UNIVERSITÀ di VERONA
Dipartimento di SCIENZE CHIRURGICHE ODONTOSTOMATOLOGICHE E MATERNO-INFANTILI

# ASSEGNO DI RICERCA

***""Screening neonatale allargato per le malattie metaboliche ereditarie. Valutazione dei casi diagnosticati. Ruolo della tipizzazione genetica nella conferma diagnostica e nella correlazione genotipo-fenotipo"."***

***Dott.ssa Giulia Rodella***

*Attività di ricerca dal 01/05/2018 al 30/04/2019*

## INTRODUZIONE

### Le Malattie Metaboliche Ereditarie (MME)

Le Malattie Metaboliche Ereditarie (MME) comprendono un gruppo fenotipicamente e geneticamente eterogeneo di disturbi causati da un enzima difettoso, cofattore o trasportatore in una via metabolica, che porta a malfunzionamento metabolico e / o accumulo di metaboliti intermedi tossici. Questo gruppo di disturbi comprende disordini degli aminoacidici, difetti del ciclo dell'urea, acidemie organiche, difetti dell'ossidazione degli acidi grassi, disordini mitocondriali, disordini del metabolismo dei carboidrati, disordini perossisomali, disturbi del metabolismo delle purine e della pirimidine, disordini neurotrasmettitori, disturbi del trasporto e dei minerali, mucopolisaccaridosi, mucolipidosi, colesterolo e disturbi del metabolismo dei lipidi neurali, disturbi della memoria lipidica, disturbi lisosomiali e altri difetti vari. Le MME possono presentarsi a qualsiasi età, dallo stadio fetale all'età avanzata. Può influenzare qualsiasi tipo di cellula o organo o può verificarsi in combinazioni. Le presentazioni cliniche sono proteiforme e spesso non specifiche. Le MME sono singolarmente rare, ma sono comuni come gruppo. Molte di queste sono suscettibili di un intervento dietetico e rispondono all'integrazione di metaboliti carenti, alla prevenzione dello stress metabolico e alla rimozione di metaboliti tossici. Inoltre, le MME non trattate possono essere altamente dannose, con conseguenti gravi disabilità e decessi.

### Lo Screening Neonatale Esteso (SNE) delle MME mediante spettrometria di massa tandem

Nell'ultimo decennio, grazie all'avvento della spettrometria di massa tandem, lo Screening Neonatale Esteso (SNE) è diventato una strategia obbligatoria di salute pubblica in molti paesi. La tecnologia consente la rilevazione simultanea ed economica di oltre 40 diversi disordini metabolici in un singolo campione di sangue su cartoncino lasciato essicare "dried blood spot" (DBS) con costi contenuti, con una precisione analitica elevata. Gli effetti negativi dei risultati falsamente positivi sono da non trascurare ma possono essere contenuti grazie all'aumento e al miglioramento della precisione del risultato, un buon grado di comunicazione ed un buon supporto psicologico.

### La Next Generation Sequencing (NGS) e lo SNE

L'avvento delle tecnologie molecolari (NGS) ha reso l'approccio genomico tecnicamente fattibile. La possibilità di eseguire programmi di SNE usando un approccio genomico è stato oggetto di discussione dal 2006. Alcuni autori hanno ipotizzato che il sequenziamento dell'intero genoma poteva essere utilizzato come servizio di routine nei programmi di SNE. È probabile che il costo di condurre SNE usando un approccio genomico diventerà più ragionevole, e questo metodo potrebbe coprire molti più disturbi che attualmente non possono essere identificati con le tecnologie odierne. Insieme alle informazioni farmacogenetiche, ciò rappresenterebbe una nuova fase nell'era della medicina personalizzata. In teoria, potrebbe anche minimizzare i falsi negativi causati dalla compensazione fisiologica, e quando non richiede un particolare tempo di campionamento, i risultati, e quindi il trattamento, possono essere dati in precedenza. Tuttavia, numerosi problemi etici e tecnici devono ancora essere risolti, molti dei quali hanno generato un dibattito. Le principali questioni riguardano la decisione delle condizioni da segnalare, le relative soglie di segnalazione, i carichi psicosociali causati dalle condizioni di segnalazione con implicazioni cliniche incerte e la conservazione, la protezione e l'utilizzo della grande quantità di informazioni genetiche generate. Altre preoccupazioni riguardano la potenziale violazione dell'autonomia dell'individuo testato se

vengono scoperti anche alcuni disordini a insorgenza tardiva. Tecnicamente, ci sono anche difficoltà inerenti all'interpretazione di varianti non classificate, la necessità di analisi e interpretazione veloci, l'importanza di prestazioni analitiche accettabili e la quantità limitata di DNA disponibile dai neonati.

**Esperienza del Centro Regionale per lo Screening, la Diagnosi e la Terapia delle Malattie Metaboliche Congenite ed Endocrinologiche.**

Secondo la legge del 19 agosto 2016 n. 169 e DGR 1308/13, lo screening metabolico allargato nel Centro Regionale per lo Screening, la Diagnosi e la Terapia delle Malattie Metaboliche Congenite ed Endocrinologiche indaga un pannello di 45 malattie metaboliche ereditarie, in particolare:

**Malattie Metaboliche Ereditarie oggetto di Screening Neonatale Allargato**

1. Malattie Metabolismo Aminoacidi

1. Fenilchetonuria/Iperfenilalainemia (PKU/H-PHE)
2. Malattia delle Urine a Sciroppo d'Acero (MSUD)
3. Tirosinemia tipo 1 e II (TYR 1 e 2)
4. Citrullinemia (CIT I e II)
5. Argininemia (ARG)
6. Acidemia Argininsuccinica (ASA)
7. Omocistinuria (CBS)
8. Omocistinuria (MTHFR severo)

2. Malattie del Metabolismo degli Acidi Organici

- Deficit beta-chetotiolasi (BKT)
- Acidemia 3-idrossi-3 metil glutarica (HMG)
- Deficit di 2-Metilbutirril-CoA deidrogenasi (2MBG)
- Aciduria Malonica (MAL)
- Acidemia Glutarica tipo I (GA 1)
- Acidemia Isovalerica (IVA)
- Acidemia Propionica (PA)
- Acidemia Metilmalaonica (MMA)
- Deficit di Cobalamina (A,B,C,D)
- Deficit di 3-idrossi-3 Metilglutaril CoA liasi (HMG)
- Deficit di 3 metil Crotonil CoA carbossilasi (3MCC)

3. Malattie del Metabolismo degli acidi grassi

- Deficit Trasportatore Carnitina (CUD)
- Deficit Carnitina Palmitoil Transferasi I (CPTI)

- Deficit Carnitina Palmitoil Transferasi II (CPT II)
- Deficit Carnitina-Acilcarnitina Traslocasi (CACT)
- Deficit dell'acil CoA deidrogenasi a Catena Media (MCAD)
- Deficit dell'acil CoA a Catena Lunga (VLCAD)
- Deficit dell'idrossi acil CoA a Catena Lunga (LCHAD)
- Deficit Multiplo di Acil CoA Deidrogenasi (GA II)
- Deficit di 3 Idrossi-Acil-CoA deidrogenasi a catena media/corta (M/SHAD)
- Deficit di Proteina Trifunzionale Mitocondriale

4. Galattosemia

5. Difetto di Biotinidasi

Malattie metaboliche ereditarie che potrebbero essere identificate perché in diagnosi differenziale con le patologie indicate nel pannello principale, ma che non sono obiettivo primario dello screening

- ✓ Tirosinemia tipo III Il marcatore, la tirosina alta, è lo stesso della tirosinemia tipo I e II
- ✓ Deficit di glicina N Metiltransferasi (GNMT) Il marcatore, la metionina, è lo stesso della omocistinuria
- ✓ Deficit di Metionina Adenosil transferasi (MAT) Il marcatore, la metionina, è lo stesso della omocistinuria
- ✓ Deficit di S Adenosilomocisteina idrolasi (SAHH) il marcatore, la metionina, è lo stesso della omocistinuria
- ✓ Deficit di 3 Metil crotonil Co A Carbossilasi (3-MCC) rientra nel nostro pannello principale, marcatore C5OH
- ✓ Deficit di 2 Metil 3 idrossibutirril CoA deidrogenasi (2M3HBA) il marcatore C5OH è lo stesso del deficit multiplo di carbossilasi (3MCC)
- ✓ Deficit di Isobutirril CoA Deidrogenasi (IBG) il marcatore C4 è lo stesso della GAII
- ✓ Deficit di Acil CoA a catena corta (SCAD) il marcatore C4 è lo stesso della GAII

UNIVERSITÀ di VERONA
Dipartimento di SCIENZE CHIRURGICHE ODONTOSTOMATOLOGICHE E MATERNO-INFANTILI

**RELAZIONE**

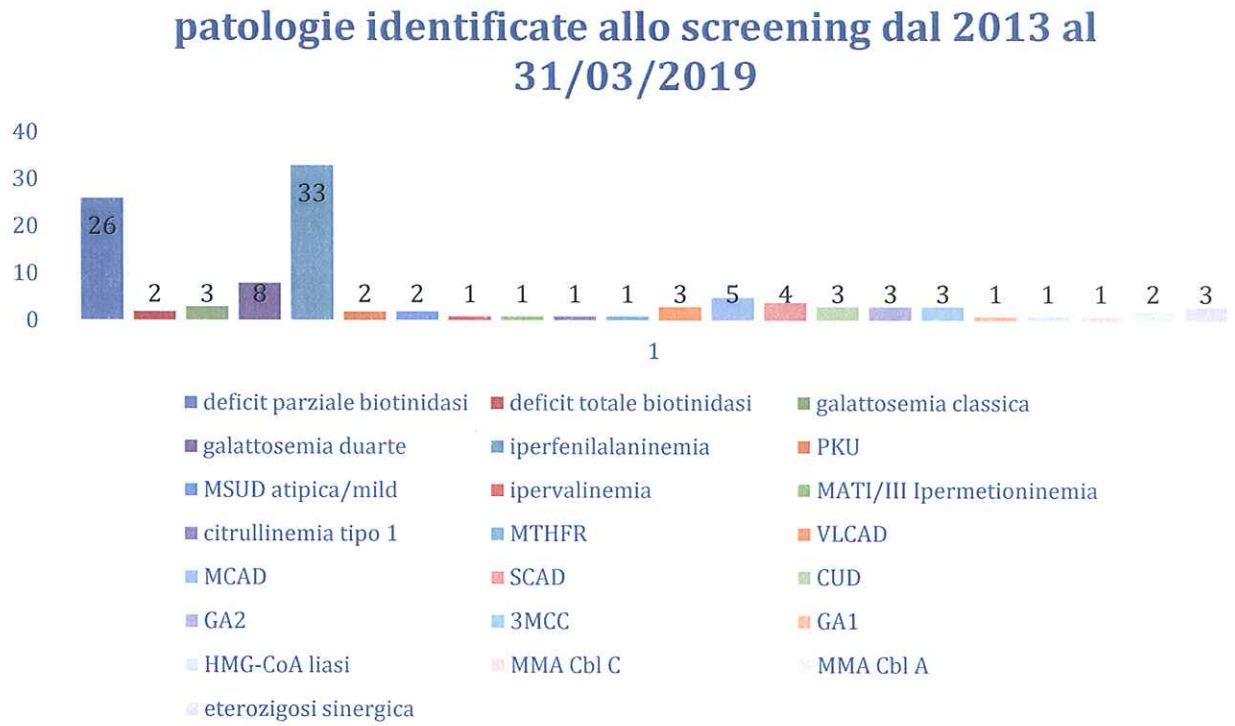
Nel periodo dal 01/2018 al 31/03/2019 sono stati diagnosticati tramite screening le seguenti MME:

| risultati screening | 2018 | 2019 | totale |
|---|---|---|---|
| deficit parziale biotinidasi | 10 | 1 | 11 |
| galattosemia classica | 2 | 0 | 2 |
| galattosemia duarte | 3 | 0 | 3 |
| iperfenilalaninemia | 6 | 3 | 9 |
| PKU | 0 | 0 | 0 |
| MSUD atipica/mild | 0 | 1 | 1 |
| VLCAD/LCHAD | 1 | 0 | 1 |
| SCAD | 1 | 0 | 1 |
| CUD | 2 | 0 | 2 |
| GA2 | 1 | 0 | 1 |

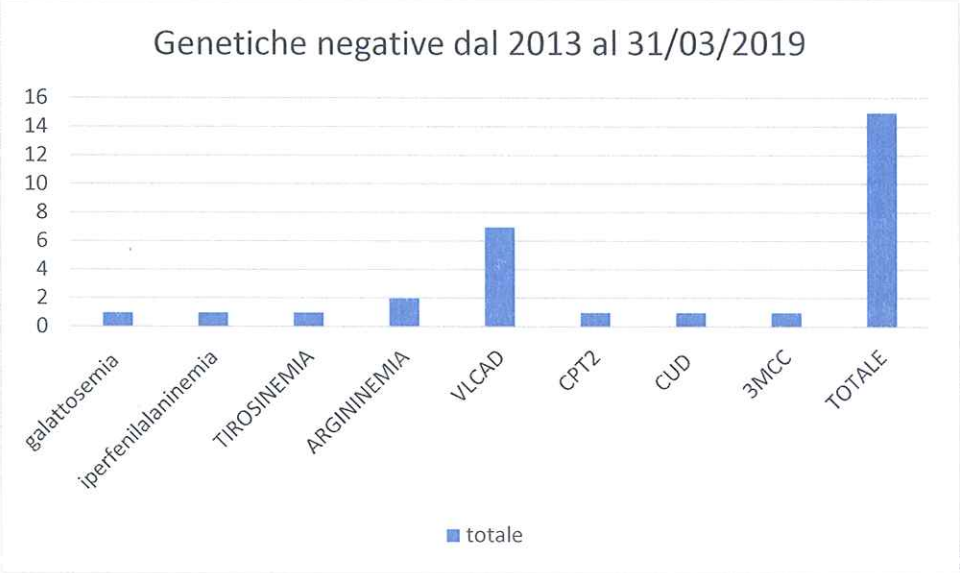
Non sono stati presi in considerazione i pazienti affetti da deficit di carnitina del prematuro e deficit di B12 materno perché non sono patologie metaboliche ereditarie e all'interno del percorso di conferma diagnostica
non è stato necessario eseguire l'analisi molecolare.
Il sospetto diagnostico di tali difetti è stato confermato mediante riverifica del dosaggio della carnitina libera dopo supplementazione con 100 mg/kg/die di carnitina nel caso del deficit di carnitina del prematuro e dosaggio della vitamina B12, omocisteina plasmatica e acido metilmalonico su DBS al richiamo e dopo 15 giorni dalla somministrazione intramuscolo di 1 mg di Neocytamen nel caso dei difetti di B12 materno.

| risultati genetiche screening | 2018 | 2019 | totale |
|---|---|---|---|
| in corso | 13 | 4 | 17 |
| eterozigoti | 9 | 0 | 9 |
| genetica negativa | 5 | 0 | 5 |
| presa in carico a Padova | 5 | 0 | 5 |
| deficit parziale biotinidasi | 5 | 0 | 5 |
| deficit totale biotinidasi | 0 | 0 | 0 |
| galattosemia | 1 | 0 | 1 |
| Duarte | 2 | 0 | 2 |
| iperfenilalaninemia | 2 | 0 | 2 |
| SCAD | 1 | 0 | 1 |
| MMA Cbl C | 1 | 0 | 1 |
| MMA Cbl A | 1 | 0 | 1 |
| eterozigosi sinergica | 1 | 0 | 1 |

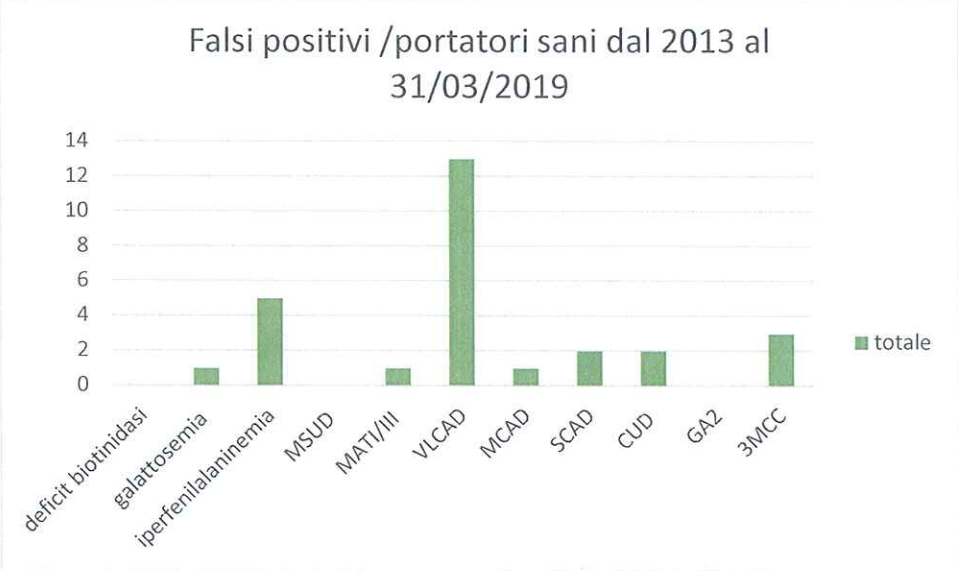
Analizzando i dati dei pazienti diagnosticati mediante screening neonatale e che hanno eseguito anche analisi molecolare, emerge che l'utilizzo dell'analisi genetica ha permesso di identificare 9 portatori sani e 5 falsi positivi aiutando a chiarire il significato del dato biochimico e permettendo di differenziare tra i neonati effettivamente affetti, i falsi positivi e coloro i quali sono portatori sani della patologia. Nel caso di MME come la galattosemia l'utilizzo dell'analisi genetica ha permesso di identificare con precisione i pazienti positivi allo screening perché portatori di variante Duarte che correla con un fenotipo più lieve e un'attività enzimatica intorno al 50% e che non necessitato di terapia dietetica. L'analisi molecolare è stata utile anche nel caso del paziente con mutazioni sinergiche dei geni VLCAD e LCHAD perché tale risultato ha permesso di eseguire approfondimenti (visita oculistica e cardiologica) mirati ad escludere che si trattasse di una forma grave e potendo rassicurare i genitori consigliando interventi solo in casi di emergenza nei periodi di stress quali febbre e gastroenteriti.
In tutti i pazienti in cui l'analisi genetica è stata completata e ha permesso di evidenziare 2 mutazioni è stata avviata la ricerca nei genitori al fine di confermare la fase allelica e poter offrire un counseling genetico per la valutazione del rischio di ricorrenza.




Analizzando i dati dei pazienti nei quali è stato confermata la presenza di una malattia metabolica ereditaria e sono stati presi in carico presso l'ambulatorio di Malattie Metaboliche Ereditarie di Verona da novembre 2013 a marzo 2019 emerge che le patologie identificate con maggior frequenza sono i deficit parziali di biotinidasi e le iperfenilalaninemie.




Se invece analizziamo i dati delle analisi genetiche eseguite all'interno del percorso di screening neonatale emerge che: la patologia con il più alto numero di falsi positivi e nella quale il risultato molecolare è stato l'assenza di mutazioni o lo stato di portatore sano è il deficit di Acil-CoA deidrogenasi a catena lunga (VLCAD).




Questo dato è spiegabile dal fatto che, come descritto anche dai dati di letteratura, nei neonati richiamati allo screening per sospetto VLCAD la normalità del dosaggio delle acilcarnitine su plasma eseguito a 3 ore di digiuno come unico fattore di stress metabolico da sola non è sufficiente a escludere la presenza della patologia ma è necessaria la diagnosi molecolare.

| ID | mutazione1 | mutazione2 | PATOLOGIA | screening neonatale galattosio | attività enzimatica GALT |
|---|---|---|---|---|---|
| 8 | p.Lys285Asn c.855G>T | p.Lys285Asn c.855G>T | GALATTOSEMIA CLASSICA | I DBS galattosio 37.71 - 40.4 - 41.6 mg/dL<br>II DBS galattosio >50 mg/dl | I DBS GALT 0 U/dl;<br>II DBS GALT 0 U/dl;<br>III DBS GALT 0.2 U/dL<br>IV DBS GALT 1.5-1.6 U/dL |
| 25 | in corso | | Galattosemia Duarte | I DBS galattosio 13-12 mg/dl;<br>II DBS galattosio 18,2-14,8 mg/dl | I DBS: 3.2-4.6 U/Dl,<br>II DBS: 3.3-3.1 U/Dl,<br>III DBS: 4.5-4.3 U/dL |
| 34 | Variante Duarte (D2) c.940A>G p.Asn314Asp | Variante Duarte (D2) c.940A>G p.Asn314Asp | Galattosemia Duarte | I DBS galattosio 9.5 mg/dl (ripetuto perché campione nonn idoneo);<br>II DBS galattosio 13,4-15,1-17,6 mg/dl;<br>III DBS galattosio 23-21,9 mg/dl | I DBS GALT 7,4-6,7 U/dl;<br>II DBS GALT 7,3-7,2 U/dl |
| 52 | Variante Duarte (D2) c.940A>G p.Asn314Asp | c.563A>G p.Gln188Arg | Galattosemia Duarte | I DBS galattosio totale 13-17-19 mg/dl;<br>II DBS galattosio totale 18,9-21,7 mg/dl;<br>III DBS galattosio totale 0,6 mg/dl (in dieta);<br>IV DBS galattosio totale 1,2 mg/dl; | I DBS GALT 3,0 e <2,5 U/dl;<br>II DBS GALT <2,5 U/dl;<br>III DBS GALT 4,9 U/dl |
| 65 | c.563A>G; p.Gln188Arg, | c.584T>C; p.Leu195Pro, | GALATTOSEMIA CLASSICA | I DBS galattosio 35 - 37 - 36 mg/dl;<br>II DBS galattosio >50 mg/dl | I DBS GALT: attività indosabile (inferiore al primo punto della curva di calibrazione;<br>II DBS e III DBS 0.9-0.9 U/dL |
| 128 | Presa in carico presso altro centro | | GALATTOSEMIA CLASSICA | Galattosio 63.3 - 62.4- 68.5 mg/dL. | GALT indosabile |
| 253 | Variante Duarte (D2) c.940A>G p.Asn314Asp | Variante Duarte (D2) c.940A>G p.Asn314Asp | Galattosemia Duarte | I DBS galattosio 11,2-9,6-10 mg/dl;<br>II DBS galattosio 14-13,4 mg/dl;<br>III DBS galattosio 3,9 mg/dl | I DBS GALT 6,6-6,0 U/dl;<br>II DBS GALT 8,3-8,3 U/dl |
| 158 | Variante Duarte (D2) c.940A>G p.Asn314Asp. | c.855G>T; p.Lys285Asn | Galattosemia Duarte | I DBS Galattosio 20.0 - 25.5 - 22.3 mg/Dl; II DBS galattosio 25,5-25,7 mg/dl; III DBS galattosio 17 mg/dl; IV DBS galattosio 5 mg/dl | I DBS GALT: <2.5 U/dL<br>II DBS GALT <2.5 U/dL<br>III DBS GALT <2.5 U/dL, ripetuta 2.6 U/Dl;<br>IV DBS GALT: 1.5 - 1.7 U/dL |
| 254 | Variante Duarte (D2) c.940A>G p.Asn314Asp | c.563A>G p.Gln188Arg | Galattosemia Duarte | I DBS galattosio 17,7-15,3-18,1 mg/Dl;<br>II DBS galattosio 16,2-13,9 mg/dl;<br>III DBS galattosio 11,9-12,3 mg/dl;<br>IV DBS galattosio 9 mg/dl | I DBS GALT: 1,9-2,0 U/dL<br>II DBS GALT 1,9-2,0 U/dL |
| 219 | Variante Duarte (D2) c.940A>G p.Asn314Asp | Variante Duarte (D2) c.940A>G p.Asn314Asp | Galattosemia Duarte | I DBS galattosio 16.4 - 17.5 - 18.5 mg/dl;<br>II DBS galattosio 13,5-15,3 mg/dl;<br>III DBS galattosio 9,1 mg/dl | I DBS GALT 4.4 U/Dl;<br>II DBS GALT <2,5-<2,5 U/Dl;<br>III DBS GALT 3,3-3,7 U/Dl |
| 255 | c.855G>T; p.Lys285Asn | Variante Duarte (D2) c.940A>G (p.Asn314Asp) | Galattosemia Duarte | I DBS galattosio 16,09-14,7-15,2mg/dl;<br>II DBS galattosio 16,5-16,9 mg/dl;<br>III DBS 14,3-13,7 mg/dl;<br>IV DBS galattosio 6,6-7,7 mg/dl;<br>V DBS galattosio 4,1-4,1 | I DBS GALT 0,6-1,1 U/dl;<br>II DBS GALT 1,1-1,2 U/dl;<br>III DBS GALT 2,2-1,9 U/dl;<br>IV DBS GALT 2,1-2,1 U/dl |

Dall'analisi dei pazienti richiamati per sospetta galattosemia emerge che il dosaggio del galattosio totale su DBS nei pazienti affetti da galattosemia classica è significativamente più alto rispetto a quelli con variante Duarte e che in questi ultimi si nota una diminuzione progressiva fino al rientro nei range di normalità al 3-4 cartoncino intorno al mese di vita. Evidenziando nei pazienti con galattosemia una importante correlazione genotipo-fenotipo.

Tale dato viene rilevato anche nei pazienti identificati per deficit parziale di Biotnidasi poiché in 19 pazienti su 20 con attività enzimatica biotinidasica superiore a 1 nmolABA/min/mL è presente la mutazione c.1330G>C p.Asp444His a carico del gene BTD.

| ID | GENE | mutazione 1 | mutazione 2 | patologia | Attività biotinidasi su siero |
|---|---|---|---|---|---|
| 7 | BTD | c.508G>A p.Val170Met | c.508G>A p.Val170Met | Deficit Biotinidasi totale | 0,69 nmol/pABA/min/mL |
| 10 | BTD | c.98_104delGCGGCTGinsTCC | c.1330G>C p.Asp444His | DEFICIT PARZIALE BIOTINIDASI | 2.67 nmol/pABA/min/mL |
| 12 | BTD | in corso | | DEFICIT PARZIALE BIOTINIDASI | 2.7 nmol pABA/min/mL |
| 13 | BTD | c.1368A>C p.Gln456His | c.1330G>C p.Asp444His | DEFICIT PARZIALE BIOTINIDASI | 2,8 nmolpABA/min/mL |
| 14 | BTD | c.454A>C p.Thr152Pro | c.1330G>C p.Asp444His | DEFICIT PARZIALE BIOTINIDASI | 2,9 nmolpABA/min/m |
| 33 | BTD | p.Arg157His e p.Asp444His | c.1330G>C p.Asp444His | DEFICIT PARZIALE BIOTINIDASI | 1,3 nmolpABA/min/m |
| 35 | BTD | in carico a PD | | DEFICIT PARZIALE BIOTINIDASI | in carico a PD |
| 39 | BTD | c.1368A>C p.Gln456His | c.1330G>C p.Asp444His | DEFICIT PARZIALE BIOTINIDASI | 2.2nmol/pABA/min/mL |
| 46 | BTD | in corso | | DEFICIT PARZIALE BIOTINIDASI | 2.3 nmolABA/min/mL |
| 49 | BTD | c.470G>A p.Arg157His | c.1330G>C p.Asp444His | DEFICIT PARZIALE BIOTINIDASI | 2.1 nmolABA/min/mL |
| 51 | BTD | in carico a PD | | DEFICIT PARZIALE BIOTINIDASI | in carico a PD |
| 53 | BTD | c.1368A>C p.Gln456His | c.1330G>C p.Asp444His | DEFICIT PARZIALE BIOTINIDASI | 2.4 nmol pABA/min/mL |
| 63 | BTD | c.511G>A (pAla171Thr) e c1330G>C (pAsp444His) | c.1330G>C p.Asp444His | DEFICIT PARZIALE BIOTINIDASI | 2.91 nmol/pABA/min/mL |
| 98 | BTD | c.511G>A p.Ala171Thr | c.1330G>C p.Asp444His | DEFICIT PARZIALE BIOTINIDASI | 2.2 nmol/pABA/min/mL |
| 101 | BTD | c.237C>T p.Pro73Leu | c.1330G>C p.Asp444His | DEFICIT PARZIALE BIOTINIDASI | 2,67 nmol pABA/min/mL |
| 108 | BTD | c.1368A>C p.Gln456His | c.1330G>C p.Asp444His | DEFICIT PARZIALE BIOTINIDASI | 2,62 nmol pABA/min/mL |
| 113 | BTD | c.1595C>T p.Thr532Met | c.1330G>C p.Asp444His | DEFICIT PARZIALE BIOTINIDASI | 1,70 nmol pABA/min/mL |
| 133 | BTD | c.1489C>T p.Pro497Ser | c.1489C>T p.Pro497Ser | DEFICIT PARZIALE BIOTINIDASI | 1.1 nmol pABA/min/ml |
| 134 | BTD | p.Cys33Phefs | c.1330G>C p.Asp444His | DEFICIT PARZIALE BIOTINIDASI | 2,5 nmolpABA/min/mL |
| 137 | BTD | P.Ala171Thr;Asp444His | c.1330G>C p.Asp444His | DEFICIT PARZIALE BIOTINIDASI | 2,8 nmolpABA/min/mL |
| 139 | BTD | c.98_104delGCGGCTinsTCC | c.1330G>C p.Asp444His | DEFICIT PARZIALE BIOTINIDASI | 2.86 nmol pABA/min/ml |
| 151 | BTD | p.Cys33Phefs | c.1330G>C p.Asp444His | DEFICIT PARZIALE BIOTINIDASI | 2,2 nmolpABA/min/mL |
| 163 | BTD | in corso | | DEFICIT PARZIALE BIOTINIDASI | in corso |
| 179 | BTD | p.[Ala171Thr; Asp444His] | c.1330G>C p.Asp444His | DEFICIT PARZIALE BIOTINIDASI | 1.28 nmol pABA/min/ml |
| 193 | BTD | c.1368A>C p.Gln456His | c.1330G>C p.Asp444His | DEFICIT PARZIALE BIOTINIDASI | 2.2 nmol pABA/min/ml |
| 200 | BTD | c.98_104delGCGGCTGinsTCC | c.98_104delGCGGCTGinsTCC | Deficit Biotinidasi totale | 0.7 nmol pABA/min/ml |
| 205 | BTD | in carico a PD | | DEFICIT PARZIALE BIOTINIDASI | 1,2 nmolpABA/min/mL |
| 241 | BTD | p.Glu112Lys | c.1330G>C p.Asp444His | DEFICIT PARZIALE BIOTINIDASI | 2.29 nmol pABA/min/mL |

Se invece analizziamo i pazienti con difetto della beta ossidazione degli acidi grassi mediante si nota che i VLCAD identificati allo screening sono forme più lievi rispetto agli MCAD; infatti i primi presentano una attività inferiore al 20%, ma non inferiore al 10% mentre i secondi una attività inferiore al 5%.

| ID | patologia | gene | mutazione1 | mutazione2 | attività enzimatica |
|---|---|---|---|---|---|
| 100 | VLCAD/LCHAD | ACADVL/HADHA | c.1269+1G>A gene VLCAD | c.1528G>C p.GluS10Gln gene HADHA | non eseguita |
| 62 | VLCAD | ACADVL | In corso | | attività enzimatica VLCAD 10% |
| 104 | VLCAD | ACADVL | c.1096C>T p.Arg366Cys | c.604C>G p.Leu202Val | attività enzimatica VLCAD 18% |
| 185 | VLCAD | ACADVL | c.848T>C p.Val283Ala | c.848T>C p.Val283Ala | attività enzimatica VLCAD 12% |
| 243 | VLCAD | ACADVL | c.848T>C p.Val283Ala | c.848T>C p.Val283Ala | attività enzimatica VLCAD 12% |
| 66 | MCAD | ACADM | c.817_829del p.Ala273Leufs*7 | c.388-14A>G | attività enzimatica MCAD 4% |
| 124 | MCAD | ACADM | c.244insT | c.978G>A p.Met326Ile | attività enzimatica MCAD 0% |
| 167 | MCAD | ACADM | c.985 A>G p.Lys329Glu | c.985 A>G p.Lys329Glu | attività enzimatica MCAD 0% |
| 197 | MCAD | ACADM | c.30+1G>T | c.985A>G p.Lys329Glu | non eseguita |
| 199 | MCAD | ACADM | c.387del p.Gln130Lysfs*20 | delezione dell'intero gene ACADM | non eseguita |
| 180 | MCAD/GA2 | ACADM/ETFDH | c.524G>A p.Arg175His in eterozigosi a carico del gene ETFDH | c.31-1G>A in eterozigosi a carico del gene ACADM; | attività enzimatica MCAD 35% |
| 181 | MCAD/GA2 | ACADM/ETFDH | c.524G>A p.Arg175His in eterozigosi a carico del gene ETFDH | c.31-1G>A in eterozigosi a carico del gene ACADM; | attività enzimatica MCAD 45% |
| 90 | MADD GA2 | ETFDH | c.1387G>C p.Gly463Arg | c.1387G>C p.Gly463Arg | test con palmitato (> C10,C12,C14,C16-GAD2) |
| 144 | MADD GA2 | ETFDH | c.1448C>T, p.Pro483Leu | c.814G>A, p.Gly272Arg | test con palmitato (> C5,C12,C14-GAD2) |
| 78 | SCAD | ACADS | c.625G>A p.Gly209Ser | c.625G>A p.Gly209Ser e c.1054G>A p.Ala352Thr | non eseguita |
| 141 | SCAD | ACADS | c.531G>A (p.Trp177*) | c.765G>T (p.Gly255Gly) | non eseguita |
| 166 | SCAD | ACADS | c.529T>C p.Trp177Arg | c.988C>T p.Arg330Cys | non eseguita |
| 189 | SCAD | ACADS | c.815G>A p.Arg272His; c.625G>A | c.1156C>T p.Arg386Cys; c.625G>A | non eseguita |
| 97 | CUD | SLC22A5 | c.136C>T p.Pro46Ser | c.394-16T>A | non eseguita |

Tra i pazienti con iperfenilalaninemia su un totale di 33 pazienti 5 sono eterozigoti poiché è stata identificata una sola mutazione a carico del gene PAH. Tale dato potrebbe essere giustificato dal fatto che

la mutazione identificata in questi pazienti è a carico del sito catalitico oppure si può ipotizzare la presenza di mutazioni a carico di altri enzimi coinvolti nella via metabolica di degradazione della fenilalanina. Per verificare queste ipotesi serviranno ulteriori studi e l'ampliamento della casistica di pazienti.

| ID | GENE | mutazione 1 | Localizzazione sul gene | Dominio proteico | Attività PAH % | mutazione 2 | patologia |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 27 | PAH | c.1208C>T p.Ala403Val | Esone 12 | Sito catalitico | 66 | NESSUNA | Iperfenilalaninemia ETEROZIGOTE |
| 56 | PAH | c.1208C>T p.Ala403Val | Esone 12 | Sito catalitico | 66 | NESSUNA | Iperfenilalaninemia ETEROZIGOTE |
| 153 | PAH | c.782G>A p.Arg261Gln | Esone 7 | Sito catalitico | 44 | NESSUNA | Iperfenilalaninemia ETEROZIGOTE |
| 228 | PAH | c.1208C>T p.Ala403Val | Esone 12 | Sito catalitico | 66 | NESSUNA | Iperfenilalaninemia ETEROZIGOTE |
| 233 | PAH | c.533A>G p.Glu178Gly | Esone 6 | Sito catalitico | 39 | NESSUNA | Iperfenilalaninemia ETEROZIGOTE |

Come dimostrato dalla letteratura più recente e confermato dai dati sopra la genetica molecolare ed il ruolo del genetista clinico stanno assumendo un ruolo sempre più importante nel campo della diagnostica di queste e di altre patologie rare.
In un prossimo futuro è probabile che lo screening genetico sostituisca lo screening biochimico attuale o per lo meno venga implementato con esso.
Infine questi dati raccolti grazie a questo assegno di ricerca hanno permesso la partecipazione con Poster e/o presentazioni orali a congressi nazionali e internazionali

- Biotinidasi deficiency. From neonatal screening to clinical. Experiece of a Regional Center (SIMMESN Roma 2017)
- Galactosemia with a happy ending: importance of neonatal screening (Unforgettable cases in outpatient pediatrics services Vicenza 2018)
- Our experience in the molecular characterization of patients with hyperphenylananinemia with focusing onto the characterisation of a new intronic variant as a disease causing mutation (SSIEM 2018)
- Mild variant of MSUD detected by newborn screening or benign form? (SSIEM Atene 2018)
- A case of Hypervalinemia and hyperleucine-isoleucinemia due to branched chain aminoacids aminotransferase gene mutation(BCAT2) highlights the challenges in newborn screening practices and gives important clinical insights in the pathway of branched chain aminoacids metabolism (SSIEM Atene 2018)
- Synergistic heterozygosity in fatty acids oxidation disorders detected with expanded newborn screening (SIGU Catania 2018)
- Long-term clinical characterization of a case of CDG type IIB (SIMMESN Catania 2018)
- Role of narrative medicine in the therapeutic relationship: the experience of a center of Hereditary Metabolic Diseases (SIMMESN Catania 2018)
- Role of nutrition in patients with early-onset mitochondrial diseases (SIMMESN Catania 2018)
- Glycomal profile of the serum proteins in a patient with the enzyme Glucosidase I deficiency
- (MOGS.CDG) (SIMMESN Catania 2018)
-

**Bibliografia:**


- ✓ Barić I. et al. *Consensus recommendations for the diagnosis, treatment and follow-up of inherited methylation disorders.*J. Inherit Metab Dis (2017) 40:5–20
- ✓ Miller M et al. *Recurrent ACADVL molecular findings in individuals with a positive newborn screen for very long chain acyl-coA dehydrogenase (VLCAD) deficiency in the United States.* Mol Genet Metab 2015
- ✓ Francescatto L. et al. *Newborn screening and the era of medical genomics* Seminars in Perinatology 3 9 (2015)617 – 6 2 2
- ✓ Friedman et al. *Genomic newborn screening: public health policy considerations and recommendations B*MC Medical Genomics (2017) 10:9
- ✓ Howard H C et al *Whole-genome sequencing in newborn screening? A statement on the continued importance of targeted approaches in newborn screening programmes* European Journal of Human Genetics (2015) 23, 1593–1600
- ✓ Mak CM et al *Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: review and update* Crit Rev Clin Lab Sci, 2013; 50(6): 142–162
- ✓ Smon A. et al. *Next generation sequencing as a follow-up test in an expanded newborn screening programme* Clin Biochem. 2018 Feb; 52:48-55
- ✓ Suzuki M et al. Large-scale molecular screening for galactosemia alleles in a pan-ethnic population. Hum Genet 2001, 109:210-215
- ✓ Swango KL et al Partial biotinidase deficiency is usually due to the D444H mutation in the biotinidase gene.Human Genetics (1998) 102:571-575
- ✓ Trbunsek M et al *Galactosemia: deletion in the 5' upstream region of the GALT gene reduces promoter efficiency.* Hum Genet 2001, 109:210-215
- ✓ Trunzo R et al Phenylalanine hydroxylase deficiency in south Italy: Genotype–phenotype correlations, identification of a novel mutant PAH allele and prediction of BH4 responsiveness. Clinica Chimica Acta 450 (2015) 51–55
- ✓ Yubero D et al *Targeted Next Generation Sequencing in Patients with Inborn Errors of Metabolism* PLOS ONE DOI:10.1371/journal.pone.0156359 May 31, 2016
- ✓ Yuval E. Landau et al *Genomics in Newborn Screening* The Journal of Pediatrics Vol. 164, No. 1 _ January 2014
- ✓ Welling L. et al. *International clinical guideline for the management of classical galactosemia: diagnosis, treatment, and follow-up.* J Inherit Metab Dis. 2017 Mar;40(2):171-176. doi: 10.1007/s10545-016-9990-5. Epub 2016 Nov 17.


Verona, 11 aprile 2019

*Dott.ssa Giulia Rodella*

Giulia Rodella