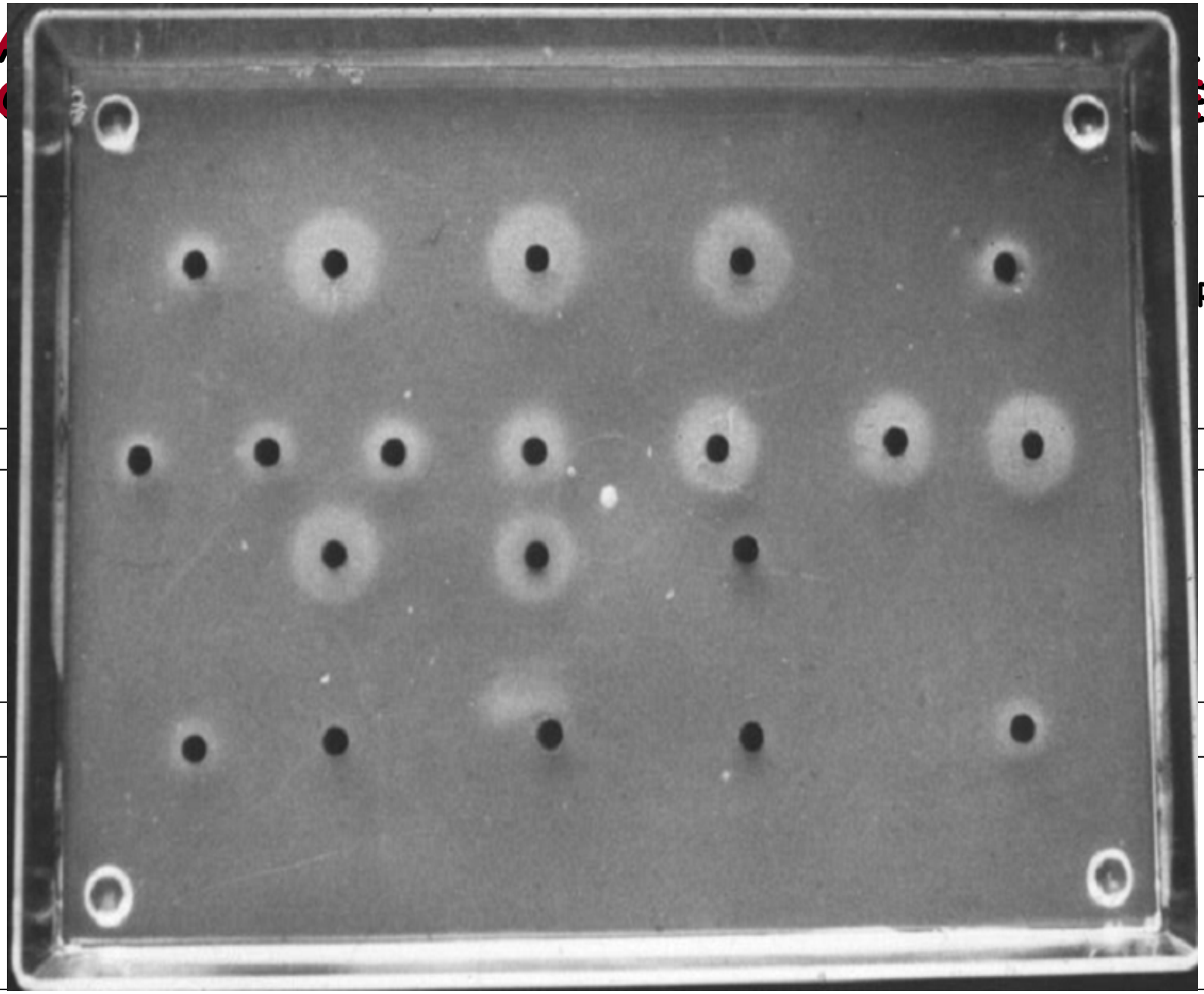
MALATTIE METABOLICHE EREDITARIE: SCREENING NEONATALE IN TANDEM MASSA

Enrico Zammarchi

Firenze

SCREENING

PRESUNTA IDENTIFICAZIONE DI UNA MALATTIA O DI UN DIFETTO NON DIAGNOSTICATI, MEDIANTE TESTS, ESAMI O ALTRE PROCEDURE CHE POSSONO ESSERE APPLICATI RAPIDAMENTE



SCREENING NEONATALE ESTESO AD ALTRI ECM CURABILI E A DISORDINI ENDOCRINI:

IPOTIROIDISMO

GALATTOSEMIA

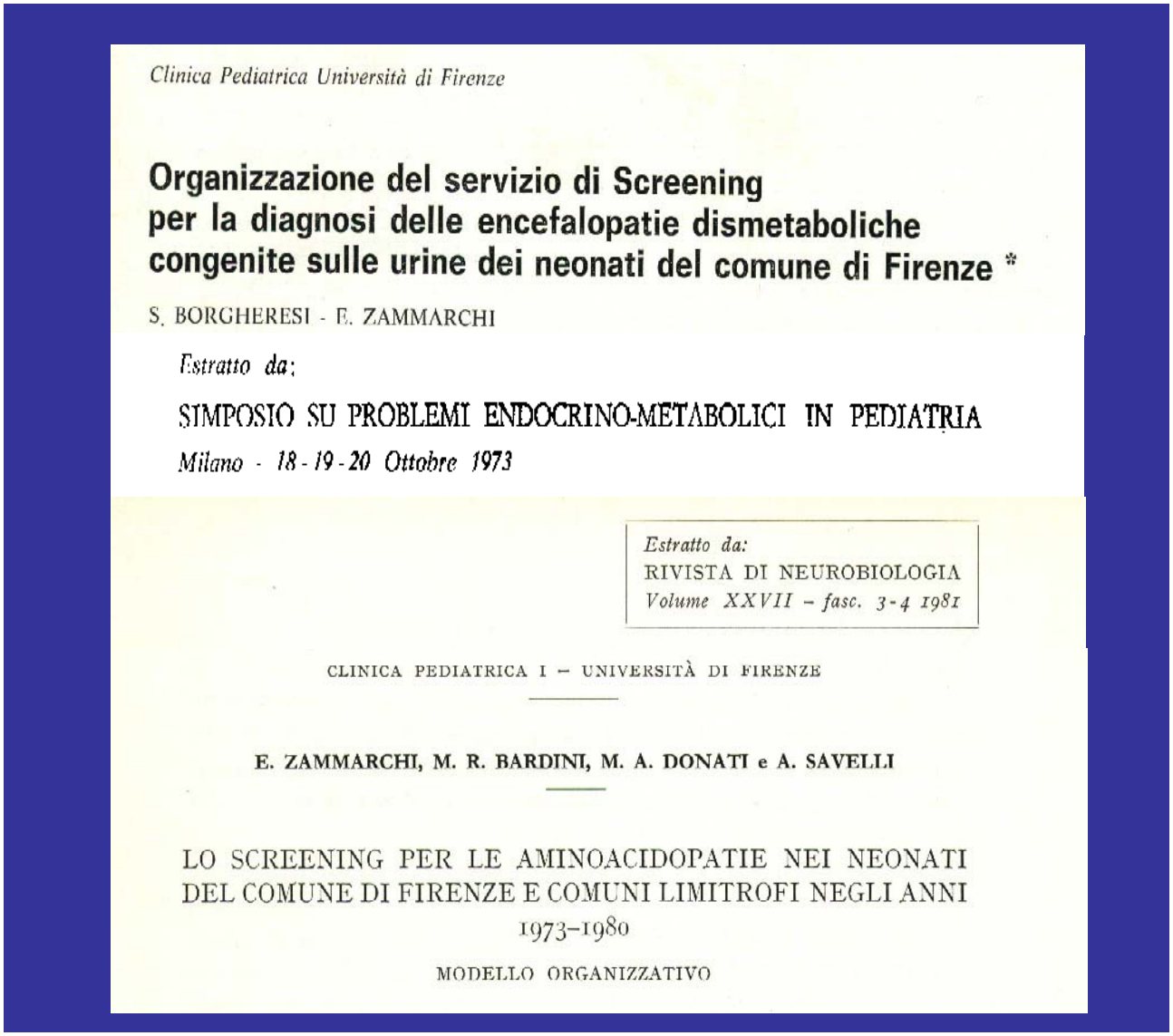
MSUD

DEFICIT DI BIOTINIDASI

SINDROME ADRENOGENITALE

SCREENING SULLE URINE DEI NATI NEI COMUNI DI FIRENZE, LASTRA A SIGNA, SCANDICCI, CALENZANO, CAMPI, FIESOLE

1973



Clinica Pediatrica Università di Firenze

Organizzazione del servizio di Screening per la diagnosi delle encefalopatie dismetaboliche congenite sulle urine dei neonati del comune di Firenze *

S. BORGHERESI - E. ZAMMARCHI

Estratto da:

SIMPOSIO SU PROBLEMI ENDOCRINO-METABOLICI IN PEDIATRIA

Milano - 18-19-20 Ottobre 1973

Estratto da:
RIVISTA DI NEUROBIOLOGIA
Volume XXVII – fasc. 3-4 1981

CLINICA PEDIATRICA I – UNIVERSITÀ DI FIRENZE

E. ZAMMARCHI, M. R. BARDINI, M. A. DONATI e A. SAVELLI

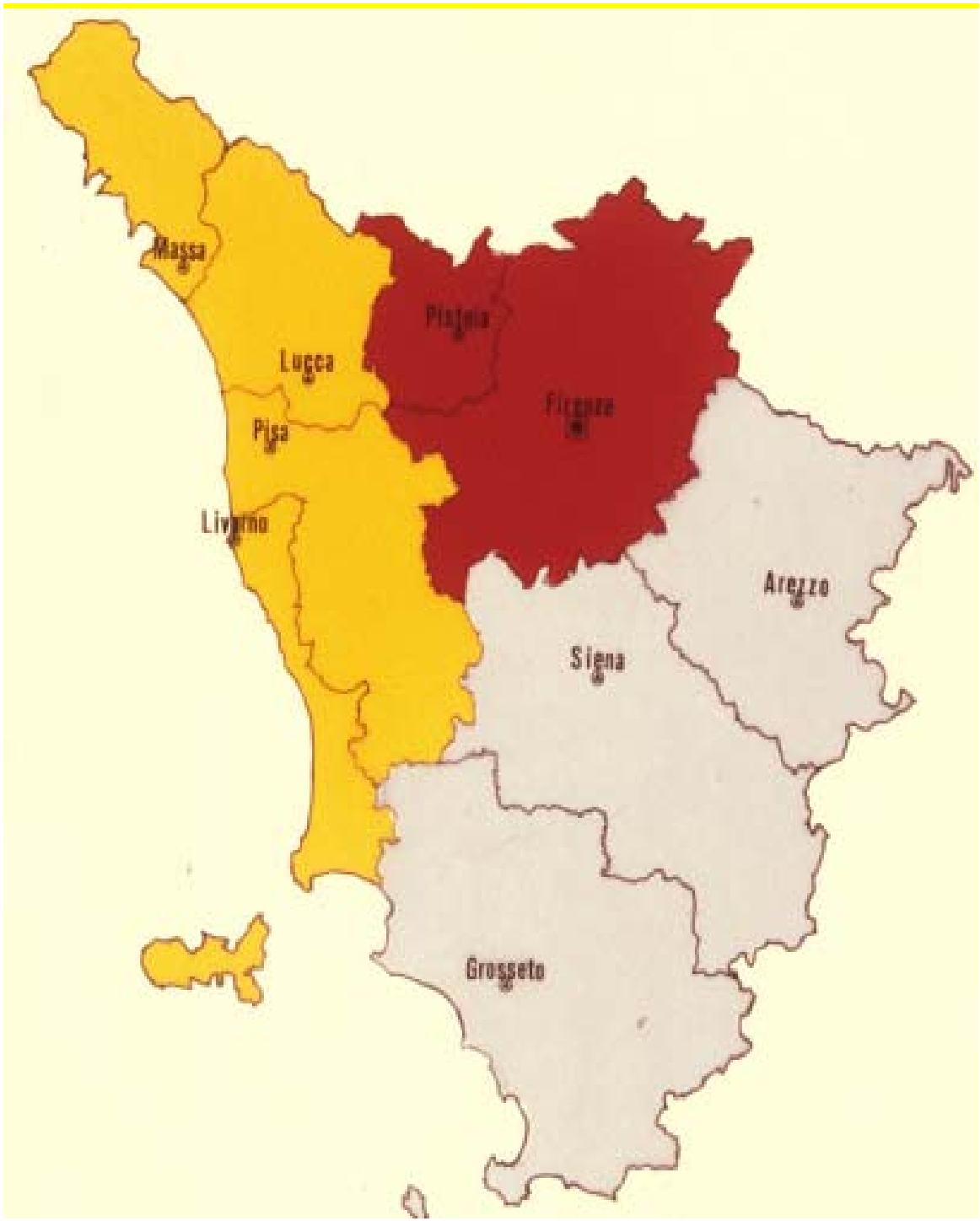
LO SCREENING PER LE AMINOACIDOPATIE NEI NEONATI DEL COMUNE DI FIRENZE E COMUNI LIMITROFI NEGLI ANNI 1973-1980

MODELLO ORGANIZZATIVO

DELIBERAZIONE REGIONALE 301 DEL 2/6/1981

"AVVIO DI ATTIVITÀ PER L'ACCERTAMENTO DELL' IPOTIROIDISMO E FENILCHETONURIA….."

ISTITUZIONE DELLO SCREENING FIBROSI CISTICA


Massa
Lucca
Pisa
Livorno
Pistoia
Firenze
Arezzo
Siena
Grosseto

LEGGE NAZIONALE
PER LO SCREENING NEONATALE

104 del 5.2.1992

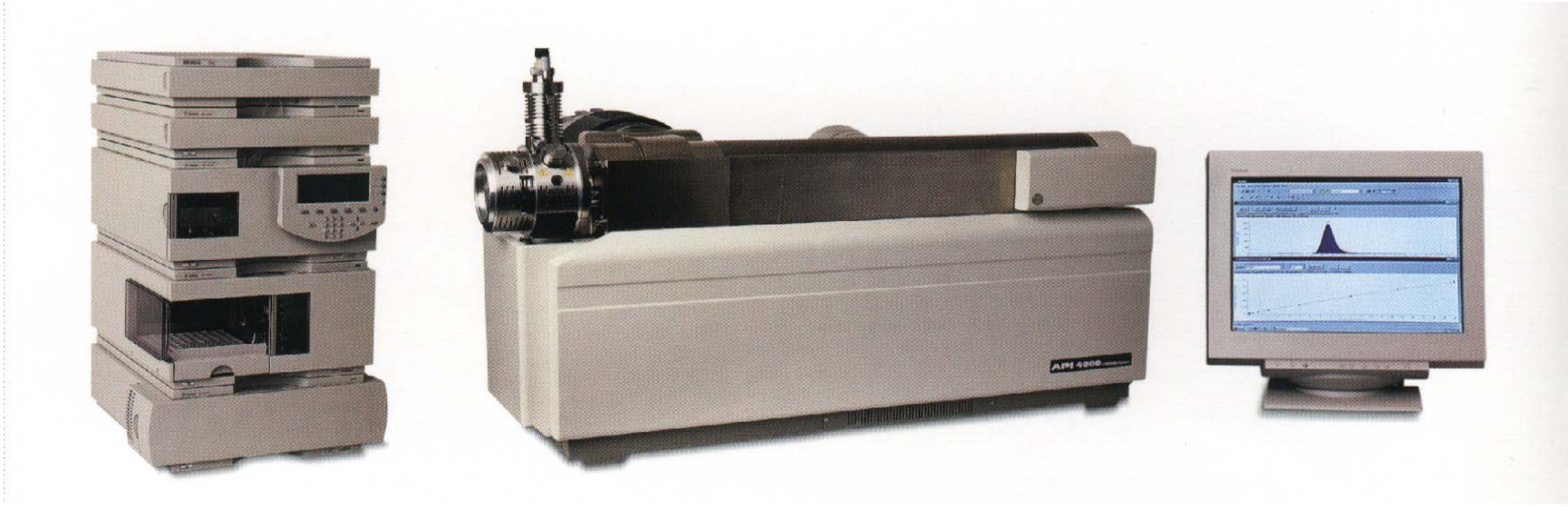
Prevede i programmi di screening neonatale per

FENILCHETONURIA

IPOTIROIDISMO CONGENITO

FIBROSI CISTICA




API 4000

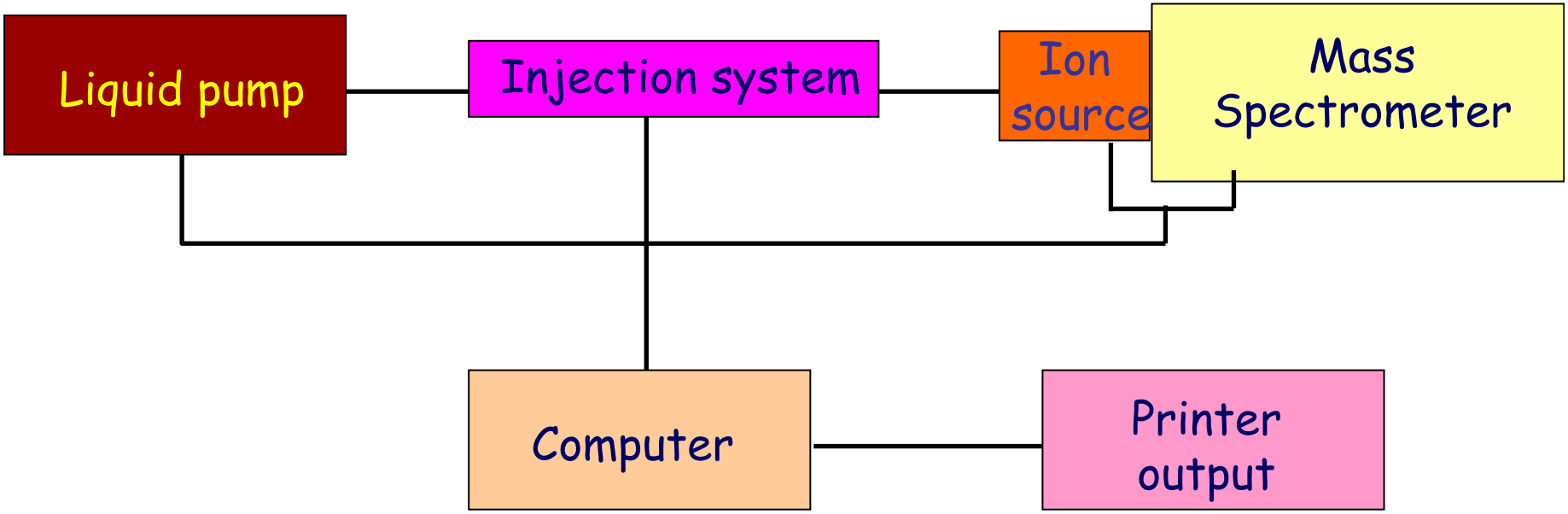
CHE COSA È?

E' UNA TECNICA DI ANALISI
E

DI RIVELAZIONE

QUALI-QUANTITATIVA
DELLE MOLECOLE (IONI)

SCREENING NEWBORN USING LC-MS/MS (1990-3)



Short Communication

Tandem Mass Spectrometry: A New Method for Acylcarnitine Profiling with Potential for Neonatal Screening for Inborn Errors of Metabolism

D. S. MILLINGTON, N. KODO, D. L. NORWOOD and C. R. ROE
Division of Pediatric Genetics and Metabolism, Box 3028, Duke University Medical Center, Durham, NC 27710, USA
J. Inher. Metab. Dis. 13: 321-324; 1990

PRINCIPALI CAMPI DI APPLICAZIONI

BIOCHIMICA CLINICA: DETERMINAZIONE QUALI-QUANTITATIVA DI SOSTANZE ENDOGENE ED ESOGENE

CHIMICA FARMACEUTICA E FARMACOLOGIA

BIOTECNOLOGIE

CHIMICA AGROALIMENTARE

CHIMICA AMBIENTALE

CHIMICA ORGANICA E ORGANOMETALLICA

VANTAGGI



VERSATILITA'

VELOCITA'

SENSIBILITA'

SELETTIVITA'



SVANTAGGI

NON FACILE UTILIZZO

COSTI ELEVATI

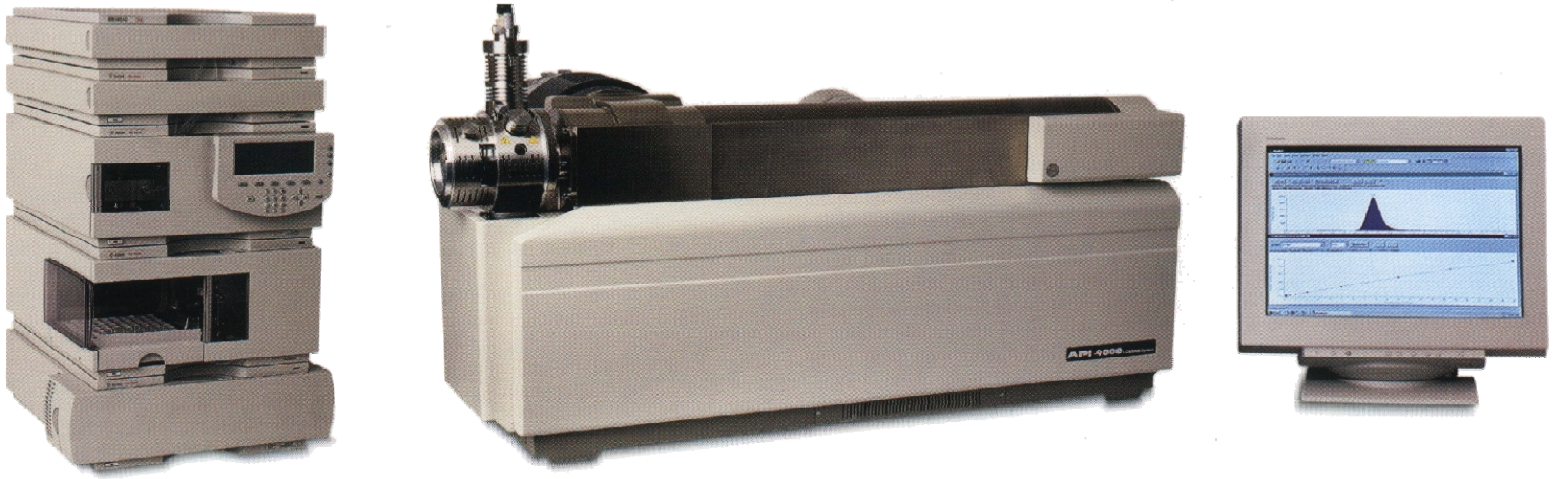
QUANTITÀ DA RILEVARE	PESO (G)	NUMERO DI MOLECOLE	TECNICA ANALITICA CHIMICO-FISICA
Milligrammo (mg)	10^{-3}	10^{18}	Titolazione, NMR
Microgrammo (µg)	10^{-6}	10^{15}	Cromatografie + Spettrofotometria
Nanogrammo (ng)	10^{-9}	10^{12}	
Picogrammo (pg)	10^{-12}	10^{9}	MS
Femtogrammo (fg)	10^{-15}	10^{6}	MS
Attogrammo (ag)	10^{-18}	10^{3}	MS
Zeptogrammo (zg)	10^{-21}	10^{0}	?

DAL 1990: TANDEM MASSA E SCREENING NEONATALE

Tandem Mass Spectrometry: A New Method for Acylcarnitine Profiling with Potential for Neonatal Screening for Inborn Errors of Metabolism

D. S. MILLINGTON, N. KODO, D. L. NORWOOD and C. R. ROE
Division of Pediatric Genetics and Metabolism, Box 3028, Duke University Medical Center, Durham, NC 27710, USA

J. Inher. Metab. Dis. 13: 321-324; 1990



Chace DH, Millington DS, Terada N, Kahler SG, Roe CR, Hofman LF. Rapid diagnosis of phenylketonuria by quantitative analysis for phenylalanine and tyrosine in neonatal blood spots by tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 1993; 39;66–71.

Chace DH, Hillman SL, Millington DS, Kahler SG, Roe CR, Naylor EW. Rapid diagnosis of maple syrup urine disease in blood spots from newborns by tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 1995;41;62–68.

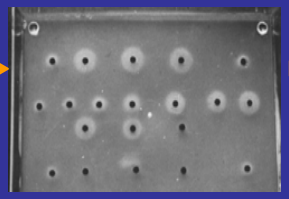
SCREENING NEONATALI

TESTS DI GUTHRIE e ALTRI TESTS

PKU
MSUD
BIOTINIDASI
GALATTOSEMIA
.....

IERI

UNO SPOT → UN TEST → UNA MALATTIA

→ fenilchetonuria

SCREENING NEONATALE LC/MS/MS

UNO SPOT → UN TEST → PIU' MALATTIE




→ ~ 30 MALATTIE

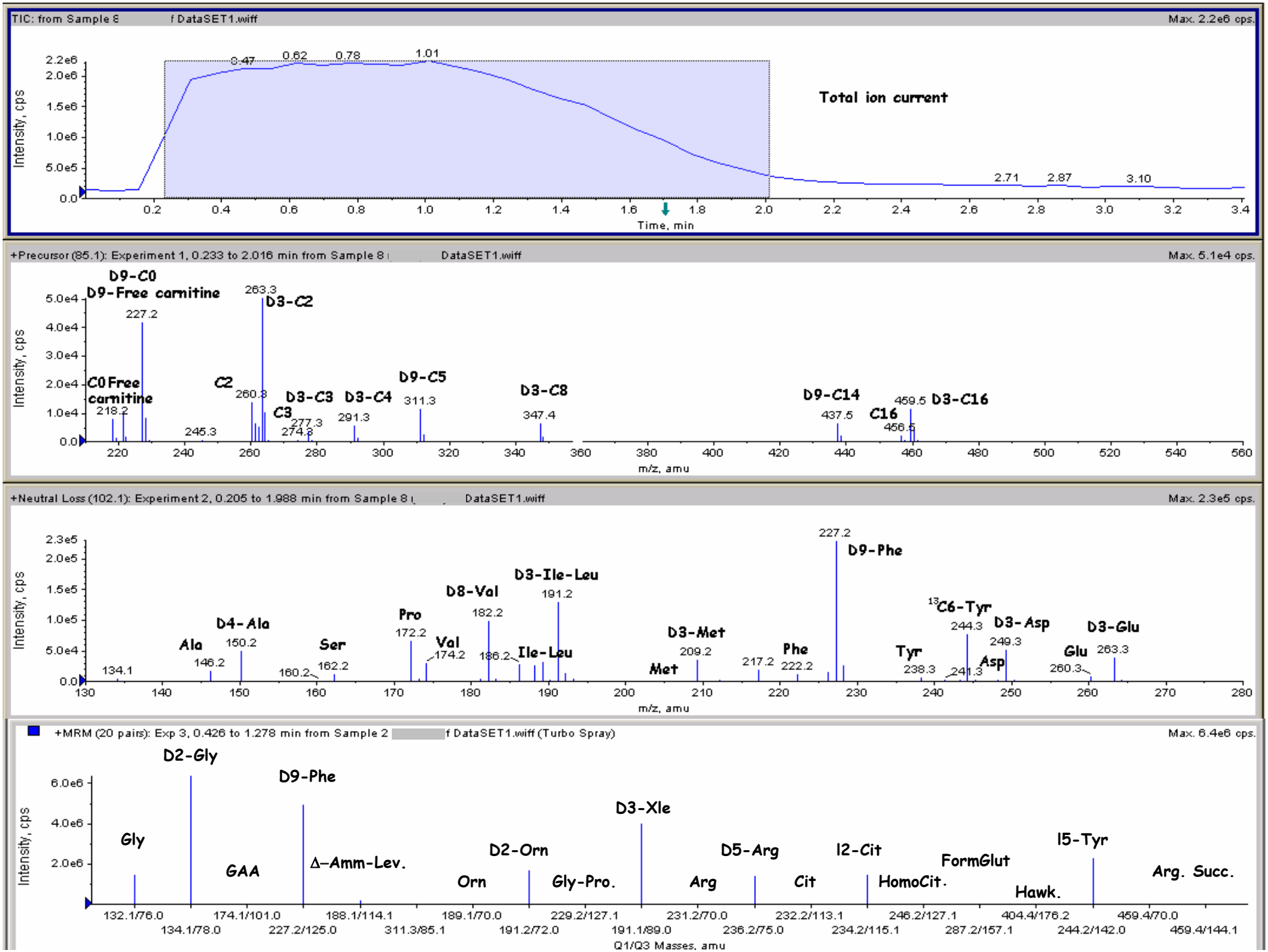
Del. Reg. Toscana n 800/2.8.04
Dal 1 NOVEMBRE 2004 SCREENING NEONATALE LC/MS/MS

Editorial

Newborn Screening by Tandem Mass Spectrometry: A New Era

Harvey L. Levy

Clinical Chemistry 44, No. 12, 1998


TIC: from Sample 8 f DataSET1.wiff
Max. 2.2e6 cps.
Intensity, cps
Time, min
Total ion current
8.47
0.62
0.78
1.01
2.71
2.87
3.10
+Precursor (85.1): Experiment 1, 0.233 to 2.016 min from Sample 8 DataSET1.wiff
Max. 5.1e4 cps.
m/z, amu
D9-C0
D9-Free carnitine
D3-C2
C0 Free carnitine
C2
C3
D3-C3
D3-C4
D9-C5
D3-C8
D9-C14
C16
D3-C16
+Neutral Loss (102.1): Experiment 2, 0.205 to 1.988 min from Sample 8 DataSET1.wiff
Max. 2.3e5 cps.
D9-Phe
D3-Ile-Leu
D8-Val
D4-Ala
Pro
Val
Ala
Ser
Ile-Leu
D3-Met
Met
Phe
Tyr
13C6-Tyr
D3-Asp
Asp
Glu
D3-Glu
+MRM (20 pairs): Exp 3, 0.426 to 1.278 min from Sample 2 f DataSET1.wiff (Turbo Spray)
Max. 6.4e6 cps.
Q1/Q3 Masses, amu
D2-Gly
D9-Phe
D3-Xle
Gly
GAA
Δ–Amm-Lev.
D2-Orn
Orn
Gly-Pro.
Arg
D5-Arg
Cit
l2-Cit
HomoCit.
FormGlut
Hawk.
l5-Tyr
Arg. Succ.

	01b-C0	02b-C2	03b-C3	04b-C3:1	05b-C3DC	06b-C4	07b-C4DC	08b-C4OH	09b-C5	10b-C5DC	11b-C5:1
M-2DS	6.5	9.5	0.42	0.02	0.01	0.06	0.07	0.04	0.05	0.02	0.01
M+2DS	45	39	2.84	0.25	0.11	0.5	0.3	0.3	0.34	0.14	0.29
	39.50	15.81	0.92	0.18	0.08	0.24	0.30	0.17	0.24	0.10	0.12
	12b-C5OH	13b-C6	14b-C6:1	15b-C6DC	16b-C7	17b-C8	18b-C8:1	19b-C9	20b-C10	21b-C10:1	22b-C10-OH
M-2DS	0.05	0.02	0.02	0.03	0.04	0.01	0.01	0.02	0.01	0.05	0.03
M+2DS	0.27	0.12	0.1	0.13	0.15	0.21	0.17	0.16	0.26	0.25	0.13
	0.20	0.08	0.05	0.09	0.08	0.17	0.17	0.11	0.10	0.17	0.10
	23b-C12	24b-C12:1	25b-C12OH	26b-C14	27b-C14:1	28b-C14:2	29b-C14OH	30b-C16	31b-C16:1	32b-C16OH	33b-C18
M-2DS	0.01	0.01	0.03	0.05	0.01	0.01	0.01	0.79	0.05	0.01	0.25
M+2DS	0.34	0.24	0.09	0.37	0.28	0.08	0.08	4.4	0.35	0.07	1.3
	0.13	0.11	0.07	0.20	0.07	0.05	0.04	1.59	0.09	0.08	0.59
	34b-C18:1	35b-C18:2	36b-C18OH	37b-C18:1OH	38b-C20	39b-C20:1	40b-C22	41b-C22:1	42b-C24	43b-C24:1	44b-C26
M-2DS	0.41	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01
M+2DS	1.95	0.32	0.05	0.09	0.06	0.1	0.1	0.1	0.09	0.07	0.04
	0.94	0.44	0.04	0.08	0.06	0.09	0.07	0.07	0.05	0.05	0.06
	45b-C26:1	46b-C28	47b-C28:1	48b-C16DC	49b-C18DC	55b-ALA	56b-VAL	57b-XLE	58b-MET	59b-PHE	60b-TYR*
M-2DS	0.01	0.01	0.01	0.06	0.03	54	70	60	11	11	6
M+2DS	0.04	0.02	0.02	0.14	0.07	284	206	195	30	79	150
	0.05	0.03	0.02	0.37	0.13	192.51	179.10	124.90	25.61	48.46	57.89
	61b-ASP	62b-GLU	63b-GLy	64b-ORN	65b-ARG	66b-CIT	67b-Arg.Suc	68b-GAA	69b-ForGLU	70b-AmmLev	71b-GlyPro
M-2DS	4	83	170	3	2	2	0.01	0.01	0.01	3.5	8
M+2DS	43	199	650	41	9	15	0.08	1.95	1.52	15	14
	17.36	99.75	348.81	13.16	8.17	12.15	0.04	1.10	0.91	5.54	11.96
	72b-HomoCIT	73b-HAW	79-Phe/Tyr	80b-C2/C0	81b-C3/C0	82b-C3/C4	83b-C5/C3	84b-C5/C4	85b-C5/C8	86b-C3/C16	87b-C5DC/C4
M-2DS	0.2	0.01	0.6	0.1	0.03	2.15	0.01	0.23	0.23	0.15	0.07
M+2DS	1.7	0.13	1.3	1.8	0.11	10.05	0.25	1.23	3.61	1.21	0.55
	1.27	0.06	0.84	0.28	0.02	3.81	0.26	0.99	1.44	0.58	0.40
	88b-C5DC/C8	89b-C5DC/C12	90b-C8/C6	91b-C8/C10	92b-CPTII						
M-2DS	0.31	0.17	0.9	0.42	1.3						
M+2DS	1.23	0.87	2.36	1.54	6.22						
	0.58	0.74	1.97	1.65	2.53						

METABOLITI ANALIZZATI DURANTE LO SCREENING NEONATALE

I fase 01/01/2002-31/10/2004

Progetto Pilota autorizzato sui neonati

di Firenze, Prato e Pistoia

42371 neonati sottoposti a screening neonatale

Delibera Regione Toscana n 800 del 3/8/2004:

…..tutti i neonati toscani dovranno essere sottoposti a screening allargato mediante spettrometria di massa tandem….

01/01/2006 ASL 1 Umbria effettua lo screening presso il nostro centro

128353 NEONATI SOTTOPOSTI A SCREENING NEONATALE
66 DIAGNOSI EFFETTUATE 1:1945
2006 12.5% DI NATI SONO STRANIERI
RICHIAMI 0.75% (2007 RICHIAMI 0.4%)

SCREENING NEONATALE in LC/MS/MS

DIAGNOSI PRECOCE

POSSIBILMENTE PRESINTOMATICA

- Aminoacidopatie
- Deficit ciclo dell'urea
- Acidurie organiche
- Difetti βossidazione

PRECOCE TERAPIA

PROGNOSI MIGLIORE → BUONA



AMINOACIDOPATIE

SCREENING NEONATALE in LC/MS/MS
AMINOACIDOPATIE e DIFETTI DEL CICLO DELL'UREA

IPERFENILALANINEMIA
IPERGLICINEMIA NON CHETOTICA
MALATTIA DELLE URINE A SCIROPPO D'ACERO
TIROSINEMIA TIPO I
TIROSINEMIA TIPO II
IPERMETIONINEMIA
IDROSSIPROLINEMIA
IPERPROLINEMIA
SINDROME HHH
ATROFIA GIRATA DELLA COROIDE E RETINA
CITRULLINEMIA TIPO II (defict di citrina)
OMOCISTINURIA
CITRULLINEMIA
ARGININOSUCCINICOACIDURIA
ARGININEMIA

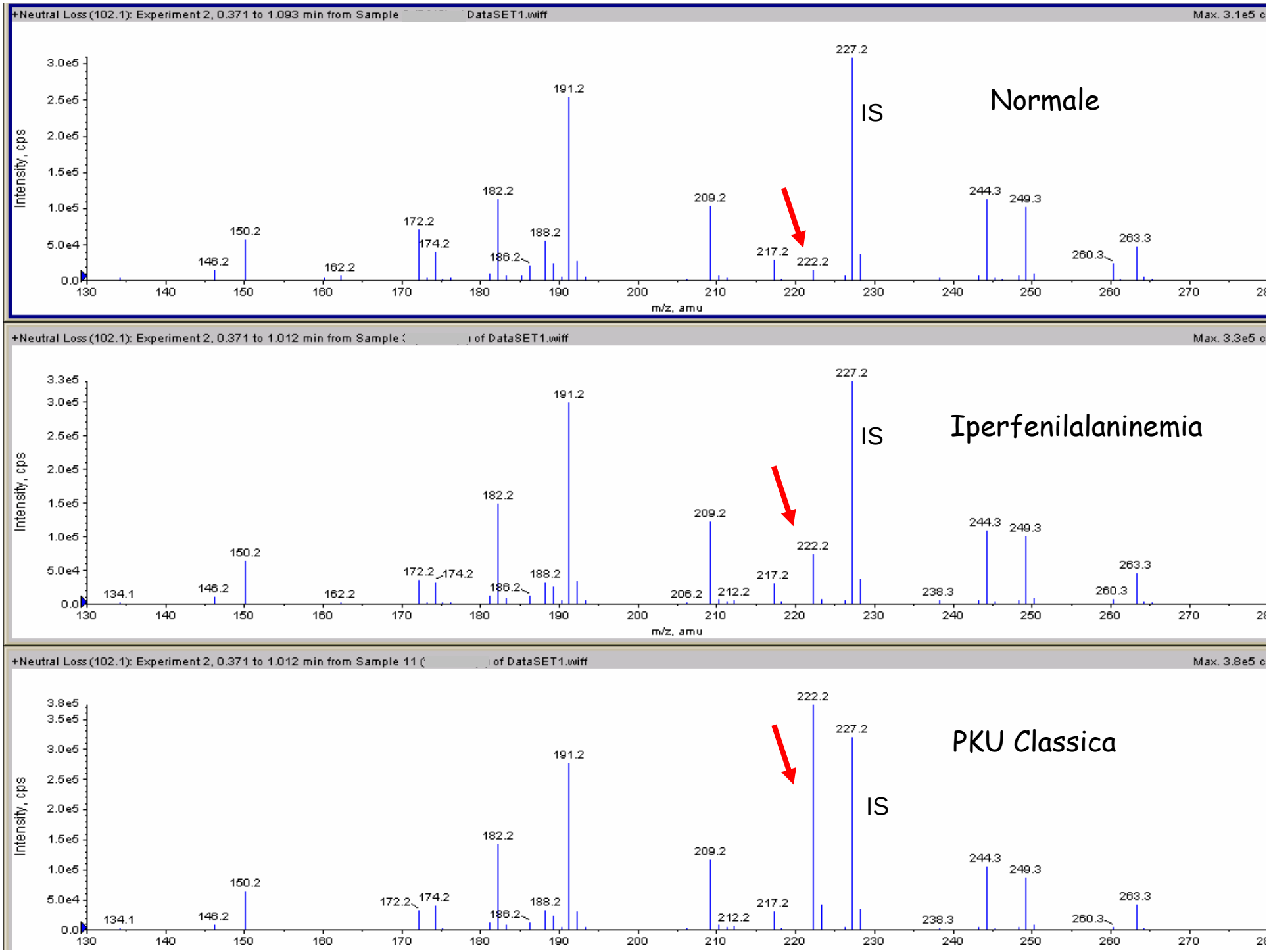
35 IPERFENILALANINEMIE (5 stranieri)

PREVALENZA 1:3602

7 PKU CLASSICHE (3 stranieri) 1:18012

(7:7 con conc. di Phe allo screening >250 μM; VPP 100%)

1 DIFETTO di DHPR


+Neutral Loss (102.1): Experiment 2, 0.371 to 1.093 min from Sample DataSET1.wiff
Max. 3.1e5 c
Intensity, cps
m/z, amu
227.2
191.2
IS
Normale
182.2
209.2
244.3
249.3
172.2
150.2
188.2
174.2
217.2
222.2
263.3
146.2
186.2
260.3
162.2
+Neutral Loss (102.1): Experiment 2, 0.371 to 1.012 min from Sample
of DataSET1.wiff
Max. 3.3e5 c
Iperfenilalaninemia
134.1
206.2
212.2
238.3
+Neutral Loss (102.1): Experiment 2, 0.371 to 1.012 min from Sample 11
of DataSET1.wiff
Max. 3.8e5 c
PKU Classica



ACIDURIE ORGANICHE

SCREENING NEONATALE in LC/MS/MS ACIDURIE ORGANICHE

ACIDEMIA PROPIONICA

METILMALONICO ACIDURIA

ISOVALERICO ACIDURIA

GLUTARICO ACIDURIA TIPO I

DEFICIT DI BIOTINIDASI

DEFICIT DI OLOCARBOSSILASI SINTETASI

DEFICIT DI 3-OH-3-METIL-GLUTARIL CoA LIASI

METILGLUTACONICO ACIDURIA

3-METILCROTONIL GLICINURIA

DEFICIT DI β-CHETOTIOLASI

DEFICIT DI 2 METILBUTIRRIL-CoA DEIDROGENASI

15 ACIDURIE ORGANICHE:

2 PROPIONICO ACIDEMIE

1 GLUTARICO ACIDURIA TIPO I

3 3-ME-CROTONIL GLICINURIA (2 GEMELLI CON TRASMISSIONE MATERNA)

1 ISOVALERICO ACIDURIA

4 ISOBUTIRRICO ACIDURIA

2 DIFETTI DI FORMIMINO GLUTAMMICO TRASFERASI

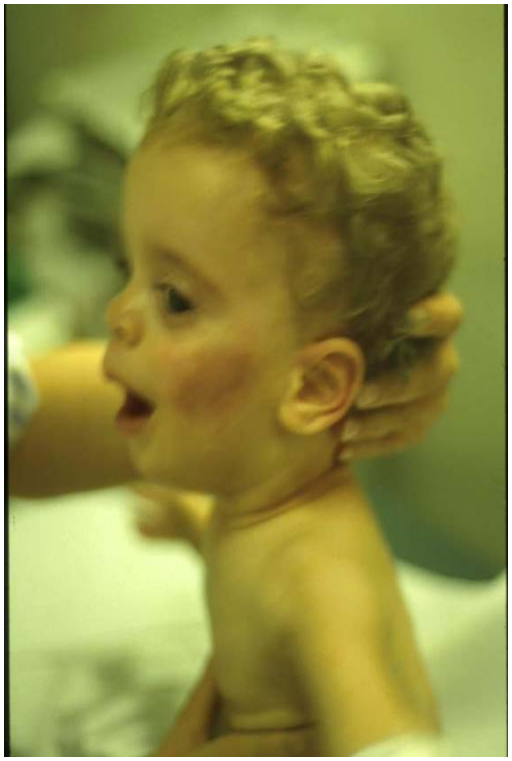
2 METILMALONICO ACIDURIE (1 MATERNA DA MADRE CARENTE IN VIT.B12)

DIAGNOSI PRECLINICA TERAPIA PRECOCE PROGNOSI MIGLIORE

MODIFICA DELL`EVOLUZIONE DELLA MALATTIA

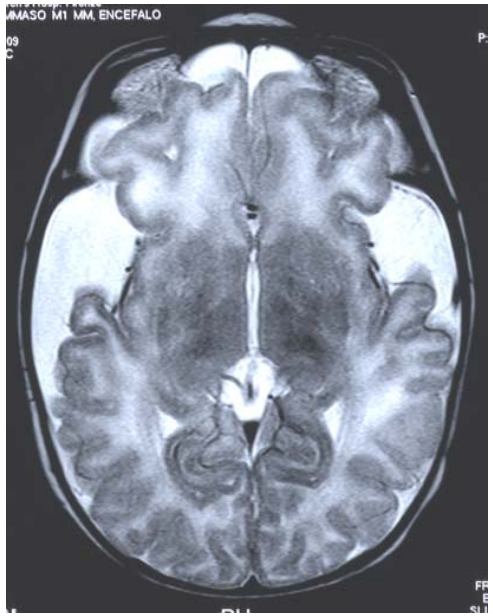
GLUTARICO ACIDURIA TIPO I

Diagnosi a 23 mesi ⟹ exitus a 32 mesi

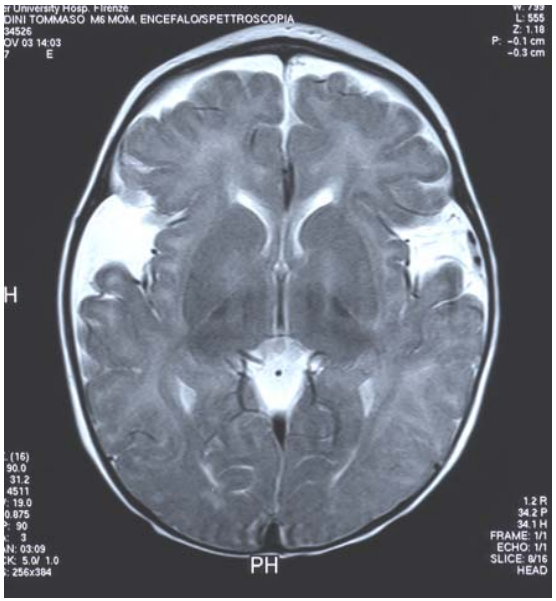




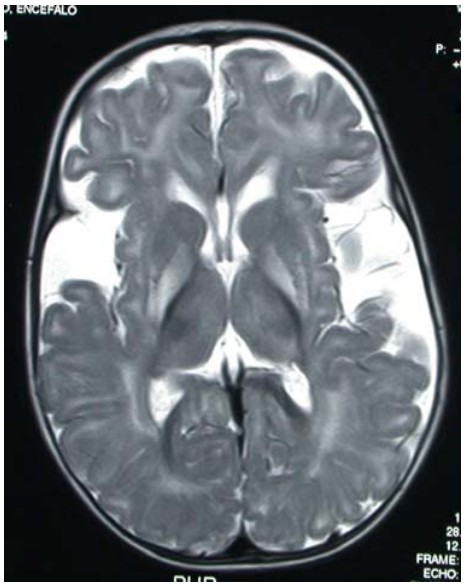
GLUTARICO ACIDURIA TIPO I



RM a 1 mese di paziente diagnosticato allo screening

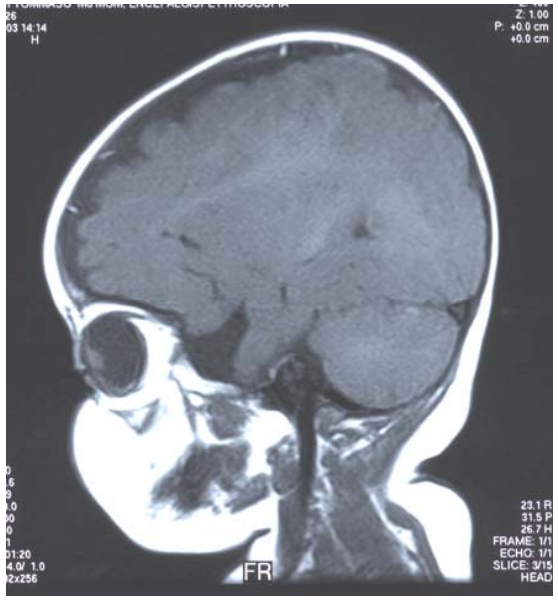


RM a 7 mese di paziente diagnosticato allo screening

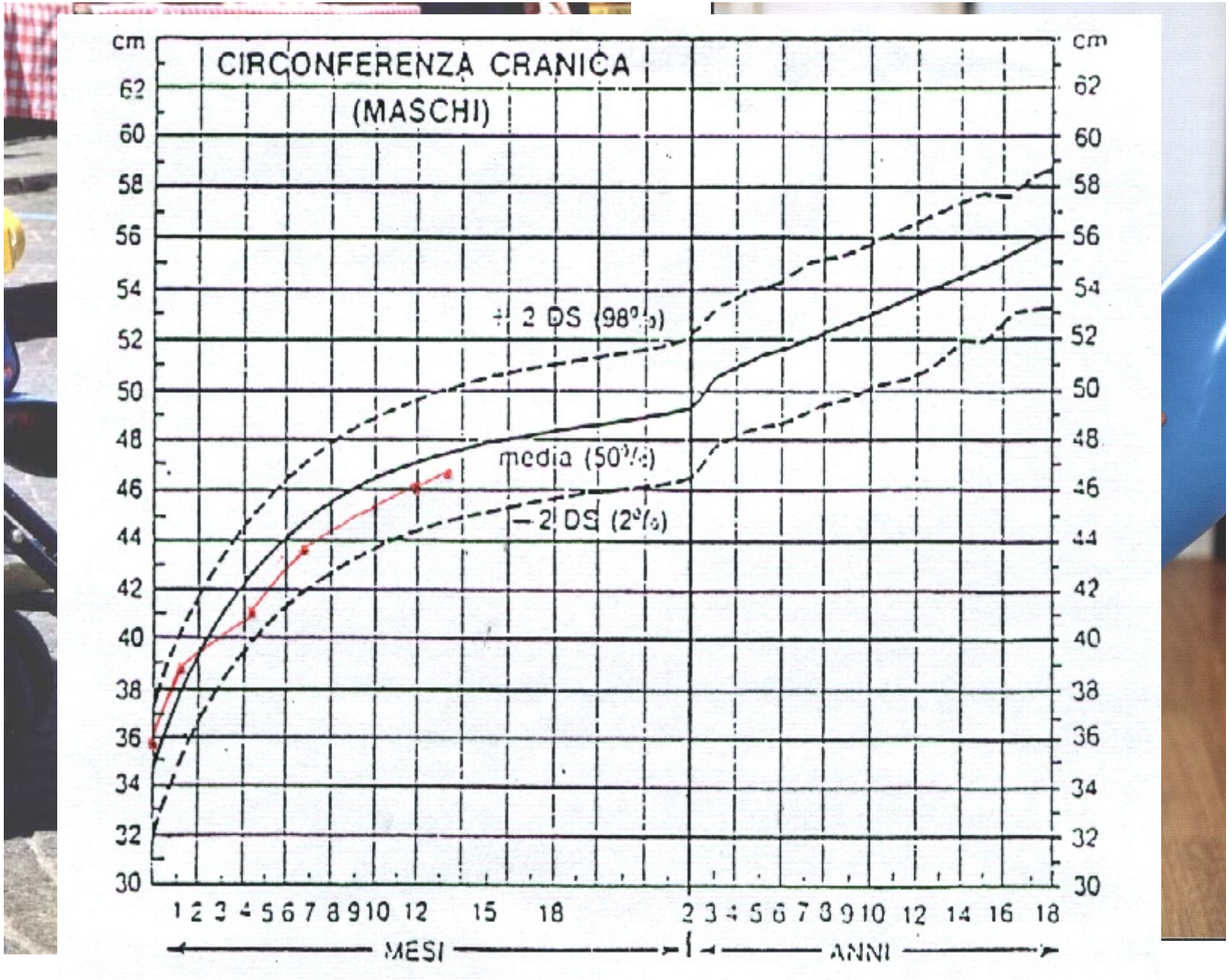


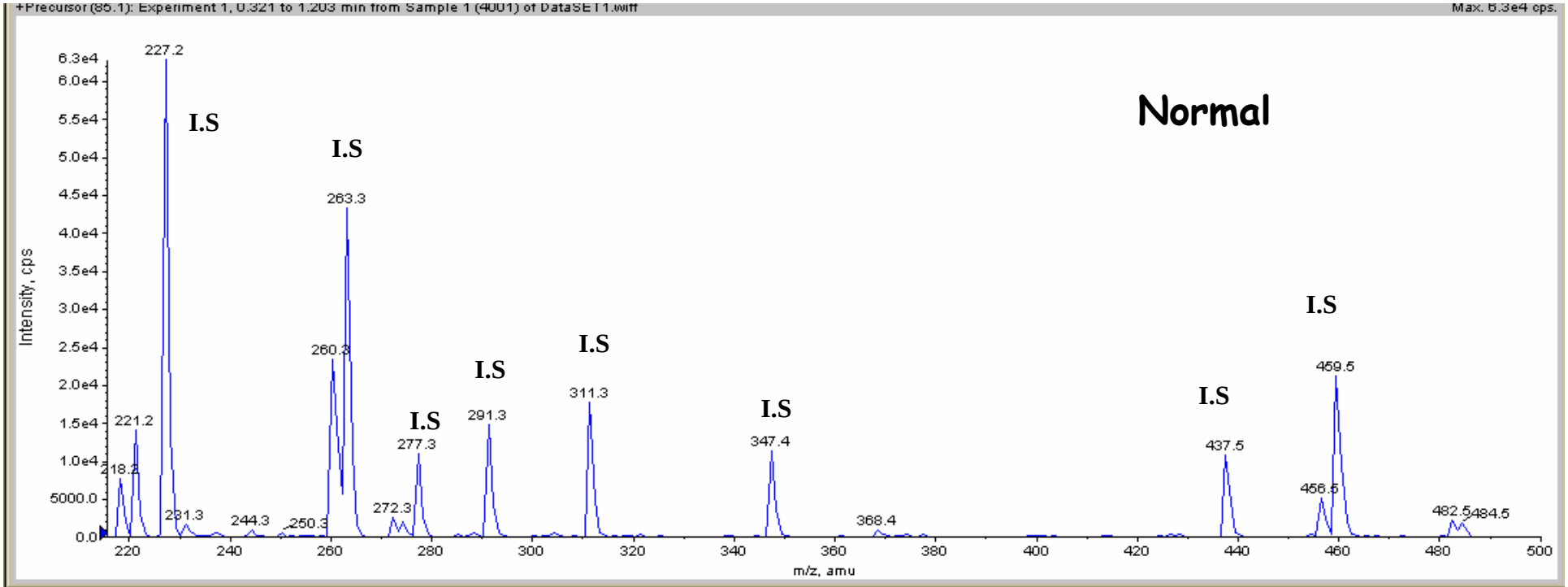
RM alla diagnosi in paziente di 8 mesi

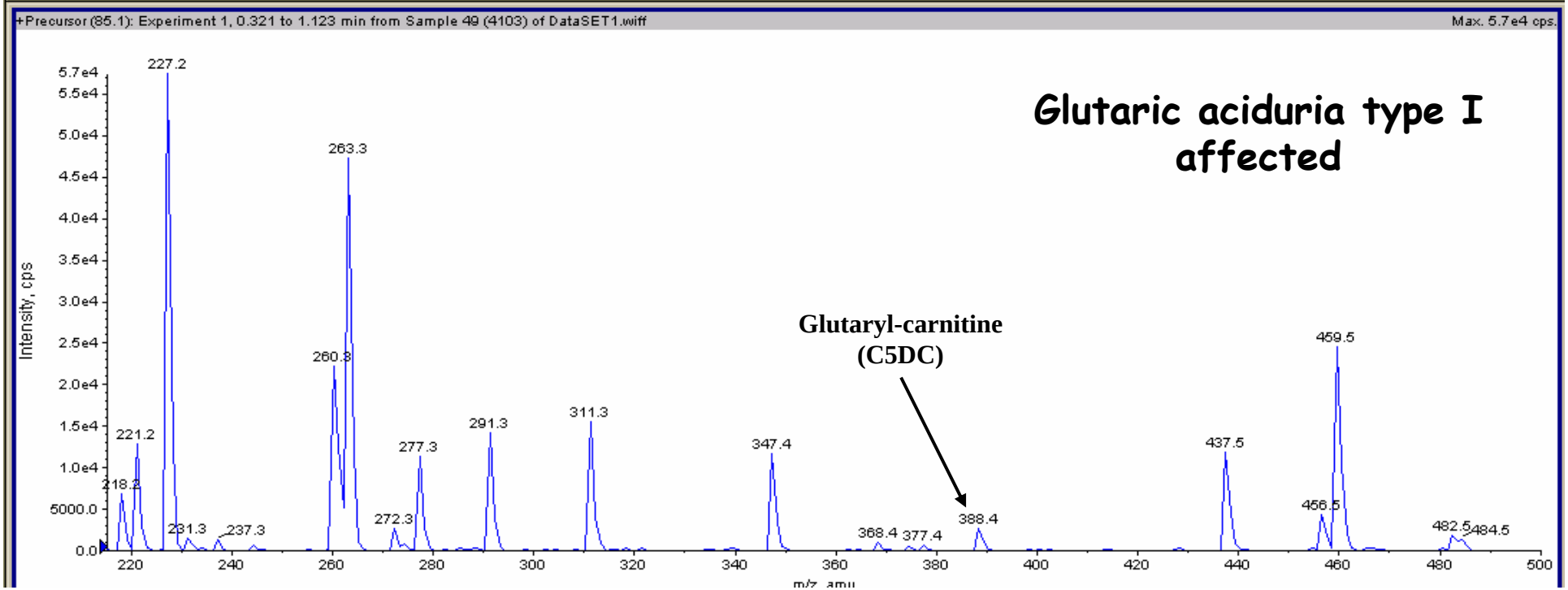







CIRCONFERENZA CRANICA
(MASCHI)
cm
62
60
58
56
54
52
50
48
46
44
42
40
38
36
34
32
30
+ 2 DS (98%)
media (50%)
– 2 DS (2%)
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 12 15 18
2 3 4 5 6 7 8 9 10 12 14 16 18
MESI
ANNI


+Precursor (85.1): Experiment 1, 0.321 to 1.203 min from Sample 1 (4001) of DataSET1.wiff
Max. 6.3e4 cps.
Normal
I.S
I.S
I.S
I.S
I.S
I.S
I.S
227.2
263.3
260.3
221.2
218.2
231.3
244.3
250.3
277.3
272.3
291.3
311.3
347.4
368.4
437.5
459.5
456.5
482.5
484.5
Intensity, cps
m/z, amu


+Precursor (85.1): Experiment 1, 0.321 to 1.123 min from Sample 49 (4103) of DataSET1.wiff
Max. 5.7e4 cps.
Glutaric aciduria type I affected
Glutaryl-carnitine (C5DC)
227.2
263.3
260.3
221.2
218.2
231.3
237.3
272.3
277.3
291.3
311.3
347.4
368.4
377.4
388.4
437.5
459.5
456.5
482.5
484.5
Intensity, cps
m/z, amu



DIFETTI DELLA β-OSSIDAZIONE DEGLI ACIDI GRASSI

SCREENING NEONATALE in LC/MS/MS DEFICIT β – OSSIDAZIONE

DEFICIT DEL TRASPORTATORE DI CARNITINA

DEFICIT DI CPT I

DEFICIT DI CPT II

DEFICIT DI CARNITINA/ACILCARNITINA TRANSLOCASI

DEFICIT DI SCAD

DEFICIT DI MCAD

DEFICIT DI VLCAD

DEFICIT DI LCHAD/PROTEINA TRIFUNZIONALE

DEFICIT DI MAD (GLUTARICO ACIDURIA II)

8 DIFETTI DELLA β-OX ACIDI GRASSI:

6 MCAD di cui 1 ASL 1 Umbria (1:21000)

1 SCAD

1 VLCAD

DEFICIT DI MCAD

- Episodi di ipoglicemia ipochetotica
- Epatomegalia
- Episodi Reye like

} dopo digiuno prolungato

} dopo infezione

DIAGNOSI POSTSINTOMATICA (120 paz.)

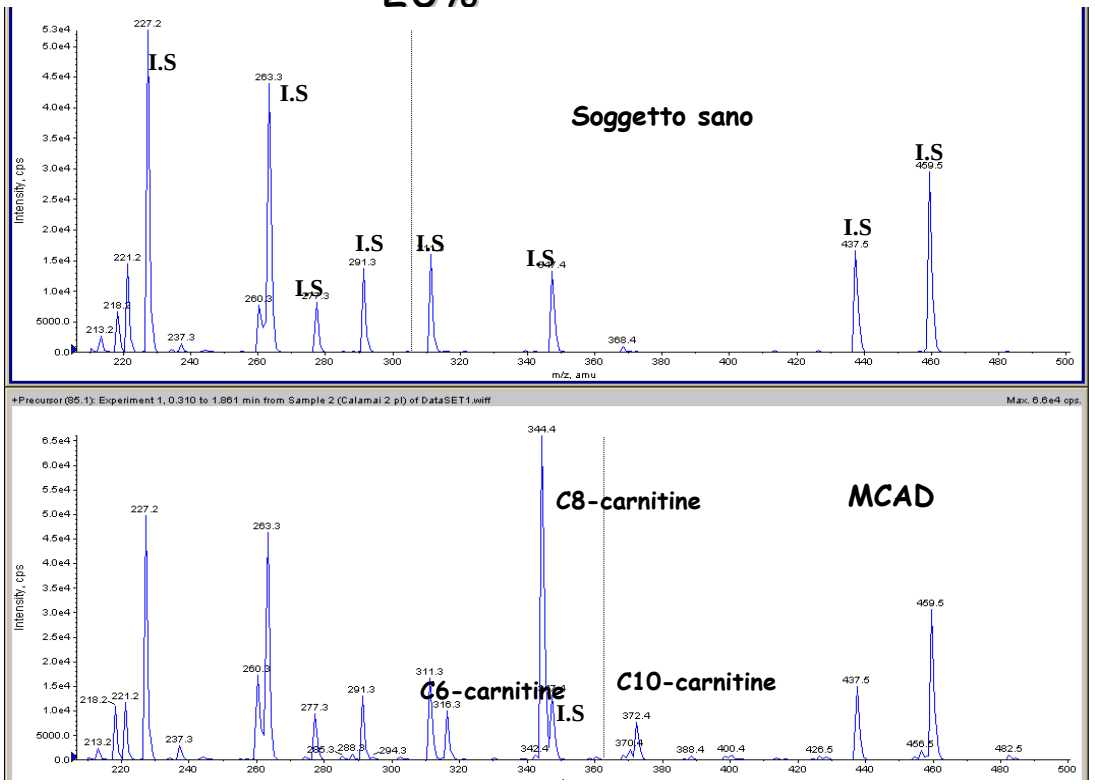
Coma	84%
Patologia neurologica residua	40%
Mortalita'	20%

SCREENING NEONATALE
in LC/MS/MS

DIAGNOSI PRESINTOMATICA (62 paz.)

Coma	**0%**
Ritardo mentale	**0%**
Mortalità	**0%**

Muntau 1999-2003



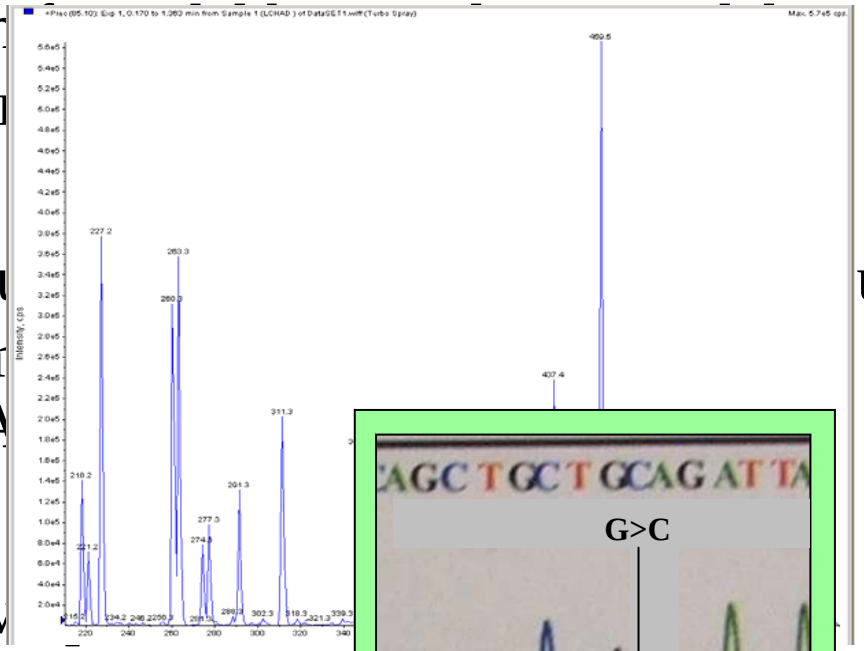
LCHAD

DICEMBRE 2005

Paziente nata in Umbria pochi km
nostro centro per lo screening neo

APRILE 2006

Deceduta all'età di 4 mesi, in segu uto
Inviato spot di sangue perimorten
Acilcarnitine suggestive di LCHA

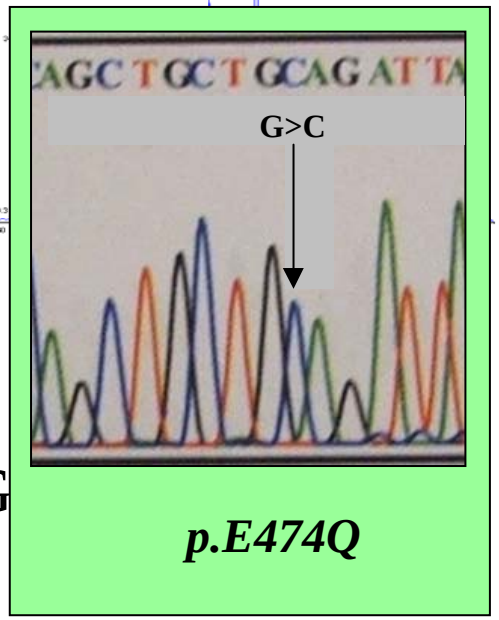


APRILE 2006

Recuperato spot neonatale: positiv

FEBBRAIO 2007

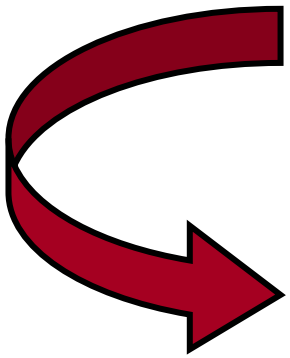
Ricerca mutazioni nel gene **HADHA**
Paziente è omozigote per la mutazione c.1528G



FEBBRAIO 2007

Prenatale su amniocitici
Feto sano

SCREENING NEONATALE
LC/MS/MS POSITIVO



NO NEONATO AFFETTO

MADRE AFFETTA

2 IPERFENILALANIMEMIA MATERNA (Phe↑)

1 3- METILCROTONIL GLICINURIA (C5OH↑)

SCREENING IN MS/MS

ASPETTI POSITIVI

- SCREENING DI PIU' MALATTIE
- DIAGNOSI PRECLINICA
- TERAPIA PRECOCE
- PROGNOSI MIGLIORE
- ANALISI QUANTITATIVA
- MONITORAGGIO DURANTE LA TERAPIA

CRITICITA'

- FALSI POSITIVI, NEGATIVI
- FORME ASINTOMATICHE
- CURE NON RISOLUTIVE IN ALCUNI CASI
- ESORDIO MOLTO PRECOCE
- STRESS FAMIGLIE
- COSTI

RAPPORTO COSTI/BENEFICI

ELEVATO NUMERO FALSI POSITIVI

ELEVATO NUMERO DI RICHIAMI
STRESS FAMILIARE

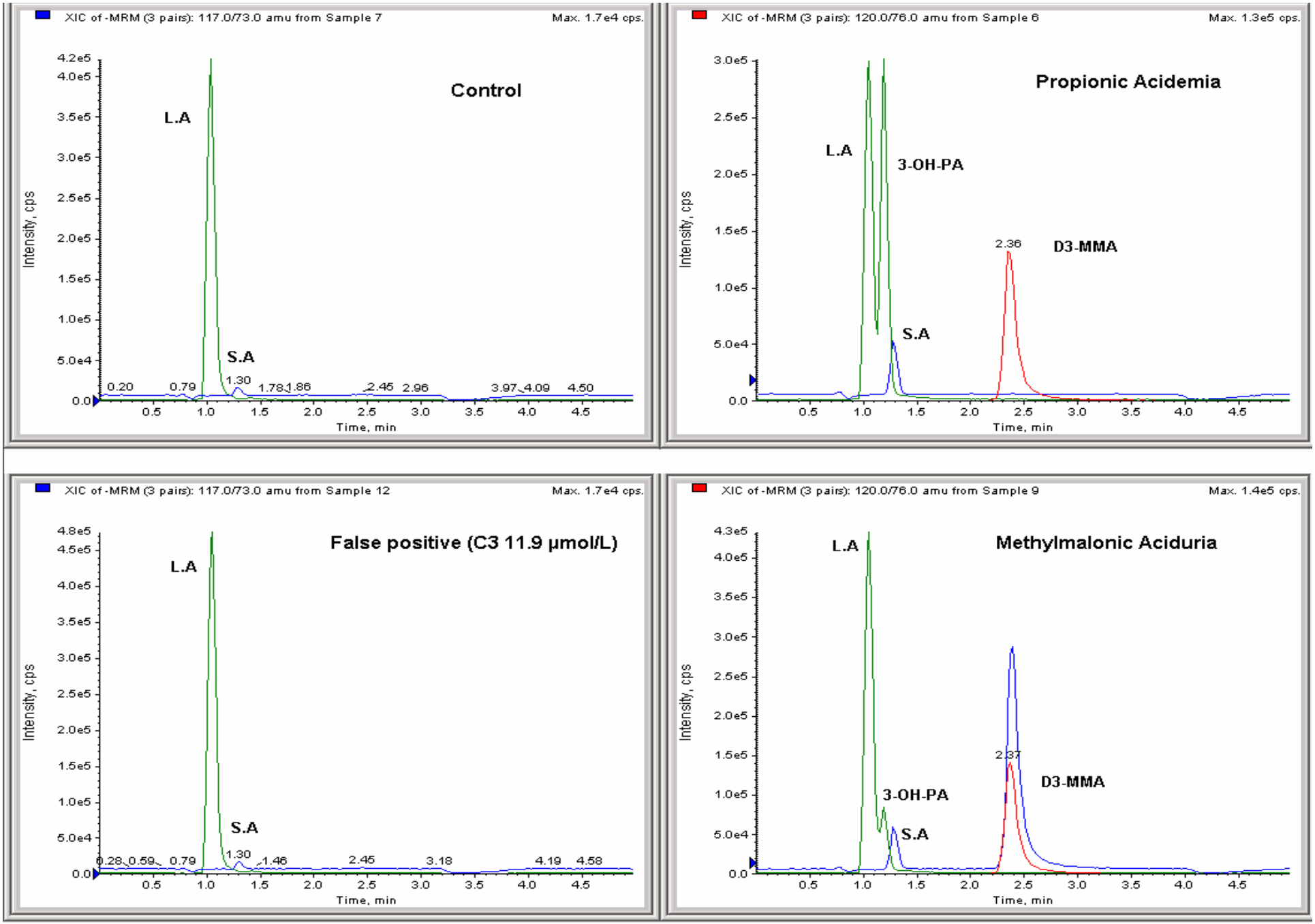
IL CASO DELLA C3 E DELLA C4DC

SUGLI ULTIMI 33600 NEONATI DEL 2006

63 RICHIAMI SU 287 TOTALI ERANO PER ALTERAZIONE DELLA PROPIONIL CARNITINA (C3) E/O DELLA METILMALONIL CARNITINA (C4DC)

DIAGNOSI EFFETTUATE: 1 PA; 2 MMA

VALORE PREDITTIVO POSITIVO 4%



G. la Marca et al, 2007, Clin Chem

SONO STATI TESTATI TUTTI I 63 POSITIVI ALLO SCREENING NEONATALE:
60 NON MOSTRAVANO PRESENZA DI ACIDO METILMALONICO O 3-OH-PROPIONICO.

GLI ALTRI 3 SONO RISULTATI VERI POSITIVI

VALORE PREDITTIVO POSITIVO 100%

Clinical Chemistry 53:7
1364–1369 (2007)

Pediatric Clinical Chemistry

Rapid 2nd-Tier Test for Measurement of 3-OH-Propionic and Methylmalonic Acids on Dried Blood Spots: Reducing the False-Positive Rate for Propionylcarnitine during Expanded Newborn Screening by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry

Giancarlo la Marca,[1*] Sabrina Malvagia,[1] Elisabetta Pasquini,[1] Marzia Innocenti,[2] Maria Alice Donati,[1] and Enrico Zammarchi[1]

CRITERI DI AMMISSIBILITA' ALLO SCREENING

- PROBLEMA IMPORTANTE DI SALUTE PER L'INDIVIDUO E LA COMUNITA'
- ESISTENZA DI UN'ACCETTABILE FORMA DI TERAPIA CHE INFLUENZI POSITIVAMENTE IL SUCCESSIVO DECORSO
- ESISTENZA DI UN PERIODO DI LATENZA O DI SINTOMI PODROMICI
- IL TEST DEVE ESSERE APPLICABILE IN TALE PERIODO ED ACCETTABILE DALLA POPOLAZIONE
- PROCEDIMENTI DIAGNOSTICI SUCCESSIVI FACILMENTE DISPONIBILI
- COSTO DIAGNOSTICO BILANCIATO DALLE SPESE MEDICHE O DI ALTRO TIPO IN CASO DI MANCATA DIAGNOSI

* AUMENTO DELLA ASPETTATIVA DI VITA

* MIGLIORAMENTO DELLA QUALITA' DI VITA

* POSSIBILITA' DI UN CONSIGLIO GENETICO "ADEGUATO E PRECOCE"

* DIAGNOSI PRENATALE

STRESS FAMIGLIE

Parenting Stress Index (PSI) > nei FALSI POSITIVI rispetto ai normali
Median score 67 vs 54 P < 0,001

STRESS MINORE allo screening ripetuto NELLE MADRI CHE RICEVEVANO IL RISULTATO DI PERSONA rispetto a quelle che lo ricevevano per lettera o per telefono
Median score 55 vs 67 P < 0,02

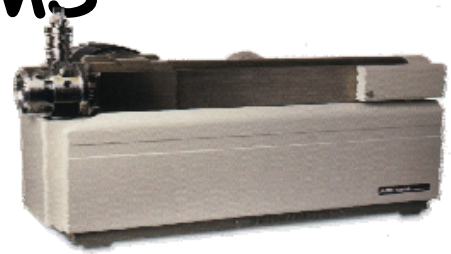
"What level of parental stress related to false-positive identifications will be tolerated within our society? Will changes in how information is communicated to parents relieve this stress?
(JAMA 2003)

IERI

FENILCHETONURIA
IPOTIRIODISMO CONGENITO
FIBROSI CISTICA

OGGI

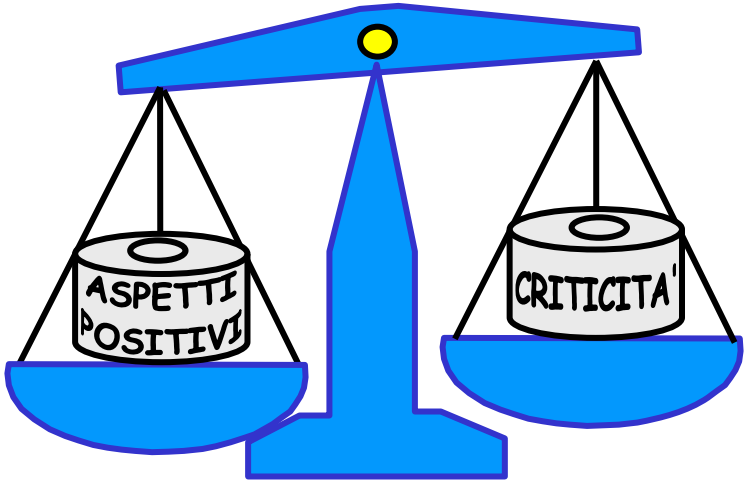
SCREENING METABOLICO ALLARGATO IN LC-MS/MS



DOMANI

SCREENING ALLARGATO ALLE MALATTIE DA ACCUMULO LISOSOMIALE E/O AD ALTRE PATOLOGIE ??

SCREENING NEONATALE in LC/MS/MS



"I bambini bavaresi sono privilegiati"

Screening neonatale 1999-2003:
524 287 analisi → 397 diagnosi
1:1300 Muntau Dicembre 2003

Dal 1°Novembre 2004.....

anche i bambini toscani sono privilegiati!

Del. Reg. Toscana n 800/2.8.04