1.5	Kajian gangguan	86
5.1.6	Perbandingan antara makmal bagi asai galaktosa jumlah	88
5.2	Kajian Perbandingan Kaedah Asai Galaktosa Jumlah dan Kit Komersil Asai Galaktosa Jumlah Perkin Elmer	88
5.3	Kajian Perakuan Kaedah Asai GALT	91
5.3.1	Kelinearan julat operasi	91
5.3.2	Kepersisan	91
5.3.3	Had pengesanan dan had pengiraan	91
5.4	Penentuan Julat Rujukan	92

5.5	Program Kawalan Kualiti Dalam	95
5.6	Penyaringan Galaktosemia	97
	5.6.1 Analisis ujian diagnostik	97
	5.6.2 Prevalens galaktosemia klasik	99
BAB VI	RUMUSAN DAN PENUTUP	102
6.1	Rumusan dan Penemuan Kajian	102
6.2	Cadangan Kajian Lanjutan	103
RUJUKAN		105
LAMPIRAN		
A	Contoh lembaran maklumat mengenai projek ujian penyaringan galaktosemia	112
B	Contoh borang kebenaran	113
C	Contoh borang permohonan ujian penyaringan galaktosemia	114
D	Penyediaan piawai tompok darah kering bagi asai galaktosa jumlah	115
E	Penyediaan reagen asai galaktosa jumlah	118
F	Penyediaan reagen asai GALT	120
G	Penyediaan sampel gangguan bagi kajian gangguan	121
H	Penyediaan set kawalan kualiti dalaman asai galaktosa jumlah	124
I	Data analisis piawai galaktosa jumlah bagi had pengosong, had pengesanan biologi dan had pengiraan	125
J	Data kepersisan bagi asai galaktosa jumlah (kebolehulangan)	126
K	Data kepersisan bagi asai galaktosa jumlah (keboleh hasilan semula)	127
L	Data eksperimen bias dalam kajian ketepatan	128
M	Data eksperimen kembalian semula dalam kajian ketepatan	129
N	Analisis data kajian gangguan	130

O	Data analisis perbandingan kaedah bagi asai galaktosa jumlah dengan kit komersil galaktosa jumlah Perkin Elmer	132
P	Data had pengesanan dan had pengiraan bagi asai GALT	135
Q	Data julat rujukan bagi asai galaktosa jumlah	136
R	Data julat rujukan bagi asai GALT	138
S	Data ujian diagnostik bagi populasi saringan	140
T	Abstrak yang dibentangkan di Annual Scientific Meeting 2011, anjuran Malaysian Association of Clinical Biochemists, di Hotel Istana, Kuala Lumpur, pada 4 – 5 Julai 2011	141



SENARAI JADUAL

No. Jadual		Halaman
2.1	Perbezaan di antara pengesanan kaedah dan perakuan kaedah	26
3.1	Ringkasan Penyediaan Larutan Kerja Piawai Galaktosa Jumlah	41
3.2	Pendekatan yang diambil kira dalam analisis ujian diagnostik	49
3.3	Penerangan mengenai jadual 2x2 dalam analisis ujian diagnostik	50
4.1	Indeks kelinearan bagi piawai galaktosa jumlah	54
4.2	Keputusan had pengosong, had pengesanan biologi dan had pengiraan	54
4.3	Bahan gangguan yang mempengaruhi asai galaktosa jumlah	56
4.4	Ujian profisiensi asai galaktosa jumlah	58
4.5	Ujian profisiensi asai GALT	59
4.6	Indeks kelinearan bagi piawai aktiviti enzim GALT	63
4.7	Analisis deskriptif data populasi normal	66
4.8	Min dan sisihan piawai bagi aras berbeza dalam asai galaktosa jumlah	69
4.9	Taburan frekuensi faktor sosio demografik populasi saringan	74
4.10	Analisis deskriptif bagi populasi saringan	75
4.11	Analisis ujian diagnostik bagi populasi saringan	76
4.12	Profil individu disyaki positif galaktosemia klasik	78
5.1	Nilai julat rujukan bagi galaktosa jumlah	95

SENARAI ILUSTRASI

No. Rajah		Halaman
2.1	Metabolisme Galaktosa	7
2.2	Tapak Jalan Alternatif dalam Metabolisme Galaktosa	9
3.1	Reka Bentuk Kajian	34
4.1	Graf regresi linear bagi piawai galaktosa jumlah tompok darah kering	53
4.2	Plot residual bagi piawai galaktosa jumlah	53
4.3	Graf korelasi antara kaedah ujian dan kit komersil Perkin Elmer	61
4.4	Plot Bland-Altman bagi kaedah ujian melawan kit komersil Perkin Elmer	61
4.5	Graf regresi linear bagi piawai aktiviti GALT dalam tompok darah kering	62
4.6	Plot residual bagi piawai GALT	63
4.7	Histogram kepekatan galaktosa jumlah bagi populasi normal	67
4.8	Histogram aktiviti GALT bagi populasi normal	67
4.9	Carta Levey-Jennings KKD buatan sendiri bagi asai galaktosa jumlah	70
4.10	Carta Levey-Jennings KKD buatan luaran bagi asai galaktosa jumlah	71
4.11	Carta Levey-Jennings KKD bagi asai GALT	72
4.12	Lengkuk ciri operasi penerima bagi ketiga-tiga pendekatan	76
5.1	Struktur molekul glukosa dan galaktosa	86
5.2	Model aruhan asid askorbik terhadap peningkatan NADH	87

SENARAI SIMBOL

α	alfa
β	beta
%	peratus
$^{\circ}\text{C}$	darjah selsius
μL	mikroliter
$\mu\text{mol/L}$ atau μM	mikromol per liter atau mikromolar
n	bilangan sampel
rpm	putaran per minit
>	lebih daripada
<	kurang daripada
p	kebarangkalian
r	pekali korelasi
R^2	pekali penentuan
%CV	peratus pekali variasi
SD	Sisihan Piawai
mg/dL	miligram per desiliter
mL	mililiter
g	gram
U/g Hb	Unit per gram hemoglobin
\pm	tambah tolak
mm	milimeter
s	saat
N	Frekuensi

SENARAI SINGKATAN

ALP	Alkalin fosfatase (<i>Alkaline phosphatase</i>)
AUROC	Kawasan di bawah lengkung ciri operasi penerima (<i>Area under receivers' operating characteristics curve</i>)
CDC	Pusat Kawalan Penyakit (<i>Centre for Disease Control</i>)
Eurachem	Pertubuhan Kimia Analisis Eropah (<i>European Analytical Chemistry Organization</i>)
FD	Fruktosa dehidrogenase (<i>Fructose dehydrogenase</i>)
FI	Kecerahan bahan berpendaflour (<i>flourescence intensity</i>)
G6PD	Glukosa-6-fosfat dehidrogenase (<i>Glucose-6-phosphate dehydrogenase</i>)
GALE	Uridin difosfagalaktosa (UDP) 4'-epimerase (<i>Uridine diphosphogalactose-4'-epimerase</i>)
GALK	Galaktokinase (<i>Galactokinase</i>)
GALT	Galaktosa-1-fosfat uridil transferase (<i>Galactose-1-phosphate transferase</i>)
GDH	Galaktosa dehidrogenase (<i>Galactose dehydrogenase</i>)
GSD IV	Penyakit simpanan glikogen jenis IV (<i>Glycogen storage disease type IV</i>)
IEC	Suruhanjaya Antarabangsa bagi Elektroteknikal (<i>International Electrotechnical Commision</i>)
IEM	Penyakit Kepincangan Metabolisme Terwaris (<i>Inborn errors of metabolism</i>)

IMR	Institut Penyelidikan Perubatan (<i>Institute for Medical Research</i>)
ISO	Organisasi Piawaian Antarabangsa (<i>International Organization for Standardization</i>)
IUPAC	Pertubuhan Antarabangsa bagi Kimia Tulen dan Gunaan (<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
KKD	Kawalan Kualiti Dalam
LR	Nisbah kebolehdian (<i>Likelihood ratio</i>)
MSUD	Penyakit urin sirap maple (<i>Maple Syrup Urine Disease</i>)
NCCLS	Jawatankuasa Piawaian Makmal Klinikal Kebangsaan (<i>National Committee on Clinical Laboratory Standards</i>) atau dahulunya dikenali sebagai Institut Piawaian Makmal Klinikal (<i>Clinical Laboratory Standard Institute</i>)
NPV/PPV	Nilai Anggaran Negatif/Positif (<i>Positive/negative predicted value</i>)
PT	Pengujian Tahap Kecekapan Dalam Diagnosis Makmal (<i>Proficiency Testing</i>)
RM	Bahan piawai (<i>Reference Material</i>)
ROC	Lengkuk ciri operasi penerima (<i>Receiver's operating characteristics curve</i>)
S&S903	Schleicher dan Schnuell 903 (kertas turas)
SPSS	Perisian Statistik untuk Sains Sosial (<i>Statistical Packages for Social Sciences</i>)
TMS	Spektrometri Jisim Tandem (<i>Tandem Mass Spectrometry</i>)

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 PENGENALAN

Sumber makanan utama bagi bayi adalah susu. Susu mengandungi laktosa, sejenis disakarida yang terdiri daripada galaktosa dan glukosa. Glukosa adalah pembekal primer dalam menjana tenaga. Galaktosa pula perlu ditukarkan ke bentuk glukosa melalui tapak jalan metabolisme galaktosa kerana galaktosa tidak boleh digunakan sebagai sumber tenaga secara terus (Beutler 1991). Enzim-enzim yang terlibat dalam metabolisme galaktosa ialah galaktokinase (GALK), galaktosa-1-fosfat uridil transferase (GALT) dan uridin difosfogalaktosa-4'-epimerase (GALE). Galaktosemia terjadi akibat kekurangan salah satu enzim dalam metabolisme galaktosa menyebabkan penimbunan galaktosa, galaktosa-1-fosfat dan beberapa metabolit perantara (Berry et al. 1995). Profil biokimia akibat kepingangan dalam metabolisme galaktosa ini mengakibatkan peningkatan kepekatan abnormal yang tinggi bagi galaktosa dan metabolit-metabolitnya di dalam tisu badan dan cecair. Kesan peningkatan metabolit ini boleh membawa maut semasa peringkat bayi atau mengalami kesan jangka masa panjang seandainya bayi tersebut terselamat daripada maut.

Kekurangan GALT dikenali sebagai galaktosemia klasik. Ia merupakan galaktosemia yang paling kerap dikesan dan dilaporkan dalam jurnal perubatan dengan kadar prevalen dan insiden yang tinggi di sesetengah negara (Honeyman et al. 1993, Schweitzer-Krantz 2003 dan Bosch et al. 2005). Antara simptom galaktosemia klasik ialah kurang menyusu (*poor feeding*), kehilangan berat badan, muntah dan cirit-birit, keletihan (*lethargy*) dan hipotonia (*hypotonia*) yang biasa berlaku pada minggu pertama selepas kelahiran. Jaundis, hati yang tidak berfungsi (*liver dysfunction*), katarak dan

septisemia boleh dilihat semasa pemeriksaan fizikal. Kesemua simptom ini akan hilang sekiranya rawatan awal diberi sebaik sahaja diagnosis disahkan. Oleh yang demikian, penyaringan bayi baru lahir bagi galaktosemia klasik diperkenalkan di kebanyakan negara dan wilayah supaya rawatan awal dapat diberikan. Pelbagai kaedah penyaringan telah diperkenalkan sama ada penentuan metabolit galaktosa ataupun penentuan aktiviti GALT (Okano et al. 2000, Simonsen et al. 2001, Berry et al. 2010). Namun begitu, keputusan untuk melakukan penyaringan galaktosemia klasik bergantung kepada insidens dan prevalens penyakit ini yang dilaporkan berbeza mengikut kawasan (Holton et al. 2001). Kadar prevalens di Ireland adalah 1 dalam 10,000 – 20,000 (Honeyman et al. 1993) manakala di Jepun adalah 1:73,700 (Wada et al. 1984). Setakat ini tiada data prevalens dilaporkan bagi negara Malaysia.

Diagnosis untuk penyakit galaktosemia klasik di Malaysia bermula pada tahun 2001 apabila Institut Penyelidikan Perubatan (IMR) menggunakan kit komersil bagi penentuan galaktosa jumlah dan kit komersil penentuan aktiviti GALT keluaran Perkin Elmer untuk diagnosis klinikal galaktosemia klasik. Kedua-dua kaedah merupakan kaedah makmal yang paling cepat dan tepat dalam mendiagnosis galaktosemia klasik (Kementerian Kesihatan Malaysia 2001). Walaubagaimanapun, kit untuk penentuan galaktosa jumlah telah ditarik balik pada tahun 2003 dari pasaran kerana penggunaan bahan kimia berbahaya seperti logam berat merkuri dan zink oksida. Diagnosis galaktosemia klasik bergantung kepada kit penentuan aktiviti GALT yang mungkin membawa kepada keputusan positif yang palsu. Ini berikutan, aktiviti GALT dilaporkan menurun sekiranya terdedah kepada suhu dan kelembapan yang tinggi (Rhode et al. 1998). Tambahan pula, kos untuk kit komersil sama ada galaktosa jumlah atau aktiviti GALT yang mahal menyebabkan hanya bayi yang mempunyai risiko tinggi galaktosemia sahaja yang patut diuji. Ini menyebabkan ada kemungkinan bayi yang tidak menunjukkan simptom yang sama akan terlepas daripada didiagnosis.

Program penyaringan di beberapa negara menggunakan pendekatan yang berbeza sama ada menggunakan kaedah penentuan metabolit galaktosa dan galaktosa jumlah atau menentukan aktiviti GALT atau penggunaan kedua-duanya sekali.

Penyaringan galaktosemia klasik boleh dilakukan melalui kaedah penentuan galaktosa jumlah dan aktiviti GALT.

Sebelum keputusan untuk melakukan penyaringan penyakit galaktosemia klasik ini, langkah untuk mewujudkan suatu kaedah penentuan galaktosa jumlah dan penentuan aktiviti GALT dilihat sebagai suatu keperluan mendesak. Selain dapat mengurangkan kos pembelian kit komersil, kesensitifan dan kespesifikan kaedah penyaringan galaktosemia boleh ditentukan melalui kedua-dua kaedah.

1.2 OBJEKTIF KAJIAN

1.2.1 Objektif Umum

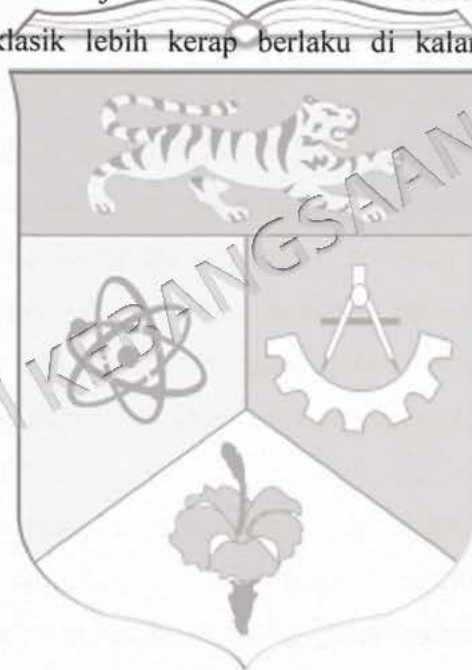
Mewujud dan mengesahkan kaedah penyaringan bagi penyakit galaktosemia klasik (kekurangan GALT) di kalangan bayi yang mengalami jaundis.

1.2.2 Objektif Khusus

1. Mewujud dan mengesahkan asai galaktosa jumlah di dalam tompok darah kering (*in-house reagent prepared method*).
2. Memperakukan asai GALT di dalam tompok darah kering melalui penggunaan kit komersil
3. Mengenal pasti unsur-unsur yang mengganggu asai galaktosa jumlah di dalam tompok darah kering dan implikasinya
4. Membandingkan asai galaktosa jumlah (kaedah penyediaan reagen dalaman) dengan kaedah kit komersil penentuan galaktosa jumlah oleh Perkin Elmer
5. Menentukan julat rujukan bagi asai galaktosa jumlah dan asai GALT yang diambil daripada bayi baru lahir yang normal
6. Menentukan prevalens galaktosemia klasik di kalangan bayi yang mengalami jaundis dengan menggunakan asai galaktosa jumlah dan asai GALT.

1.3 HIPOTESIS

1. Bahan yang mempunyai struktur atau sifat kimia yang sama atau hampir sama dengan molekul galaktosa tidak mengganggu asai galaktosa jumlah
2. Terdapat korelasi yang memuaskan di antara asai galaktosa jumlah (kaedah penyediaan reagen dalaman) dengan kaedah kit komersil penentuan galaktosa jumlah oleh Perkin Elmer
3. Kepekatan galaktosa jumlah dan aktiviti GALT di dalam populasi bayi yang normal dan sihat menunjukkan taburan normal/Gaussian
4. Galaktosemia klasik lebih kerap berlaku di kalangan bayi yang mengalami jaundis.



RUJUKAN

- Altman, D.G. & Bland, J.M. 1994. Diagnostic test 1: Sensitivity and Specificity. *British Medical Journal* 308: 1552.
- Altman, D.G. & Bland, J.M. 1994. Diagnostic test 2: Predicted Values. *British Medical Journal* 309: 102.
- Ashino, J., Okano, Y., Suyama, I., Yamazaki, T., Yoshino, M., Furuyama, J.I., & Lin, H.C. (1995). Molecular characterization of galactosemia (type 1) mutations in Japanese. *Human Mutation* 6(1): 36 – 43.
- Berry, G.T. & Segal, S. 1995. *Disorders of Galactose Metabolism*. Dlm Schiver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D. (pnyt.). *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. 7th edition. pg967 – 1000. New York: McGraw-Hill Medical Publishing.
- Berry, G.T., Li, Y., Ptolemy, A.S., Harmonay, L. & Kellog, M. 2010. Quantitation of galactose-1-phosphate uridylyltransferase enzyme activity by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clinical Chemistry*. 56(5): 772 – 780.
- Beutler, E. & Baluda, M.C. 1966. A simple spot screening test for galactosemia. *Journal of Laboratory & Clinical Medical* 68(1): 137 – 141.
- Beutler, E. 1991. Galactosemia: Screening and Diagnosis. *Clinical Biochemistry* 24: 293 – 300.
- Bland, J.M. & Altman D.G. 1986. Statistical Methods for Assessing Agreement Between Two Methods of Clinical Measurement. *Lancet*: 307 – 310.
- Bosch, A.M. 2006. Classical galactosaemia revisited. *Journal of Inherited Metabolism Disorder* 29: 516 – 525.
- Bosch, A.M., Ijlst, L. & Oostheim W. 2005. Identification of novel mutations in classical galactosemia. *Human Mutation* 25(5): 502.
- Chan, Y.H. 2003a. Biostatistics 101: Data Presentation. *Singapore Medical Journal* 44(6): 280 – 285.
- Chan, Y.H. 2003b. Biostatistics 102: Quantitative Data – Parametric and Non Parametric Tests. *Singapore Medical Journal* 44(8): 391 – 396.
- Chan, Y.H. 2003c. Biostatistics 104: Correlation Analysis. *Singapore Medical Journal* 44(12): 614 – 619.

- Chan, Y.H. 2004. Biostatistics 201: Linear Regression Analysis. *Singapore Medical Journal* 45(2): 55 – 61.
- Clague, A. & Thomas, A. 2002. Neonatal biochemical screening for disease. *Clinica Chimica Acta* 315: 99 – 110.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007. *CLSI LA4-A5: Blood Collection on Filter Paper for Newborn Screening Program; Approved Standard – Fifth Edition*. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Coleman, M. (2003). Method Evaluation and Preanalytical Variables. Dlm. Cockayne, S. & Anderson, S.C. (pnyt.). 2003. *Clinical Chemistry* 1st edition pg. 65 – 79. New York: McGraw Hill.
- EURACHEM Working Group. 1998. *The fitness for purpose of analytical methods: A laboratory guide to method validation and related topics*. Middlesex: EURACHEM Working Group.
- Fenton, J.C.B. 1965. The estimation of galactose-1-phosphate in red cells. *Clinica Chimica Acta* 11: 205 – 211.
- Freer, D.E., Ficicioglu, C. & Finegold, D. 2010. Newborn Screening for Galactosemia: A Review of 5 Years of Data and Audit of a Revised Reporting Approach. *Clinical Chemistry* 56(3): 437 – 444.
- Fridovich-Keil, J.L. 2006. Galactosemia: The good, the bad and the unknown. *Journal of Cellular Physiology* 209: 701 – 705.
- Fujimura, Y., Ishii, S., Kawamura, M. & Naruse, H. 1981. Microdetermination of galactose and galactose-1-phosphate in dried blood spots. *Analytical Biochemistry* 117: 187 – 195.
- Gitzelmann, R. & Auricchio, S. 1965. The handling of soya alpha galactosides by a normal and a galactosemic child. *Pediatrics* 36: 231.
- Goeppert, F. 1917. Galaktosurie nach Milchzuckergabe bei angeborenem, familiaerem chronischem leberleiden. *Berl Klin Wochenschr* 54: 473
- Holton, J.B., Walter J.H. & Tyfield, L.A. 2001. Galactosemia. Dlm. Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D. (pnyt.) *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. 8th Ed. Pg. 1553 – 1583. New York: McGraw-Hill.
- Honeyman, M.M., Green, A., Holton, J.B. & Leonard J.V. 1993. Galactosemia: Results of the British pediatric surveillance unit study, 1988 – 1990. *Archive of Disorder Child* 69: 339 – 341.

- Hong, S.P., Jeong, J.S., Kwon, H.J., Yoon, H.Y., Lee, Y.M. & Choi T.Y. 2008. A pulsed amperometric detection method of galactose-1-phosphate for galactosemia diagnosis. *Analytical Biochemistry* 376: 200 – 205.
- Hsiao, K.J. & Wu, K.D. 1986. Galactosemia detected by neonatal screening in Taiwan. *Taiwan I Hsueh Hui Tsa Chih* 85:S112 – 3.
- It-Koon Tan, Bani Gajra & Maria, S.F. Lim. 2006. Study of Inherited Metabolic Disorders in Singapore – 13 years experience. *Annals Academy of Medicine* 35(11): 804 – 813.
- Jinks, D.C., Vollmer, D., Orfanos, A. & Guthrie, R. 1987. An evaluation of a new test kit to screen for galactosemia. *Clinical Biochemistry* 20: 353 – 357.
- Kawamura, M., Fujimura, Y. & Naruse, H. 1982. Simultaneous Quantitative Estimation of Galactose-1-Phosphate and Galactose in Blood for the Diagnosis of Galactosemia. *Tohoku Journal of Experimental Medical*. 137: 289 – 295.
- Kaye, C.I. 2006. Newborn Screening Fact Sheets. *Pediatrics* 118: 934 – 963.
- Kementerian Kesihatan Malaysia. 2001. *IMR Annual Report*.
- Kirby, L.T., Norman, M.G., Applegarth, D.A. & Hardwick D.F. 1985. Screening of newborn infants for galactosemia in British Columbia. *Canada Medical Association Journal* 132:1033-1035.
- Kumar, R. & Indrayan, A. 2011. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve for Medical Reseachers. *Indian Pediatrics* 48:277-287.
- Lai, K., Langley, S.D., Singh, R., Dembure P.P., Hjelm, L.N. & Elsas, L.J. 1996. A prevalent mutation for galactosemia among Black Americans. *Journal of Pediatrics* 128: 89 – 95.
- Lai, K., Willis, A.C. & Elsas, L.J. 1999. The biochemical role of glutamine 188 in human galactose-1-phosphate uridylyltransferase. *Journal of Biology Chemistry* 274: 6559 – 66.
- Lehotay, D.C. 1993. Current controversies about galactosemia. *Clinical Biochemistry* 26: 69 – 74.
- Leslie, N.D. 2003. Insights into pathogenesis of galactosemia. *Annual Review of Nutrition* 23: 59 – 80.
- Low, L.C.K. 1996. Inborn Errors of Metabolism: Clinical Approach and management. *Hong Kong Medical Journal* 2(3): 274 – 281.

- Mandrekar, J.N. & Mandrekar, S.J. 2005. Statistical Methods in Diagnostic Medicine using SAS software. *SUGI 30 Proceedings 2005*. hlm. 1 – 8 (Kertas 211 – 30).
- Mason, H.H. & Turner, M.E. 1935. Chronic galactosemia. *American Journal of Disorder Children* 50: 359.
- Mathews, C.K., van Holde, K.E. & Ahern, K.G. 2000. Carbohydrate Metabolism I: Anaerobic Processes in Generating Metabolite Energy. Dlm Mathews, C.K., van Holde, K.E. & Ahern, K.G. *Biochemistry*. 3rd edition. pg467 – 468. San Francisco: Addison-Wesley Publishing Company.
- Misuma, H., Wada, H., Kawakami, M., Ninomiya, H. & Shohmori, T. 1981. Galactose and galactose-1-phosphate spot test for galactosemia screening. *Clinica Chimica Acta* 111: 27 – 32.
- Naidu, K.A. 2003. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutrition Journal* 2(7): 1 – 10.
- Naito, E., Ito, M., Matsuura, S., Yokota, I., Saijo, T., Ogawa, Y., Kitamura, S., Kobayashi, K., Saheki, T., Nishimura, Y., Sakura, N. and Kuroda, Y. 2002. Type II citrullinaemia (citrin deficiency) in a neonate with hypergalactosemia detected by mass screening. *Journal of Inherited Metabolism Disorder* 25: 71 – 76.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). 1995. *NCCLS C28-A: How to define and determine reference intervals in clinical laboratory*. Approved Guidelines. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). 1999a. *NCCLS EP5-A: Evaluation of precision performance of clinical chemistry devices*. Approved Guidelines. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). 1999b. *NCCLS EP17-P: Protocols for demonstration, verification, and evaluation of limits of detection and quantitation*. Approved Guidelines. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). 2001. *NCCLS EP6-P2: Evaluation of the linearity of quantitative analytical methods*. Approved Guidelines. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). 2002a. *NCCLS EP9-A2: Method Comparison and bias estimation using patient samples*. Approved Guidelines. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards.

- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). 2002b. NCCLS EP7-A: Interference testing in clinical chemistry. Approved Guidelines. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). 2004. NCCLS EP17-A: Protocols for Determination of Limits of Detection and Limit of Quantitation. Approved Guidelines. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- Okano, Y., Fujimoto, A., Miyagi, T., Isshiki, G. & Oura, T. 2000. Quantitative Beutler Test for newborn mass screening of galactosemia using a fluorometric microplate reader. *Clinical Chemistry* 46 (6): 806 – 810.
- Ono, H., Mawatari, H., Mizoguchi, N., Eguchi, T., Sakura, N. & Hamakawa, M. 1999. Transient galactosemia detected by neonatal mass screening. *Pediatrics International* 41: 281 – 284.
- Orfanos, A., Jinks, D.C. & Guthrie, R. 1986. Microassay for estimation of galactose and galactose-1-phosphate in dried blood specimens. *Clinical Biochemistry* 19: 225 – 228.
- Paigen, K., Pacholec, F. & Levy, H.L. 1982. A new method of screening for inherited disorders of galactose metabolism. *Journal of Laboratory and Clinical Medical*. 99: 895 – 907.
- Pesce, M.A., Bodourian, S.H., Harris, R.C. & Nicholson, J.F. 1977. Enzymatic Micromethod for Measuring Galactose-1-phosphate Uridyltransferase Activity in Human Erythrocytes. *Clinical Chemistry* 23(9): 1711 – 1717.
- Petersen, P.H., Stockl, D., Blaabjerg, O., Pedersen, B., Birkemose, E., Thienpont, L., Lassen, J.F. & Kjeldsen, J. 1997. Graphical interpretation of analytical data from comparison of a field method with a reference method by use of difference plots. *Clinical Chemistry* 43: 2039 – 2046.
- Pollitt, R.J. 1999. Principles and performance: Assessing the evidence. *Acta Paediatric Supplement* 432: 110 – 114.
- Rhode, H., Elei, E., Taube, I., Podskarbi, T. & Horn, A. 1998. Newborn screening for galactosemia: Ultramicro assay for galactose-1-phosphate-uridyltransferase activity. *Clinica Chimica Acta* 274: 71 – 87.
- Roy-Chowdhury, N., Lu, Y. & Roy-Chowdhury, J. 2007. Bilirubin Metabolism. In: Rodes, J., Jean-Pierre, B., Blei, A., Reichen, J. & Rizzetto, M (pnyt.). *Textbook of Hepatology*. 3rd edition. pg165 – 174. Massachusetts: Blackwell Publishing, Inc.

- Sander, J., Heckler, R., Schickling, H., Engelhard, T., Bock, D., & Diepenbrock, F. 1992. Colorimetric determination of galactose and galactose-1-phosphate from dried blood. *Clinical Biochemistry* 25: 37 – 39
- Schwartz, I.V., de Souza, C.F. & Giugliani, R. 2008. Treatment of inborn errors of metabolism. *Jornal de Pediatria* 84(4): S8 – 19.
- Schweitzer-Krantz, S. 2003. Early diagnosis of inherited metabolic disorders towards improving outcome: the controversial issue of galactosemia. *Europe Journal of Pediatric* 162(Supplement I): S50 – 53.
- Segal, S. 1995. Defective galactosylation in galactosemia: Is low cell UDPgalactose an explanation? *European Journal of Pediatrics*. 154(7-2): S65 – 71
- Simonsen, H., Jensen, U.G., Brandt, N.J., Christensen, E., Skovby, F. & Norgaard-Pedersen, B. 2001. Neonatal Screening for Galactosemia by Quantitative Analysis of Hexose Monophosphates Using Tandem Mass Spectrometry: A Retrospective Study. *Clinical Chemistry*. 47(8): 1364 – 1372.
- Spitalnic, S. 2004a. *Test Properties I: Sensitivity, Specificity & Predictive Values*. *Hospital Physician* 27-31.
- Spitalnic, S. 2004b. *Test Properties II: Likelihood Ratios, Bayes' Formula and Receiver Operating Characteristic Curves*. *Hospital Physician* 53-58.
- Tang, N.L.S., Cheung, K.L., Hsiao, K.J., Law, L.K., Wong, W., Ng, P.C., Pang, C.P., Applegarth, D.A., Fok, T.F. & Hjelm, N.M. 1999. Classical galactosemia in Chinese: A case report and review of disease incidence. *Journal of Pediatric Child Health* 35:399-400.
- Thompson, M., Ellison, S.L.R. & Wood, R. 2002. Harmonized Guidelines For Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis. *Pure Applied Chemistry*. 74(5): 835 – 855.
- Tyfield L., Reichardt J., Fridovich-Keil, J., Croke, D.T., Elsas, L.J., Strobl, W., Kozak, L., Coskun, T., Novelli, G., Okano, Y., Zekanowski, C., Shin, Y. & Boleda, M.D. 1999. Classical galactosemia and mutations at the galactose-1-phosphate uridylyltransferase (GALT) gene. *Human Mutation* 13: 417-430.
- von Reuss, A. 1908. Zuckernausscheidung im Saeuglingsalter. *Wien Med Wochenschr* 58: 799
- Wada, Y., Nakajima, H., Irie, M., Hirayama, M. & Suwa, S. 1984. Mass Newborn Screening in Japan – 1984. *Japan Journal of Human Genetics* 29:277 – 286.

- Westgard, J.O. 1995. A method evaluation decision chart (MEDx chart) for judging method performance. *Clinical Lab Science* 8:277-283.
- Westgard, J.O. 2003. *Basic Method Validation*. 2nd edition. Madison: Westgard QC.
- Westgard, J.O., Barry, P.L. & Hunt, M.R. 1981. A Multi-Rule Shewhart Chart for Quality Control in Clinical Chemistry. *Clinical Chemistry* 27(3): 493 – 501.
- Williams, C.A., Phillips, T. & Macdonald, I. 1983. The influence of Glucose on Serum Galactose Levels in Man. *Metabolism* 32(3): 250 – 256.
- Woo, H.C., Phornphutkul, C. & Luptook, A.R. 2010. Early and severe indirect hyperbilirubinemia as manifestation of galactosemia. *Journal of Perinatology* 30: 295 – 297.
- Yamaguchi, A., Fukushi, M., Mizushima, Y., Shimizu, Y., Takasugi, N., Arashima, S.I. & Ohyanagi, K. 1989. Microassay for Screening Newborns for Galactosemia with use of a fluorometric microplate reader. *Clinical Chemistry* 35(9): 1962 – 1964.
- Yoo, H.W., Lee, B.H., Cheon, C.K., Kim, J.M., Kang, M., Kim, J.H., Yang, S.H, Kim, G.H. & Choi, J.H. 2011. Low prevalence of classical galactosemia in Korean population. *Journal of Human Genetics* 56: 94 – 96.

