

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE
“AMEDEO AVOGADRO”**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO
Corso di Laurea Magistrale in Farmacia**

TESI DI LAUREA

*Studio dell'efficacia diagnostica dello Screening Neonatale Esteso e della Conferma
Biochimica per due malattie metaboliche rare: Tirosinemia di tipo 1 e Deficit di Acil-CoA
deidrogenasi a catena media*

Relatore

Prof.ssa Erika Del Grosso

Candidato

Dorothea Vaccaro

Correlatore

Dott.ssa Maria Paola Puccinelli

Anno accademico 2023-2024

Sessione autunnale

Ai miei genitori,

la mia vita

A nonno Nino,

che continua a respirare

nei miei ricordi

INDICE

1. INTRODUZIONE	3
1.1 Cos'è uno screening	3
1.1.1 Sensibilità e specificità	3
1.2 Lo Screening Neonatale	5
1.3 Storia dello Screening Neonatale	5
1.3.1 Il test di Guthrie	5
1.3.2. I criteri di Wilson e Jugner	7
1.3.3 La normativa italiana	8
1.4 Legge Italiana sullo SNE	9
1.4.1 Consenso informato SNE	12
1.4.2 Modalità di raccolta	12
1.5 Sistema organizzativo dello screening neonatale	13
1.5.1 Conferma analitica.....	14
1.5.2 Piemonte e Valle d'Aosta.....	16
1.6 I biomarcatori	17
1.6.1 Gli aminoacidi	17
1.6.2 Il succinilacetone	18
1.6.3 Le acilcarnitine e le acilglicine	19
1.7 Tirosinemia di tipo 1	19
1.7.1 Via metabolica.....	20
1.7.2 Manifestazioni cliniche	21
1.7.3 Trattamento.....	22
1.7.4 Diagnosi.....	23
1.8 Deficit- di acil-Coenzima A deidrogenasi a catena media (MCADD)	23
1.8.1 Via metabolica.....	24
1.8.2 Sintomi e manifestazione clinica	26
1.8.3 Diagnosi.....	26
1.8.4 Genetica	27
1.8.5 Trattamento.....	27
2. SCOPO DEL LAVORO	28

3. MATERIALI E METODI.....	30
3.1 Materiali per l'analisi degli aminoacidi	31
3.1.1 Campioni: plasma	31
3.1.2 Reattivi	31
3.1.3 Strumentazione analitica	34
3.2 Metodi	35
3.2.1 Trattamento campione di plasma	35
3.2.2 Preparazione miscela dei due standard interni (SI MIX)	37
3.2.3 Preparazione dei calibratori: Standard Sigma	37
3.2.4 Preparazione del controllo qualità interno (CQ)	37
3.2.5 Analisi Biochrom 30 plus.....	38
3.3 Materiali per l'analisi degli acidi organici	42
3.3.1 Campioni: urine	42
3.3.2 Reattivi	42
3.3.3 Strumentazione analitica	47
3.4 Metodi	47
3.4.1 Trattamento campione di urina.....	47
3.4.2 Preparazione campioni per analisi degli acidi organici urinari	47
3.4.3 Preparazione miscela dei due standard interni.....	50
3.4.4 Analisi in GC-MS.....	50
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	53
4.1 Risultati pazienti affetti da Tirosinemia di tipo 1	53
4.1.1 Valutazione biomarcatori acidi organici urinari per la Tirosinemia di tipo 1.....	62
4.1.2 Metabolismo della tirosina	64
4.1.3 Il biomarcatore succinilacetone	65
4.1.4 Casi particolari.....	67
4.1.5 Il succinilacetone nello Screening neonatale Esteso.....	69
4.1.6 Esperimento per la quantificazione del succinilacetato.....	74
4.2 Risultati casistica pazienti affetti da MCADD	79
5. CONCLUSIONI	85
6. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA	86
RINGRAZIAMENTI.....	90

1. INTRODUZIONE

1.1 Cos'è uno screening

L'espressione screening in medicina, indica una serie di esami o test sistematici, che vengono effettuati su una popolazione target composta da individui apparentemente in salute, al fine di andare a identificare la positività a una patologia (tramite mezzi clinici, strumentali e di laboratorio), prima che quest'ultima dia dei sintomi clinici. Inoltre, è da sottolineare che screening non vuol dire diagnosi, per cui in caso di positività il paziente per una corretta diagnosi deve essere sottoposto a degli ulteriori esami. Uno screening riguarda soprattutto quelle che sono delle patologie gravi e diffuse nella popolazione, la quale può essere costituita da: popolazione totale, da un solo sesso, o da soggetti che per genetica o familiarità rischiano di sviluppare la malattia. In genere si tratta di test di rapido e semplice impiego; il test è una procedura ben definita e standardizzata, utile per ottenere un'informazione.

1.1.1 Sensibilità e specificità

Sicuramente i test di screening rappresentano un grande vantaggio, tuttavia, hanno dei limiti circa la capacità di individuare tutti i sani e tutti i malati. Si introduce in questo ambito la definizione di due caratteristiche molto importanti: sensibilità e specificità, le quali permettono di valutare determinate capacità del test a cui viene sottoposta la popolazione.

La sensibilità è una caratteristica che indica quanto il test sia in grado di individuare i soggetti che sono davvero patologici. Viene espressa come la probabilità che un individuo realmente affetto dalla malattia risulti positivo al test e, dunque, che il test classifichi i malati in maniera corretta:

$$\text{sensibilità} = \frac{VP}{VP+FN} \times 100$$

VP nella formula, indica il numero dei veri positivi, cioè quanti pazienti che risultano positivi al test sono veramente malati. FN indica invece i falsi negativi, per cui al denominatore troviamo il totale dei soggetti malati.

Per specificità diagnostica, si intende la capacità di identificare gli individui sani, dunque si parla di probabilità che un individuo non affetto risulti negativo al test, (classificazione dei sani in maniera corretta):

$$\text{specificità} = \frac{VN}{VN+FP} \times 100$$

In questo caso, al numeratore si hanno i veri negativi (VN), al denominatore troviamo invece il totale dei soggetti sani, dunque i veri negativi e i falsi positivi.

Per malattie a bassa incidenza, un test dovrebbe avere sia un'elevata specificità, sia un'elevata sensibilità. Sia specificità che sensibilità sono due caratteristiche che possono

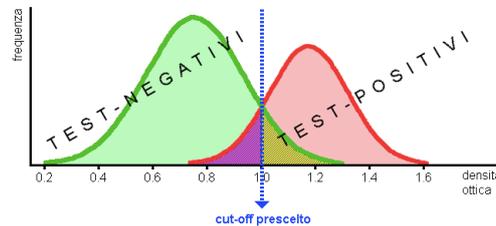


Figura 1 Cut-off di un test di screening (1)

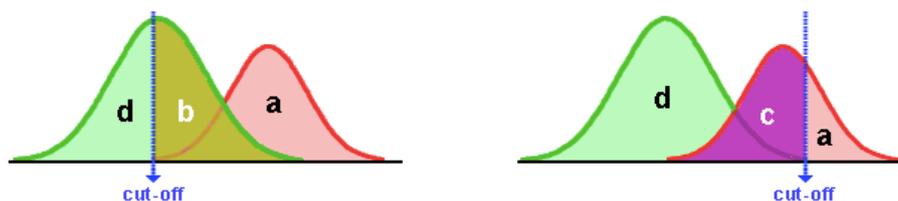


Figura 2 modifiche del cut-off (1)

essere modificate andando a spostare il cut-off, il quale altro non è che un punto limite che discrimina un test positivo da un test negativo:

In figura 1 è raffigurato come utilizzando un cut-off prescelto si ottiene una popolazione di test positivi, test negativi ma anche test falsi negativi a sinistra in viola e falsi positivi a destra in giallo.

Se, però, il cut-off viene abbassato come nella figura 2 a sinistra, il test individua tutti i malati ma aumenta anche la % dei falsi positivi, la sensibilità è quindi massima mentre invece la specificità diminuisce.

Se, invece, il cut-off viene aumentato il test individua tutti i soggetti sani, ma, aumentano anche i falsi negativi: la specificità è al massimo mentre la sensibilità diminuisce. In sintesi:

- se si diminuisce il cut-off di un test diagnostico, aumenta di conseguenza la sensibilità del test;
- se il cut-off di un test diagnostico viene aumentato, aumenta di conseguenza la specificità del test (1);

Per i test di Screening Neonatale, l'obiettivo è quello di identificare tutti i casi positivi. Di conseguenza, il valore dei cut-off viene aggiornato in base al numero di test che risultano falsi negativi, ossia quei casi che, nonostante il risultato negativo, erano in realtà affetti dalla patologia.

1.2 Lo Screening Neonatale

In questo ambito si colloca dunque lo “Screening Neonatale” (2), il quale è nello specifico uno strumento di prevenzione definita “secondaria”, che permette di diagnosticare in maniera precoce malattie congenite del metabolismo, in una fase durante la quale sono ancora asintomatiche, per cui non potrebbero essere diagnosticate dal pediatra. Tutto ciò si rivela utile al fine di evitare conseguenze severe sulla salute del neonato o, in certi casi, una mortalità precoce.

In altre parole, mediante un test biochimico, che viene di solito effettuato entro le 48/72 ore di vita, si è in grado di evidenziare in maniera tempestiva la presenza o meno della malattia prima che ci sia stata una manifestazione clinica, in modo da avviare al più presto un protocollo di trattamento e modificare dunque il corso naturale della patologia (3).

Con il termine “metabolismo” si intende l’insieme delle reazioni biochimiche tra loro correlate, che interconvertono metaboliti cellulari. Si tratta di reazioni di sintesi (anabolismo) e di degradazione (catabolismo) che normalmente avvengono nell’organismo, necessarie per sintetizzare molecole essenziali al mantenimento della vita. Ogni sequenza di reazioni è regolata in modo da fornire alla cellula ciò di cui ha bisogno in quel preciso momento e a consumare energia solo quando è strettamente necessario.

Quando si ha una malattia metabolica, si verifica un disordine a livello del metabolismo, causato da mutazioni di geni che codificano per enzimi coinvolti nelle reazioni biochimiche, che comportano quindi un blocco di una o più vie metaboliche a seconda della patologia.

1.3 Storia dello Screening Neonatale

1.3.1 Il test di Guthrie

Lo screening neonatale nasce nel XX secolo negli Stati Uniti d’America, quando Sir Archibald Garrod (4) coniò il termine “Errori Congeniti del Metabolismo”. Negli anni 60’, il Dott. Robert Guthrie, identificò una malattia chiamata “Fenilchetonuria” (PKU) mediante un test di inibizione enzimatica che prevedeva il prelievo di una piccola goccia di sangue dal tallone del neonato (5).

Questo test semplice e veloce, prese il nome dal suo scopritore: è conosciuto infatti come test di Guthrie. Consiste nel prelevare al neonato delle gocce di sangue e, depositarle in seguito su carta bibula. In seguito, si ricavano dei dischetti tramite punzonatura che si depositano su un terreno di coltura contenente agar e un ceppo batterico che è in grado di crescere in presenza di

fenilalanina: *Bacillus subtilis*. Questo ceppo è inibito dalla presenza di una sostanza chiamata β -tialanina, la quale viene aggiunta al terreno di coltura: quando la fenilalanina è presente in concentrazioni elevate può superare l'inibizione enzimatica data dalla presenza dell'inibitore β -tialanina e consentire la crescita del batterio.

L'alone intorno allo spot ematico (Figura 3) definisce la crescita batterica, la quale, in presenza di quantità elevate di fenilalanina e quindi di un individuo malato di PKU, non risente dell'effetto inibitorio della β -tialanina e quindi i batteri crescono attorno al campione di sangue generando un alone. In presenza di un test di Guthrie positivo per la fenilalanina, si nota quindi un alone di crescita batterica abbondante. Se l'individuo non

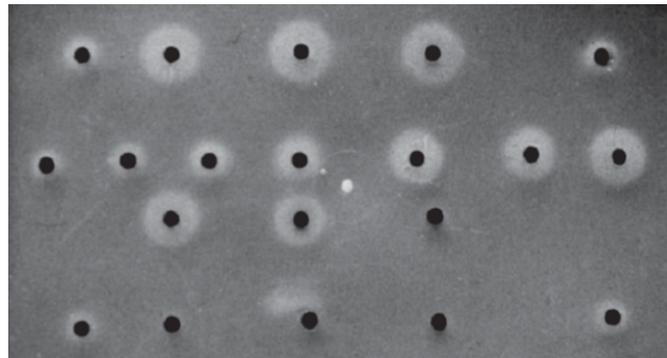


Figura 3 Aloni di crescita batterica del test di Guthrie (6)

è malato di PKU, la quantità di fenilalanina nel sangue è insufficiente per superare l'inibizione della molecola inibitrice e quindi il batterio non cresce attorno al campione di sangue. La concentrazione di fenilalanina si misurava visivamente guardando il diametro degli aloni di crescita batterica intorno al campione e confrontandoli con aloni di crescita batterica di una serie di dischetti contenenti concentrazioni standard di fenilalanina che venivano posizionati sulla stessa piastra di coltura.

Questo test si estese poi negli altri paesi, compresa l'Italia. Il riconoscimento precoce della patologia e semplicemente l'introduzione di una dieta priva di fenilalanina, o a basso contenuto di questa, permise il decremento della morbilità.

Successivamente è stata introdotta la spettrometria di massa tandem (MS/MS) nei programmi di screening. Questa tecnica permise l'identificazione e la quantificazione dei composti presenti in una matrice biologica in base al rapporto massa/carica (m/z). Alcuni paesi degli Stati Uniti d'America (7) hanno iniziato così a utilizzare questa tecnica per 30 diverse patologie e, nel 2003, il Segretario della Salute e dei Servizi Umani ha creato un comitato avente il compito di delineare delle linee guida standard per l'esecuzione dello Screening Neonatale. Il piano prevedeva la ricerca di 29 disturbi principali e 25 secondari, tra organico acidurie, aminoacidopatie e disturbi dell'ossidazione degli acidi grassi. Verso gli anni 70' fu introdotto

il test di screening per l'ipotiroidismo congenito (IC), grazie alla nascita di tecniche di radioimmunologia mediante le quali si riusciva a misurare la tiroxina (T4) i cui bassi livelli sono diagnostici di IC. Vennero sviluppate in seguito nuove tecniche che favorirono, negli anni 90' l'avvio dello screening per l'iperplasia surrenalica congenita e la fibrosi cistica. Nasce, in particolare, la spettrometria di massa tandem con sorgente electrospray che si rivela in grado di analizzare numerosi metaboliti, permettendo di passare al concetto che un test sia in grado di identificare molte malattie. Grazie a questa metodica si può avere un quadro su diverse patologie nel corso di una singola sessione analitica (8).

1.3.2. I criteri di Wilson e Jugner

Le malattie oggetto di screening sono inserite nel programma diagnostico in base ad alcuni criteri che tengono conto della frequenza della malattia nella popolazione, della gravità della malattia stessa e dei possibili trattamenti. I criteri presi in considerazione sono stati definiti nel 1968 dall'Organizzazione Mondiale della Sanità come "criteri di Wilson e Junger" (9), elencati di seguito:

1. La patologia oggetto di screening deve rappresentare un vero e proprio problema di salute importante;
2. Esistenza di un trattamento per i soggetti affetti dalla patologia stessa;
3. Presenza di strutture utili alla diagnosi e alla terapia stessa;
4. Dovrebbe esserci una fase della patologia definita latente o asintomatica;
5. Esistenza di un test applicabile che permetta la diagnosi della patologia ricercata;
6. Il test di screening dovrebbe essere ben accettato dalla popolazione in studio;
7. Conoscenza dell'evoluzione naturale della patologia da parte dei professionisti sanitari;
8. È necessario che ci siano dei parametri o una politica concordata che indichino quali soggetti trattare come "pazienti";
9. I costi relativi allo screening stesso, inclusi diagnosi e trattamento devono essere convenienti rispetto alle spese di assistenza medica;
10. Il progetto di screening deve essere costante e continuo, non occasionale.

Tutti i criteri sopraindicati sono stati rielaborati (10) nel 2008 e ne sono nati dunque di nuovi:

1. Lo screening dovrebbe rispondere a un'esigenza evidente e riconosciuta;
2. Gli obiettivi devono essere definiti sin dall'inizio;
3. È opportuno che venga identificata una popolazione target definita;
4. Dovrebbero essere disponibili delle prove scientifiche relative al fatto che lo screening è uno strumento efficace;
5. Si dovrebbero integrare formazione, test e servizi clinici;
6. Si dovrebbe garantire la qualità e minimizzare i rischi;
7. È necessario che venga garantito il consenso informato, il rispetto e la riservatezza;
8. Si dovrebbe garantire l'accesso allo screening da parte di tutta la popolazione target;
9. Sarebbe opportuno e utile pianificare sin dall'inizio la valutazione del programma;
10. I benefici del programma di screening dovrebbero superare i rischi o danni;

È inoltre da sottolineare che le malattie ricercate nello screening sono scelte a livello nazionale e inserite nel programma anche se non presentano tutti i criteri elencati, quindi, gli Stati decidono di derogare da alcuni principi, per esempio il numero due e il numero sette. Questo ha permesso di diagnosticare casi di malattie rare, migliorando notevolmente la comprensione di queste patologie favorendo lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici.

Nel caso di un'alterazione al test di screening neonatale, si mostrano necessari ulteriori esami che diano conferma dell'ipotetica diagnosi; entra in gioco, dunque, la "conferma diagnostica". Il paziente, se positivo alla conferma, viene preso in carico dal centro clinico di riferimento, si avvia il trattamento e, il percorso di follow-up.

1.3.3 La normativa italiana

Sono numerose le leggi italiane che regolamentano la pratica di Screening Neonatale.

La legge del 5 febbraio 1992 n.104, è una legge messa a punto per l'assistenza, i diritti e per l'integrazione sociale delle persone con handicap. In particolare, l'articolo 6, introduce lo screening neonatale su spot ematico per le seguenti malattie: ipotiroidismo congenito, fibrosi cistica, fenilchetonuria.

La legge del 23 dicembre 1993 n.548, descrive le linee guida per la prevenzione e per il trattamento della fibrosi cistica.

Vi è poi il decreto del 9 luglio 1999, relativo al coordinamento delle regioni autonome di Trento e Bolzano circa la diagnosi precoce e il controllo per l'ipotiroidismo congenito, la fenilchetonuria e la fibrosi cistica.

Nel 2013 nacque un disegno legge che rese obbligatorio lo Screening Neonatale Esteso in tutte le Regioni d'Italia, dopo tre anni, in particolare il 4 agosto 2016 divenne Legge (167/2016). Prima dell'entrata in vigore di questa legge, tuttavia, in tutta Italia si eseguiva il pannello base dello screening che prevedeva la ricerca di fenilchetonuria, l'ipotiroidismo congenito e la fibrosi cistica, ma ogni regione estendeva lo screening ad altre patologie che variavano da regione a regione.

1.4 Legge Italiana sullo SNE

La legge 19 agosto 2016, n.167, è considerata una delle norme più avanzate in termini di sanità pubblica ed illustra le disposizioni circa gli accertamenti diagnostici neonatali obbligatori per le malattie metaboliche ereditarie.

Con il decreto del 13 ottobre 2016 finalizzato ad attuare la Legge 167/2016, vengono emesse le disposizioni per l'avvio dello screening neonatale per la diagnosi precoce delle malattie metaboliche ereditarie.

Nel sopraindicato decreto, viene trattato lo Screening Neonatale Esteso, indicato con l'acronimo SNE. Lo SNE rappresenta non solo un test, bensì un'organizzazione complessa che necessita la sinergia tra istituzioni centrali, regioni, centri clinici, pazienti e famiglie, ed infine società scientifiche, al fine di garantire accesso a tutti i nati su territorio nazionale.

Le patologie ricercate nello SNE, sono elencate in figura 4 e 5: in particolare, si tratta di 9 aminoacidopatie, 13 acidurie organiche, 4 disturbi del ciclo dell'urea, e 10 disturbi del metabolismo degli acidi grassi.

ALLEGATO

Tabella 1. Malattie metaboliche ereditarie oggetto di screening neonatale con metodica di massa tandem									
Malattia	Acronimo	Numero MIM	Gruppo (**)	Denominazione del Gruppo Patologia (D.M 279/2001 All. N.1)	Cod. di esenzione (D.M 279/2001 All. N.1)	Marker primari (vedi legenda**)			
Fenilchetonuria*	PKU	261600	AA	DISTURBI DEL METABOLISMO E DEL TRASPORTO DEGLI AMMINOACIDI	RCG040	Phe			
Iperfenilalaninemia benigna	HPA	261600				Phe			
Deficit della biosintesi del cofattore bioterina	BIOPT (BS)	261640				Phe			
Deficit della rigenerazione del cofattore bioterina	BIOPT (REG)	261630				Phe			
Tirosinemia tipo I	TYR I	276700				SUAC			
Tirosinemia tipo II	TYR II	276600				Tyr			
Malattia delle urine a sciroppo d'acero	MSUD	248800				Val Xleu			
Omocistinuria (difetto di CBS)	HCY	236200				Met alta			
Omocistinuria (difetto severo di MTHFR)	MTHFR	236250				Met bassa			
Acidemia glutarica tipo I	GA I	231670				OA	DISTURBI DEL METABOLISMO E DEL TRASPORTO DEGLI AMMINOACIDI	RCG040	C5-DC
Acidemia isovalerica	IVA	243500	C5						
Deficit di beta-chetotilasi	BKT	203750	C5:1 C5-OH						
Acidemia 3-I-drossi 3-metilglutarica	HMG	246450	C5-OH C6-DC						
Acidemia propionica	PA	606054	C3						
Acidemia metilmalonica (Mut)	MUT	251000	C3						
Acidemia metilmalonica (Cbl-A)	Cbl A	251100	C3						
Acidemia metilmalonica (Cbl-B)	Cbl B	251110	C3						
Acidemia metilmalonica con omocistinuria (deficit Cbl C)	Cbl C	277400	C3 alta Met bassa						
Acidemia metilmalonica con omocistinuria (deficit Cbl D)	Cbl D	277410	C3 alta e/o Met bassa						
Deficit di 2-metilbutiril-CoA deidrogenasi	2MBG	610006	UCD	DISTURBI DEL CICLO DELL'UREA	RCG050	C5			
Aciduria malonica	MAL	606761				C3-DC			
Deficit multiplo di carbossilasi	MCD	253270				C5-OH			
Citrullinemia tipo I	CIT I	215700				UCD	DISTURBI DEL CICLO DELL'UREA	RCG050	Cit
Citrullinemia tipo II (deficit di Citrina)	CIT II	605814							Cit
Acidemia argininosuccinica	ASA	207900							ASA
Argininemia	ARG	207800							Arg
Deficit del trasporto della carnitina	CUD	212140				O DELLE LIPOPROTEINE			C0 bassa
Deficit di carnitina palmitoil-trasferasi I	CPT Ia	255120							C0 alta C16 bassa C18 bassa
Deficit carnitina-acilcarnitina traslocasi	CACT	212138							C16 C18:2 C18:1 C18
Deficit di carnitina palmitoil-trasferasi II	CPT II	600650	C16 C18:2 C18:1 C18						

Figura 4 Tabella malattie SNE (11)

Deficit di acil-CoA deidrogenasi a catena molto lunga	VLCAD	609575	FAO	ALTERAZIONI CONGENITE DEL METABOLISM	RCG070	C14:2 C14:1 C14
Deficit della proteina trifunzionale mitocondriale	TFP	609015				C16:1-OH C16-OH C18:1-OH C18-OH
Deficit di 3-idrossi-acil-CoA deidrogenasi a catena lunga	LCHAD	609016				C16:1-OH C16-OH C18:1-OH C18-OH
Deficit di acil-CoA deidrogenasi a catena media	MCAD	201450				C6 C8 C10:1 C10
Deficit di 3-idrossi-acil-CoA deidrogenasi a catena media/corta	M/SCHAD	231530				C4-OH
Acidemia glutarica tipo II	GA II/MADD	231680				da C4 a C18 sature e insature

Si segnala la possibilità, per alcune condizioni e per cause fisiologiche, di normali concentrazioni del biomarcatore in epoca neonatale pur in presenza di patologia (falso negativo).

Note:

* La Fenilchetonuria è già oggetto di screening neonatale obbligatorio.

** Acronimi gruppi di malattie: AA, aminoacidopatie; OA, organico acidemie; UCD, disturbi del ciclo dell'urea; FAO, disturbi dell'ossidazione degli acidi grassi.

*** Legenda della nomenclatura dei marcatori primari:

Aminoacidi
Arg = Arginina
Asa = Acido argininosuccinico
Cit = Citrullina
Met = Metionina
Orn = Ornitina
Phe = Fenilalanina
SUAC = Succinilacetone
Tyr = Tirosina
Val = Valina
Xleu = Leucina /isoleucina/alloisoleucina
Acilcarnitine
C0 = Carnitina libera
C3 = Acilcarnitina (3 atomi di carbonio) satura
C3-DC = Acilcarnitina (3 atomi di carbonio) dicarbossilica
C4 = Acilcarnitina (4 atomi di carbonio) satura
C4-OH = Acilcarnitina (4 atomi di carbonio) satura idrossilata
C5 = Acilcarnitina (5 atomi di carbonio) satura
C5:1 = Acilcarnitina (5 atomi di carbonio) monoinsatura
C5-DC = Acilcarnitina (5 atomi di carbonio) dicarbossilica
C5-OH = Acilcarnitina (5 atomi di carbonio) satura idrossilata
C6 = Acilcarnitina (6 atomi di carbonio) satura
C6-DC = Acilcarnitina (6 atomi di carbonio) dicarbossilica
C8 = Acilcarnitina (8 atomi di carbonio) satura
C10 = Acilcarnitina (10 atomi di carbonio) satura
C10:1 = Acilcarnitina (10 atomi di carbonio) monoinsatura
C14 = Acilcarnitina (14 atomi di carbonio) satura
C14:1 = Acilcarnitina (14 atomi di carbonio) monoinsatura
C14:2 = Acilcarnitina (14 atomi di carbonio) di-insatura
C16 = Acilcarnitina (16 atomi di carbonio) satura
C16-OH = Acilcarnitina (16 atomi di carbonio) satura idrossilata
C16:1 = Acilcarnitina (16 atomi di carbonio) monoinsatura
C16:1-OH = Acilcarnitina (16 atomi di carbonio) monoinsatura idrossilata
C18 = Acilcarnitina (18 atomi di carbonio) satura
C18-OH = Acilcarnitina (18 atomi di carbonio) satura idrossilata
C18:1 = Acilcarnitina (18 atomi di carbonio) monoinsatura
C18:1-OH = Acilcarnitina (18 atomi di carbonio) monoinsatura idrossilata
C18:2 = Acilcarnitina (18 atomi di carbonio) di-insatura

Figura 5 Tabella malattie SNE (11)

Il Ministero della Salute, ogni tre anni, fa una revisione della lista delle patologie, in relazione alle evidenze scientifiche diagnostico-terapeutiche. L'Istituto Superiore della Sanità procede, invece, con l'aggiornamento quantitativo e qualitativo dei markers primari necessari per identificare i malati positivi allo sc SNE (11).

1.4.1 Consenso informato SNE

Gli operatori sanitari forniscono ai genitori il consenso informato prima dell'effettuazione del test; questi ultimi decideranno se dare il consenso per lo SNE.

È opportuno che il consenso informato venga formulato in un linguaggio facilmente comprensibile e chiaro, in modo da consentire ai genitori di comprendere gli obiettivi e le modalità di effettuazione dello SNE e le malattie ricercate. Il consenso riguarda, oltre l'adesione per l'esecuzione dello screening, anche il trattamento dei dati personali e i parametri legati alla conservazione dei campioni raccolti.

Negli articoli successivi del medesimo decreto, si affrontano le modalità di raccolta, invio e conservazione dello spot ematico raccolto.

1.4.2 Modalità di raccolta

La raccolta dello spot ematico avviene al secondo/terzo giorno di vita del neonato, quindi tra le 48 e le 72 ore da parte del personale specificamente formato o, in caso di parto a domicilio, dall'operatore sanitario che ha assistito al parto; lo spot verrà inviato al centro nascita di riferimento. La figura 6 illustra le modalità di raccolta del campione su carta bibula.



Figura 6 Modalità di raccolta dello spot ematico (12)

Lo spot viene raccolto previa disinfezione della pelle. In seguito, si punge il tallone con un bisturi sterile o altro dispositivo che permetta l'incisione della pelle ad una profondità di 1.0-2.0 mm; è molto importante non superare i 2.0 mm per non arrecare danni alle ossa dei neonati.

La prima goccia di sangue va pulita e, la seconda goccia di sangue va raccolta appoggiando su di essa la carta da filtro e dunque impregnando uno dei cerchi prestampati. È importante in questa fase controllare che anche l'altro lato della carta da filtro sia impregnata di sangue. È necessario anche evitare di premere eccessivamente la ferita, in quanto questo può comportare emolisi del campione. Il campione raccolto, deve asciugarsi per circa tre ore a temperatura ambiente. Il cartoncino contenente lo spot ematico è utilizzato sia per lo screening neonatale

tradizionale che per lo SNE e contiene alcune informazioni utili al laboratorio, tra cui: peso ed età gestazionale del neonato, alimentazione o eventuale trattamento con farmaci sia del neonato che della madre, eventuali trasfusioni, condizioni cliniche particolari, modalità del parto (cesareo o naturale). Sono presenti, inoltre, dati del neonato (nome e cognome), dati dei genitori (nome e cognome), la data di nascita del neonato, la data del prelievo (utile al fine di riconoscere se il prelievo è stato effettuato nei giusti tempi prestabiliti). È presente il nome dell'Ospedale di nascita, l'indirizzo, e, i riferimenti del medico. Si utilizza inoltre un codice a barre identificativo univoco per ogni neonato, dunque sarà diverso per ogni individuo.

Il materiale biologico residuo si conserva per quattro anni durante i quali, se dovesse emergere un sospetto, si avrebbe del materiale disponibile all'analisi per comprendere ad esempio se eventuale patologia era presente già alla nascita.

Nel caso in cui il neonato muoia entro le 48-72 ore, è necessario comunicarlo al laboratorio di screening e al centro clinico per eventuale consulenza genetica ai genitori.

In base al protocollo dell'Ospedale Regina Margherita di Torino, il quale rappresenta il centro screening di riferimento per Piemonte e Valle d'Aosta, va effettuato un richiamo al fine di ripetere l'analisi nei seguenti casi:

1. Ai neonati con un peso alla nascita inferiore a 1500 g il prelievo va effettuato nuovamente dopo 15 giorni;
2. Ai neonati pretermine, cioè nati fino prima delle 37 settimane di gestazione, il prelievo va ripetuto dopo 15 giorni;
3. Se il neonato sta effettuando una terapia parenterale (TPN) l'esame va effettuato nuovamente dopo tre giorni dal termine della TPN;
4. Se il neonato è sottoposto a trasfusione, va ritestato dopo sette giorni dalla fine della trasfusione;
5. Se il prelievo è stato effettuato prima delle 48 ore di vita compiute, va effettuato un ulteriore spot dopo altre 48 ore.

1.5 Sistema organizzativo dello screening neonatale

Il laboratorio di screening del SSN effettua il test di primo livello per le malattie metaboliche ereditarie ma garantisce in determinati casi anche l'esecuzione del second-tier test (2TT). quest'ultimo è un test che viene effettuato sullo stesso spot ematico utilizzato per i test di primo

livello nei casi in cui l'analita alterato rientra da quelli per cui è stato implementato questo test (Metionina, acilcarnitine C3, C4, C5 e alloisoleucine), in caso contrario si procede alla ripetizione sullo stesso cartoncino la medesima analisi in doppio. Il second tier-test può essere di tipo biochimico o genetico, quello di tipo biochimico utilizza la spettrometria di massa tandem interfacciata alla cromatografia liquida (HPLC o UPLC). Gli analiti attraversano una colonna cromatografica, nella quale vengono separati in base all'affinità che ciascuno di essi ha con la fase stazionaria. Successivamente, una volta separato, entrano nello spettrometro di massa che identifica i composti in base al rapporto m/z. Quest'analisi offre maggiore sensibilità e specificità, migliorando il valore predittivo positivo.

Esiste poi un laboratorio del SSN che si occupa invece delle analisi di secondo livello per lo SNE, si occupa quindi della "conferma diagnostica", anche in condizioni di urgenza.

Il centro clinico è organizzato in modo da gestire le urgenze sulle 24 ore e prende in carico il neonato sospetto come malato di malattia metabolica ereditaria. Esegue, inoltre il follow-up a lungo termine e consulenze genetiche alla famiglia.

Esiste, inoltre, il coordinamento regionale del sistema di screening, avente il compito di organizzare e monitorare il sistema a livello provinciale o regionale.

In caso di esito positivo allo SNE, il risultato viene notificato al punto nascita e al centro clinico, che si occupano di richiamare il neonato per effettuare un nuovo spot ematico (secondo DBS). Nel caso in cui anche dopo conferma diagnostica il neonato dovesse risultare positivo, questo, viene preso in carico per il follow-up e viene garantito il counseling genetico ai familiari.

I casi positivi, quindi dopo conferma diagnostica, vengono comunicati al Registro nazionale malattie rare.

Per quanto riguarda gli oneri economici, le risorse finanziarie sono destinate a finalizzare gli obiettivi quali e quantitativi in modo da garantire gratuità e uniformità per lo SNE. A garantire tutto ciò ci sono degli accordi interregionali presi in relazione alla popolazione neonatale dei bacini d'utenza e miglioramento di tutto il sistema di screening, quindi anche del potenziamento della rete per il trasporto dei campioni al laboratorio screening di riferimento (11).

1.5.1 Conferma analitica

Come già riportato, uno screening non è di per sé uno strumento diagnostico, bensì l'inizio di un processo che porta in seguito all'applicazione di test di secondo livello o conferma, ad una diagnosi, terapia e follow-up.

Per la conferma analitica si mostrano essenziali metodiche di laboratorio che siano ad alta sensibilità e specificità, tra queste vi è la cromatografia a scambio ionico, l'HPLC, la gascromatografia/MS. La MS/MS (spettrometria di massa tandem), è molto utile sia nella fase di screening di primo livello in cui gli analiti vengono ricercati su spot ematico su carta bibula, sia nella fase di conferma accoppiata alla cromatografia, in cui gli analiti sono ricercati su plasma o urine. Lo SNE è un esame di tipo biochimico o enzimatico, la conferma è invece un esame che può essere di tipo biochimico, enzimatico e genetico. Con la conferma di tipo biochimico si va a valutare la presenza di determinati analiti e rispettivamente le concentrazioni su matrice urinaria o plasmatica a seconda dei casi. Con la conferma di tipo genetico si va a valutare la presenza di mutazioni a livello del DNA su determinati geni coinvolti nella patologia. Infine, con la conferma enzimatica, quando possibile, si va a valutare l'attività di determinati enzimi coinvolti nella patologia sospettata.

DISTURBI CATABOLISMO E TRASPORTO AMINOACIDI	MARKER SCREENING	ANALISI CONFERMA	MARKERS CONFERMA	TEST AGGIUNTIVI
Fenilchetonuria (inclusa iperfenilalaninemia benigna e deficit metabolici delle pterine)	Fenilalanina Tirosina	Aminoaci plasmatici	Fenilalanina Tirosina	Metaboliti delle pterine nelle urine. Attività della Diidropteridina riduttasi
Tirosinemia Tipo 1 Tipo 2	Tirosina	Acidi organici urinari Aminoaci plasmatici	Succinilacetone Tirosina >1000 µM all'esordio	Nessun ulteriore test indicato
Malattia delle urine a sciroppo d'acero	Isoleucina + leucina + alloisoleucina	Aminoaci plasmatici Acidi organici urinari	Isoleucina, Leucina, valina, alloisoleucina	Nessun ulteriore test indicato
Citrullinemia Tipo 1 Tipo 2	Citrullina Citrullina	Aminoacidi urinari/plasmatici	Citrullina, Argininosuccinato	Ammonemia, bilirubina, fosfatasi alcalina, GGT. Test genetici possono distinguere tipo I dal Tipo II.
Acidemia Argininosuccinica	Citrullina	Aminoacidi urinari/plasmatici	Citrullina, Argininosuccinato	Nessun ulteriore test indicato
omocitsinuria	Metionina	Aminoacidi urinari/plasmatici Acidi organici urinari	Omocisteina Metionina, omocistina Acido Metilmalonico	Il rapporto Folato/Vitamin B ₁₂

Figura 7 Conferma diagnostica aminoacidopatie (modificato da (13))

In figura 7, è riportata una tabella relativa ai disturbi del trasporto e del catabolismo degli aminoacidi. Per ogni patologia sono indicati i marker ricercati attraverso screening, quindi gli analiti che vengono indagati nel DBS; sono poi indicati anche i percorsi di conferma biochimica, ovvero le tipologie di analisi che vengono effettuate per monitorare l'andamento di alcuni analiti, ad esempio per le aminoacidopatie appunto si possono indagare gli aminoacidi plasmatici o urinari e gli acidi organici urinari.

Nell'ultima colonna sono indicati i test aggiuntivi che vengono effettuati eventualmente per alcune patologie.

La figura 8 è relativa alla diagnosi dei disturbi della β -ossidazione degli acidi grassi. Tramite il dosaggio delle acil-carnitine in MS/MS si possono diagnosticare alcune malattie della β -ossidazione degli acidi grassi (Fatty Acid β -oxidation disorder o FAOD e anche diverse acidurie organiche. Anche in questa tabella sono indicate le tipologie di analisi da eseguire durante la conferma biochimica, come, il dosaggio delle acil-carnitine su plasma, degli acidi organici urinari e, la carnitina libera totale. Nella penultima colonna si trovano indicati i marker specifici da ricercare per le rispettive patologie e nell'ultima colonna sono invece riportati eventuali test addizionali che si possono eseguire per avere ulteriori conferme.

+	Marker Screening	Analisi conferma	Marker conferma	Test addizionali
Deficit dell'acil CoA deidrogenasi a catena media (MCAD)	Acilcarnitine C6, C8, C10	Dosaggio acilcarnitine Acidi organici urinari	Acilcarnitine C6, C8, C10	Analisi molecolare per mutazione predominante A985G
Deficit dell'acil CoA deidrogenasi a catena molto lunga (VLCAD)	Acilcarnitine Acilcarnitine C14:0, C14:1	Dosaggio acilcarnitine Acidi organici urinari	Acilcarnitine C14:0, C14:1, C16:0, C16:1, C18:0, C18:1 Aumento degli acidi dicarbossilici a catena lunga/media	L'analisi genetica può discriminare le forme ad esordio acuto da quelle ad esordio tardivo
Deficit dell'acil CoA deidrogenasi a catena lunga (LCHAD)/ deficit di TFP	Acilcarnitine C16-OH, C18-OH, C18:1-OH	Dosaggio acilcarnitine Acidi organici urinari	Acilcarnitine C16-OH, C18-OH, C18:1OH Aciduria 3-idrossi dicarbossilica con limitata chetosi	80-90% degli alleli mostra la mutazione G1528C. La diagnosi differenziale con il deficit di TFP richiede dosaggio attività enzimatica
Deficit dell'acil CoA deidrogenasi a catena corta (SCAD)	Carnitina C4	Acidi organici urinari	Acidi etilmalonico e metilsuccinico	Il profilo dell'ossidazione degli acidi grassi sui Fibroblasti è indicato quando il dosaggio degli acidi organici urinari è dubbio.
Deficit dell'idrossiacil CoA deidrogenasi a catena medio/corta (M/SCHAD)	Carnitina C4-OH	Acidi organici urinari	Acido 3-OH adipico, 3-OH sebacico, 3-OH suberico.	Non sono indicati test addizionali
Deficit primari di Carnitina	Carnitina libera (C0)	Carnitina libera Totale	Bassi livelli di carnitina libera e totale. Elevati livelli di Carnitina urinaria.	Secondaria? Ridotto uptake di carnitina nei fibroblasti

Figura 8 Conferma diagnostica FAOD (modificato da (13))

1.5.2 Piemonte e Valle d'Aosta

Il Centro Screening Neonatale del Piemonte, si occupa di eseguire gli screening neonatali obbligatori sia per il Piemonte stesso che per la Valle d'Aosta.

Il pannello di patologie è il seguente:

- Ipotiroidismo congenito
- Fibrosi cistica

- Iperplasia surrenalica congenita
- Galattosemia
- Biotinidasi
- Fenilchetonuria
- Malattie metaboliche ereditarie dello SNE
- Atrofia midollare spinale (Progetto pilota)

L'utenza è di circa 30.000 neonati per anno e nel 10% di questi casi il test di screening viene ripetuto in riferimento a protocolli speciali (14).

Ultimamente, (14 novembre 2022), è stata aggiunta allo screening neonatale presso Ospedale Regina Margherita di Torino, un progetto pilota che prevede la ricerca dei biomarcatori per l'Atrofia Midollare Spinale, anche conosciuta come SMA. In particolare, nella diagnosi di questa malattia vi è la collaborazione del laboratorio biochimico e del laboratorio di genetica.

1.6 I biomarcatori

I biomarcatori sono delle sostanze che possono rappresentare un vero e proprio parametro biologico che misura lo stato di salute o malattia di un individuo. Un biomarcatore è quindi una molecola che può essere misurata in matrici biologiche come siero, plasma, urine e sangue.

1.6.1 Gli aminoacidi

Gli aminoacidi (AA), sono delle molecole organiche anfotere, il che vuol dire che all'interno della loro struttura molecolare si trova sia un gruppo funzionale amminico basico (NH_2), che un gruppo funzionale carbossilico acido (COOH); vi è poi un gruppo funzionale R che si differenzia per struttura, dimensioni e carica e va a influenzare caratteristiche del singolo aminoacido. I due gruppi funzionali principali degli aminoacidi possono essere ionizzati o non-ionizzati in base al pH in cui si trova l'aminoacido: a pH fisiologico (circa 7.4) gli aminoacidi che non hanno ulteriori cariche (neutri), si trovano sotto forma ionizzata e quindi zwitterionica, il COOH si deprotona a COO^- e l' NH_2 si protona a NH_3^+ , la molecola è quindi neutra. Gli aminoacidi acidi (come acido aspartico e acido glutammico) sono deprotonati a pH fisiologico, avendo una carica negativa nella catena laterale. Gli aminoacidi basici (come lisina e arginina), avranno la catena laterale protonata e quindi carica positiva a pH fisiologico. Pertanto, questi aminoacidi pH fisiologico non sono elettricamente neutri, poiché hanno una catena laterale che

ne determina la carica. Ogni aminoacido ha un pH specifico detto punto isoelettrico (valore a cui la molecola è neutra), che, dipende dalle pKa dei gruppi ionizzabili e dalla sua struttura chimica (15).

Questo concetto spiega il principio secondo cui, in HPLC (High-Performance Liquid Chromatography), utilizzata per la conferma delle aminoacidopatie, gli aminoacidi hanno tempi di ritenzione diversi in base ai loro valori di pKa e in base al pH della fase mobile utilizzata che, quindi, influenza lo stato di ionizzazione degli aminoacidi. Questo a sua volta, determina quanto fortemente gli aminoacidi interagiscono con la fase stazionaria e quindi ne determina il tempo di ritenzione. Cambiando il pH della fase mobile, è possibile modulare la carica di essi ottenendo una buona separazione.

L'organismo umano, è capace di sintetizzare solo alcuni aminoacidi, mentre altri sono definiti essenziali e devono per forza essere assunti mediante l'alimentazione: leucina, isoleucina, istidina, metionina, valina, lisina, fenilalanina, treonina e triptofano. Gli aminoacidi rappresentano un'importante risorsa energetica per l'organismo ma sono altrettanto importanti durante i periodi di digiuno quando carboidrati o lipidi non sono disponibili. Un alterato metabolismo aminoacidico può portare ad un incremento degli aminoacidi plasmatici e, quindi, il manifestarsi di aminoacidopatie ma anche un incremento delle acilcarnitine plasmatiche, da cui derivano alcune malattie metaboliche definite acidurie organiche.

1.6.2 Il succinilacetone

Il succinilacetone (SA), (figura 9), $C_7H_{10}O_4$, è un composto chimico che deriva da un blocco nel catabolismo della tirosina. Non è quindi una molecola fisiologicamente presente, bensì viene sintetizzata in seguito a un deficit dell'enzima fumaroilacetoacetato idrossilasi (FAH) nella malattia metabolica Tirosinemia di tipo 1. La determinazione quantitativa del SA urinario è molto utile in caso di diagnosi precoce di Tirosinemia di tipo 1 ma anche in caso di follow-up e monitoraggio del trattamento.

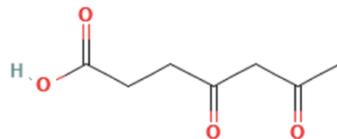


Figura 9 Struttura chimica del SA (16)

1.6.3 Le acilcarnitine e le acilglicine

La carnitina è un aminoacido non proteico, in quanto non è utilizzato dall'organismo per sintetizzare proteine. Può essere assunto con la dieta o sintetizzato in maniera endogena a partire dall'aminoacido lisina.

La carnitina svolge importanti funzioni nell'organismo, che vanno da processi di detossificazione, al trasporto degli acidi grassi all'interno dei mitocondri, in particolare acidi grassi a catena lunga. Gli acidi grassi quando sono presenti nella loro forma attivata, si legano ad una molecola di acil-CoA, a causa della quale, però, non riescono ad attraversare la membrana mitocondriale ed è per questo che l'acil-CoA viene ceduto alla molecola di carnitina a formare la carnitina esterificata, quindi l'acilcarnitina (17): $R - CO - N(CH_3)_3$.

Sono dei biomarcatori molto interessanti in quanto permettono di diagnosticare sia disordini della β -ossidazione degli acidi grassi, che aminoacidopatie e organico acidurie in maniera molto precoce.

Le acilglicine ($R-CO-NH-CH_2-COOH$) sono dei composti derivati da acido glicolico e acidi grassi. Sono costituiti da una molecola di glicina, a cui è legato un gruppo acile R (derivato da un acido grasso). Sono molecole utilizzate come intermedi nei meccanismi metabolici di degradazione degli acidi grassi e come donatori di gruppi acilici in diverse reazioni biochimiche. Svolgono inoltre un ruolo di elevata importanza nella detossificazione dei metaboliti tossici. Possono accumularsi in malattie metaboliche come nei disordini della β -ossidazione degli acidi grassi, per questo, l'analisi delle acilglicine nel sangue o nelle urine può essere utile nella diagnosi di questa tipologia di malattie metaboliche. Nel caso dell'accumulo di acilglicine in presenza di un disordine a livello della β -ossidazione degli acidi grassi, gli acidi grassi non sono degradati in maniera efficace e questo comporta che essi vengano legati alla glicina e la conseguenza è quindi un'elevata concentrazione di acilglicine. Queste molecole si accumulano anche in presenza di difetti del ciclo dell'urea, in cui si verifica iperammonemia; l'ammoniaca, di conseguenza, viene coniugata con la glicina e ciò comporta l'aumento delle concentrazioni di acilglicine.

1.7 Tirosinemia di tipo 1

La tirosinemia di tipo 1 è una malattia metabolica rara di tipo ereditario, a trasmissione autosomica recessiva, la cui causa è un deficit o difetto enzimatico della fumarilacetoacetato idrossilasi (FAH), enzima che interviene nella fase finale del metabolismo dell'aminoacido tirosina.

La tirosina è un α -aminoacido aromatico non essenziale, ovvero può essere sintetizzato nell'organismo animale a partire dalla fenilalanina, la cui idrossilazione in *para* (figura 10) è inversamente proporzionale alla quantità di tirosina derivante dall'ingestione di proteine dalla dieta.

La fenilalanina è precursore di dopamina, noradrenalina, adrenalina, melanina; un difetto a carico di queste vie metaboliche può facilmente indurre un danno al sistema nervoso.

Nella seguente figura 10 sono rappresentate le vie cataboliche della fenilalanina e della tirosina, aminoacidi che vengono normalmente convertiti in Acetoacetyl-CoA e fumarato;

in presenza di un blocco di queste vie cataboliche insorgono malattie metaboliche quali:

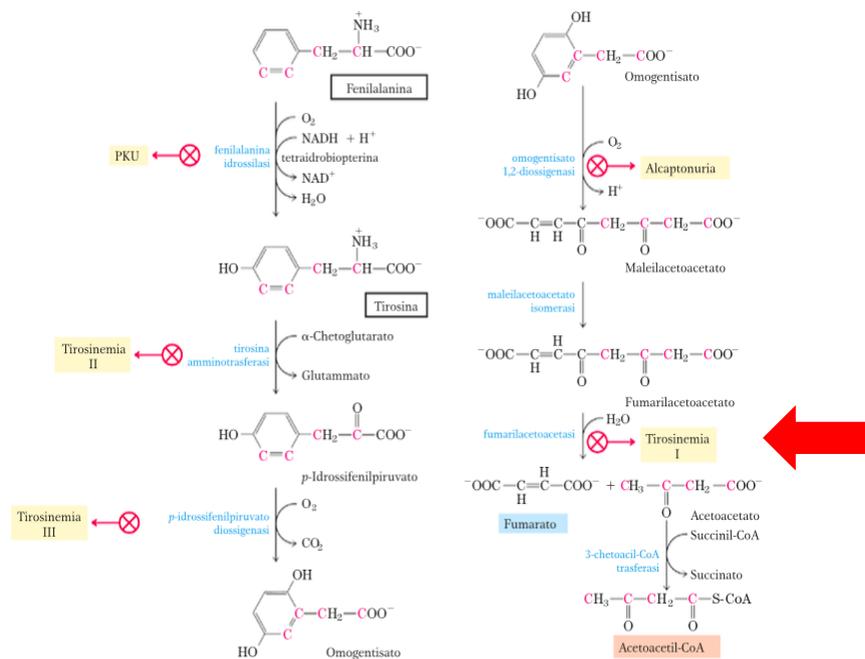


Figura 10 Catabolismo tirosina (18)

- la PKU, in seguito a blocco dell'enzima fenilalanina idrossilasi;
- la tirosinemia di tipo II è causata da un deficit dell'enzima tirosinaaminotrasferasi;
- la Tirosinemia di tipo III, si presenta in seguito a blocco della p-idrossifenilpiruvato deidrogenasi;
- la Tirosinemia di tipo I causata da un blocco della fumarilacetoacetasi.

1.7.1 Via metabolica

La Tirosinemia di tipo 1 è causata da mutazioni del gene FAH che codifica per l'enzima fumarilacetoacetato idrossilasi (FAH), importante per la degradazione della tirosina. Nel

momento in cui l'aminoacido tirosina risulta essere presente in concentrazioni elevate, subisce l'azione dell'enzima FAH, che la metabolizza fino a formare fumarato e acetoacetato e poi CO₂ e acqua. Se FAH è carente, causa un blocco nell'ultimo passaggio del catabolismo e di conseguenza si accumula un metabolita chiamato fumarilacetoacetato (FAA).

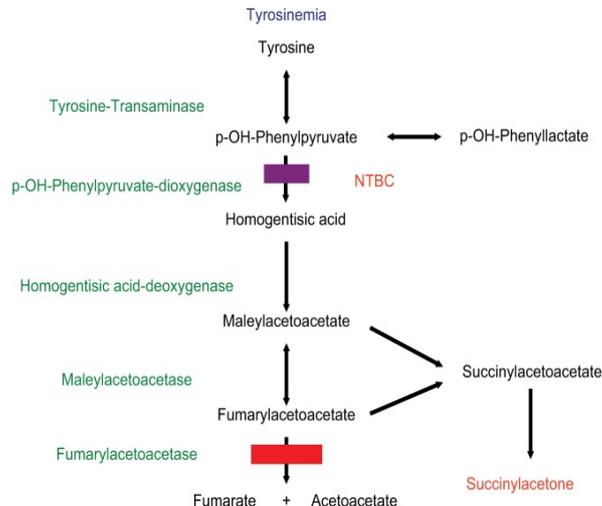


Figura 11 Conseguenze del blocco di FAH (19)

L'FAA viene convertito in SA, molecola tossica sia per il fegato che per i reni (figura 11) (20). Il SA inibisce inoltre un enzima, la porfobilinogeno sintasi, necessario alla biosintesi del gruppo eme a partire dall'acido δ -amminolevulinico (δ -ALA). Ciò risulta nell'accumulo di porfirine che causano danni al sistema nervoso e manifestazioni di porfiria intermittente, come già accennato. I metaboliti che si accumulano causano, inoltre, una vasocostrizione con aumento dell'adenosina che induce a sua volta aumento della renina, con ischemia a livello del nefrone e, dunque, danno renale. I pazienti affetti da Tirosinemia di tipo 1 hanno un'alta probabilità di sviluppare un carcinoma epatico; tutto ciò è conseguente quindi all'accumulo del FAA che viene poi convertito in SA, molecola che causa morte apoptotica dell'epatocita, cirrosi ed infine carcinoma.

1.7.2 Manifestazioni cliniche

Le *tirosinemie* costituiscono un gruppo di malattie, tra le quali vi è la Tirosinemia di tipo 1 (TH1), la più diffusa. La prevalenza è di circa 1:120.000 nati vivi, e, si presenta normalmente tra i 2 e i 6 mesi di vita, in alcuni casi anche nelle prime settimane. Alcuni dei sintomi più comuni sono rappresentati da crisi epatica acuta, accompagnata da febbre, irritabilità, vomito, disturbi della coagulazione, epatomegalia, ittero e ipoglicemia. In alcuni casi la crisi epatica acuta progredisce in insufficienza epatica fino al decesso dell'individuo; in altri casi, l'accumulo dei metaboliti tossici a livello epatico, causano morte apoptotica degli epatociti,

portando alla cirrosi epatica ed infine al carcinoma epatocellulare. In una buona percentuale, circa il 40% dei pazienti affetti, si può verificare una neuropatia periferica con crisi che ricordano una patologia definita porfiria. Il danno renale può manifestarsi attraverso vari sintomi, tra cui, acidosi metabolica, bassi livelli di fosfato nel sangue (ipofosfatemia), elevati livelli di fosfato nelle urine (iperfosfaturia) e rachitismo, condizione che compromette lo sviluppo osseo, spesso legata a carenza di vitamina D o fosfato. In alcuni casi si osserva un coinvolgimento cardiaco.

1.7.3 Trattamento

I pazienti affetti da tirosinemia di tipo 1, richiedono sia un trattamento farmacologico che un regime alimentare adeguato. Durante il trattamento dietetico e farmacologico, vanno tenuti sotto controllo i livelli di SA, aminoacidi e marcatori epatici e renali: AST, ALT, GGT, PT, INR, bilirubina totale e diretta, fosfatasi alcalina e α -fetoproteina. Oltre a tutto ciò, importante è anche il monitoraggio dei livelli di farmaco nell'organismo.

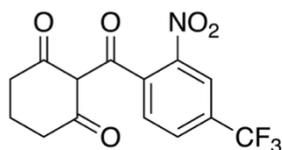


Figura 12 Struttura chimica del

2-(2-nitro-4-(trifluorometil)benzoi)cicloesano-1,3-dione (21)

Il farmaco d'elezione è il nitisinone (NTBC). Questa molecola (figura 12) approvata dall'EMA in circostanze eccezionali nel 2005, ma usata per la prima volta nel 1991 per la Tirosinemia di tipo 1, riesce a ridurre i livelli di composti tossici: blocca la degradazione della tirosina andando a inibire l'enzima 4-idrossifenilpiruvato diossigenasi, evitando così la formazione del SA come rappresentato in figura 11.

Nonostante la terapia con questo farmaco sia molto efficace, è importante anche controllare i livelli di proteine assunte con la dieta. Ideale è infatti adottare un regime alimentare a basso contenuto proteico con l'integrazione aggiuntiva di aminoacidi, naturalmente a eccezione della tirosina.

Questo perché, bloccando il catabolismo della tirosina, essa si accumula, rendendo necessaria una dieta adeguata a evitare concentrazioni eccessive di quest'ultima: i valori ideali di tirosina nel plasma durante il trattamento farmacologico e dietetico sono al di sotto di 400 μ M. La dose raccomandata di farmaco è di 1-2 mg/Kg al giorno, suddivisa in due dosi (19). L'introduzione di questo farmaco ha cambiato la l'evoluzione della malattia: in pochi giorni di trattamento si

assiste già a una riduzione dei livelli di SA e una normalizzazione dei parametri epatici e renali. L' α -fetoproteina (22) (glicoproteina fetale utilizzata come marcatore tumorale) si riduce entro un anno e, l'inizio della terapia prima che il paziente abbia compiuto i 2 anni di età, riduce il rischio di sviluppare un carcinoma epatico. In alcuni Paesi in cui il nitisinone non è in commercio per via dei costi, il trapianto di fegato è dunque l'unico trattamento in caso di danno epatico.

1.7.4 Diagnosi

Lo screening neonatale rappresenta il primo step utile alla diagnosi della Tirosinemia di tipo 1, attraverso cui vengono misurati i livelli di Tirosina e SA su spot ematico, tuttavia per confermarla servono ulteriori esami:

- Misurazione della tirosina nel plasma, la sua concentrazione elevata indica un blocco del catabolismo di quest'ultima;
- Misurazione del SA, il quale, quando è presente nel sangue e nelle urine del paziente, è indicatore della presenza della patologia. Come precedentemente descritto questo metabolita si accumula proprio a causa del deficit enzimatico di FAH;
- Concentrazione di α -fetoproteina, la quale è normalmente elevata in presenza della malattia, come indicatore di danno epatico tipico della patologia;
- Ridotta attività di Porfobilinogeno sintasi nei globuli rossi è un ulteriore indicatore di patologia in quanto inibito dal SA stesso, questo determina un aumento di δ -ALA nelle urine;
- Analisi del DNA di FAH come ulteriore conferma della presenza della mutazione genetica.

1.8 Deficit- di acil-Coenzima A deidrogenasi a catena media (MCADD)

L'MCADD (23) è una malattia metabolica dovuta a un disturbo o difetto a carico del catabolismo degli acidi grassi a catena media (MCFA) la cui trasmissione è di tipo autosomico recessivo, la prevalenza è di circa 1-9/100000. Si tratta del più comune tra i difetti della β -ossidazione degli acidi grassi mitocondriale (24). La malattia si presenta in genere a circa 3-24 mesi di vita. Molti soggetti possono però rimanere asintomatici ed in questi casi la diagnosi può

avvenire in età adulta, in quanto spesso la patologia esordisce dopo un particolare stress metabolico.

1.8.1 Via metabolica

La β -ossidazione degli acidi grassi costituisce un elemento essenziale per la produzione di energia nei periodi di digiuno o in caso di riduzione dell'apporto calorico. L'organismo in questi casi utilizza gli acidi grassi per produrre energia necessaria per la sopravvivenza. I prodotti finali sono β -idrossibutirrato e acetoacetato, i quali costituiscono un'essenziale riserva di energia per i tessuti extraepatici e, soprattutto, per il cervello. Nel caso di MCADD, si ha un difetto enzimatico che riguarda un enzima necessario alla corretta esecuzione della β -ossidazione degli acidi grassi, che avviene a livello di strutture cellulari chiamate mitocondri. I mitocondri sono organuli intracellulari nelle cellule eucariote; nella loro struttura possiedono due membrane lipidiche a doppio strato importanti per l'esecuzione di funzioni cellulari necessarie alla sopravvivenza dell'organismo. All'interno delle cellule ci sono diversi sistemi di trasporto, alcuni di questi permettono il trasporto degli acidi grassi:

- navetta del glicerolo 3-P collega le funzioni mitocondriali e citosoliche;
- sistema di trasporto della carnitina, che permette agli acidi grassi a catena lunga ($C > 8$) di attraversare la membrana interna del mitocondrio per far sì che subiscano la β -ossidazione. È bene sottolineare che fino a un numero di atomi di carbonio pari a otto la membrana interna viene oltrepassata dagli acidi grassi in modo passivo, senza la necessità del trasportatore della carnitina. La β -ossidazione mitocondriale degli acidi grassi si può suddividere in quattro fasi:

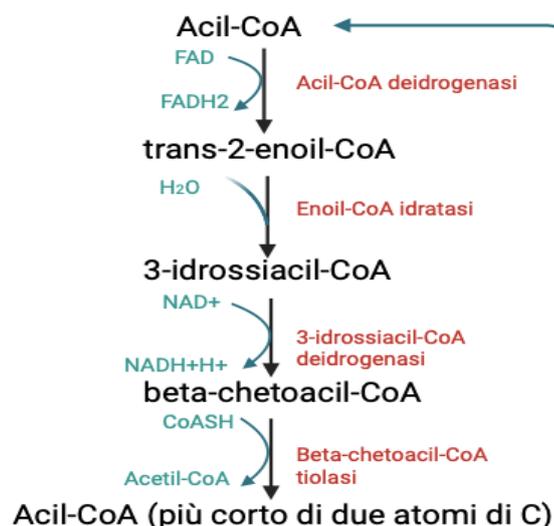


Figura 13 β -ossidazione degli acidi grassi

1. L'enzima Acil-CoA deidrogenasi rimuove le unità bicarboniose dell'acido grasso sottoforma di acetil-CoA. L'acetil-CoA che si forma, viene ossidato a diossido di carbonio (CO₂) all'interno del ciclo dell'acido citrico. In queste due fasi avviene la riduzione di NAD⁺ e FAD a NADH e FADH₂. I coenzimi NADH e FADH₂ entrano nella catena di trasporto degli elettroni per sintetizzare ATP;
2. In seguito interviene l'enzima enoil-CoA idratasi che converte l'enoil-CoA in 3-idrossiacil CoA;
3. l'enzima 3-idrossiacil-CoA deidrogenasi ossida il 3-idrossiacil CoA, il quale, diventa β -chetoacil-CoA. anche qui, il NADH che si forma viene inviato alla catena respiratoria per produrre ATP;
4. L'enzima β -chetoacil-CoA tiolasi divide il β -chetoacil-CoA creando Acetil-CoA che entra per esempio nel ciclo di Krebs e acil-CoA privo dei due atomi di carbonio iniziali. Quest'ultimo continuerà a subire cicli di β -ossidazione fin quando non rimane Acetil-CoA. L'Acetil-CoA che si forma può essere anche substrato di β -idrossi- β -metilglutaril CoA- sintasi (HMG CoA-sintasi) e diventare idrossimetilglutaril CoA, il quale viene trasformato in corpo chetonico dalla HMG CoA-liasi. Il numero totale dei cicli di β -ossidazione che subisce un acido grasso, dipendono dalla lunghezza della catena carboniosa iniziale.

Proprio nella prima fase dell'ossidazione, l'MCAD è l'enzima che catalizza l'ossidazione dei due acil-CoA a 2-enoil-CoA sugli acidi grassi a catena media, ovvero con numero di atomi di carbonio tra 6 e 12.

Un difetto a livello della β -ossidazione mitocondriale, porta a una carente produzione di energia durante i periodi di digiuno. In carenza dell'enzima MCAD, che accorcia gli acidi grassi a catena media a formare acetil-CoA, risulta nella riduzione di acetil-CoA disponibile per la catena respiratoria cellulare. La carnitina è impiegata nel trasporto degli acidi grassi accumulati che devono entrare nel mitocondrio, viene trasformata in acilcarnitina, di conseguenza, si accumulano acilcarnitine che risultano essere tossiche per tessuti come il fegato e il muscolo cardiaco (25).

1.8.2 Sintomi e manifestazione clinica

La patologia si presenta con ipoglicemia ipochetotica (iperinsulinemia) e vomito in pazienti che sono apparentemente sani. Può poi manifestarsi, inoltre, epatomegalia, iperammonemia e livelli di transaminasi elevati, con un quadro simile alla sindrome di Reye. Spesso, questi sintomi, possono progredire in letargia e convulsioni e, in alcuni casi, morte improvvisa(28). Anche organi come il cuore possono risentire della carenza di MCAD; le manifestazioni di questo possono consistere in aritmie, tachiaritmie ventricolari, fibrillazioni ventricolari, arresto cardiaco ed emorragia polmonare. Le aritmie sono dovute all'accumulo di acilcarnitine a catena media e, si verifica nella prima infanzia, l'allungamento del tratto QT. Le tachiaritmie ventricolari sono le più comuni, mentre le fibrillazioni ventricolari sono invece quelle che vanno poi a indurre l'arresto cardiaco. Il coinvolgimento cardiaco è molto importante, infatti per via di quest'ultimo sono stati diagnosticati dei casi di MCADD, alla nascita apparentemente normali. A livello del sistema nervoso centrale, oltre a emicrania e edema cerebrale, si può presentare anche uno stato comatoso. Tutta la sintomatologia si presenta in genere dopo circa 12-16 ore di digiuno o durante periodi febbrili intercorrenti, in quanto, negli affetti da MCADD, la mancanza enzimatica viene normalmente compensata dalla produzione di energia tramite il consumo delle riserve di glicogeno. Quando queste si esauriscono a causa di digiuno prolungato, ecco che si manifesta la malattia, come accade ai neonati tra una poppata e la successiva. L'MCADD interferisce con varie vie metaboliche: blocca la chetogenesi e la mobilitazione del glucosio, riducendo l'apporto energetico nei tessuti extraepatici. La riduzione di tutte queste fonti energetiche impatta sulla gluconeogenesi e l'organismo va in ipoglicemia. Il deficit di MCAD induce anche una fosforilazione ossidativa inefficace.

1.8.3 Diagnosi

Si sospetta MCADD quando la sintomatologia compare dopo un lungo digiuno, i sintomi sono a carico di diversi organi ed i dati di laboratorio suggeriscono ipoglicemia, acidosi metabolica e coinvolgimento epatico. A questo punto, è utile eseguire analisi accurate, raccogliendo campioni di urine per dosare gli acidi organici e campioni di plasma per dosare le acilcarnitine. Nel caso di MCADD: nelle urine sono presenti acidi dicarbossilici (suberico, adipico, sebaco) e coniugati di glicina come l'esanoilglicina e la suberilglicina. Per quanto riguarda lo Screening Neonatale, l'MCADD è stata inserita nel protocollo di screening nel 2016 quando è nato lo SNE. Le acilcarnitine a catena media vengono misurate su spot ematico attraverso la spettrometria di massa tandem, grazie alla quale si potrà notare: un aumento della

esanoilcarnitina, aumento dell'ottanoilcarnitina, aumento della decanoilcarnitina. Nella conferma biochimica, si evidenzia l'aumento delle concentrazioni urinarie delle acilglicine (esanoilglicina, suberilglicina) e anche degli acidi dicarbossilici. Ulteriore conferma diagnostica è data dall'indagine genetica sul gene ACADM.

1.8.4 Genetica

Il gene coinvolto è il gene ACADM che si trova sul cromosoma 1p31, il quale in presenza della patologia presenta una mutazione che fa sì che avvenga un ripiegamento errato delle proteine (misfolding) con conseguente perdita di funzione di queste ultime. La diagnosi definitiva infatti prevede il sequenziamento del gene ACADM per verificare la presenza della mutazione (26).

1.8.5 Trattamento

I trattamenti applicabili in caso confermato di MCADD sono diversi in base allo stadio della malattia. La malattia in fase acuta necessita la somministrazione di carboidrati semplici per via orale in modo da bloccare la sintomatologia dovuta all'ipoglicemia e dunque avviare così la produzione di energia. In casi particolari, è consigliata la somministrazione di destrosio al 25% per via endovenosa. Durante i periodi di benessere, è molto utile evitare il digiuno prolungato e attuare un regime alimentare che sia adeguato (27). Inoltre, in alcuni casi, viene valutata l'integrazione di L-carnitina, anche se questa via di trattamento è molto controversa perché i benefici rimangono ad oggi poco chiari (28). Attualmente, l'unico farmaco valutato come trattamento sperimentale è il glicerolo fenilbutirrato, inizialmente approvato da FDA per disturbi del ciclo dell'urea. Questo farmaco va ad agire andando a ridurre l'iperammonemia secondaria tipica della patologia e gli studi sono stati effettuati su bambini di età inferiore a due mesi (29). È utilizzato solo dal punto di vista sintomatologico per evitare le manifestazioni tipiche dell'accumulo di ammonio, non è quindi un medicinale curativo per l'MCADD. Al centro di studi futuri vi è invece una terapia genica che utilizza vettori adenovirus ricombinanti (30).

2. SCOPO DEL LAVORO

Le malattie metaboliche ereditarie costituiscono un gruppo eterogeneo di patologie rare causate da difetti a carico di enzimi, cofattori o trasportatori che portano ad alterazioni metaboliche che comportano o un accumulo di metaboliti che risultano essere tossici o una mancanza di elementi essenziali per il corretto funzionamento dell'organismo. I sintomi che possono derivare dalle alterazioni metaboliche possono variare da lievi a molto gravi, compromettendo la salute di chi ne è affetto fino ad essere letali. Tutto ciò rende le malattie metaboliche ereditarie un tema di grande rilevanza per la ricerca.

Attualmente sono note oltre 500 malattie metaboliche ereditarie, molte delle quali si manifestano nei primi mesi di vita. La diagnosi precoce attraverso lo Screening Neonatale risulta essere cruciale per evitare conseguenze severe e per avviare il prima possibile un protocollo di trattamento che può includere diete specifiche, terapie farmacologiche, trattamenti con enzimi o terapie geniche, a seconda della patologia.

Questo lavoro di tesi è stato svolto presso i laboratori di Biochimica Clinica degli ospedali Regina Margherita e Molinette della città di Torino.

Scopo di questo lavoro di tesi è stato lo studio di due particolari malattie metaboliche ereditarie: la Tirosinemia di tipo 1 e il Deficit di Acil-CoA deidrogenasi a catena media (MCADD), la cui scelta è stata dettata in quanto molto gravi e letali se non individuate in maniera precoce. Si tratta di malattie diverse sia per quanto riguarda i biomarcatori specifici, in quanto sono coinvolti due differenti metabolismi (aminoacidi per la Tirosinemia di tipo 1 e β -ossidazione degli acidi grassi a catena media per l'MCADD), sia per quanto riguarda il trattamento terapeutico. Per la Tirosinemia di tipo 1, oltre ad una dieta specifica, esiste un trattamento farmacologico molto efficace che risulta diminuire la sintomatologia ed evitare conseguenze gravi come il carcinoma epatico; per l'MCADD, invece, non esiste ad oggi un trattamento farmacologico, ma una dieta rigorosa che risulta essere salvavita quando la patologia viene individuata in modo tempestivo.

Obiettivo della presente tesi è stato valutare l'efficacia diagnostica sia dello SNE che della conferma diagnostica biochimica per le due patologie metaboliche studiate, approfondendo in particolar modo la parte analitica di laboratorio e le diverse tecniche cromatografiche utilizzate per la ricerca dei biomarcatori, essenziali per la diagnosi e per il monitoraggio dei pazienti. In particolare, si è valutato se lo Screening Neonatale, attraverso l'identificazione delle patologie in maniera precoce, possa migliorare l'esito clinico dei pazienti affetti da MCADD, i quali, frequentemente, non venivano, prima della sua applicazione, diagnosticati in tempo e quindi morivano prematuramente.

Durante il primo periodo della tesi, ho avuto modo di studiare le modalità con cui vengono effettuati gli esami di Screening Neonatale Esteso presso l'Ospedale Regina Margherita di Torino, che risulta essere il laboratorio di riferimento per il Piemonte e per la Valle d'Aosta e che, si occupa di analizzare i campioni di sangue su DBS (Dried Blood Spot) dei neonati. Successivamente ho lavorato presso il laboratorio di Biochimica Clinica dell'Ospedale Molinette di Torino in cui viene effettuata la conferma diagnostica biochimica, dove ho eseguito le analisi dei campioni di urine e plasma pervenuti e ho avuto l'opportunità di valutarne i risultati.

Per la raccolta dei dati dei pazienti malati e in follow-up presso il centro clinico che riporto in questo lavoro di tesi, ho esaminato le cartelle cliniche presso il Day Hospital dell'Ospedale Pediatrico Regina Margherita.

3. MATERIALI E METODI

I materiali ed i metodi utilizzati in questo lavoro sono distinti in virtù della tecnica utilizzata per la diagnosi delle diverse malattie metaboliche ereditarie studiate.

Tra i materiali elencati in questo capitolo, ci sono i campioni di fluidi biologici che provengono dalla sala prelievi dell'Ospedale Molinette di Torino, o dai reparti quando i pazienti sono in ricovero o in Day Hospital.

La raccolta dei dati clinici dei pazienti malati ed in follow-up presso l'Ospedale Molinette di Torino è stata effettuata tramite consultazione delle cartelle cliniche presso il Day Hospital di malattie metaboliche ereditarie dell'Ospedale Regina Margherita di Torino, e , tramite la consultazione dei referti disponibili sul programma del laboratorio di Biochimica Clinica dell'Ospedale Molinette di Torino DNLab.

I fluidi biologici trattati si distinguono in due categorie: urine e sangue intero da centrifugare.

Le provette contenenti i fluidi biologici arrivano direttamente dalla sala prelievi o dai reparti al laboratorio con un'etichetta che contiene il check-in, ovvero un numero che identifica la singola provetta e il nominativo dei pazienti.

Per quanto concerne l'urina, va controllato il valore di creatinina urinaria, al fine di eseguire una corretta diluizione prima di proseguire con l'analisi.

Per quanto riguarda il sangue intero, invece, è importante eseguire la centrifugazione per ottenere la separazione del plasma ed è altrettanto essenziale controllare che il campione non sia emolizzato.

In questo modo, i campioni vengono preparati e suddivisi al fine di effettuare le diverse analisi. Le metodiche analitiche utilizzate sono principalmente due: l'analisi degli aminoacidi su plasma per la diagnosi della Tirosinemia di tipo I e l'analisi degli acidi organici sulle urine per la diagnosi sia della Tirosinemia di tipo I sia per l'MCADD. Pertanto, i materiali e metodi descritti in questo capitolo, seguiranno il seguente schema:

1. Materiali e metodi per l'analisi degli aminoacidi;
2. Materiali e metodi per l'analisi degli acidi organici;

3.1 Materiali per l'analisi degli aminoacidi

3.1.1 Campioni: plasma

Il sangue è un materiale biologico su cui vengono effettuate numerose analisi, fornisce infatti importanti informazioni e svolge numerose funzioni:

- ossigenazione dei tessuti grazie al trasporto dell'ossigeno da parte dei globuli rossi;
- trasporto di ormoni, proteine, enzimi, nutrienti, elettroliti e gas disciolti alle cellule dell'organismo;
- regolazione della pressione sanguigna;
- distribuzione di fluidi tra il sangue e i tessuti;
- mantenimento del pH;
- difese immunitarie;
- coagulazione ed emostasi;

Il sangue è composto da una porzione corpuscolata o cellulare contenente eritrociti, leucociti, trombociti e da una porzione liquida: il plasma. Il plasma deprivato dei fattori della coagulazione è chiamato siero.

Il plasma si presenta di colore giallo paglierino ed è costituito al 90% da acqua e al 10% da sostanza secca composta da lipidi, aminoacidi e proteine. Svolge diverse funzioni quali: regolazione del volume dei liquidi, regolazione pH ematico, difese immunitarie, coagulazione del sangue, trasporto di nutrienti e metaboliti. Si ottiene dal sangue intero attraverso un processo di centrifugazione in presenza di un anticoagulante.

L'analisi del plasma è cruciale nella conferma delle malattie metaboliche ereditarie.

3.1.2 Reattivi

I buffer successivamente elencati sono una serie di eluenti a base di litio citrato (a eccezione di B6 che è una soluzione di idrossido di litio), Biochrom[®], a molarità e pH crescente utilizzati per ottenere la separazione cromatografica degli aminoacidi in HPLC, metodica utilizzata presso il laboratorio Baldi e Riberi dell'Ospedale Molinette di Torino, al fine di identificare aminoacidopatie attraverso la misurazione degli aminoacidi su plasma e urine.

	MOLARITA'	pH
--	------------------	-----------

BUFFER 1	0,20	2,80
BUFFER 2	0,30	3,00
BUFFER 3	0,50	3,15
BUFFER 4	0,90	3,50
BUFFER 5	1,65	3,55

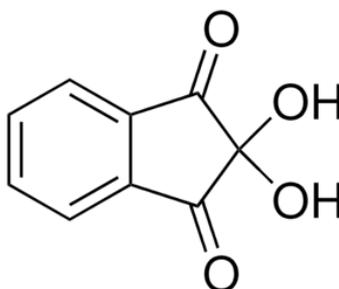
Tabella 1 Tamponi Biochrom 30 plus

Ulteriori reagenti sono il buffer 0 e il buffer 6.

Il buffer 0 è chiamato “Lithium Loading Buffer”, ha un pH di circa 2,20 ed è il tampone di avvio del sistema cromatografico, utilizzato per preparare la colonna, anche questo è a base di litio citrato.

Il buffer 6 è anche chiamato “Lithium Regeneration Buffer” ed è una soluzione di LiOH con molarità 0,30. È utilizzato nelle fasi finali della separazione per assicurare la completa eluizione delle sostanze in colonna.

- Ninidrina



Sinonimo: 1,2,3-Indantrione monoidrato, 2,2 – Diidrossi- 1,3- indanedione.

Numero CAS: 485-47-2

Peso molecolare: 178.14 g/mol

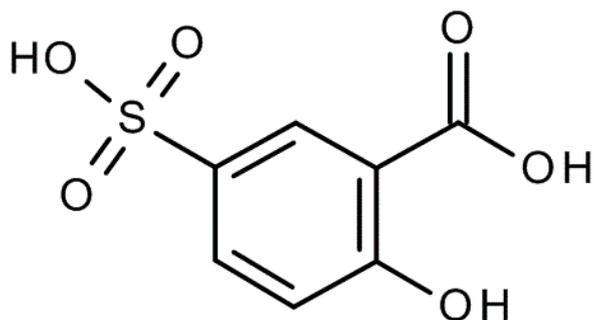
Pittogramma:



Indicazioni di pericolo: H302, nocivo se ingerito; H315, provoca irritazione cutanea; H319, provoca grave irritazione oculare.

Consigli di prudenza: P264, P280, P301+P312, P302+P352, P305+P351+P338, P332+P313.

- Acido Solfosalicilico



Sinonimi: acido salicilsolfonico

Numero CAS: 5965-83-3

Peso molecolare: 254,22 g/mol

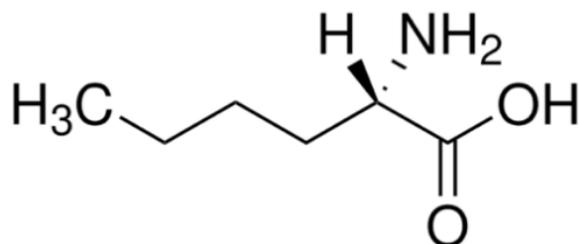
Pittogramma:



Indicazioni di pericolo: H314, provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari

Consigli di prudenza: P260, P280, P303 + P361 + P353 P304 + P340 + P310, P305 + P351 + P338, P363

- Norleucina (NorLeu)



Sinonimi: Acido aminocaproico

Numero CAS: 327-57-1

Peso molecolare: 131,17 g/mol

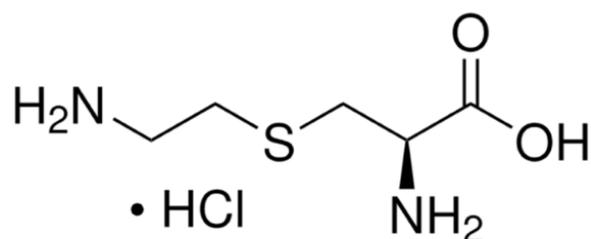
Pittogramma:



Indicazioni di pericolo: H317, può provocare una reazione allergica cutanea

Consigli di prudenza: P261, P272, P280, P302+P352, P333+P313, P362+P364

- S-(2-Aminoetil)-L-cisteina cloruro (AEC)



Sinonimi: AEC

Numero CAS: 4099-35-8

Peso molecolare: 200,69 g/mol

- Sigma A/N, Pn° A-6407, Sigma Aldrich®
- Sigma BAS, Pn° A-6282, Sigma Aldrich®
- CQ commerciali in matrice AMI-02, MCA®

3.1.3 Strumentazione analitica

- Provette etichettate con numero di check-in, codice a barre (richiesta) e relativo nominativo dei pazienti;
- Pipette tarate, Eppendorf;
- Vials porta campioni;
- Vortex;
- Centrifuga refrigerata 5804 R, Eppendorf, spA;

- Analizzatore Biochrom 30 plus, Biochrom®;

3.2 Metodi

3.2.1 Trattamento campione di plasma

Il plasma che viene analizzato presso il laboratorio di biochimica clinica “Baldi e Riberi” dell’Ospedale Molinette di Torino deriva dalla centrifugazione di sangue intero raccolto in una provetta apposita.

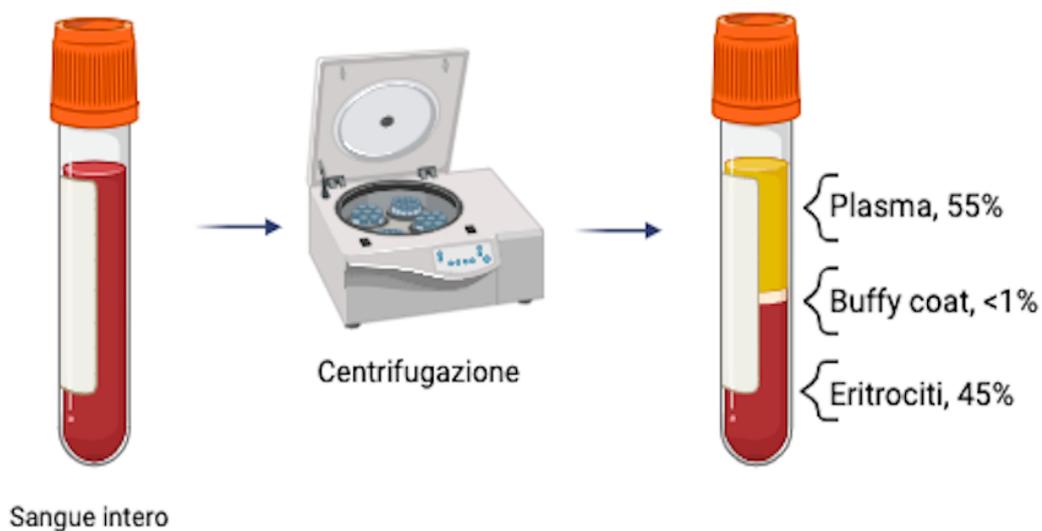


Figura 14 Centrifugazione sangue intero

All’interno della provetta è presente EDTA (Acido Etilendiamminotetracetico), il quale agisce bloccando la cascata coagulativa attraverso la chelazione dei metalli. Il campione viene centrifugato per ottenere la separazione del plasma dalla rimanente componente sanguigna corpuscolare.

Il plasma viene trasferito mediante una pipetta in una provetta con Acido Solfoalcolico, allo scopo di deproteinizzare, il volume di plasma prelevato è compreso tra 800 e 1200 μL e viene

trasferito in una provetta contenente 40 mg di Acido Solfosalicilico. In generale la ratio SSA/plasma è di 40 mg/ mL di plasma.

Il processo di deproteinizzazione è importante per eliminare le proteine che interferirebbero altrimenti con l'analisi, danneggerebbero la colonna dello strumento e potrebbero anche influire sulla concentrazione degli aminoacidi liberi.

Il campione viene in seguito vortexato per 10 secondi e lasciato a riposo per 15 minuti.

A questo punto, il campione può essere conservato in congelatore a -20°C fino al momento dell'analisi. Prima dell'analisi si scongela il campione e si procede alla centrifugazione: 3500 rpm per 10 minuti.

Una parte di surnatante viene miscelata con Buffer 0 e addizionata alla soluzione che contiene due standard interni NorLEU e AEC (SI MIX).

Successivamente si centrifuga a 3500 rpm per 10 minuti, si trasferisce il contenuto nelle vials porta campioni e si carica nel campionatore dello strumento di analisi. È importante centrifugare soprattutto in caso di campioni congelati perché si possono formare dei precipitati che non devono assolutamente essere caricati nel campionatore.

	TOLLERATA	PREFERIBILE	SCARSO	
PLASMA	/	/	/	/
FATTORE DI DILUIZIONE	4,33	3,25	6,5	13
SI MIX μL	100	100	100	100
BUFFER 1 μL	400	350	450	500
PLASMA DEPROTEINIZZATO μL	150	200	100	50

Tabella 2 Schema di preparazione campione di plasma per l'analisi degli aminoacidi plasmatici

3.2.2 Preparazione miscela dei due standard interni (SI MIX)

Come standard interni per HPLC si utilizza una miscela costituita da Nor-Leucina (NLeu) e aminoetil cisteina (AEC).

Per prima cosa, si prepara una soluzione madre in HCl 0.001 N a cui si aggiungono i due standard alle seguenti concentrazioni:

- a. Nor-Leucina 28 mg/10 mL
- b. AEC 20.8 mg/10 mL

La miscela viene in seguito diluita con Buffer 0 per ottenere soluzione figlie diluite 1:16.5. Le soluzioni madri vengono di solito conservate in freezer a -80°C e sono stabili per 18 mesi.

La soluzione di lavoro (SI MIX) si ottiene quindi miscelando in rapporto 1:1 le due soluzioni figlie.

3.2.3 Preparazione dei calibratori: Standard Sigma

Per la calibrazione, viene utilizzato lo standard Sigma, il quale si prepara a partire da due prodotti commerciali della Sigma Aldrich®:

- sigma A/N, Pn° A-6407(fisiologici acidi e neutri)
- sigma BAS (fisiologici basici) Pn° A-6282.

Gli aminoacidi contenuti negli standard hanno una concentrazione dichiarata di 2500.0 µmol/L, ad eccezione di anserina, cistina e omocisteina (1250.0 µmol/L). Entrambi i prodotti commerciali vanno diluiti con Buffer 0 per ottenere la soluzione madre:

- Soluzione M: 200 µL BAS + 200 µL A/N + 600 µL B0.

dalla quale si ottengono soluzioni figlie nel seguente modo:

- Diluire 1:2 = standard sigma 250
- Diluire 1:10 = standard sigma 50

Per la calibrazione le soluzioni figlie standard 50 e 250 sono trattate come i campioni B0 e SI MIX diluiti x3,25.

3.2.4 Preparazione del controllo qualità interno (CQ)

Il controllo qualità interno viene eseguito utilizzando i CQ commerciali in matrice AMI-02 acquistati dalla ditta MCA e sono denominati SKLM. Il liofilo è conservato in frigo ed è stabile per cinque anni. Al momento della preparazione deve essere ricostituito con 1 mL di acqua

distillata, va lasciato a riposo per 15 minuti ed infine deve essere agitato per 20 minuti. In seguito si deproteinizza trasferendo l'intero contenuto in una provetta contenente 40 mg di acido solfosalicilico e si vortexa. Il tutto si lascia poi a riposo per 15 minuti.

3.2.5 Analisi Biochrom 30 plus

Biochrom 30 plus Erreci®, è uno strumento specializzato nell'analisi degli aminoacidi, in grado di lavorare su matrici molto diverse tra loro quali urine e plasma.



Figura 15 Biochrom 30 plus

In questa tesi ci si concentra sull'analisi degli aminoacidi plasmatici tramite questo strumento, in quanto è utilizzato per la diagnosi di disordini metabolici legati agli aminoacidi, sebbene abbia numerosi altri campi di applicazione (farmaceutica, nutrizione, mangimi, fertilizzanti). È dotato di una buona precisione e sensibilità e permette di gestire un numero piuttosto elevato di campioni perché è abbastanza automatizzato.

Lo strumento è composto da: una parte analitica, un campionatore automatico ed un computer che gestisce il sistema.

La tecnica di analisi è la cromatografia a scambio ionico integrata a rilevazione UV. La cromatografia a scambio ionico è una tecnica di separazione che si basa sulle interazioni elettrostatiche tra gli ioni del campione e i gruppi funzionali presenti sulla fase stazionaria della colonna cromatografica.

La fase mobile è il buffer che viene fatto fluire attraverso la colonna. La variazione del pH e della forza ionica del buffer (in tutto 6 buffer differenti in cui questi due parametri variano), permettono di modulare la forza di legame tra gli aminoacidi del campione e la fase stazionaria e quindi di favorire la separazione degli aminoacidi in colonna. La temperatura della colonna è importante e deve essere controllata attentamente perché da questa dipende la qualità della separazione cromatografica.

Il campione, contenente gli aminoacidi da testare, è presente in vials all'interno dell'autocampionatore, viene prelevato con una siringa di precisione ed iniettato in una colonna in resina a scambio ionico. Gli eluenti (buffer) vengono pompati nella colonna da una pompa dedicata, detta "pompa buffer", separando così i vari aminoacidi in base alle affinità fase mobile/stazionaria e nei tempi stabiliti dal programma analitico.

All'inizio di ogni analisi avviene il caricamento del campione attraverso una siringa di precisione che ne preleva 100 µL. La miscela eluente-campione è fatta reagire con Ninidrina (pompata dalla pompa dedicata "REAGENT"), in un reattore ad alta temperatura (termostato) chiamato "coil di reazione", utile a mantenere una certa temperatura finalizzata all'avvenimento della reazione di colorazione.

La reazione fornisce come risultato dei composti colorati la cui intensità è direttamente proporzionale alla concentrazione di aminoacido presente in matrice. La miscela eluisce poi verso il rivelatore fotometrico con "cella a flusso continuo", in cui ogni composto colorato è quantificato tramite la misurazione della quantità di luce che viene assorbita: l'assorbanza è misurata su due lunghezze d'onda: 570 nm e 440 nm.

Tutti gli aminoacidi legati con la Ninidrina assorbono a 570 nm ma la prolina e l'idrossiprolina assorbono maggiormente a 440 nm. Il segnale dal fotometro viene inviato ad un sistema, Data System, che crea il cromatogramma e calcola la concentrazione di aminoacidi. Il liquido viene inviato ad un recipiente di scarico.

L'analisi qualitativa si basa sul tempo di ritenzione che permette l'identificazione del campione attraverso il confronto di quest'ultimo con i tempi di ritenzione degli standard noti di aminoacidi che vengono calibrati nel sistema.

L'analisi quantitativa permette di determinare la concentrazione di ogni singolo aminoacido nel campione e si basa sull'intensità del picco cromatografico visibile nel cromatogramma. Viene, quindi, preparata la curva di calibrazione utilizzando degli standard per ogni aminoacido e, questi, vengono analizzati nelle stesse condizioni del campione così da stabilire un confronto tra l'area del picco e la concentrazione. Pertanto, la concentrazione si calcola confrontando l'area del picco di ciascun aminoacido, ottenuta tramite l'integrazione, con la curva di calibrazione.

La parte analitica è costituita da contenitori in vetro per i tamponi (buffer) numerati da 1 a 6 e con codice colore pronti all'uso, di cui va controllato il volume presente prima di ogni analisi. È inoltre presente un "piston wash", ovvero un contenitore che serve per il lavaggio dei pistoni delle pompe (alcool isopropilico al 2-5%). Vi è poi un contenitore per il lavaggio di fine ciclo del coil di reazione. Il contenitore contiene il colorante Ninidrina. Tutti i contenitori sono mantenuti in atmosfera di gas inerte (azoto).

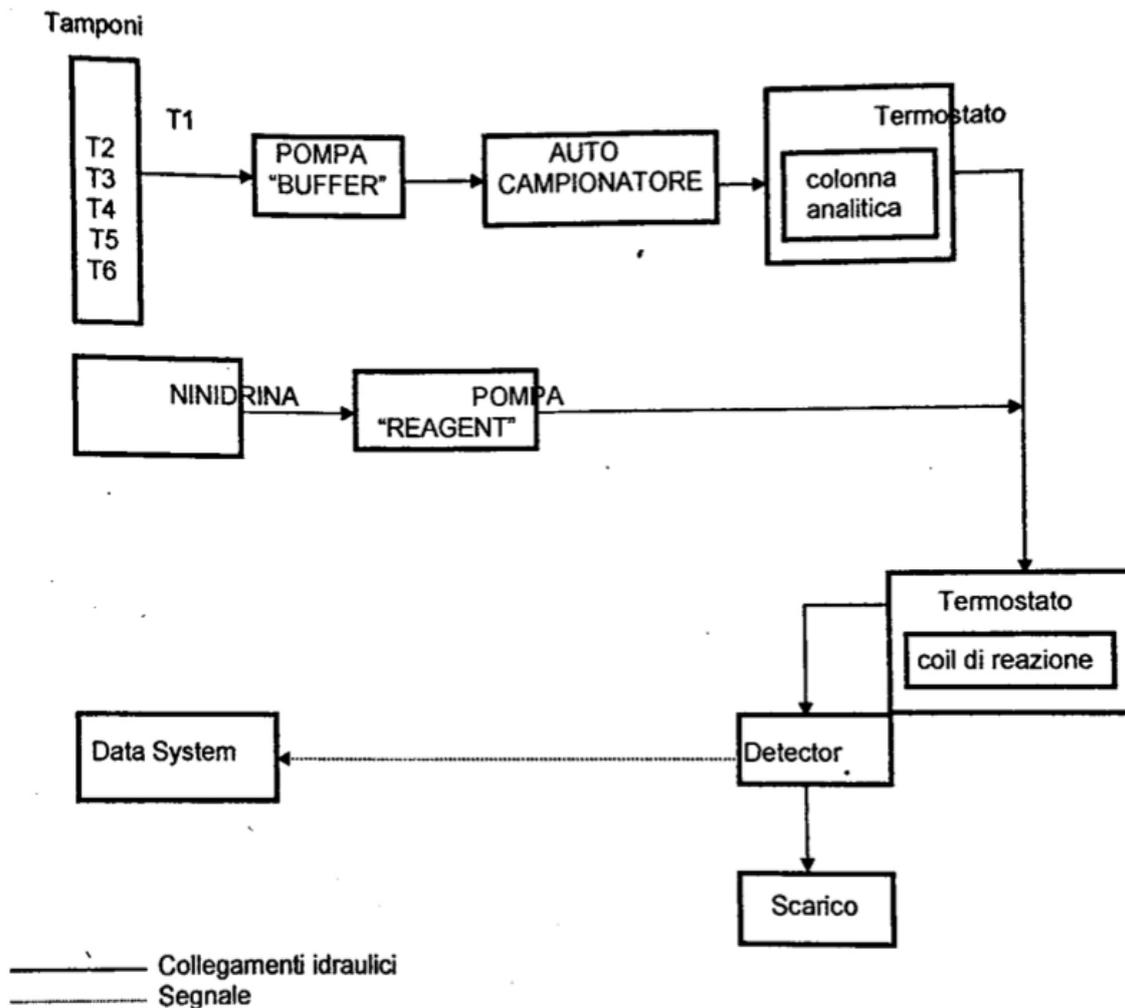


Figura 16 Parte analitica Biochrom 30 plus

La parte del software comprende tre programmi:

1. ERRECI Biosys Manual:

Questo programma serve per la definizione delle sequenze di cicli analitici, stesura delle sequenze e avvio ma anche creazioni o modifiche dei cicli analitici.

2. ERRECI Alias Manager

Questo programma è ideato per la gestione dell'autocampionatore; qui viene impostata la temperatura di stoccaggio dei campioni e il lavaggio della siringa di campionamento così come l'accesso alle provette dei campioni.

3. ERRECI Open Lab

Questo programma serve invece per la creazione dei batch (sequenze per l'acquisizione dei dati), per l'integrazione dei cromatogrammi e la stampa del report (rapporto d'integrazione).

3.3 Materiali per l'analisi degli acidi organici

3.3.1 Campioni: urine

L'urina è una miscela omogenea in cui sono disciolte più sostanze mantenute in fase liquida; è costituita per il 97-99% da acqua, 1-3% da soluti. È un liquido biologico che viene escreto dall'uretra come risultato di processi che avvengono nell'apparato urinario: filtrazione glomerulare, riassorbimento tubulare del sangue, secrezione ed escrezione.

La sua funzione principale è l'eliminazione dei prodotti di scarto del metabolismo e delle sostanze tossiche o esogene come i farmaci; è anche importante la funzione di mantenimento dell'osmolarità, del pH, del bilancio idrico ed elettrolitico. La composizione qualitativa e quantitativa delle urine fornisce informazioni molto utili sui processi fisiologici ed anche patologici che avvengono nell'organismo. È un importante strumento diagnostico per identificare malattie metaboliche, in quanto può contenere biomarcatori specifici che segnalano un'alterazione del metabolismo di vari composti chimici.

3.3.2 Reattivi

Di seguito, sono elencati degli altri reattivi, utilizzati nella preparazione dei campioni per l'analisi degli acidi organici urinari tramite GC-MS (gas-cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa), acquistati presso la ditta Sigma-Aldrich:

- NaOH

Sinonimo: idrossido di sodio

Numero CAS: 1310-73-2

Peso molecolare: 40,00 g/mol

Pittogramma:



Indicazioni di pericolo: H314

Consigli di prudenza: P303+P361+P353, P304+P340+P310, P305+P351+P338, P363

- Idrossilammina cloridrato 1M (NH₂OH·HCl)

Sinonimi: cloridrato di idrossilammina

Numero CAS: 5470-11-1

Peso molecolare: 69,49 g/mol

Pittogramma:



Indicazioni di pericolo: H290, H302+H312, H315, H317, H319, H351, H373, H410

Consigli di prudenza: P273, P280, P301+P312, P302+P352+P312, P305+P351+P338, P308+P313.

- HCl 30%

Sinonimo: acido cloridrico, cloruro di idrogeno

Numero CAS: 7647-01-0

Peso molecolare: 36,46 g/mol

Pittogramma:



Indicazioni di pericolo: H290, H314, H335

Consigli di prudenza: P234, P261, P271, P280, P303+P361+P353, P305+P351+P338.

- NaCl

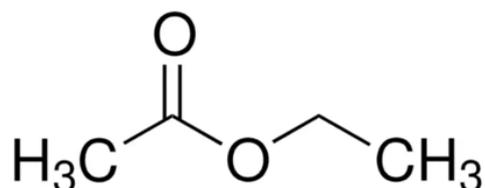
Sinonimo: sodio cloruro

Numero CAS: 7647-14-5

Peso molecolare: 58,44 g/mol

Pittogramma: nessuno, sostanza o miscela non pericolosa secondo la regolamentazione (CE) n. 1272/2008.

- Acetato di etile



Sinonimi: etile acetato

Numero CAS: 141-78-6

Peso molecolare: 88,11 g/mol

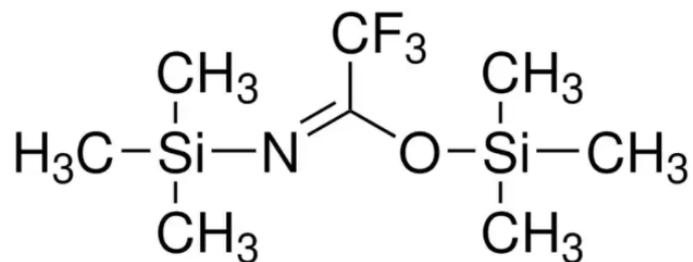
Pittogramma:



Indicazioni di pericolo: H225, H319, H336

Consigli di prudenza: P210, P233, P240, P242, P305 + P351+ P338

- N, O- Bis(trimetilsilil) trifluoroacetamide



Sinonimi: BSFTFA

Numero CAS: 25561-30-2

Peso molecolare: 275,40 g/mol

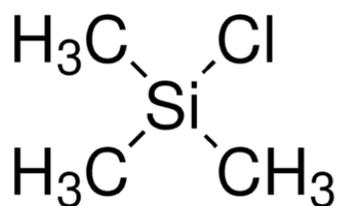
Pittogramma:



Indicazioni di pericolo: H225, H315, H319

Consigli di prudenza: P210, P233, P240, P241, P303+P361+P353, P305+P351+P338

- TMCS



Sinonimi: trimetilclorosilano

Numero CAS: 75-77-4

Peso molecolare: 108,64

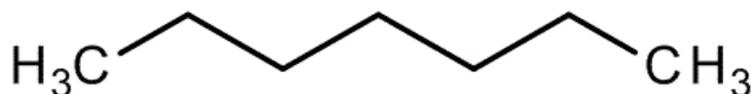
Pittogramma:



Indicazioni di pericolo: H225, H301 + H331, H312, H314

Consigli di prudenza: P210, P233, P303 + P361 + P353, P304 + P340 + P310. P305 + P351 + P338

- Eptano



Sinonimo: n-eptano

Numero CAS: 142-82-5

Peso molecolare: 100,20 g/mol

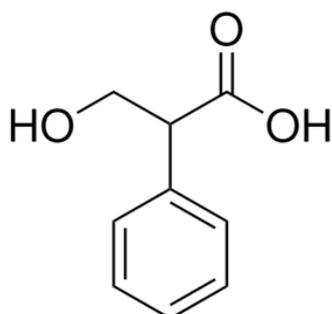
Pittogramma:



Indicazioni di pericolo: H225, H304, H315, H336, H410

Consigli di prudenza: P210, P233, P301+P310, P303 + P361 +P353, P331.

- Acido tropico



Sinonimo: acido 3-idrossi-2- fenilpropionico

Numero CAS: 552-63-6

Peso molecolare: 166,17 g/mol

- Acido 2-CO-caproico

Sinonimo: acido 2-chetoesanoico

Numero CAS: 13022-85-0

Peso molecolare: 152,12 g/mol

Pittogramma:



Indicazioni di pericolo: H315, H319, H335

Consigli di prudenza P261, P264, P271, P280, P302 + P352, P305 + P351 + P338

3.3.3 Strumentazione analitica

- Provette etichettate con numero di check-in, codice a barre (richiesta) e relativo nominativo dei pazienti;
- Pipette tarate, Eppendorf;
- Pipetta a spostamento positivo;
- Provette in vetro pyrex con tappo e sottotappo in teflon;
- Provette in vetro borosilicato;
- Vials porta campion con inserto;
- Vortex;
- Vortex multiplo;
- Termostato
- Centrifuga refrigerata 5804 R, Eppendorf;
- GCMS- QP2020 NX, Shimadzu®;
- Evaporatore rotante miVac;
- Software GCMS Solution, in cui sono inclusi:
 - GCMS Post Run Analysis, per l'analisi qualitativa;
 - GCMS Browser, per l'analisi quantitativa;

3.4 Metodi

3.4.1 Trattamento campione di urina

Le urine vengono trasferite dalla provetta di raccolta ad un'altra provetta e, in seguito, il campione viene centrifugato a 3900 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente. La diluizione che viene eseguita è diversa in funzione del valore di creatinina urinaria.

3.4.2 Preparazione campioni per analisi degli acidi organici urinari

La preparazione delle urine per l'analisi degli acidi organici, si articola in due fasi:

1. DILUIZIONE
2. DERIVATIZZAZIONE DOPPIA

1. Diluizione

La concentrazione di creatinina urinaria è soggetta a grande variabilità; per questo motivo quando essa è troppo elevata vanno effettuate delle diluizioni, al fine di ottenere risultati comparabili tra campioni diversi in termini di concentrazione urinaria di creatinina e di avere una massima resa durante l'estrazione.

L'obiettivo è quello di estrarre se possibile 1,0 mL di campione che abbia circa 2,0 μ mol di creatinina (22,6 mg/mL). Le diluizioni si effettuano utilizzando NaCl al 0,9% (soluzione fisiologica); le quantità di fisiologica da utilizzare dipendono quindi dai valori di creatinina come espressamente indicato nella seguente tabella:

U-CREA (mg/dL)	DILUIZIONE	ESEMPIO mL
MINIMO-MASSIMO		URINA + FISIOLÓGICA
5-10	/	Usare 2 mL di urina
10-48	1,0	1,0 + 0,0
48,1 - 57,6	1,2	1,0+0,2
57,7 - 100,0	1,6	1,0 +0,6
101-200	2,0	1,0 +1,0
> 200	3,0	1,0 + 2,0

Tabella 3 Diluizione urine

2. Derivatizzazione doppia

Questa seconda fase dell'analisi degli acidi organici, si divide a sua volta in quattro step principali:

1. Ossimazione dei 2-cheto acidi
2. Estrazione degli acidi organici liberi e ossimati
3. Essiccazione degli estratti
4. Preparazione del derivato cromatografabile

- Ossimazione dei 2-cheto acidi

- a. Si prelevano 0,1 mL di standard interno con una pipetta a spostamento positivo;

- b. si alcalinizza a pH 12 circa, aggiungendo 20 μL circa di NaOH soluzione al 35% ;
- c. si aggiungono 100 μL di idrossilammina cloridrato 1M;
- d. si aggiunge 1,0 mL di urina diluita seguendo le istruzioni della tabella delle diluizioni;
- e. si scalda per 30 minuti a circa 60°C;
- f. le ossime possono essere pronte per la fase successiva dopo raffreddamento, oppure, devono essere conservate in frigo per massimo una giornata;

- Estrazione degli acidi organici liberi

Per prima cosa si raffredda il campione che era stato precedentemente scaldato su termostato e, successivamente, si aggiungono circa 50 μL di HCl al 30% acidificando così il campione fino ad arrivare a un valore di pH 1 (circa).

Si aggiungono circa 0,5 g di NaCl e in seguito si vortexa per qualche secondo, si verifica che la soluzione sia satura, cioè che sia presente un corpo di fondo visibile, e si aggiungono successivamente 2,0 mL di acetato di etile.

La provetta va immediatamente chiusa e vortexata per circa 3 minuti su vortex multiplo in modo da vortexare contemporaneamente più campioni. Si prosegue con il trasferimento delle provette in centrifuga per 5 o 6 minuti a 3500 rpm.

Dopo centrifugazione, è visibile nella provetta una netta separazione della fase organica superiore dalla fase acquosa inferiore. Si ha quindi un sistema bifasico, nel quale si preleva la fase organica facendo attenzione a non prelevare parte della soluzione acquosa al di sotto, perché altrimenti andrebbe a interferire con i risultati. La fase organica recuperata con una pipetta viene trasferita in una provetta in vetro Pyrex borosilicato.

- Essiccamento

Dopo aver recuperato la fase organica in provetta, questa va essiccata in un evaporatore a 40°C per circa 8-10 minuti. Si procede poi con una nuova estrazione dalla fase inferiore degli acidi organici quindi si prendono le provette in cui è presente il campione iniziale, si aggiungono 2 mL di acetato di etile, si vortexa, si centrifuga, si recupera la fase organica nuovamente e si

trasferisce sulla provetta contenente il campione già essiccato una volta. A questo punto si ritrasferisce nell'evaporatore per la seconda volta.

Si ripetono nuovamente i procedimenti descritti, dall'aggiunta dell'acetato di etile fino al trasferimento della fase organica in provetta. Il campione deve essere evaporato completamente.

Si passa alla fase di preparazione del derivato cromatografabile.

- Preparazione del derivato cromatografabile

Nelle provette con i campioni, si aggiunge il derivatizzante BSFA +1% TCMS circa 50 μ L.

Dopo aver aggiunto il derivatizzante nelle provette col campione, si tappa e si vortexa per sciogliere il residuo sul fondo della provetta; se fosse necessario, si può sottoporre la provetta ad agitazione lenta su agitatore automatico per qualche minuto.

I campioni così preparati, si trasferiscono su termostato a 50°C per 40 minuti, in alternativa i campioni possono essere lasciati una notte a temperatura ambiente.

Quindi, ai campioni viene in seguito aggiunta una aliquota di 500 μ L di eptano; in questo modo i campioni sono cromatografabili e pronti ad essere caricati in GC-MS.

3.4.3 Preparazione miscela dei due standard interni

Gli standard interni utilizzati per l'analisi degli acidi organici urinari in GC-MS sono costituiti da un MIX di due molecole:

- Acido 2-CO caproico 1 g/L soluzione acquosa
- Acido tropico 1 g/L soluzione acquosa

3.4.4 Analisi in GC-MS

Lo strumento GCMS-QP2020 NX è composto da un gas cromatografo accoppiato ad uno spettrometro di massa con analizzatore a singolo quadrupolo con sorgente a ionizzazione elettronica (EI).

La sorgente a ionizzazione elettronica, opera a un potenziale di 70 eV e si trova a una temperatura di 230°C; la temperatura dell'interfaccia che collega la colonna alla sorgente è invece pari a 280°C.

La gas cromatografia è una tecnica utilizzata per separare diversi componenti presenti in una matrice complessa. Il campione che deve essere trattato viene prima vaporizzato e trasportato da un gas vettore (elio) che attraversa la colonna. Nella colonna, i diversi composti presenti nella matrice che viene trattata, vengono separati in base alla loro affinità con la fase stazionaria.

In seguito alla separazione tramite gascromatografia, i composti entrano nel sistema di spettrometria di massa in cui vengono ionizzati. Gli ioni che vengono generati si frammentano e vengono separati in base al loro rapporto massa/carica (m/z) dallo spettrometro. Viene elaborato dallo strumento uno spettro di massa per ogni composto presente in matrice; grazie allo spettro si identifica la specifica molecola.

La GC-MS utilizzata è a singolo quadruplo- Questo analizzatore usa quattro aste parallele metalliche per filtrare gli ioni in base al rapporto m/z in funzione di un campo elettrico oscillante e permette loro di arrivare al rivelatore.

SPECIFICHE TECNICHE COLONNA UTILIZZATA	
Spessore	0,18 μm
Diametro interno	0,18 mm
Lunghezza	20 m
Fase stazionaria	5% difenil, 95% dimetil polisilossano
Temperatura	Da -60°C a $330/350^{\circ}\text{C}$

Tabella 4 Specifiche tecniche della colonna SH-I-5MS, Shimadzu

L'iniezione viene eseguita impostando una temperatura di iniezione di 285°C . la velocità del flusso del gas carrier che è l'elio (He) viene impostata ad un valore di 40 cm/sec.

La pressione in testa alla colonna all'inizio dell'iniezione è di 131.2 kPa, i parametri relativi al flusso sono i seguenti:

Total Flow	9,7 mL/min
Column Flow	0,79 mL/min
Purge Flow	5,0 mL/min

Tabella 5 Parametri relativi al flusso

Le modalità di acquisizione sono due: SCAN e SIM, le quali differiscono per la tipologia di informazioni ottenibili. In modalità SCAN lo spettrometro di massa acquisisce l'intero spettro di massa di un intervallo predefinito di m/z per ciascun composto che eluisce, quindi è utile per una prima caratterizzazione del campione; in questo caso lo SCAN utilizzato è compreso tra 50 e 500 m/z. La modalità SIM (Single Ion Monitoring) è utile per una quantificazione dei composti come la modalità SCAN, con la differenza che in SIM aumenta la sensibilità ed è quindi utile per la ricerca di analiti in tracce.

L'analisi in GC-MS è utile per quantificare gli acidi organici urinari nelle malattie trattate in questa tesi:

- Aumento dei livelli di SA, molecola che non è presente assolutamente in condizioni fisiologiche, si accumula nella Tirosinemia di tipo 1
- Aumento degli acidi dicarbossilici (suberico, adipico e sebacoico) nell'MCADD
- Aumento di acilglicine specifiche in caso di sospetto MCADD

Anche in questo caso, lo strumento darà come risultato un cromatogramma che mostra picchi relativi alle molecole presenti nei campioni e gli spettri di massa relativi.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

Per portare a termine questo lavoro di tesi si è resa necessaria la raccolta dei dati diagnostici dei pazienti malati di Tirosinemia ed MCADD, malattie su cui mi sono focalizzata. La raccolta dei dati è il risultato di un lavoro che comprende diversi aspetti: consultazione delle cartelle cliniche presso il Day Hospital dell’Ospedale Regina Margherita di Torino, consultazione dei referti cartacei e disponibili sul programma di laboratorio di Biochimica Clinica dell’Ospedale Molinette DNLab e, dei risultati delle analisi effettuate quotidianamente sui pazienti in follow-up ma anche su individui sani in modo da studiare i relativi cromatogrammi e confrontarli con i cromatogrammi dei pazienti malati.

4.1 Risultati pazienti affetti da Tirosinemia di tipo 1

PAZIENTI		GM	BE	BD	DM	GH	OM	GA
DATA DI NASCITA		31/05/92	28/12/99	07/10/02	11/07/14	31/01/16	28/04/16	08/12/16
ESORDIO		/	/	cirrosi epatica	epatite subacuta	nefropatia	ematemesi	insuff epatica
DIAGNOSI CROMATOGRAFICA	età	9 anni	4 mesi	12 mesi	3 mesi	7 mesi	3 anni	2 mesi
	u-SA	35 (n.d)	640 (n.d)	n.d (n.d)	17,4 (n.d)	99 (n.d)	122,3 (n.d)	++
	p-TIR	46 (31-106)	489 (31-106)	361,3 (31-106)	378,4 (31-106)	205,2 (31-106)	529,7 (31-106)	102,9 (31-106)
	u- δ -ALA	78 (n.d)	7,6 (n.d)	210 (n.d)	165,3 (n.d)	/	49,68 (n.d)	/
TERAPIA		SI				NO	SI	
FOLLOW-UP	data	Trasferita	16/06/20	27/06/24	15/10/22	04/11/24	13/08/24	Trasferita
	u-SA		n.d (n.d)	n.d (n.d)	n.d (n.d)	10,7 (n.d)	7,2 (n.d)	
	p-TIR		1209 (31-106)	1098 (31-106)	346,1 (31-106)	62,7 (31-106)	90,6 (31-106)	

Legenda:

u-SA: succinilacetone urinario; p-TIR: tirosina plasmatica; u- δ -ALA: Acido- δ – aminolevulinico urinario;

(n.d): valore di riferimento per u-SA e u- δ -ALA;

(31-106): range di riferimento per la tirosina;

Tabella 6 pazienti affetti da Tirosinemia di tipo 1

In questa tabella sono riportati i pazienti, afferenti all’ospedale Regina Margherita, che risultano affetti dalla malattia metabolica rara Tirosinemia di tipo 1. Questi casi sono stati diagnosticati tramite le analisi cromatografiche e non attraverso lo Screening Neonatale.

Per analisi cromatografiche si intende l'analisi degli acidi organici urinari tramite GC-MS e l'analisi degli aminoacidi plasmatici tramite HPLC. Questo ha permesso di misurare rispettivamente i livelli del biomarcatore succinilacetone (SA) nell'analisi degli acidi organici e i livelli di tirosina nell'analisi degli aminoacidi su plasma.

Si parla di "esordio" in quanto, non essendoci in quegli anni lo SNE, istituito solo con il Decreto Ministeriale del 13 ottobre 2016 e atto all'individuazione della patologia in uno stato subclinico dunque asintomatico, questi pazienti sono giunti in ospedale o in pronto soccorso con determinati sintomi caratteristici della patologia. I sintomi accusati dalla casistica di pazienti studiati si manifestano a livello epatico con epatopatia e alterazione dei parametri epatici (AST, ALT). Tipiche sono infatti la cirrosi epatica, la steatosi microvescicolare e l'insufficienza epatica.

DM ha manifestato epatite subacuta, GA insufficienza epatica e, dalle cartelle cliniche, sono emerse anche una marcata splenomegalia e un rallentamento dello sviluppo ponderale.

GH ha manifestato anche nefropatia e sindrome di Fanconi, oltre alla sofferenza epatica e al ritardo psicomotorio, rachitismo e microcefalia.

BD è stato diagnosticato in seguito a una cirrosi epatica associata a steatosi microvescicolare e BE in seguito all'aumento di tutti i lobi epatici, come confermato con una ecografia addominale. Un altro paziente, OM, ha invece avuto dei sintomi più generici come vomito con emissione di sangue e malessere generale, che ha portato il clinico ad approfondire in questo senso.

In generale, i sintomi osservati, sono tipici della patologia e il clinico dopo aver osservato la sintomatologia e i risultati degli esami del sangue ha prescritto il dosaggio dei markers ricercati nella Tirosinemia di tipo 1 attraverso l'analisi degli acidi organici urinari e degli aminoacidi plasmatici. I biomarcatori studiati sono il SA urinario (u-SA) e la tirosina plasmatica (p-TIR). Un terzo marker importante è il δ -ALA (u- δ -ALA) urinario, di solito presente nella patologia. È stato evidenziato infatti che il SA prodotto in caso di tirosinemia di tipo 1 va a inibire l'enzima δ -aminolevulinato deidratasi, limitando la produzione di porfobiligeno a partire da δ -ALA, causandone l'accumulo ed è responsabile delle crisi simili alla porfiria.

Nel caso di DM, OM e BE, tutti e tre i parametri risultano alterati e questo riflette le caratteristiche della patologia. Nel caso di GA, il marker patognomonico SA risulta essere elevato e questo è indicativo della patologia anche se la tirosina plasmatica risulta essere nei limiti della norma.

Un caso particolare è quello di BD, in cui il marker patognomonico SA risulta essere assente, nonostante i livelli di tirosina molto alti e nonostante un'escrezione urinaria elevata di δ -ALA. GH è stato trapiantato a solo 1 anno di età a causa di carcinoma epatico derivante proprio della patologia. La tirosinemia di tipo 1 può infatti predisporre chi ne è affetto a carcinoma epatico a causa dell'accumulo di SA tossico per il fegato. Nonostante il trapianto il paziente risulta avere anche in follow-up livelli di SA urinario elevati perché non più in terapia con nitisinone (NTBC, farmaco specifico per la tirosinemia I) post-trapianto.

Tutti i pazienti sono in terapia col farmaco NTBC, eccetto GH dal momento del trapianto, in quanto la terapia risultava troppo tossica per il suo nuovo fegato. Il farmaco diminuisce i livelli di SA come si può notare in tabella, ma tende frequentemente ad aumentare i livelli di tirosina. Ciò è un effetto del meccanismo d'azione di NTBC che inibisce l'enzima idrossifenilpiruvato diossigenasi bloccando la conversione dell'idrossifenilpiruvato in omogentisato, impedendo quindi la formazione del SA ma bloccando il catabolismo della tirosina a monte causandone l'accumulo. GH e OM hanno invece livelli di tirosina entro i limiti di norma.

I livelli di SA sono elevati per GH perché come precedentemente riportato non è più in terapia con NTBC da quando è avvenuto il trapianto di fegato per carcinoma epatico. OM e GH in terapia presentano invece livelli di SA elevati.

Questa tabella mostra quindi la necessità di un monitoraggio molto accurato per queste patologie metaboliche, in quanto, a prescindere dalla terapia e dalla dieta priva di tirosina, i parametri dei markers a volte possono essere elevati, sottolineando la complessità della biochimica dell'organismo umano.

Nel seguente grafico (figura 17) è mostrato l'andamento dei livelli di tirosina rilevati dal cromatogramma degli aminoacidi plasmatici prima e dopo trattamento dei malati. La maggior parte dei punti, specialmente quelli nella seconda colonna (dopo trattamento) risultano essere al di sopra del limite superiore per la tirosina. I punti nella prima colonna sono compresi tra 50 e 600, quindi alcuni valori (pochi) rientrano nell'intervallo di riferimento normale (pre-trattamento).

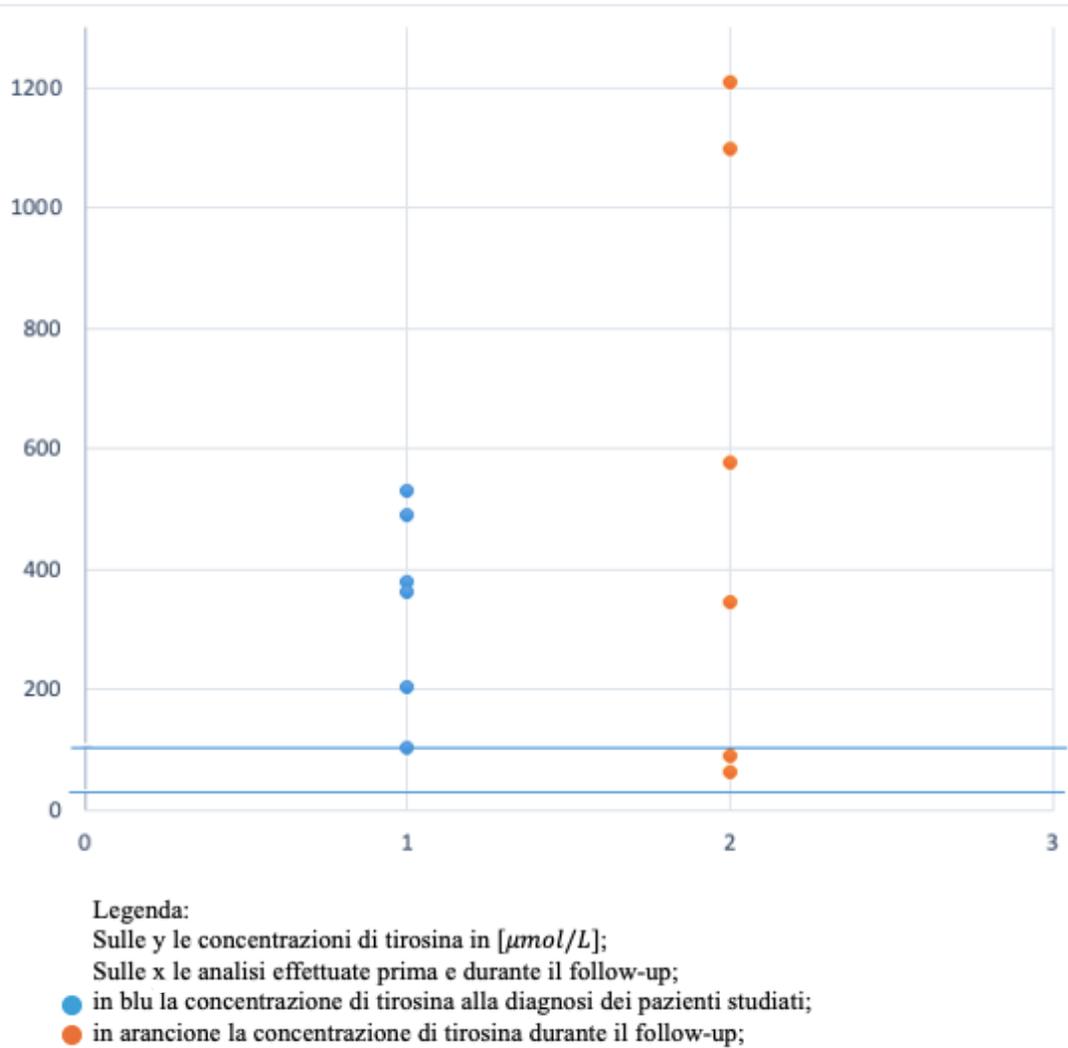


Figura 17 Grafico valori plasmatici di tirosina prima e durante il follow-up;

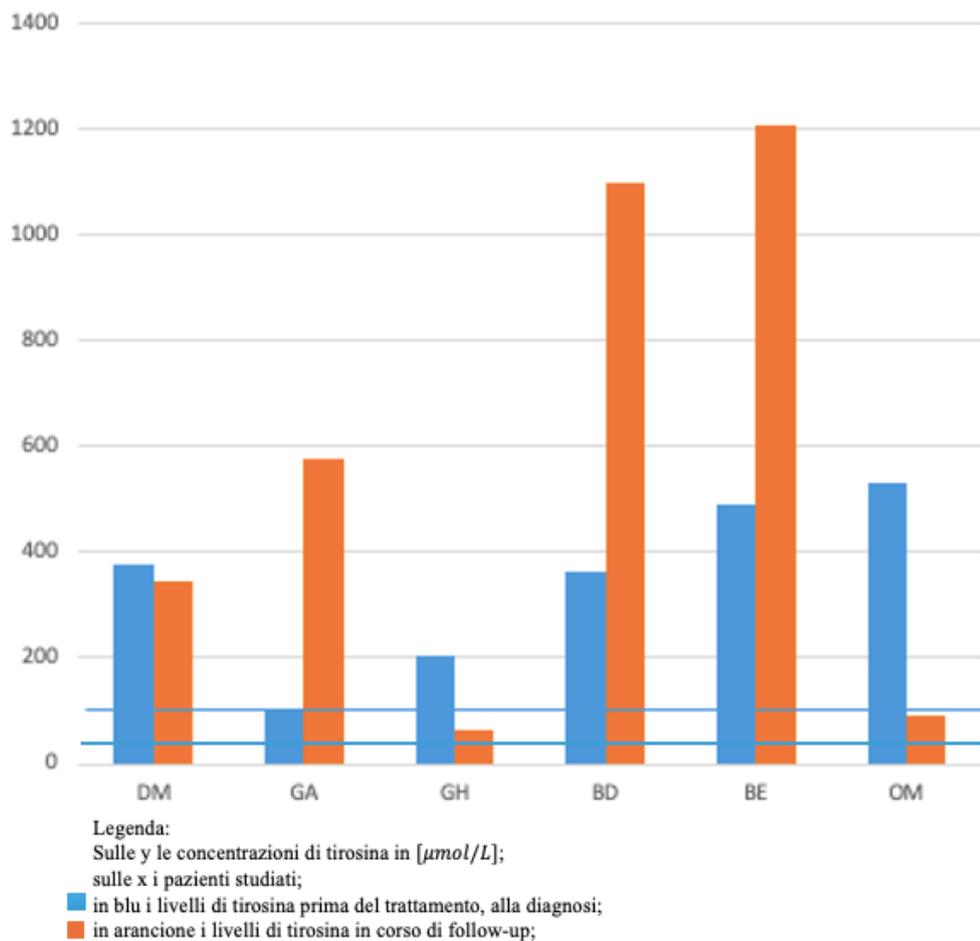


Figura 18 Istogramma con valori plasmatici di tirosina alla diagnosi e durante il follow-up per i pazienti studiati

In figura 18 è riportato l'istogramma con l'andamento della tirosina prima e dopo il trattamento per ogni singolo paziente. Per DM i valori rimangono piuttosto simili prima e dopo il trattamento, per GA, BD e BE i livelli di tirosina aumentano notevolmente, mentre per GH e OM tendono a diminuire.

GH è il paziente che ha subito un trapianto epatico e a causa di ciò i livelli di tirosina risultano bassi, in aggiunta non assume più l'NTBC da dopo il trapianto.

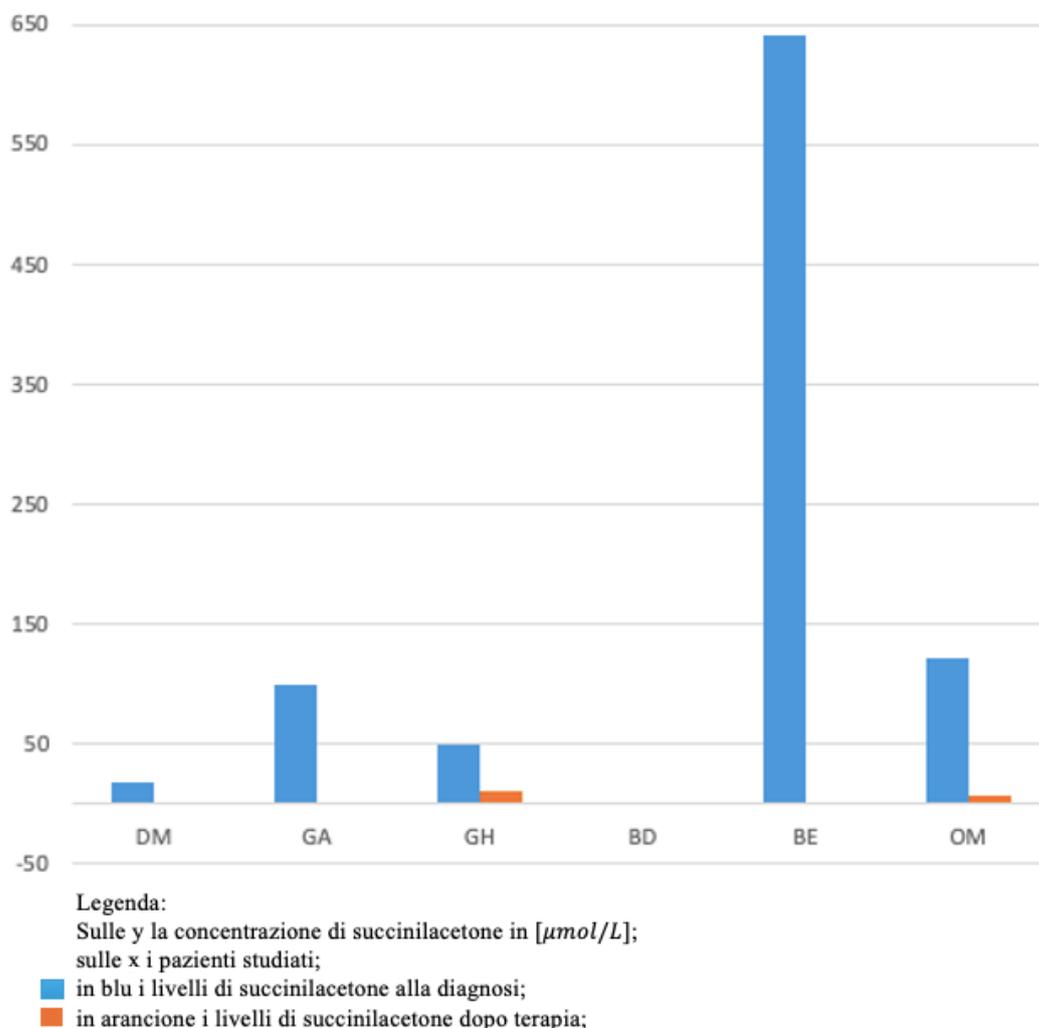


Figura 19 Istogramma con valori di u-SA alla diagnosi e durante il follow-up

In figura 19 è illustrato un istogramma con i valori di SA alla diagnosi ed in follow-up.

Per la maggior parte dei pazienti i livelli di SA sono elevati alla diagnosi e migliorano con la terapia fino ad azzerarsi.

Caso particolare è quello di BD con assenza totale di SA alla diagnosi. Per il paziente GH la presenza del SA in follow-up è riferibile all'interruzione della terapia con NTBC post-trapianto di fegato.

PAZIENTI		GA	GH	OM
DBS (stesse modalità dello SNE)	TIR (μM)	480,21 (<250)	281,43 (<250)	349,13 (<250)
	SA (μM)	4,05 (<0,6)	4,23 (<0,6)	8,73 (<0,6)

Legenda:

(<250): cut-off della tirosina allo Screening Neonatale [μM];

(<0,6): cut-off del succinilacetone allo Screening Neonatale [μM];

Tabella 7 Rivalutazione dei DBS dei pazienti con tirosinemia di tipo 1

Nella tabella 7 sono presentati i dati di tre pazienti selezionati dai casi precedentemente descritti. Questi pazienti sono nati durante il periodo in cui veniva effettuato lo Screening Neonatale per la PKU e nel quale si stava introducendo il programma di SNE.

Per tali pazienti è stato quindi possibile riesaminare il DBS conservato in congelatore e inizialmente utilizzato per la diagnosi di PKU. La rivalutazione del DBS è stata eseguita con spettrometria di massa tandem applicando le stesse metodiche dell'attuale SNE. I risultati hanno confermato che non vi sarebbero stati casi di pazienti non diagnosticati o sottovalutati con il nuovo protocollo.

Come evidenziato in tabella, sia i valori di tirosina che quelli di SA risultano essere al di sopra dei cut-off previsti per lo SNE.

Questi dati suggeriscono che lo SNE sarebbe stato in grado di individuare i malati di Tirosinemia di tipo 1.

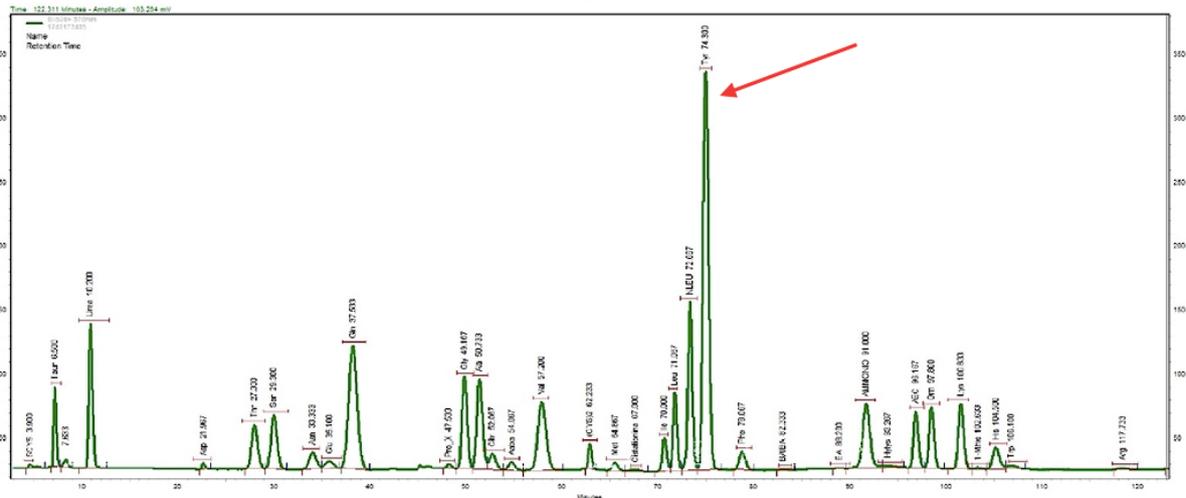


Figura 20 Cromatogramma aminoacidi plasmatici di un pz affetto da Tirosinemia di tipo 1

In figura 20 è riportato il cromatogramma di un paziente affetto da Tirosinemia di tipo 1 e in follow-up presso l’Ospedale Molinette di Torino. Il cromatogramma del plasma analizzato tramite HPLC per la misurazione degli aminoacidi plasmatici mostra un picco in corrispondenza della tirosina, aminoacido che risulta essere un marker importante per la diagnosi e il follow-up della patologia.

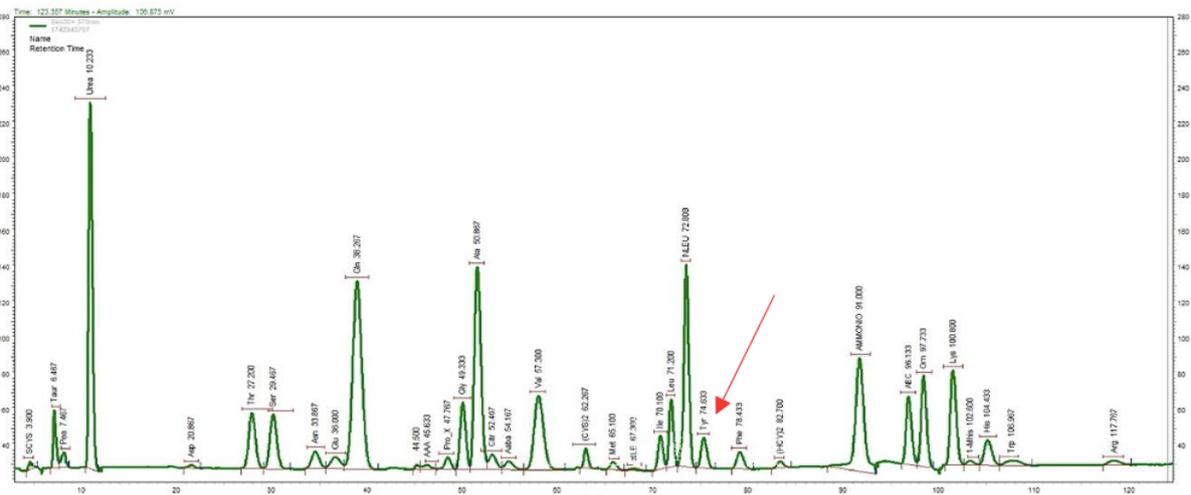


Figura 21 Cromatogramma aminoacidi plasmatici di pz sano

In figura 21 è invece mostrato un cromatogramma risultante dall’analisi degli aminoacidi plasmatici con HPLC, di un individuo che risulta essere sano; al contrario del precedente cromatogramma si può notare che è assente il picco che era presente in figura 20 relativo all’alta concentrazione di tirosina.

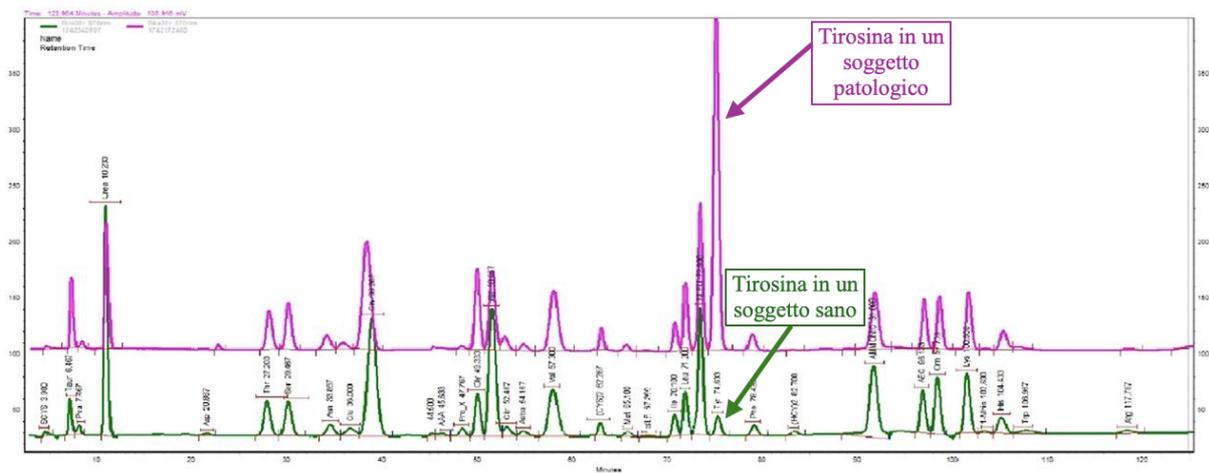


Figura 22 Overlay cromatogramma aminoacidi plasmatici di un paziente e di un soggetto sano

In figura 22 è mostrata la sovrapposizione di due cromatogrammi: quello inferiore in verde mostra l'andamento degli aminoacidi del paziente sano; come si può notare la tirosina ha un picco molto basso che corrisponde alla normalità mentre quello superiore in viola mostra un picco relativo alla tirosina molto elevato, mettendo in evidenza la diversità tra un cromatogramma di aminoacidi plasmatici di un paziente con un'aminoacidopatia e di un soggetto sano.

4.1.1 Valutazione biomarcatori acidi organici urinari per la Tirosinemia di tipo 1

PAZIENTI	PARAMETRI ANALIZZATI	GM		BD	
		PRE-NTBC	POST-NTBC	PRE-NTBC	POST-NTBC
	p-SA [μ M]	3,5 (<0,1)	<0,1 (<0,1)	<0,1 (<0,1)	<0,1 (<0,1)
	s- α -FETOPROTEINA [μ g/L]	10200 (<12)	<5 (<12)	12 (<12)	10 (<12)
	p-TIROSINA [μ M]	46 (50-130)	329 (50-130)	777 (50-130)	917 (50-130)
	p-FENILALANINA [μ M]	45 (40-120)	54 (40-120)	57 (40-120)	60 (40-120)
	s-NTBC [μ M]	/	32	/	62
	u- δ -ALA [mmol/mol cr]	78 (0-3)	2,5 (0-3)	2,6 (0-3)	1,8 (0-3)
	u-SAA [mmol/mol cr]	46 (<1)	<1 (<1)	<0,1 (<1)	<0,1 (<1)
	u-SA [mmol/mol cr]	35 (<1)	<1 (<1)	<0,1 (<1)	<0,1 (<1)

Legenda: p-SA: succinilacetone plasmatico; s- α -FETOPROTEINA: α -fetoproteina sierica; p-tirosina: tirosina plasmatica; p-fenilalanina: fenilalanina plasmatica; s-NTBC: nitisinone sierico; u- δ -ALA: acido- δ -aminolevulinico urinario; u-SAA: succinilacetatoacetato urinario; u-SA: succinilacetone urinario;

Tabella 8 Trial NTBC pazienti affetti da tirosinemia di tipo 1

I primi due casi di tirosinemia di tipo 1 sono stati arruolati in un trial in Svezia presso il dipartimento di chimica clinica dell'università di Gothenburg in cui è stato studiato l'effetto del farmaco sui pazienti.

In particolare, sono stati studiati gli effetti dell'NTBC sui livelli di: SA plasmatico, α - fetoproteina sierica, tirosina plasmatica, fenilalanina plasmatica, δ -ALA urinario, SA urinario e SA urinario, prima e dopo l'inizio della terapia. In concomitanza è stata valutata la concentrazione di NTBC nell'organismo.

Primo paziente, GM:

Con la terapia il SA plasmatico (p-SA) e l' α -fetoproteina sierica (s- α -fetoproteina) scendono a valori normali; i livelli di fenilalanina plasmatica (p-Fenilalanina), per GM risultano essere normali prima e dopo il trattamento con una lieve fluttuazione. Il δ -ALA) urinario è molto elevato prima del trattamento ma si normalizza dopo l'inizio della terapia farmacologica, suggerendo un buon controllo della condizione da parte del farmaco; anche il SAA urinario (u-SAA) si normalizza con l'inizio della terapia così come u-SA.

Come si può notare da ciò che è riportato in tabella, i livelli di tutti i markers nel paziente GM diminuiscono dopo l'inizio della terapia, eccetto la tirosina che, come spiegato precedentemente, tende a rimanere in concentrazioni elevate in quanto l'NTBC ne blocca il catabolismo, portando inevitabilmente al suo accumulo.

Secondo paziente, BD:

Dopo il trattamento le concentrazioni dei markers diminuiscono, a eccezione della tirosina che tende ad aumentare per le motivazioni già chiarite. Questo paziente risulta un caso particolare perché il SA plasmatico è assente nonostante sia un marker patognomico.

L' α -fetoproteina sierica in questo caso rimane nei limiti della norma sia prima che dopo il trattamento; la tirosina plasmatica è molto elevata prima del trattamento e continua ad essere elevata nonostante la terapia, anzi, proprio a causa di quest'ultima.

La fenilalanina plasmatica è normale prima e dopo il trattamento con leggere fluttuazioni anche in questo caso; δ -ALA è abbastanza stabile in questo paziente sia prima che dopo il trattamento. Il SAA urinario e il SA urinario risultano assenti per BD.

Entrambi i pazienti mostrano dei miglioramenti dopo l'assunzione di NTBC con la normalizzazione di alcuni parametri come il SA, l' α -fetoproteina e δ -ALA.

Nonostante i miglioramenti, i livelli dei markers e dello stato di salute di questi pazienti, i biomarcatori vanno sempre controllati per ottimizzare il trattamento e prevenire complicanze a lungo termine.

Per quanto riguarda la situazione clinica di BD alla diagnosi, che risulta particolare perché non presenta il marker SA, è stato necessario fare degli approfondimenti in letteratura.

Nella tirosinemia di tipo 1, in cui FAH è mutato o carente, il FAA viene convertito in SAA, il quale viene metabolizzato a SA. Quest'ultimo è il responsabile delle manifestazioni simili alla porfiria, nonché di altre tossicità a livello epatico e renale.

Sia FAA che SAA si accumulano nella patologia. La riduzione da FAA a SAA avviene ad opera di un enzima non conosciuto, si presume che sia una FAA-reduttasi. FAA non è stato trovato nei fluidi dei pazienti in quanto viene immediatamente convertito in SAA, il quale, invece, insieme al SA risulta essere un metabolita presente della patologia, come descritto da Chinsky et al (31).

4.1.3 Il biomarcatore succinilacetone

Secondo le linee guida per lo Screening Neonatale a livello mondiale, quando c'è il sospetto di tirosinemia di tipo 1 con lo screening, si effettua la conferma biochimica con il dosaggio degli acidi organici urinari, tra i quali, si va a valutare la concentrazione di SA, considerato dalle linee guida un marker idoneo per la diagnosi precoce della patologia.

Nel 1981 Christensen (32) isolò il SA nelle urine di 4 pazienti con tirosinemia di tipo 1, confermando l'ipotesi, già avanzata nel 1977 da Lindblad, che il deficit di FAH fosse la causa della patologia.

In tutti i pazienti con elevate concentrazioni di SA, fu anche rilevato un aumento di δ -ALA, suggerendo che il SA inibendo l'enzima aminolevulinato deidratasi implicato nella sintesi dell'emoglobina, scatenasse le crisi porfiriche.

Nel 1982 Lindblad (33) isolò il SA insieme al suo metabolita ed il SAA in varie percentuali nelle urine di pazienti affetti da questa patologia. L'intento dello studio era di approfondire la relazione tra l'inibizione dell'aminolevulinato deidratasi e il SA

Le molecole sono state isolate con varie tipologie di derivatizzazione (metilesteri, sililderivati)

Lo studio degli spettri di massa dei diversi derivatizzati ha permesso di identificare tre molecole: SAA, SA e acido 4-ossido-6 idrossieptanoico rappresentate in figura 24.

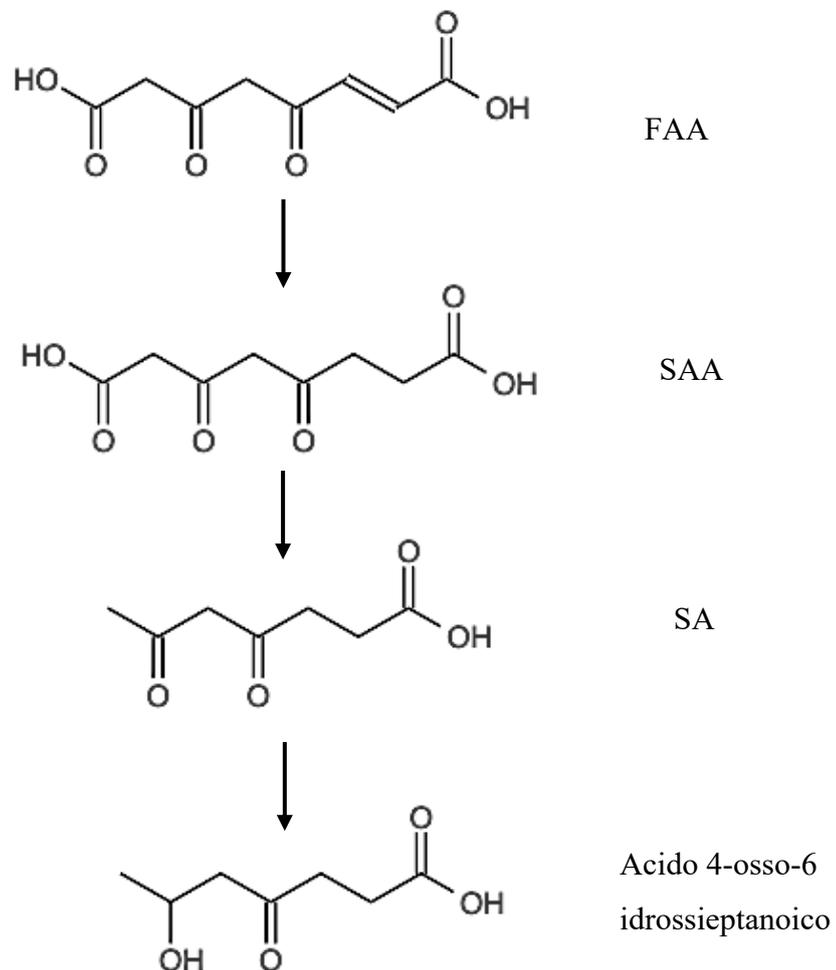


Figura 24 Metabolismo del FAH (33)

Come illustrato in figura 24, il FAA viene convertito in SAA, il quale, subisce una decarbossilazione formando il SA, che a sua volta viene convertito in acido 4-osso-6 idrossieptanoico.

Successivamente, Tuchman(34) nel 1984 tentò di isolare il SA dalle urine dei pazienti affetti da Tirosinemia di tipo 1, applicando delle metodiche che permisero di comprendere le conseguenze che subisce la molecola quando sottoposta a pH differenti.

Questo studio portò alla conclusione che, a pH inferiori a 5, avviene l'ossimazione di uno solo dei due gruppi chetonici e questo determina la formazione di due molecole isomere: 3-metil-5-isossazolo propionato e 5-metil-3-isossazolo propionato.

In seguito si derivatizza con BSTFA. Si formano due isomeri ciclici con ione molecolare M+ 227 (mono-trimetilsilil derivato).

A pH uguale o superiore a 5 si ha la formazione della molecola ossimata sui due gruppi chetonici, in questo caso si parla di diossima e non può avvenire la formazione del ciclo. Con il derivatizzante BSTFA si formano tre isomeri trimetilsilil derivati, visibili nel cromatogramma con 3 picchi.

Infine, se dopo la formazione della diossima si diminuisce il pH nuovamente ad un valore <5, questa si converte nella forma ciclica quindi 3(5)-metil-(3)-5 isossazolo propionato in maniera irreversibile.

Nel 1989 Schierbeek(35) sviluppò una metodica per identificare sia il SA che il SAA, in modo da migliorare la diagnosi di questa patologia. La metodica prevedeva il trattamento dell'urina con idrossilammina cloruro e la successiva aggiunta di HCl in modo da portare il pH a 3 circa. L'incubazione per 30 minuti a 80°C doveva permettere la trasformazione dell'eventuale SAA presente, in SA.

In conclusione, trattando il campione in questa maniera, è stato convertito tutto il SAA in SA. L'analisi quantitativa eseguita su questi campioni era quindi il risultato della somma delle concentrazioni di entrambe le molecole.

4.1.4 Casi particolari

Mori et al (36) descrivono il caso clinico di un neonato sottoposto a SNE che non aveva elevati livelli di SA ma che mostrava sintomi tipici di sofferenza epatica in associazione a parametri epatici alterati; durante il ricovero gli esami del sangue mostravano elevati livelli di tirosina ma

assenza di SA. Il paziente è morto dopo 18 giorni di ricovero per insufficienza epatica. È stata effettuata un'analisi genetica post-mortem che rivelò una mutazione di FAH e quindi la presenza della malattia nonostante assenza del marker patognomonico.

Un altro caso, studiato da Cassiman (37) nel 2009, ha coinvolto un bambino di 4 mesi affetto da Tirosinemia di tipo 1 con parametri epatici alterati come l' α -fetoproteine e le transaminasi. In questo paziente erano assenti il SA e il SAA urinari, mentre la tirosina era elevata insieme alla metionina ma altrettanto normale la concentrazione di δ -ALA, in accordo con l'assenza di SA.

La particolarità è che è stato trovato un incremento dei livelli urinari dell'acido 4-osso-6-idrossieptanoico, metabolita del SA. Le analisi genetiche sul gene FAH hanno confermato la presenza di una nuova variante definita "mild type" in cui vi è dell'attività residua dell'enzima che potrebbe spiegare l'assenza di SA e SAA, ma non spiega in ogni caso la presenza dell'acido 4-osso-6-idrossieptanoico, che deriva dal SA.

Nel 2016, è stato pubblicato un articolo, Blackburn et al, in cui viene individuata una nuova variante del gene FAH definita "silent" e responsabile di una situazione clinica molto particolare in cui è assente sia il SA che il SAA, mentre δ -ALA è elevato (38). Viene descritto il caso di una famiglia con membri affetti da Tirosinemia di tipo 1 con enzima FAH mutato e livelli di SA assenti. Si tratta di due bambine, nate da genitori consanguinei, la cui malattia è stata diagnosticata a 12 e 13 anni a causa di un carcinoma epatocellulare nonostante durante gli anni precedenti non avessero avuto delle alterazioni negli esami di laboratorio. Poco dopo la morte di una delle sorelle è stato diagnosticato un carcinoma epatico anche all'altra sorella che ha ricevuto un trapianto di fegato. Anche la paziente trapiantata aveva una concentrazione di tirosina normale e SA normale. A 11 anni di età, anche il fratello delle due pazienti venne studiato: in questo caso il SA era normale ma il δ -ALA era molto elevato. Anche la madre risultava portatrice della variante di FAH con totale assenza di SA.

I casi appena descritti hanno delle varianti dell'enzima FAH che comportano un quadro biochimico diverso rispetto a quello che ci si aspetta tramite lo SNE, risultando falsi negativi. Per cui si tratta di pazienti che vengono persi allo SNE perché non identificati a causa dell'assenza del biomarcatore patognomonico.

4.1.5 Il succinilacetone nello Screening neonatale Esteso

Nello SNE, la molecola di SA viene misurata su DBS è attraverso derivatizzazione con idrazina, che si lega al SA con un legame forte, spiazzando le proteine plasmatiche a cui il SA si lega, come mostrato nella seguente figura 25.

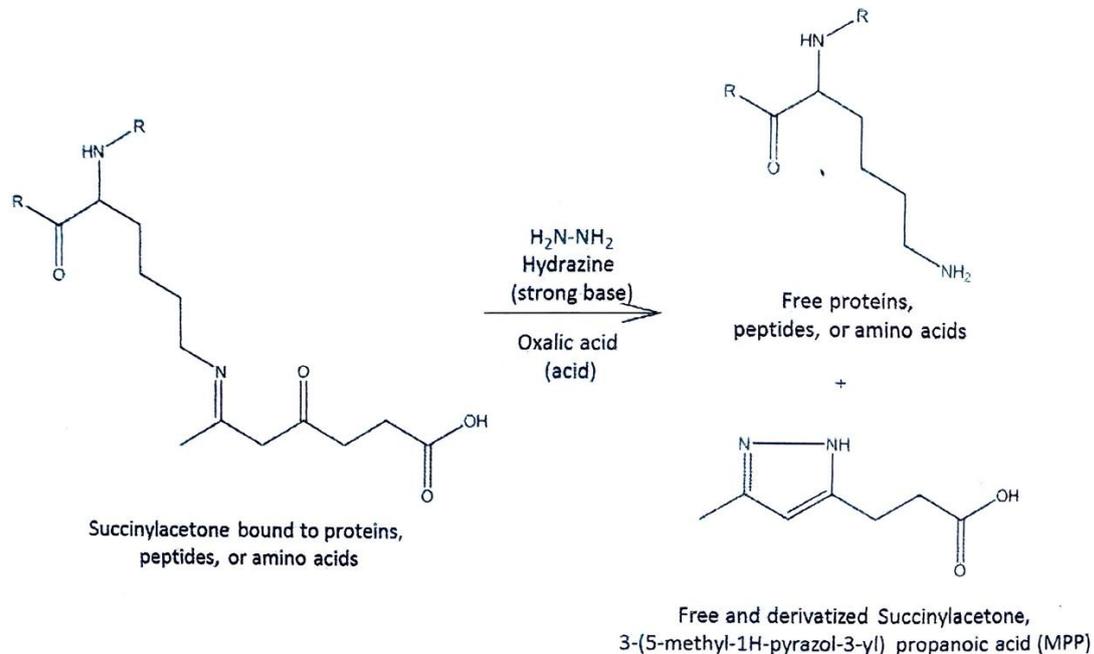


Figura 25 SA derivatizzato allo SNE

La molecola di SA che viene misurata con la conferma biochimica su matrice urinaria con GC-MS viene invece ossimata con idrossilammina cloruro a pH basico. L'abbassamento successivo del pH per l'estrazione determina la conversione irreversibile del SA in due molecole cicliche isomere: 3-metil-5-isossazolo propionato e 5-metil-3-isossazolo propionato. I due isomeri (figura 26) dopo derivatizzazione con BSTFA sono responsabili del doppio picco (relativo ai sililderivati) del SA evidenziabile nel cromatogramma di un paziente malato.

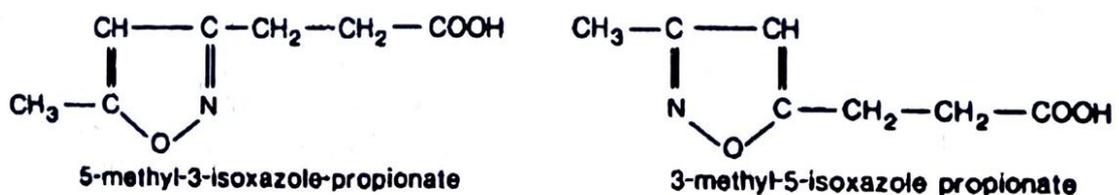


Figura 26 Isomeri del SA ossimato

Lo spettro di massa è uguale per i due isomeri dopo derivatizzazione ed è il seguente:

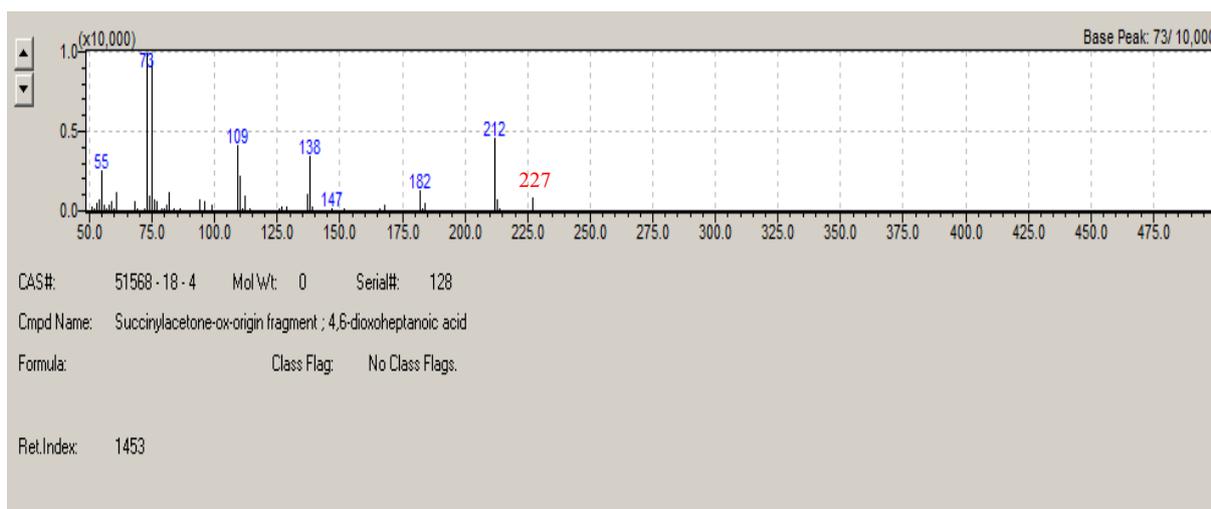


Figura 27 Spettro di massa SA sililderivato

Legenda:

m/z 227: ione molecolare

m/z 212: M- CH₃

m/z 182: M-(CH₃)₃

m/z 138: M-OTMS

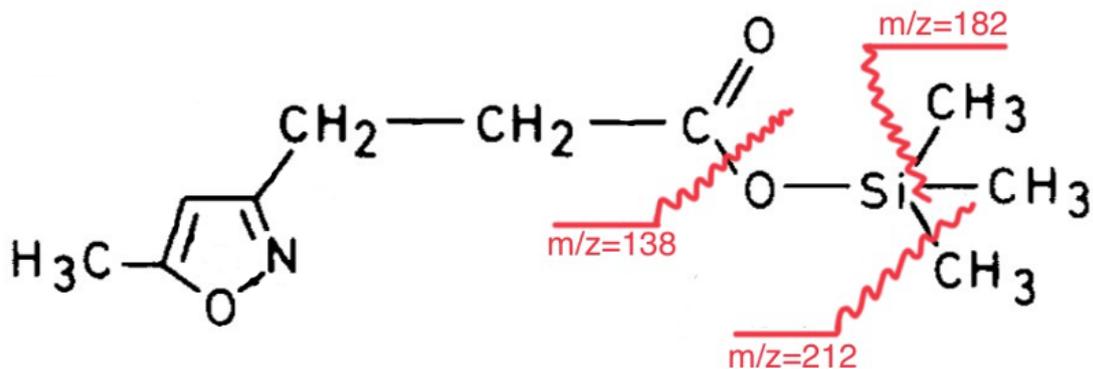


Figura 28 Frammentazione del SA

In figura 28 è rappresentata la frammentazione del SA derivatizzato: trimetilsilil-5-metil-3-isossazolo propionato.

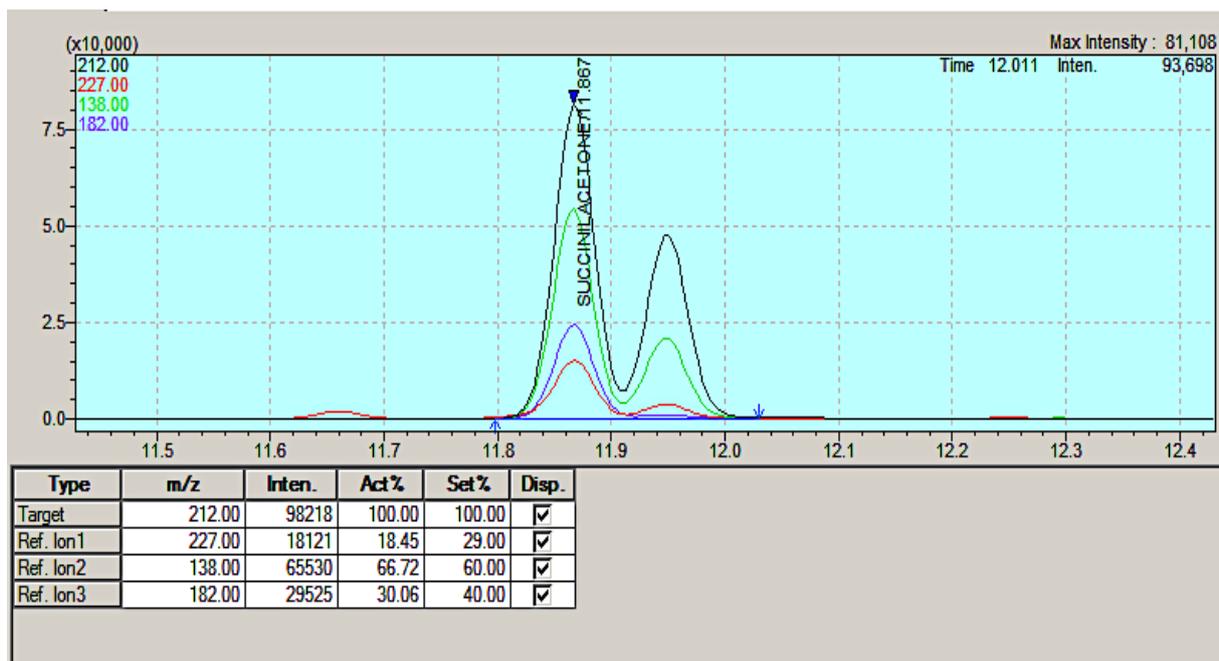


Figura 29 Doppio picco del SA in modalità SIM

In figura 29 è riportato il doppio picco relativo al SA, estratto dal cromatogramma di uno dei pazienti malati che sono in follow-up per Tirosinemia di tipo 1 presso l’Ospedale Molinette di Torino.

La molecola è identificata in base al tempo di ritenzione, circa 11,87 minuti e, in base al confronto degli ioni scelti come “qualifiers” (q) (227, 138, 182) con quelli del picco presente, necessari quindi per l’identificazione della molecola. Lo ione “quantifier” (Q) adatto alla quantificazione è il 212. Il cromatogramma riportato è relativo alla modalità SIM, la quale si concentra su determinati ioni e richiede però una conoscenza a priori dei composti target da monitorare.



Figura 30 Cromatogramma del SA in modalità TIC

In figura 30 è mostrato il cromatogramma di un paziente incluso nella casistica esaminata per la malattia metabolica Tirosinemia di tipo 1 a confronto con un cromatogramma normale. Come mostrato in figura, è ben visibile il doppio picco relativo al SA in modalità TIC (Total Ion Chromatogram, ovvero l'insieme degli ioni rilevati nel tempo durante l'analisi) che riflette tutte le specie ionizzate che passano attraverso la colonna cromatografica. Il cromatogramma del paziente malato è confrontato con un cromatogramma normale, in cui si nota l'assenza totale del doppio picco relativo al SA (tracciato rosa).

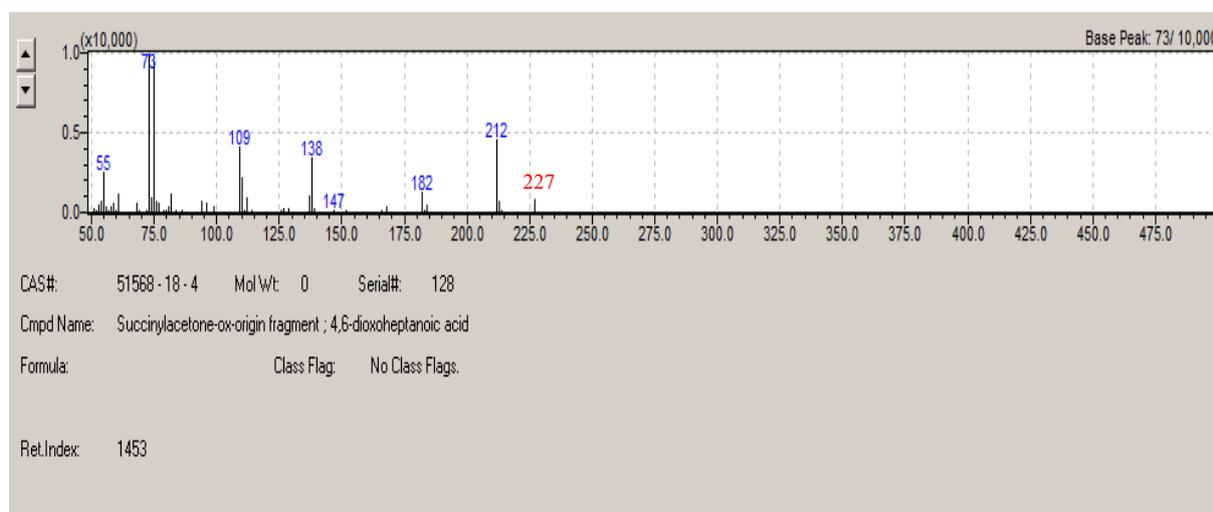


Figura 31 Spettro di massa del SA sililderivato

In figura 31 è rappresentato lo spettro di massa del SA.

L'analisi dello spettro è utile in quanto permette di identificare il composto attraverso la rilevazione di frammenti caratteristici.

Lo ione m/z 227 è lo ione molecolare che conserva gran parte della struttura del SA ed è importante come suggerimento della struttura principale del composto.

lo ione m/z 212 corrisponde al frammento che fa riferimento alla molecola che ha perso un radicale metile (-CH₃), quindi questo conserva una buona parte della struttura molecolare d'origine.

Lo ione m/z 182 è M- (CH₃)₃.

Lo ione m/z 138 è M- (O-TMS).

La biblioteca a cui si fa riferimento quando si studia uno spettro di massa

è la NIST (National Institute of Standards Technology), nella quale è possibile trovare una collezione digitale di spettri di massa noti e serve per l'identificazione di composti totalmente sconosciuti (facendo un confronto con gli spettri in libreria) ma anche come conferma di un composto noto.

In conclusione, dopo aver studiato la casistica dei pazienti affetti da Tirosinemia di tipo 1, è emersa una particolarità: il paziente BD aveva un quadro biochimico diverso dagli altri pazienti coinvolti in questo presente lavoro di tesi e questo ha portato alla necessità di fare degli approfondimenti. La particolarità consiste nel fatto che il biomarcatore patognomonico in questo paziente è stato sempre assente, persino alla diagnosi.

Gli approfondimenti bibliografici hanno effettivamente dimostrato che sono stati individuati dei casi di pazienti (molto rari) affetti da questa patologia che non presentano il biomarcatore raccomandato per lo Screening Neonatale.

La situazione è molto complessa perché molti elementi rimangono inspiegabili come i casi in cui si ha l'aumento δ -ALA nei pazienti anche in assenza di SA. Un altro elemento che non è stato chiarito è la presenza dell'acido 4-osso-6-idrossieptanoico, metabolita del SA, nell'urina di un paziente che non ha il SA.

Tutto ciò mette in risalto la complessità della biochimica e, soprattutto, la possibilità di avere dei falsi negativi allo Screening Neonatale per la Tirosinemia di tipo 1; pertanto, il dosaggio del SA come biomarcatore della patologia risulta inadeguato ed insufficiente.

Sarebbe estremamente utile, in futuro, approfondire questa tematica, analizzando in modo dettagliato l'intera gamma dei metaboliti coinvolti nella via catabolica della tirosina nelle urine dei pazienti. D'altra parte, però, la bassa incidenza della patologia limita la possibilità di studio.

Sarebbe altrettanto importante individuare una molecola alternativa all'interno di questa via catabolica, capace di fungere da biomarcatore per la Tirosinemia di tipo 1. Una tale molecola dovrebbe garantire una diagnosi accurata, riducendo al minimo il rischio di falsi negativi e migliorando significativamente il processo diagnostico per questa patologia rara.

4.1.6 Esperimento per la quantificazione del succinilacetoacetato

Il SA è il biomarcatore utilizzato nello Screening Neonatale Esteso per la diagnosi precoce della Tirosinemia di tipo 1: si tratta di un marker patognomonico, ovvero, di un biomarcatore la cui presenza permette di identificare con certezza la specifica patologia.

Tuttavia, come descritto precedentemente, in letteratura sono riportati dei casi di pazienti definiti “mild type”, cioè affetti dalla patologia anche in assenza di SA alla diagnosi. La maggior parte di questi pazienti sono poi andati incontro a conseguenze severe come il carcinoma epatico o il decesso. Tra i casi di Tirosinemia di tipo 1 analizzati in questa tesi, è presente un paziente, BD, che aveva avuto il biomarcatore succinilacetone assente all’esordio della patologia: la diagnosi è stata eseguita grazie all’analisi genetica che ha rivelato la mutazione di FAH. Il paziente ad oggi è in terapia ed è in buono stato di salute.

Si evidenzia in questo ambito, l’importanza di poter contare su un biomarcatore che sia efficace e che sia presente in tutti i soggetti malati, in modo da evitare dei falsi negativi.

A causa della problematica legata ai casi “mild type” è stato fondamentale approfondire la via catabolica della tirosina per cercare di identificare un’altra molecola da poter utilizzare come biomarcatore alternativo. Dagli approfondimenti emerge la presenza di due molecole importanti nella via catabolica della tirosina: il SAA, precursore del SA e l’acido 4-ossido-6 idrossi eptanoico, metabolita del succinilacetone.

In questa tesi ho effettuato un esperimento di quantificazione del SAA, il precursore del SA. L’ipotesi alla base dell’esperimento è che, in individui con varianti genetiche particolari, o semplicemente per variabilità individuale, il precursore non venga convertito nel metabolita con conseguente risultato dello screening falso negativo.

Per effettuare questo esperimento, è stata seguita la metodica descritta da Schierbeek (35), che prevede la quantificazione del SAA attraverso la conversione di quest’ultimo in SA. Pertanto, nelle urine trattate mediante questa procedura avviene la conversione del precursore SAA in SA che può essere quantificato tramite la conferma biochimica di routine.

L'analisi di un'urina di paziente affetto da tirosinemia 1 è stata effettuata in doppio con il metodo di Schierbeek (35) oltre che con il metodo di routine, in modo da evidenziare le differenze nella concentrazione del biomarcatore.

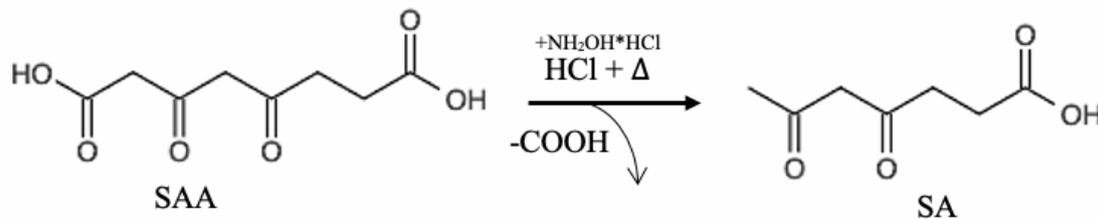


Figura 32 Reazione di decarbossilazione da SAA a SA

Come riportato da letteratura e come illustrato nella reazione riportata in figura 32, il SAA decarbossila a pH acido e ad alte temperature, trasformandosi in SA.

Il metodo prevede una modifica rispetto al metodo utilizzato in routine presso il laboratorio di Biochimica Clinica dell'Ospedale Molinette di Torino.

In particolare, 1 ml di urina del campione in prova è stato acidificato a $pH < 3$ per aggiunta di HCl al 30% (circa $50 \mu L$); subito dopo è stata aggiunta idrossilammina cloridrato. Successivamente, il campione è stato trasferito nel termostato e riscaldato a $80^\circ C$ per 30 minuti. I passaggi successivi sono i medesimi del metodo descritto in questa tesi nel capitolo 3. L'aggiunta di HCl e il riscaldamento determinano la conversione del SAA eventualmente presente, in SA: in questo modo si potrebbe avere un valore quantitativo del totale SAA+SA.

L'acido 2-CO caproico è lo standard interno utilizzato per calcolare la concentrazione di tutti i 2-chetoacidi che subiscono ossimazione e quindi anche del succinilacetone. Dal confronto tra il metodo di routine e quello applicato in questo esperimento, si deduce che viene degradato dall'aggiunta di HCl e riscaldamento (figura 33).

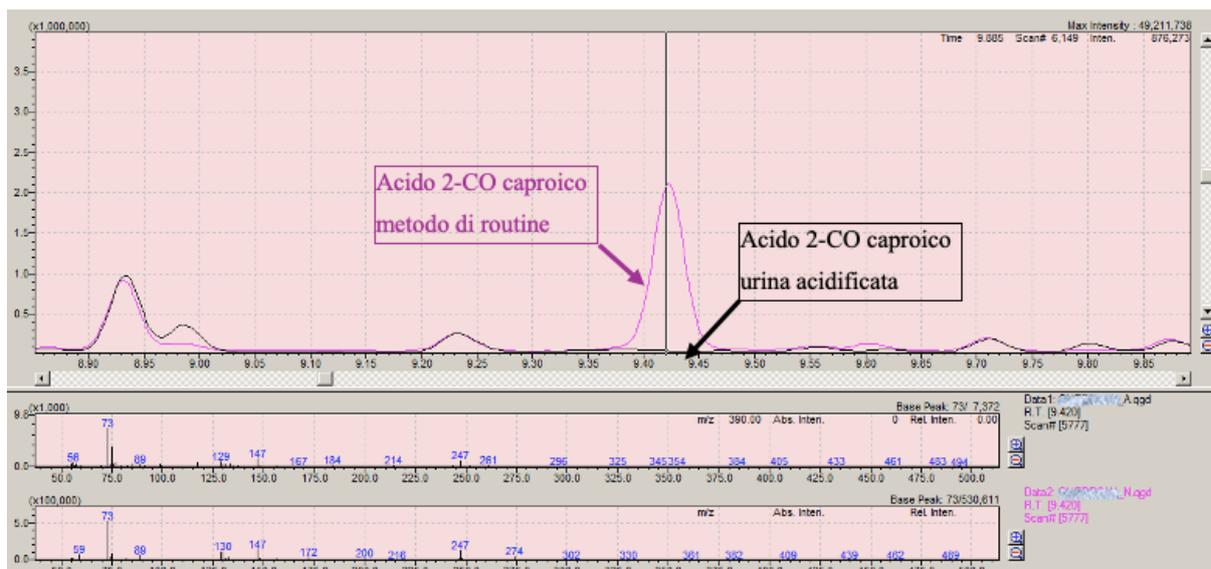


Figura 33 Cromatogramma TIC dell'acido 2-CO caproico nell'urina con metodo standard a confronto con urina acidificata

Da ciò si può dedurre che non è uno standard interno adeguato quando l'urina è trattata con questa procedura: per eseguire un'analisi quantitativa andrebbe individuata una molecola non fisiologica che subisca ossimazione ma non si degradi nelle condizioni sperimentali; infatti, nell'articolo da cui è stata tratta questa metodica (35) viene utilizzato come standard interno (N)-5(3)-metil-3(5)-isossazolo propionato e non il l'acido 2-cheto-caproico.

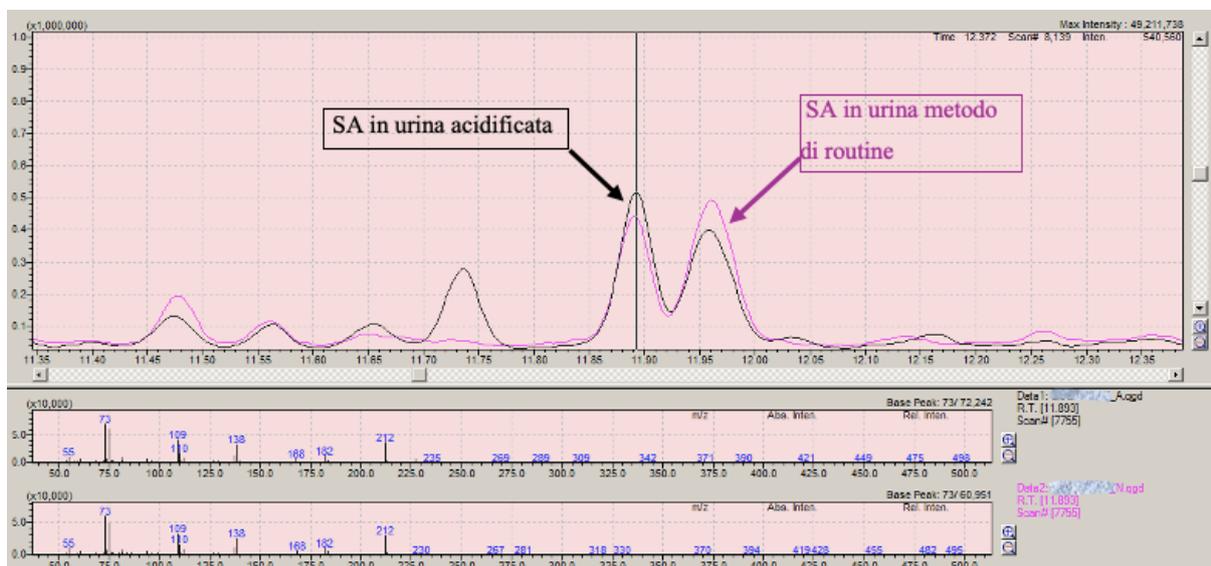


Figura 34 Cromatogramma TIC dei due picchi relativi al succinilacetone nell'urina con metodo standard a confronto con urina trattata secondo con il metodo sperimentale (35).

Come si può osservare nel cromatogramma in figura 34 l'analisi in TIC, evidenzia che, le differenze tra i campioni trattati col metodo di routine e quelli trattati con il metodo sperimentale, non risultano essere significative in questo paziente. I due picchi relativi al SA nell'urina del paziente patologico trattato con le due metodiche sono quasi sovrapponibili con nessuna differenza significativa.

Applicando questa metodica, quindi acidificando l'urina, è risultato evidente che, come lo standard interno acido 2-chetocaproico, anche gli altri 2-cheto acidi normalmente misurati in questa analisi (gliossilico, piruvico, 2-CO glutarico, 2-CO adipico, 4-OH piruvico) con il metodo di routine, sono stati degradati in proporzioni variabili e quindi le loro concentrazioni sono diminuite nel campione di urina acidificata rispetto all'urina trattata con il metodo normale.

Un'ulteriore osservazione è che alcuni acidi organici che vengono abitualmente misurati con questa metodica di routine, hanno subito delle reazioni per le quali alcuni di essi hanno formato delle altre molecole visibili in TIC esclusivamente nel campione di urina acidificato.

Un esempio illustrato in figura 35, evidenzia che l'acido isocitrico ha un valore di 13,7 mmol/mol crea nel campione acidificato e di 18,2 mmol/mol crea nel campione di urina trattato normalmente. Confrontando lo spettro di massa riportando in figura con quelli disponibili nella biblioteca NIST, si è potuti risalire all'identificazione del lattone dell'acido isocitrico. La concentrazione dell'acido isocitrico diminuisce mentre aumenta quella del suo metabolita lattone.

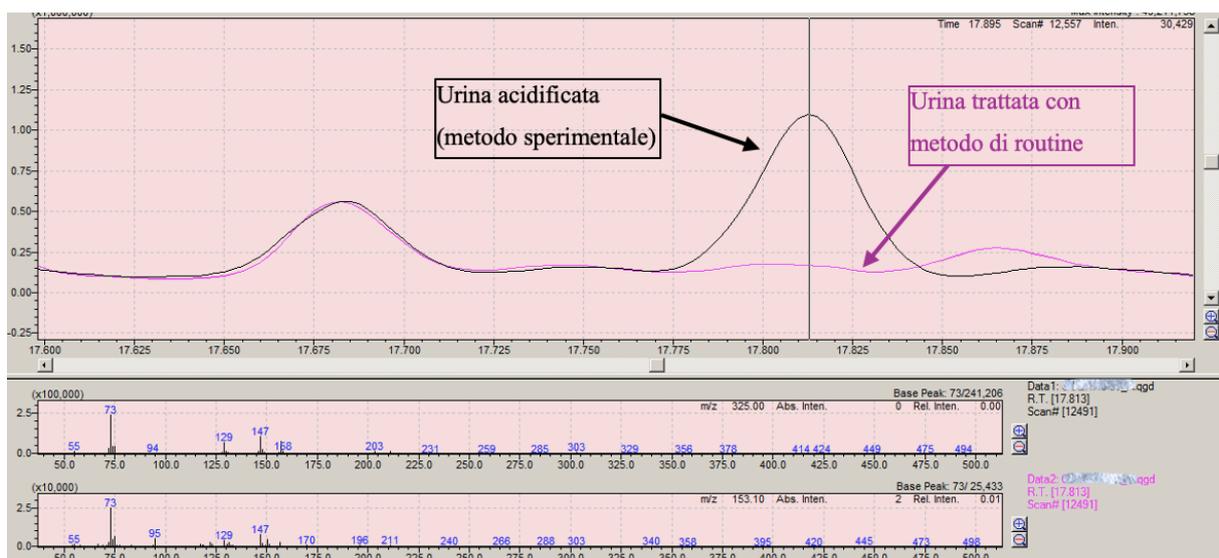


Figura 35 TIC che mostra l'acido isocitrico lattoneizzato nell'urina acidificata

In conclusione, quindi, l'esperimento in questo caso non ha rivelato una differenza significativa tra il campione trattato normalmente e lo stesso campione acidificato con il metodo sperimentale per quanto concerne la quantità di SA. Ciò potrebbe essere causato dal fatto che questo paziente non ha SAA nelle urine, tuttavia, era l'unica urina disponibile di un paziente affetto da tirosinemia di tipo 1.

Questa metodica potrebbe però risultare molto utile in pazienti come BD, per i quali il SA risulta essere assente.

La letteratura evidenzia come stia ampliandosi la ricerca di un biomarker più adeguato o da affiancare al SA per la diagnosi della Tirosinemia 1, al fine di evitare che i casi "mild type" risultino falsi negativi.

Ad oggi, non si è ancora arrivati ad una conclusione riconosciuta e definitiva.

4.2 Risultati casistica pazienti affetti da MCADD

Nella seguente tabella 9 sono riportati i casi di MCADD diagnosticati da quando è stato messo in vigore il Decreto Ministeriale per lo SNE.

Su DBS vengono quindi misurati per l'MCADD i livelli di acilcarnitine C6, C8, C10:1 e C10. Come si può notare dai casi riportati in tabella, l'acilcarnitina C8 risulta particolarmente alta in tutti i casi, mentre la C10:1 è alta solo in alcuni casi e la C10 aumenta nella maggiore parte dei casi. Il quadro $C8 > C6 > C10/C10:1$ è tipico della patologia.

Per quanto riguarda la conferma di questi sospetti di MCADD identificati attraverso lo SNE, per molti di essi è stata eseguita la conferma biochimica (acidi organici urinari su GC-MS) e/o la conferma enzimatica (attività enzimatica residua); per tutti i casi è stata eseguita una conferma di tipo genetico per la valutazione di mutazioni sul gene ACADM.

Per quanto riguarda l'attività enzimatica residua, questa è stata studiata solo per 7 dei 18 casi riportati in tabella, e, tra questi, risulta che i due gemelli (MA, MW) hanno un'attività enzimatica pari al 24%, percentuale nettamente maggiore rispetto agli altri casi per cui è stata studiata l'attività dell'enzima. In questi altri casi, si può osservare quindi un'attività enzimatica residua che varia dal 14% all'1%. I pazienti con un'attività enzimatica maggiore sono coloro che in teoria vivono bene nonostante la patologia perché hanno una buona parte di enzima funzionante al contrario, coloro che hanno un'attività dell'enzima molto ridotta, rischiano di manifestare episodi critici durante il corso della vita.

PZ	DATA DI NASCITA	SESSO	SNE [$\mu\text{mol/L}$]				CONFERMA BIOCHIMICA	CONFERMA ENZIMATICA	CONFERMA GENETICA
			C6 (0,02-0,11)	C8 (0,03-0,17)	C10 (0,03-0,24)	C10:1 (0,03-0,28)	ACIDI ORGANICI URINARI	ATTIVITÀ RESIDUA %	
FGA	02/05/19	M	0,17	0,32	0,21	0,13	SI	NO	patologico
CA	12/09/19	M	0,59	3,03	0,31	0,35	SI	4%	patologico
DC	22/09/19	F	0,42	2,69	0,2	0,27	SI	2%	patologico
JHX	28/11/19	F	0,25	0,43	0,56	0,22	SI	NO	eterozigote
TC	23/01/20	F	5,11	21,29	1,75	1	SI	1%	patologico
MZ	13/02/20	F	0,65	1,55	0,69	0,54	SI	14%	patologico
GI	19/03/20	F	0,47	2,61	0,23	0,18	SI	2%	patologico
FS	12/10/20	M	0,24	0,4	0,47	0,17	/	NO	eterozigote
DEK	02/11/20	F	0,16	0,3	0,32	0,09	/	NO	patologico
AA	03/09/21	F	0,16	0,29	0,25	0,11	SI	NO	patologico
RD	24/11/21	F	0,13	0,28	0,61	0,12	SI	NO	no varianti, falso positivo
MA	29/04/22	F	0,74	3	1,05	0,73	SI	24%	patologico
MW	29/04/22	M	0,57	1,39	0,64	0,33	SI	24%	patologico
LS	07/06/22	M	0,14	0,27	0,44	0,1	SI	NO	eterozigote
DL	26/09/22	F	1,4	13,8	1,2	0,74	/	NO	patologico
VE	30/12/22	F	1,55	13,6	1,13	0,53	/	NO	patologico
CED	07/12/23	M	0,23	0,72	0,85	0,27	/	NO	patologico
FN	10/10/23	F	0,44	1,46	0,51	0,16	SI	NO	patologico
CER	31/10/24	M	0,2	0,58	0,31	0,2	/	NO	/

Legenda : pz: pazienti; C6: esanoilcarnitina; C8: ottanoilcarnitina; C10: decanoilcarnitina; C10:1: decanoilcarnitina insatura;

Tabella 9 Pazienti affetti da MCADD

È bene sottolineare che l'analisi enzimatica è molto importante in quanto può dare un'idea delle manifestazioni cliniche che può eventualmente presentare un malato. A volte, infatti, capita che bambini malati siano asintomatici evitando semplicemente il digiuno prolungato e facendo una dieta adeguata, questo perché hanno una buona attività enzimatica e non effettuano nemmeno il follow-up, se non in casi particolari di malessere.

Per quanto riguarda la conferma genetica è stata eseguita per tutti i 18 casi riportati in tabella e da questa è emersa la presenza delle mutazioni del genere ACADM per tutti i pazienti a eccezione di 3 eterozigoti (sani) e un paziente che si è dimostrato a tutti gli effetti un falso positivo.

È interessante evidenziare il fatto che tra i casi riportati ci sono delle familiarità: due pazienti malati di MCADD sono tra loro cugini (DL e DC), altri due casi sono tra loro gemelli (MA, MW) e questi ultimi hanno anche la stessa % di attività enzimatica residua; infine, altri due casi di cui uno è stato diagnosticato di recente, sono tra loro fratelli (CED e CER). Questo evidenzia

l'importanza delle consulenze genetiche familiari quando uno dei figli risulta malato di MCADD, in quanto come vediamo la probabilità che un altro figlio nasca malato è evidente.

Il laboratorio di Screening Neonatale dell'Ospedale Regina Margherita utilizza in particolare un programma per la valutazione dei parametri analitici e integra i risultati di laboratorio per diagnosticare una particolare condizione clinica: CLIR (Collaborative Laboratory Integrated Reports). Lo scopo di CLIR è quello di migliorare la scoperta dei casi positivi e ridurre al minimo i casi falsi positivi e falsi negativi attraverso un'identificazione accurata delle malattie metaboliche ereditarie. Questo è possibile anche grazie al fatto che il programma tiene conto dei risultati di tutti i laboratori di Screening Neonatale del mondo e quindi ha delle statistiche molto accurate attraverso cui è possibile fare una diagnosi esatta.

In figura 36 è riportato un grafico a box plot che rappresenta le distribuzioni dei valori di vari biomarcatori in termini di Z-score, in questo caso di un paziente malato di MCADD.

L'asse verticale rappresenta lo Z-score e quindi la deviazione standard dei biomarcatori rispetto alla media. L'asse orizzontale riporta i diversi biomarcatori e le ratio analizzati. Ogni box-plot è tipico di un biomarcatore specifico. Ogni box rappresenta la popolazione di malati raccolta da CLIR e i punti neri a forma di diamante rappresentano il valore assunto dallo specifico parametro nel paziente. La fascia verde rappresenta il range di riferimento normale per ciascun biomarcatore. I box blu evidenziano invece i valori considerati informativi ossia significativi dal punto di vista clinico in quanto risultano essere al di fuori dal range di normalità verde. Tutti i box che invece si trovano perfettamente sulla linea verde di normalità rappresentano ciò che non è informativo. Come si può osservare e come riportato anche in tabella 9, la popolazione di malati può avere C10:1 normale e C10 normale.

Mediante questo grafico si può quindi notare il quadro clinico tipico di un neonato malato di MCADD individuato dallo SNE.

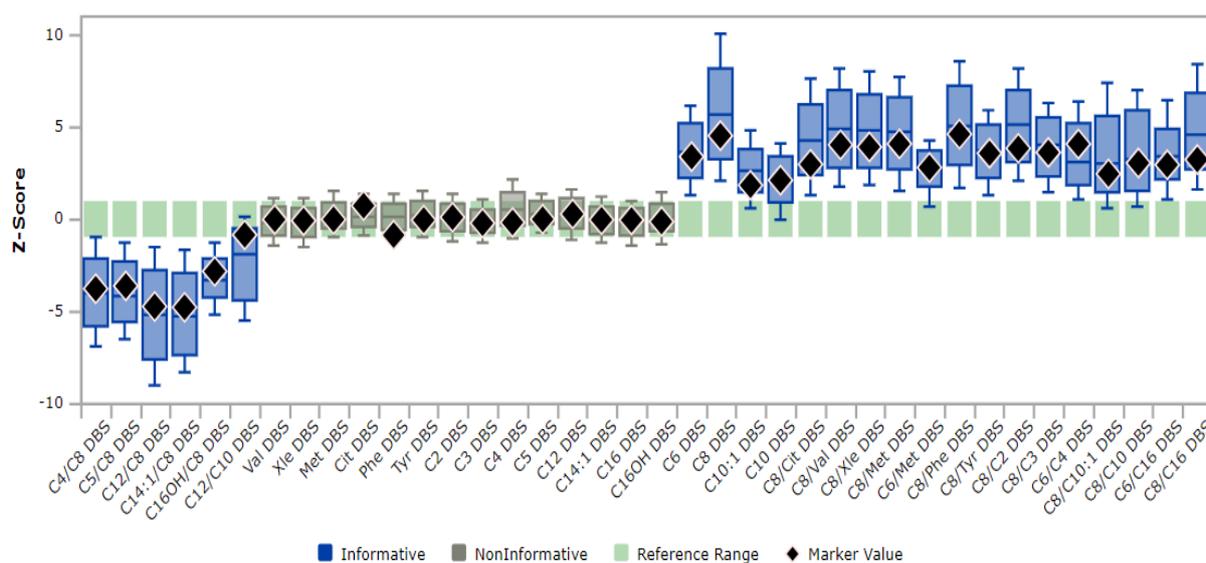


Figura 36 Paziente affetto da MCADD elaborazione CLIR

Pazienti	Data di nascita	ACIDI ORGANICI URINARI ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ crea)								
		Acido adipico	Acido suberico	Acido sebacico	Acido octenedioico	Acido decenedioico	Acido 5-OH esanoico	Acido 7-OH ottanoico	Esanoilglicina	Suberilglicina
valori di riferimento età <1mese		<21,5	<8,2	<4,1	<25,8	<7,5	<4,4	<0,8	<1,2	<5,4
CA	12/09/19	5,0	5,5	0,6	NORM	/	++	N.D	3,5	++
DC	22/09/19	4,7	4,3	2	NORM	/	++	N.D	7,8	++
TC	23/01/20	5,5	16	3,2	NORM	/	++	N.D	18,9	++
MZ	13/02/20	4,5	7,2	0,5	NORM	/	++	N.D	2,8	N.D
GI	19/03/20	12,3	12,4	13,7	NORM	/	++	N.D	1,8	++
AA	03/09/21	6,4	7,9	0,3	N.D	/	4,1	N.D	N.D	N.D
RD	24/11/21	14,3	7	1,9	4,1	++	1,5	N.D	N.D	N.D
MA	29/04/22	7,8	14,8	1,7	N.D	/	2,7	N.D	N.D	N.D
MW	29/04/22	5,6	7,2	1,4	2,3	/	N.D	N.D	1,5	0,26
LS	07/06/22	8,5	6,5	1,1	N.D	/	N.D	N.D	N.D	0,12
FN	10/10/23	12	15,1	1,5	N.D	/	4,2	N.D	8,4	2,09

Legenda: N.D= al di sotto dei limiti di sensibilità del metodo; NORM= concentrazione nei limiti della norma;

++= al di sopra dei limiti della norma; /= non rilevato

Tabella 10 Acidi organici urinari pazienti MCADD

Per quanto riguarda la conferma biochimica, la Legge prevede l'analisi delle acilcarnitine plasmatiche in cromatografia e degli acidi organici urinari in cromatografia sui casi sospetti, riportati in tabella 10. La conferma biochimica che viene effettuata attualmente per i sospetti di MCADD prevede l'analisi degli acidi organici urinari su GC-MS, tra cui si dosano i biomarcatori specifici: acido adipico (6 atomi di carbonio), suberico (8 atomi di carbonio), sebacico (10 atomi di carbonio), acido octenedioico, acido decendioico, acido 5-OH esanoico, acido 7-OH ottanoico, esanoilglicina e suberilglicina.

Durante il digiuno prolungato o lo sforzo fisico, quando le riserve di glucosio sono basse, il metabolismo del corpo umano si sposta sugli acidi grassi che subiscono quindi la β -ossidazione mitocondriale per produrre acetil-CoA che entra nel ciclo di Krebs per produrre energia. Tutto ciò risulta essere problematico in pazienti affetti da MCADD, in quanto gli acidi grassi a catena media non vengono metabolizzati e si accumulano dei precursori che devono essere eliminati.

Come si può notare dalla casistica riportata in tabella 10 non sempre la conferma biochimica degli acidi organici urinari è utile alla diagnosi della patologia, in molti casi si osservano concentrazioni normali di acidi organici e di acilglicine.

L'acido suberico risulta essere l'unico marker urinario elevato insieme alla esanoilglicina.

Mediante la conferma biochimica la maggior parte dei casi risultano normali, nonostante la patologia venga poi confermata tramite l'indagine genetica e/o enzimatica.

Alla luce di questi risultati si può dedurre che sarebbe molto più appropriato se, nella conferma biochimica, venisse eseguita l'analisi delle acilcarnitine a catena media (C6, C8, C10, C10:1) su plasma tramite cromatografia. Questo perché l'accumulo di esse è un segnale diretto del blocco metabolico degli acidi grassi a catena media, i quali, essendo in accumulo perché non vengono metabolizzati, saranno coniugati con la carnitina.

Secondo la Legge prevista in materia di SNE, come precedentemente riportato, la conferma biochimica per l'MCADD dovrebbe prevedere due diverse analisi: dosaggio delle acilcarnitine su plasma tramite la cromatografia e dosaggio di acidi organici urinari tramite la cromatografia, quindi in questo caso presso il laboratorio in cui ho elaborato questo lavoro di tesi viene effettuata la conferma solo tramite analisi di acidi organici urinari, e, come evidenziato, non si rileva utile a confermare la patologia. Al contrario, molto utile sarebbe il dosaggio delle

acilcarnitine plasmatiche C6, C8, C10. In assenza di questa possibilità viene però effettuata la conferma genetica ed in alcuni casi anche quella enzimatica.

L'MCADD, come anticipatamente descritto, impedisce all'organismo di utilizzare correttamente alcuni grassi come fonte di energia, soprattutto durante il digiuno prolungato o un particolare stress metabolico. L'assenza o insufficienza dell'enzima prodotto dal gene ACADM, che risulta essere mutato, provoca accumulo nel sangue di acidi grassi a catena media che sono tossici e che spiegano le manifestazioni severe della patologia, tra cui la morte improvvisa, specialmente nei bambini e nei neonati in quanto le riserve di glicogeno sono basse. Se il corpo di un bambino durante il digiuno non è in grado di generare energia dai grassi, l'organismo va in ipoglicemia grave a cui consegue una crisi metabolica severa che porta a questi fenomeni di morte improvvisa. Spesso i sintomi pre-mortem non sono così evidenti e la malattia veniva infatti identificata solo post-mortem. Con l'avvio dello SNE sono migliorate le possibilità di una diagnosi precoce, riducendo il rischio di morte improvvisa tra cui la sindrome della morte improvvisa del lattante (SIDS).

Secondo il portale Orphanet per le malattie rare, l'incidenza di MCADD che fa riferimento al 2023, va da 0,1 a 0,9: 10.000 nati vivi. Nella casistica di pazienti esaminati sono risultati positivi alla malattia 15 dei 18 casi sospetti per lo Screening Neonatale dal 2019 al 2023. I neonati screenati sono 136.791, dunque l'incidenza in questi cinque anni per le regioni Piemonte e Valle d'Aosta è di circa 1,1: 10.000 nati vivi, leggermente superiore a quella di Orphanet.

L'aspetto positivo di questo dato è che suggerisce una casistica di MCADD ben identificata, senza significativi rischi di sottostima. Ciò implica che in questo caso lo SNE risulti affidabile, per cui è improbabile la presenza di falsi negativi.

5.CONCLUSIONI

Il presente lavoro di tesi ha messo in evidenza l'importanza della diagnosi precoce e del monitoraggio costante dei pazienti affetti da malattie metaboliche rare come la Tirosinemia di tipo 1 e l'MCADD. I risultati ottenuti dalla raccolta dei dati diagnostici, che comprendono l'analisi dei cromatogrammi, delle cartelle cliniche e dei biomarcatori, hanno confermato l'efficacia delle tecniche di screening, soprattutto con l'introduzione dello SNE grazie al Decreto Ministeriale del 2016. Per quanto concerne la Tirosinemia di tipo 1, è stato possibile osservare l'efficacia del farmaco NTBC nel migliorare le condizioni cliniche, pur con alcuni casi particolari che necessitano quindi un monitoraggio molto accurato per prevenire complicanze a lungo termine. Lo studio approfondito del biomarcatore SA ha permesso di evidenziare la complessità dei meccanismi biochimici alla base delle aminoacidopatie. È stato evidenziato che esistono delle varianti genetiche per cui il biomarcatore dosato attraverso lo Screening Neonatale si rivela inaffidabile, portando al rischio di falsi negativi. Sarebbe utile approfondire in futuro la presenza di eventuali altre molecole derivanti dal catabolismo della tirosina, da utilizzare come marker, come il metabolita del SA o il suo precursore. Inoltre, la rivalutazione dei DBS ha mostrato come lo SNE avrebbe potuto individuare i pazienti affetti da Tirosinemia di tipo 1 anche prima dell'implementazione formale del programma.

Nel caso dell'MCADD, i risultati ottenuti dallo SNE hanno evidenziato un quadro tipico della patologia nei pazienti affetti, confermato dall'analisi genetica; per quanto concerne la conferma biochimica degli acidi organici urinari si è rivelata insufficiente. È emerso che, i pazienti con attività enzimatica residua elevata, presentano generalmente un decorso meno grave, mentre quelli con una bassa attività enzimatica necessitano più attenzione per evitare episodi critici. In entrambi i casi, il monitoraggio dei biomarcatori è fondamentale anche per ottimizzare i trattamenti, ridurre i rischi e migliorare la qualità di vita dei pazienti. L'analisi e l'interpretazione accurata dei dati diagnostici, unita alla terapia farmacologica o dietetica, sono indispensabili per la gestione a lungo termine di queste patologie.

Questo lavoro evidenzia, quindi, la necessità di un approccio integrato e multidisciplinare nella gestione delle malattie metaboliche rare, in modo da migliorare la prognosi e garantire un adeguato supporto ai pazienti.

Ulteriori ricerche potrebbero concentrarsi sul monitoraggio a lungo termine dei pazienti, per migliorare la diagnosi precoce e l'efficacia dei trattamenti nelle malattie metaboliche rare.

6. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

1. Sensibilità e specificità: influenza del valore di soglia o cut-off
<https://www.quadernodiepidemiologia.it/epi/screen/soglia.htm>
2. Portale delle Malattie Rare <https://www.malattierare.gov.it/screening>
3. Cos'è Lo Screening Neonatale – SIMMESN
<https://www.simmesn.it/it/societa/lo-screening-neonatale.html>
4. Jones, P. M., and Bennett, M. J. (2002) The changing face of newborn screening: diagnosis of inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta*. **324**, 121–128
5. Green, N. S., Dolan, S. M., and Murray, T. H. (2006) Newborn Screening: Complexities in Universal Genetic Testing. *Am J Public Health*. **96**, 1955–1959
6. SCREENING NEONATALE PER MALATTIE METABOLICHE EREDITARIE MEDIANTE SPETTROMETRIA DI MASSA2011.pdf
<https://flore.unifi.it/bitstream/2158/777138/1/SIMP%20carnitina%202011.pdf>
7. Villoria, J. G., Pajares, S., López, R. M., Marin, J. L., and Ribes, A. (2016) Neonatal Screening for Inherited Metabolic Diseases in 2016. *Semin Pediatr Neurol*. **23**, 257–272
8. Spiekerkoetter, U., Bick, D., Scott, R., Hopkins, H., Krones, T., Gross, E. S., and Bonham, J. R. (2023) Genomic newborn screening: Are we entering a new era of screening? *J Inherit Metab Dis*. **46**, 778–795
9. Wilson J.M.G and Jugner G. (1968) *Principles and Practice of Screening for Disease*
10. Andermann, A., Blancquaert, I., Beauchamp, S., and Déry, V. (2008) Revisiting Wilson and Jungner in the genomic age: a review of screening criteria over the past 40 years. *Bull World Health Organ*. **86**, 317–319
11. Gazzetta Ufficiale <https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/1992/02/17/092G0108/sg>
12. Redazione (2022) Screening neonatale, 25 associazioni chiedono l'aggiornamento del panel di patologie. *Osservatorio Screening*. <https://www.osservatorioscreening.it/screening-neonatale-25-associazioni-chiedono-laggiornamento-del-panel-di-patologie/>
13. SISMME-SISN Linee Guida per Screening Esteso e Conferma (2008)
14. A.O.U. Città della Salute e della Scienza di Torino - SCREENING PRENATALE E NEONATALE – SS

https://www.cittadellasalute.to.it/index.php?option=com_content&view=article&id=19386%3Ascreening-prenatale-e-neonatale-ss&catid=141&Itemid=442

15. Negri, F. D., and Salari, P. C. (2022) pathways metabolici convergenti per l'impiego nel paziente acuto e subacuto. *Aminoacidi essenziali e glutamina* https://www.pacinimedicina.it/wp-content/uploads/51030_QMC_Errekappa_aminoacidi.pdf
16. 4,6-Dioxoheptanoic acid | C7H10O4 | CID 5312 - PubChem <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5312>
17. Indiveri, C., Iacobazzi, V., Tonazzi, A., Giangregorio, N., Infantino, V., Convertini, P., Console, L., and Palmieri, F. (2011) The mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier: function, structure and physiopathology. *Mol Aspects Med.* **32**, 223–233
18. David L. Nelson and Michael M. Cox (2014) *I principi di biochimica di Lehninger*, sesta, Zanichelli Editore
19. Das, A. M. (2017) Clinical utility of nitisinone for the treatment of hereditary tyrosinemia type-1 (HT-1). *Appl Clin Genet.* **10**, 43–48
20. Cassiman, D., Zeevaert, R., Holme, E., Kvittingen, E.-A., and Jaeken, J. (2009) A novel mutation causing mild, atypical fumarylacetoacetase deficiency (Tyrosinemia type I): a case report. *Orphanet J Rare Dis.* **4**, 28
21. Qureshi, Dr. H. K., Fatima, N., Fatima, S., Fatima Banu, S. S., Nadeem Uddin, M., and Noorain, S. H. (2024) Stability indicating method development and validation of nitisinone in pure form in marketed pharmaceutical dosage form by using RP-HPLC. *IJMRGE.* **5**, 199–205
22. Adigun, O. O., Yarrarapu, S. N. S., Zubair, M., and Khetarpal, S. (2024) Alpha-Fetoprotein Analysis. in *StatPearls*, StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430750/>
23. Loughrey, C., and Bennett, M. J. (2009) Screening for MCAD deficiency in newborns. *BMJ.* **338**, b971
24. Chang. I. J., Lam, C., Vockley, J. (2000) Medium-Chain Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency
25. Van Hove, J. L., Zhang, W., Kahler, S. G., Roe, C. R., Chen, Y. T., Terada, N., Chace, D. H., Iafolla, A. K., Ding, J. H., and Millington, D. S. (1993) Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency: diagnosis by acylcarnitine analysis in blood. *Am J Hum Genet.* **52**, 958–966

26. Mason, E., Hindmarch, C. C. T., and Dunham-Snary, K. J. (2022) Medium-chain Acyl-CoA dehydrogenase deficiency: Pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Endocrinol Diabetes Metab.* **6**, e385
27. Yamada, K., and Taketani, T. (2019) Management and diagnosis of mitochondrial fatty acid oxidation disorders: focus on very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Hum Genet.* **64**, 73–85
28. Huidekoper, H. H., Schneider, J., Westphal, T., Vaz, F. M., Duran, M., and Wijburg, F. A. (2006) Prolonged moderate-intensity exercise without and with L-carnitine supplementation in patients with MCAD deficiency. *Journal of Inherited Metabolic Disease.* **29**, 631–636
29. Longo, N., Diaz, G. A., Lichter-Konecki, U., Schulze, A., Inbar-Feigenberg, M., Conway, R. L., Bannick, A. A., McCandless, S. E., Zori, R., Hainline, B., Ah Mew, N., Canavan, C., Vescio, T., Kok, T., Porter, M. H., and Berry, S. A. (2021) Glycerol phenylbutyrate efficacy and safety from an open label study in pediatric patients under 2 months of age with urea cycle disorders. *Molecular Genetics and Metabolism.* **132**, 19–26
30. Keeler, A. M., and Flotte, T. R. (2012) Cell and Gene Therapy for Genetic Diseases: Inherited Disorders Affecting the Lung and Those Mimicking Sudden Infant Death Syndrome. *Hum Gene Ther.* **23**, 548–556
31. Chinsky, J. M., Singh, R., Ficicioglu, C., Van Karnebeek, C. D. M., Grompe, M., Mitchell, G., Waisbren, S. E., Gucsavas-Calikoglu, M., Wasserstein, M. P., Coakley, K., and Scott, C. R. (2017) Diagnosis and treatment of tyrosinemia type I: a US and Canadian consensus group review and recommendations. *Genetics in Medicine.* **19**, 1380–1395
32. Christensen, E., Jacobsen, B. B., Gregersen, N., Hjeds, H., Pedersen, J. B., Brandt, N. J., and Baekmark, U. B. (1981) Urinary excretion of succinylacetone and -aminolevulinic acid in patients with hereditary tyrosinemia. *Clinica Chimica Acta.* **116**, 331–341
33. Lindblad, B., and Steen, G. (1982) Identification of 4,6-dioxoheptanoic acid (succinylacetone), 3,5-dioxooctanedioic acid (succinylacetoacetate) and 4-oxo-6-hydroxyheptanoic acid in the urine from patients with hereditary tyrosinemia. *Biol. Mass Spectrom.* **9**, 419–424
34. Tuchman, M., Whitley, C. B., Ramnaraine, M. L., Bowers, L. D., Fregien, K. D., and Krivit, W. (1984) Determination of Urinary Succinylacetone by Capillary Gas Chromatography. *Journal of Chromatographic Science.* **22**, 211–215
35. Schierbeek, H., and Berger, R. (1989) Determination of succinylacetone and succinylacetoacetate in physiological samples as the common product 5(3)-methyl-3(5)-

isoxazole propionic acid using an isotope dilution method and mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*. **184**, 243–250

36. Mori, J., Furukawa, T., Kodo, K., Nakajima, H., Yuasa, M., Kubota, M., and Shigematsu, Y. (2023) A patient with urinary succinylacetone-negative hereditary tyrosinemia type 1. *Pediatrics International*. **65**, e15644

37. Cassiman, D., Zeevaert, R., Holme, E., Kvittingen, E.-A., and Jaeken, J. (2009) A novel mutation causing mild, atypical fumarylacetoacetase deficiency (Tyrosinemia type I): a case report. *Orphanet J Rare Dis*. **4**, 28

38. Blackburn, P. R., Hickey, R. D., Nace, R. A., Giama, N. H., Kraft, D. L., Bordner, A. J., Chaiteerakij, R., McCormick, J. B., Radulovic, M., Graham, R. P., Torbenson, M. S., Tortorelli, S., Scott, C. R., Lindor, N. M., Milliner, D. S., Oglesbee, D., Al-Qabandi, W., Grompe, M., Gavrillov, D. K., El-Youssef, M., Clark, K. J., Atwal, P. S., Roberts, L. R., Klee, E. W., and Ekker, S. C. (2016) Silent Tyrosinemia Type I Without Elevated Tyrosine or Succinylacetone Associated with Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma. *Human Mutation*. **37**, 1097–1105

RINGRAZIAMENTI

In primo luogo, vorrei ringraziare la Prof.ssa Erika Del Grosso, per la sua disponibilità ed i suoi preziosi consigli che mi hanno accompagnata in tutte le fasi della stesura di questa tesi. Il suo supporto è stato di fondamentale importanza per affrontare questo lavoro.

Un ringraziamento speciale va alla Dott.ssa Maria Paola Puccinelli, che mi ha accolta con grande professionalità nel laboratorio di Biochimica Clinica dell'Ospedale Molinette di Torino. Grazie per essere stata sempre disponibile, per avermi fatto da guida e per avermi supportata in ogni momento.

Desidero ringraziare il team della Farmacia Subalpina di Torino dove ho svolto il periodo di tirocinio professionale, grazie per avermi accolta e avermi fatta sentire parte di voi, avete reso il mio periodo di tirocinio speciale. Grazie di cuore, vi voglio bene.

Grazie a tutti i miei compagni di università, che hanno reso il mio percorso meno faticoso e più ricco. Grazie alle mie colleghe e amiche Giorgia e Ilaria, con cui ho condiviso momenti di disperazione e di ansia prima degli esami, ma anche tanta complicità. Grazie per esserci state e per aver reso questo percorso più leggero, sostenendoci a vicenda. Porterò sempre con me il ricordo del nostro cammino condiviso. Grazie ad Alessandro, per i consigli, per aver ascoltato i miei audio infiniti e per avermi supportata sempre. Grazie a Federico, per esserci stato nei momenti difficili, per aver creduto in me quando ne avevo maggiormente bisogno. Sei stato una presenza fondamentale in questo mio percorso, con cui ho condiviso lo studio, ma anche il cammino di crescita che questo periodo universitario mi ha permesso di fare.

Grazie di cuore a tutte le persone che mi sono state vicine in questo percorso, ognuna in modo unico e speciale. In particolare, desidero ringraziare la mia amica Francesca, con la quale sono cresciuta. La tua amicizia e il tuo supporto hanno reso questo percorso ancora più significativo, grazie di tutto, ti voglio bene. Un ringraziamento speciale va a Matilde, i tuoi consigli, la tua capacità di ascoltarmi e il tuo sostegno incondizionato mi hanno accompagnata sempre, rendendo ogni difficoltà più semplice da affrontare. Sono immensamente grata di averti conosciuta, ti voglio bene. Grazie di cuore a Paola, per essermi stata accanto in ogni momento della mia crescita, dalla Sicilia fino a Torino, sempre insieme. Grazie per avermi ascoltata, sostenuta ed incoraggiata nei momenti più difficili, ti voglio bene.

Grazie a Margherita, la mia cuginetta del cuore (ma non lo diremo a nessuno). Sei quella persona a cui posso dire tutto, senza filtri. Siamo cresciute insieme, complici sin da piccole, quando rubavamo i fiori della nonna per fare le "pozioni". Oggi quel legame così forte ci unisce ancora. La tua presenza nella

mia vita è un dono prezioso, e sono immensamente grata di averti al mio fianco, ti voglio bene, più di quanto le parole possano esprimere.

Un grazie di cuore ai miei genitori, il mio punto di riferimento più grande. Senza il vostro amore, sostegno e fiducia, non avrei mai raggiunto questo traguardo. Ogni sacrificio ed ogni gesto di affetto è stato fondamentale per me. Grazie mamma sei il mio porto sicuro e la mia forza più grande. Non sarei mai arrivata fin qui senza di te e non ci sono abbastanza parole per dirti quanto tu sia importante per me. Grazie a papà per avermi sempre incoraggiata e per essere sempre stato un pilastro portante su cui posso contare. Porterò sempre con me il vostro supporto in ogni passo che farò, vi voglio un bene immenso.

Grazie di cuore a Grazia, mia sorella maggiore e la mia guida in tutte le fasi della mia vita. Sei stata un punto di riferimento fondamentale, con il tuo affetto e i tuoi consigli mi hai accompagnata in ogni momento importante della mia vita e anche in questo percorso, rendendolo meno difficile e più significativo, ti voglio immensamente bene.

Grazie alla mia sorellina Roberta, che con la sua dolcezza e la sua energia riesce sempre a strapparmi un sorriso. Grazie come dici tu per “avermi fatta ripetere” prima degli esami e per essermi stata vicina. Ti voglio bene.

Un ringraziamento speciale va al mio cuoricino a quattro zampe Olaf. Con il tuo affetto incondizionato e i tuoi sguardi pieni d’amore, sei riuscito a darmi conforto quando ne avevo bisogno. Con il tuo entusiasmo mattutino, mi svegliavi ogni giorno, costringendomi a iniziare presto la giornata e studiare con più concentrazione. Le nostre passeggiate sono sempre state preziose per mettere in ordine i miei pensieri e passare del tempo con il mio compagno di vita più fedele. Grazie per l’amore che mi dai ogni giorno, ti voglio bene e te ne vorrò per sempre.

Grazie a zia Mela, per essermi stata accanto dalla mia più tenera età e per avermi accompagnata in ogni momento della mia vita. Sei importante e sei per me punto di riferimento essenziale. Ti voglio tanto bene.

Infine, ringrazio i miei nonni, che non sono più con me. Grazie per tutto quello che mi avete insegnato e per tutto l’amore che mi avete dato. Ogni ricordo con voi è un tesoro che porterò sempre dentro di me. Questo traguardo è anche per voi, che mi siete stati accanto sempre. Resterete per sempre una parte fondamentale della mia vita.

Grazie di cuore a tutti.