



**UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA**

**Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova**  
Dipartimento di Pediatria

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN  
Medicina dello Sviluppo e Scienze della Programmazione  
INDIRIZZO Scienze della Programmazione  
CICLO XXIII**

**PROGETTAZIONE DELLO SCREENING NEONATALE ALLARGATO  
PER LE MALATTIE METABOLICHE EREDITARIE:  
IMPATTO NELLA POPOLAZIONE E NEI SERVIZI SANITARI DEL VENETO**

**Direttore della Scuola:** Ch.mo Prof. Giuseppe Basso

**Coordinatore d'indirizzo:** Ch.mo Prof. Paola Facchin

**Supervisore:** Ch.mo Prof. Paola Facchin, Ch.mo Prof. Giorgio Romanin Jacur

**Dottorando:** Dr.ssa Monica Da Frè



# INDICE

|   |            |
|---|------------|
| <b>RIASSUNTO .....</b>  | <b>vii</b> |
| <b>ABSTRACT .....</b>   | <b>xi</b>  |
| <b>1. INTRODUZIONE .....</b>  | <b>1</b>   |
| 1.1 Definizione di screening .....  | 1          |
| 1.2 Lo screening neonatale .....  | 3          |
| 1.3 I programmi di screening neonatale metabolico allargato .....           | 4          |
| 1.4 Il progetto di screening neonatale allargato della Regione Veneto ..... | 7          |
| 1.4.1 Le dimensioni del bacino d'utenza .....                               | 7          |
| 1.4.2 Le modalità di raccolta e trasporto dei campioni .....                | 8          |
| 1.4.3 Il pannello di malattie .....   | 9          |
| 1.5 La rete regionale per le malattie rare .....                            | 10         |
| <b>2. LE MALATTIE METABOLICHE EREDITARIE .....</b>                          | <b>13</b>  |
| 2.1 Classificazione ed approccio generale diagnostico e terapeutico.....    | 13         |
| 2.2 I difetti del metabolismo degli acidi organici .....                    | 19         |
| 2.2.1 Acidurie organiche a catena ramificata .....                          | 19         |
| 2.2.2 Difetti del metabolismo intracellulare della Cobalamina .....         | 21         |
| 2.2.3 Aciduria glutarica tipo I .....                                       | 23         |
| 2.3 I difetti del metabolismo degli aminoacidi .....                        | 24         |
| 2.3.1 Iperfenilalaninemia: deficienza di fenilalanina idrossilasi .....     | 24         |
| 2.3.4 Tirosinemia .....   | 26         |
| 2.3.3 Malattia delle urine a sciroppo d'acero .....                         | 28         |
| 2.3.4 Disordini del ciclo dell'urea .....                                   | 30         |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.4 I disordini del metabolismo mitocondriale .....  | 34        |
| 2.4.1 Disordini dell'ossidazione degli acidi grassi .....  | 34        |
| 2.4.2 Aciduria glutarica tipo II .....   | 38        |
| 2.5 I disordini lisosomiali .....  | 38        |
| 2.5.1 La glicogenosi tipo II .....   | 39        |
| 2.5.2 La malattia di Fabry .....   | 40        |
| 2.5.3 Le mucopolisaccaridosi .....   | 41        |
| 2.5.3.1 Mucopolisaccaridosi tipo I .....   | 42        |
| 2.5.3.2 Mucopolisaccaridosi tipo II .....  | 44        |
| 2.5.3.3 Mucopolisaccaridosi tipo VI .....  | 46        |
| 2.6 Una sintesi delle opzioni terapeutiche disponibili per il trattamento della<br>malattia metabolica di base .....     | 48        |
| <br>   |           |
| <b>3. I PROGRAMMI DI SCREENING NEONATALE ALLARGATO .....</b>   | <b>51</b> |
| 3.1 L'incidenza delle patologie .....  | 51        |
| 3.2 L'organizzazione dei programmi di screening .....  | 57        |
| 3.2.1 Lo screening in Toscana e le linee guida nazionali .....   | 57        |
| 3.2.1.1 Toscana .....  | 57        |
| 3.2.1.2 Le linee guida nazionali .....   | 58        |
| 3.2.2 Portogallo .....   | 60        |
| 3.2.3 Germania .....   | 61        |
| 3.2.4 California .....   | 63        |
| 3.2.5 New England .....  | 65        |
| 3.2.6 North Carolina .....   | 66        |
| 3.2.7 Australia .....  | 68        |
| 3.2.8 Studi pilota sullo screening della malattia di Pompe, della<br>malattia di Fabry e delle mucopolisaccaridosi ..... | 69        |
| 3.2.9 Confronti tra i programmi di screening .....   | 71        |
| 3.3 I cut-off e i positivi al test di primo livello .....  | 74        |
| 3.4 Il monitoraggio dei falsi negativi .....   | 81        |
| 3.5 I test di conferma diagnostica .....   | 82        |

|  |            |
|--|------------|
| <b>4. LE STIME SULL'IMPATTO DELLO SCREENING IN VENETO .....</b>  | <b>87</b>  |
| 4.1 I casi attesi .....  | 87         |
| 4.2 I positivi al test di screening attesi .....   | 89         |
| 4.3 Il dimensionamento dei centri di primo e secondo livello .....   | 90         |
| 4.3.1 La progettazione concettuale .....   | 91         |
| 4.3.2 L'analisi dei dati .....   | 92         |
| 4.3.3 L'implementazione del modello .....  | 98         |
| 4.3.4 I risultati .....  | 101        |
| 4.5 Conclusioni .....  | 104        |
| <br>   |            |
| <b>5. LA PROGETTAZIONE DEL SISTEMA DI RACCOLTA DATI .....</b>  | <b>105</b> |
| 5.1 La progettazione di un database .....  | 105        |
| 5.1.1 La progettazione concettuale .....   | 105        |
| 5.1.2 La progettazione logica .....  | 107        |
| 5.2 La progettazione del sistema di raccolta dati dello screening<br>neonatale per le malattie metaboliche ..... | 108        |
| 5.2.1 La progettazione concettuale .....   | 108        |
| 5.2.1.1 La raccolta dei requisiti .....  | 108        |
| 5.2.1.2 L'analisi dei requisiti .....  | 108        |
| 5.2.1.3 Il modello entità-relazione .....  | 116        |
| 5.2.2 La progettazione logica .....  | 120        |
| 5.3 Le viste .....   | 133        |
| <br>   |            |
| <b>6. CONCLUSIONI .....</b>  | <b>143</b> |
| <br>   |            |
| <b>BIBLIOGRAFIA .....</b>  | <b>149</b> |



## **RIASSUNTO**

Gli errori congeniti del metabolismo sono singolarmente rari o eccezionali, ma nel loro insieme costituiscono un gruppo di malattie sempre più consistente, eterogeneo e complesso.

Alcune di queste patologie erano già dagli anni '60 oggetto dei programmi di screening neonatale in diverse nazioni. Negli anni '90 con lo sviluppo della tecnologia tandem mass si è aperta la possibilità di analizzare contemporaneamente con un unico campione di sangue un numero molto elevato di metaboliti permettendo lo screening di circa quaranta malattie metaboliche.

In questa tesi è stata affrontata la pianificazione dello screening neonatale per le malattie metaboliche ereditarie nella Regione Veneto dove una legge regionale ne ha approvato l'attivazione. La legge prevede la valorizzazione dei centri già presenti sul territorio, presso le Aziende Ospedaliere di Padova e Verona per il test di primo livello, e il Centro Regionale di Riferimento per le Malattie Metaboliche Ereditarie dell'Azienda Ospedaliera di Padova per i test di conferma diagnostica (secondo livello). Il pannello di malattie previsto dalla legge regionale comprende cinque difetti del metabolismo degli acidi organici, sei difetti degli aminoacidi, nove difetti del metabolismo mitocondriale, e tre tipi di disordini lisosomiali.

Questa legge si va ad inserire in un contesto nazionale dove non è al momento presente una legge che regola lo screening neonatale allargato per le malattie metaboliche ereditarie.

In diversi paesi come l'Australia, gli Stati Uniti, la Germania e il Portogallo da molti anni sono attivi programmi di screening neonatale. Ciò ha reso possibile avvalersi di queste esperienze per valutare l'organizzazione dello screening da attuarsi in Regione Veneto e avere una fonte di dati importante per stimare i casi attesi e la proporzione di soggetti positivi al test di screening che necessitano del test di conferma diagnostica.

Per quanto riguarda la malattia di Pompe e la Malattia di Fabry, che rientrano nel pannello di malattie previste dal progetto di screening della Regione Veneto, non sono

riportate esperienze di altre nazioni sullo screening neonatale con la tecnologia tandem mass, ma solo il risultato di studi pilota condotti in Austria. Non si dispongono invece di dati sullo screening neonatale per le mucopolisaccaridosi.

Sulla base delle esperienze delle altre nazioni ci si aspetta che il programma di screening nella Regione Veneto, individui annualmente un numero di casi che va da 6 a 24 escludendo la malattia di Fabry che, da sola, ha un numero di casi attesi da 8 a 20. I casi attesi sono stati stimati sul numero di nati del 2009 che è stato di 47.367.

Tra le altre patologie, le più frequenti sono la fenilchetonuria con un numero annuo di casi attesi compreso tra 1 e 5 e l'MCAD (il deficit dell'acil CoA deidrogenasi a catena media) con un numero di casi attesi compreso tra 2 e 5.

Per quanto riguarda i criteri di positività al test di primo livello, non c'è un consenso unanime nel mondo scientifico sui metaboliti e sui cut-off da utilizzare. Trattandosi di popolazioni diverse, essi vengono calcolati sulla base dei valori di un gruppo di neonati sani e di un gruppo di soggetti con patologia e vengono rivisti nel tempo alla luce dei risultati ottenuti.

La pianificazione prevede anche il dimensionamento dei centri di primo e secondo livello per far sì che il tempo che intercorre tra la nascita e il risultato definitivo sia sufficiente da evitare gravi rischi per il neonato. Si ritiene, dalle esperienze delle altre nazioni, che in Veneto il numero annuo di richieste di test di conferma diagnostica sia compreso tra 285 a 393.

Questo problema programmatico è stato affrontato con un modello di simulazione dinamica che permette di valutare varie soluzioni di allocazione delle risorse e di scegliere quella che, riducendo al minimo i rischi per il neonato, al tempo stesso non sia sovradimensionata e comporti una non corretta allocazione delle risorse.

Il modello di simulazione potrà essere nuovamente utilizzato per riallocare le risorse qualora le richieste di assistenza cambino, oppure qualora nuove patologie vengano inserite nel programma di screening.

In questo scenario è fondamentale il ruolo del punto nascita che, oltre ad effettuare il prelievo e inviarlo al centro screening, sarà il ponte tra il centro screening e la famiglia in quanto si occuperà di comunicare i risultati negativi, ma soprattutto di contattare la famiglia in caso di risultato positivo e di inviarla al centro di secondo livello fornendole

tutte le informazioni necessarie. Si occuperà anche di un eventuale secondo prelievo in caso di necessità.

È stato inoltre progettato un sistema di monitoraggio di tutte le informazioni che si susseguono dalla nascita ai risultati definitivi del test. Gli attori che entrano in gioco sono il punto nascita, il centro di primo livello e il centro di secondo livello. Il percorso che porta alla diagnosi definitiva richiede anche di conoscere le informazioni anamnestiche del neonato e dei suoi familiari.

Il sistema di raccolta dati si va ad inserire in un contesto dove i punti nascita sono già attivi nella compilazione del Certificato di Assistenza al Parto, che viene compilato via web, e il centro di secondo livello è già attivo nella compilazione del Registro Malattie Rare tra le quali rientrano le malattie metaboliche ereditarie. La raccolta dati sullo screening neonatale collegherà questi due flussi informativi e, oltre a essere uno strumento fondamentale nel passaggio delle informazioni tra i centri durante il processo di screening, permetterà di monitorare l'efficacia dello stesso. Si potranno conoscere le proporzioni di falsi positivi, i valori predittivi positivi ma anche sarà possibile monitorare i falsi negativi, cioè i neonati classificati come negativi dal test di screening, ma che sviluppano la malattia e che verranno quindi registrati successivamente nel Registro Malattie Rare.

Un ruolo chiave assume il monitoraggio di quanto verrà intrapreso. Infatti il programma di screening allargato per le malattie metaboliche ereditarie andrà sicuramente valutato nel tempo alla luce delle nuove conoscenze cliniche e possibilità terapeutiche relative alle patologie diagnosticabili, dei dati di efficacia che si otterranno, delle risorse disponibili, ma soprattutto delle scelte e degli orientamenti delle persone e dei risultati ottenuti, intesi come effettivi miglioramenti della presa in carico dei pazienti.



## ABSTRACT

Each inborn metabolic disease represents a rare pathology. But, the whole group of inborn metabolic diseases should be considered in its complexity, heterogeneity and relevance.

Since the sixties several countries developed screening programs, and from the nineties, with the use of tandem mass spectrometry, the possibility to analyze simultaneously a huge number of metabolites have allowed the screening of about forty metabolic diseases.

In the present work, the planning of newborn screening for inborn metabolic disease in the Veneto Region, where a new regional law has been taken into force, is studied. The above cited law provides for the improvement of the already existing centres in the Region: Padua and Verona for the first level test and the regional referral centre of expertise for inborn metabolic disease of Padua Teaching Hospital for the second level test.

The regional law provides for a panel of diseases including inborn errors involving the metabolism of organic acids (5 disorders), amino acid (6), mitochondrial (9) and lisosomal (3) defects.

At a national level, Italy still has not a regulated planning for inborn metabolic disease screening in newborns.

Besides, in many countries such as Australia, United States of America, Germany, and Portugal, newborn screening has been activated since several years. This has allowed us to refer to the experience of other countries on screening implementation in order to get a consistent data source leading to a better understanding of the prevalence of diseases explored and the proportions of newborns positive to the screening test and who needs second level test.

Exploring the available literature on neonatal newborn screening with tandem mass spectrometry for Pompe and Fabry disease, included in our diseases panel, no evidence has been found except of two pilot studies performed in Austria even though no data considering mucopolysaccharidoses.

On the basis of the experience of other countries, we estimated in our region an annual number of cases ranging from 6 to 24, excluding Fabry disease. For this pathology, the number of cases estimated is 8-20. In 2009, the total number of births in the region was 47,367.

Among the remaining pathologies, phenylketonuria and MCAD (medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency) are the most frequent inborn metabolic diseases with an annual number of cases ranging from 1 to 5 and from 2 to 5 respectively.

Looking at international literature there is not a worldwide consent metabolites and cut-off for first level test. Usually cut-off are computed on the basis of statistics of healthy at term newborns and reviewed afterwards when a bigger number of newborn will be screened.

The planning needs also a functional fitting of first and second level centres in order to: minimize the time between the birth and the second level visit, and newborn harm avoiding. From the data gathered from the other countries, the estimated number of newborns in Veneto Region who requires a second level visit in one year ranges 285-393.

This planning question has been approached with a dynamic simulation model that enables to compare different allocation choice and to choose those reducing newborns risks and wasting resources.

This created simulation model could be implemented in order to answer to different questions: a new attribution of resources to fulfil changes in care requests even though the inclusion in the screening program of other or newly discovered pathologies.

In this context, the role of the birth centre is essential, not only for samples collection, but also because it will inform the family about screening results and, in case of positive results, it addresses the family to the second level centre, gives all the information needed, performs the eventually required second blood samples.

In this thesis we have also studied a database to collect all information on neonatal newborn screening from birth to the final test results. In this data collection, the birth centre, the screening centre and the second level centre are involved. The diagnosis process required all the available medical history of the newborn and family.

The birth centre is already involved in the data collection of the delivery assistance certificate which is a web system and the second level centre is part of the rare disease registry network.

The newborn screening will connect these two data flows and, in addition to be an essential communication tool among centres, will allow the monitoring of the screening procedure efficacy. As effectiveness measure, it could be possible to gather the false positive rates, the positive predictive values but also to allow the false negative monitoring that is newborns with screening negative results showing a late disease onset “re-catching” them with the Rare Diseases Register System.

The planned screening program could be implemented in order to be updated with clinical and therapeutical advancements and discoveries on diagnosable pathologies, with new available technologies, with the efficacy outcomes achieved in time, with cultural changes in the population and also in the available resources.



# 1. Introduzione

In questa tesi sarà trattato il tema dello screening neonatale allargato per le malattie metaboliche ereditarie con la tecnologia tandem mass e in particolare la pianificazione dello stesso nella Regione Veneto e il suo impatto nella popolazione e nei servizi sanitari.

In questo capitolo si tratterà degli screening sia in generale sia neonatali, della loro diffusione, della normativa della Regione Veneto che disciplina lo screening neonatale allargato e della rete regionale per le malattie rare tra le quali rientrano le malattie metaboliche ereditarie.

### 1.1. Definizione di screening

Lo **screening** è l'applicazione di un test a tutti i soggetti di una popolazione con lo scopo di identificare una malattia nel momento in cui essa è asintomatica. Un test di screening non ha il significato di un test diagnostico ma individua un soggetto apparentemente sano che probabilmente ha una malattia tra quelli che non l'hanno: le persone con un risultato positivo o di sospetto devono essere inviate al medico per la conferma diagnostica e l'eventuale terapia (Wilson e Jungner, 1968).

In generale, l'idea centrale di diagnosi precoce di malattia e trattamento è essenzialmente semplice ma il percorso che porta, da una parte a curare le persone con una malattia precedentemente non diagnosticata, dall'altra a non creare danno a coloro che non hanno bisogno di trattamento, non è così semplice. Per questo Wilson e Jungner nel 1968 fissarono dei criteri guida per l'individuazione delle patologie per cui fosse appropriato un programma di screening. Questi criteri prevedono che:

1. la condizione patologica deve essere un problema importante di salute;
2. deve esistere una terapia per la condizione;
3. devono esistere strutture per la diagnosi e trattamento;
4. deve esistere uno stadio latente della malattia;
5. deve esistere un test o esame per accertare la patologia;
6. il test deve essere bene accetto dalla popolazione;
7. la storia naturale della malattia, incluso lo sviluppo dalla forma latente alla forma conclamata, dovrebbe essere adeguatamente compresa;

## INTRODUZIONE

8. deve esistere un accordo sui protocolli terapeutici di terapia e su chi sottoporre a trattamento;
9. il costo totale della scoperta di un caso dovrebbe essere bilanciato economicamente in relazione alla spesa medica nel suo complesso;
10. il *case-finding* dovrebbe essere continuo, non semplicemente un progetto temporaneo.

Da allora in medicina si sono susseguiti progressi tecnologici, in particolare nel campo della genetica, che hanno reso lo screening un tema di crescente importanza e controverso tanto che negli anni i criteri di Wilson e Jungner sono stati rivisitati e riadattati.

Una *review* dei criteri di screening degli ultimi 40 anni li sintetizza nelle seguenti dieci proposte (Andermann et al. 2008):

- il programma di screening deve rispondere a un bisogno riconosciuto;
- gli obiettivi dello screening devono essere definiti dall'inizio;
- deve essere definita la popolazione bersaglio;
- deve esserci evidenza scientifica dell'efficacia del programma di screening;
- il programma deve integrare formazione, valutazione, servizi clinici e programmi di gestione;
- deve esserci controllo di qualità, con meccanismi che minimizzano i potenziali rischi dello screening;
- il programma deve assicurare scelte informate, confidenzialità, e rispetto dell'autonomia;
- il programma deve promuovere accesso allo screening ed equità all'intera popolazione obiettivo;
- i programmi di valutazione devono essere pianificati dall'inizio;
- i benefici globali dello screening devono pesare i danni.

Alcuni adattamenti derivano dal crescente interesse per gli screening genetici (ad esempio l'importanza di alcune gravi condizioni genetiche che sono però molto rare, l'implicazione delle informazioni genetiche ai membri della famiglia, la necessità di validazione clinica e analitica dei test di screening). Alcuni dei criteri emergenti riflettono invece tendenze, sia della medicina moderna sia della società attuale, come il

## INTRODUZIONE

crescente consumismo, la crescita dei modelli di cura che enfatizzano i costi-benefici, il controllo di qualità e la responsabilità dei decisori.

La pianificazione di uno screening prevede vari livelli di analisi per integrare le evidenze scientifiche con il contesto, bilancia diverse prospettive (quelle individuali verso quelle generali), confronta diverse alternative (es. le diverse strategie di screening), e deve considerare se l'implementazione in un determinato contesto porterà dei benefici.

Ci possono essere infine delle ragioni che rendono necessario rivedere in qualsiasi momento un programma di screening come ad esempio una miglior conoscenza della storia naturale della patologia e delle sue varianti, le nuove possibilità di trattamento oppure i progressi nelle tecniche di analisi che ne migliorano la sensibilità e la specificità.

### **1.2 Lo screening neonatale**

Lo scopo dello screening neonatale è quello di identificare neonati con gravi patologie al fine di favorire interventi appropriati per evitare o migliorare gli esiti avversi (Wilken e Wiley, 2008).

I test biochimici di massa nei neonati ebbero inizio negli anni '60 con l'introduzione dello screening per la fenilchetonuria, un raro errore congenito del metabolismo che se non trattato porta a grave ritardo mentale. Guthrie nel 1960 sviluppò una metodologia per misurare la concentrazione di fenilalanina nel sangue nei neonati affetti. Questo test richiedeva poche gocce di sangue prelevate dal tallone intrise in una carta bibula oggi conosciuta come *Guthrie card* (Marsden e Levy, 2010). Aveva inoltre la caratteristica che poteva essere eseguito velocemente su un grande numero di campioni. Il Massachusetts nel 1963 fu il primo Stato a rendere obbligatorio il test per la fenilchetonuria in tutti i neonati. Da allora in molte nazioni ebbero inizio i programmi di screening neonatale. Lo stesso campione poteva essere usato anche per altri test e nel tempo altre patologie furono introdotte nei programmi di screening neonatale.

Negli anni '90 lo sviluppo nella spettrometria tandem mass (MS/MS) portò a un grande cambiamento nell'approccio allo screening neonatale. Questa metodica permette di identificare, sempre con il prelievo di una goccia di sangue raccolta su una carta bibula, un grande numero di metaboliti rendendo così possibile lo screening di circa 30-40

## INTRODUZIONE

patologie metaboliche. È cambiata così la filosofia diagnostica dei test di screening che passa dal concetto “un campione, un test, una malattia” al concetto “un campione, un test, molte malattie”.

L'efficacia del programma di screening con la tandem mass è stata studiata attraverso progetti pilota condotti in Australia e New England che hanno dimostrato una maggiore capacità di identificazione di queste patologie con lo screening rispetto all'identificazione con le diagnosi cliniche (Zytkovicz et al. 2001; Wilken et al. 2003). Inoltre i risultati suggerivano che l'espansione della tandem mass aveva il vantaggio di migliorare la prognosi dei soggetti identificati e trattati precocemente.

### **1.3 I programmi di screening neonatale metabolico allargato**

Fino ad ora sono stati implementati programmi di screening neonatale per le malattie metaboliche ereditarie con la tecnologia tandem mass in Australia, Canada e in Qatar. Negli Stati Uniti lo screening metabolico non è obbligatorio a livello federale, ma ciascuno stato stabilisce quali patologie sottoporre a screening e, al momento, lo screening è stato attivato in 46 dei 50 stati. Lo screening neonatale è attivo anche in diverse nazioni europee e in alcune Regioni italiane.

Bodamer et al. nel 2007 hanno fatto il punto sulla situazione dello screening metabolico con la tecnologia tandem mass in Europa. Una sintesi del lavoro è riportata in Tabella 1.1. È evidente che la situazione in Europa non è omogenea. La prima nazione ad avviare il programma di screening neonatale metabolico allargato fu la Germania nel 2000 e l'ultima fu l'Olanda che lo iniziò nel 2007. Oltre a Germania e Olanda sono presenti programmi di screening con la tecnologia tandem mass in Austria, Belgio, Danimarca, Polonia, Portogallo, Spagna e Svizzera. La Gran Bretagna nel 2007 aveva invece completato uno studio pilota su larga scala sullo screening neonatale per l'MCAD (deficit dell'acil-CoA deidrogenase a catena media). I risultati confermavano quelli di un precedente studio eseguito in Germania che evidenziava benefici del programma di screening con una notevole riduzione delle morbidità e della mortalità a seguito di trattamento pre-sintomatico. L'MCAD è stata così introdotta nel programma di screening.

In molte nazioni ci sono delle società scientifiche che si occupano in particolare di screening neonatali e molti laboratori partecipano a programmi internazionali di

## INTRODUZIONE

controllo di qualità e di *proficiency testing*. In alcuni paesi lo screening è organizzato dallo stato o da istituzioni ufficiali e il numero di laboratori è ristretto per garantire un numero sufficiente di campioni a ciascuno di essi.

Tra i diversi paesi dove lo screening neonatale allargato per le malattie metaboliche ereditarie è in atto già da alcuni anni, non c'è ancora un consenso su quali malattie sia utile ed eticamente giusto diagnosticare alla nascita e la discussione su questo tema è molto attiva. Le differenze che si riscontrano non sono spiegabili da particolari differenze nelle prevalenze di patologie quanto piuttosto in diversi approcci nella stima dei rischi e dei benefici.

In Austria vengono sottoposte a screening 20 patologie. In Germania lo screening neonatale iniziò con un approccio non restrittivo ma i decisori stabilirono nel 2005 di limitare il numero di patologie a 10 e tutti gli analiti non necessari per questo scopo vengono cancellati. La decisione sulle patologie eliminate non ha sempre una chiara motivazione, in alcuni casi per motivi etici ed in altri casi per motivi clinici.

In alcuni paesi europei solo l'MCAD e la fenilchetonuria (PKU) sono oggetto di screening (Gran Bretagna e Svizzera) e tutti i metaboliti che non sono necessari per diagnosticare queste due malattie sono non analizzati o non riportati. L'introduzione della tandem mass per lo screening dell'MCAD ha aperto la possibilità in Gran Bretagna di estendere lo screening ad altre patologie che sono molto rare, ma il cui costo marginale dello screening sarebbe inferiore al costo effettivo. Nel 2010 è stato finanziato un progetto di ricerca per valutare l'opportunità di introdurre altre cinque patologie (malattia delle urine a sciroppo d'acero, omocistinuria, acidemia glutarica di tipo I, acidemia isovalerica e deficit dell'idrossiacil CoA deidrogenasi a catena lunga) usando la tandem mass in 500.000 bambini nei prossimi due anni (Burton and Moorthie, 2010).

In Italia, la Regione Toscana ha per prima avviato un programma di screening neonatale allargato per le malattie metaboliche ereditarie, che è regolamentato da una legge regionale (DR 800 del 2 agosto 2004). In Toscana vengono attualmente sottoposte a screening 43 patologie, un numero di gran lunga superiore a quello di tutti gli altri programmi di screening. Successivamente lo screening neonatale è stato avviato anche in altre regioni come ad esempio il Lazio, la Liguria, la Campania, l'Emilia Romagna e il Veneto.

## INTRODUZIONE

**Tabella 1.1:** Confronto tra le nazioni europee sul numero di centri di screening, popolazione totale, neonati sottoposti a screening e malattie metaboliche incluse nello screening con la tecnologia tandem mass (adattata da Bodamer et al. 2007).

| Nazione                               | No. centri           | Popolazione *<br>(milioni) | Numero di bambini sottoposti a screening **<br>(numero medio di campioni per laboratorio) | Patologie incluse nello screening metabolico allargato con la tecnologia tandem mass   |
|---------------------------------------|----------------------|----------------------------|---|--|
| Austria (compreso Sud Tirolo, Italia) | 1                    | 8,18                       | 77.186 (77.186)   | PKU, MSUD, TyrI, Cit, ASA, Homocyst, MCAD, LCHAD, VLCAD, CPT I, CPT II/CACT, CUD, KTD, HMG, MMA, PA, IVA, GA I, MCC                                  |
| Belgio                                | 6                    | 10,29                      | 105.335 (17.555)  | PKU, MSUD, TyrI, MCAD, LCHAD, VLCADD, CPT I, CPT II/CACT, CUD, KTD, HMG, MMA, PA, IVA, GA I, MCC   |
| Bulgaria                              | 1                    | 7,55                       | 63.190 (63.190)   | Nessuna  |
| Croazia                               | 1                    | 4,43                       | Nessuna informazione  | Nessuna  |
| Danimarca                             | 1                    | 5,38                       | 66.657 (66.657)   | PKU, MSUD, Cit, ASA, ARG, MCAD, LCHAD, VLCAD, CPT I, CPT II/CACT, CUD, KTD, HMG, MMA, PA, IVA, GAI, MCC (studio pilota, copertura inferiore al 100%) |
| Finlandia                             | 40                   | 5,19                       | 56.000 (1.400)  | Nessuna  |
| Francia                               | 22                   | 59,94                      | 764.212 (34 737)  | Nessuna  |
| Germania                              | 13                   | 83,43                      | 725.125 (60 427)  | PKU, MSUD, MCAD, LCHAD, VLCAD, CPT I, CPT II/CACT, IVA, GA I   |
| Gran Bretagna ***                     | 20                   | 54,78                      | 625.749 (32.287)  | MCAD; dal 2010 studio pilota per MSUD, Homocyst, GA I, IVA, LCHAD  |
| Irlanda                               | 1                    | 3,92                       | 62.000 (62.000)   | Nessuna  |
| Islanda                               | 1                    | 0,308                      | 4.000 (4.000)   | Nessuna  |
| Italia                                | 22                   | 57,74                      | 566.169 (25.734)  | In Toscana 43 patologie, in Emilia Romagna 19  |
| Norvegia                              | 1                    | 4,54                       | 56.846 (56.846)   | Nessuna  |
| Olanda                                | 5                    | 16,14                      | 200.635 (40.127)  | PKU, MSUD, Homocyst, TyrI, MCAD, LCHAD, VLCAD, HMG, IVA, GA I, MCC   |
| Polonia                               | 8                    | 38,62                      | 352.152 (44.019)  | PKU, MSUD, TyrI, MCAD, LCHAD, VLCAD, CPT I, CPT II/CACT, CUD, IVA, GAI   |
| Portogallo                            | 1                    | 10,10                      | 112.557 (112.557)   | PKU, MSUD, MCAD, LCHAD, VLCAD, CPT I, CPT II/CACT, IVA, GA I, GAMTD  |
| Repubblica Ceca                       | 4                    | 10,25                      | 93.685 (23 421)   | Nessuna  |
| Romania                               | Nessuna informazione | 22,28                      | Nessuna informazione  | Nessuna  |
| Serbia                                | 1                    | 10,50                      | 57.354 (57.354)   | Nessuna  |
| Slovacchia                            | 1                    | 5,43                       | Nessuna informazione  | Nessuna  |
| Slovenia                              | 1                    | 1,94                       | 14.000 (14.000)   | Nessuna  |
| Spagna                                | 20                   | 40,11                      | 441.297(22.064)   | PKU, MSUD, MCAD, LCHAD, VLCAD, CPT I, CPT II/CACT, IVA, GAI  |
| Svizzera                              | 1                    | 7,32                       | 74.450 (74.450)   | PKU, MCAD  |
| Ungheria                              | 4                    | 10,05                      | circa 100.000 (25.000)  | Nessuna  |
| <b>Total</b>                          | <b>176</b>           | <b>478,418</b>             | <b>4.618 (599.000)</b>  |  |

\* Anno 2001      \*\* Anno 2003      \*\*\* Esclusa Scozia

PKU: fenilchetonuria; MSUD: malattia delle urine a sciroppo d'acero; TYR I: tirosinemia di tipo I; Cit: citrullinemia; Homocyst: omocistinuria; ASA: acidemia arginino succinica; ARG: argininemia; MCAD: deficit dell'acil-CoA deidrogenase a catena media; LCHAD: Deficit dell'idrossiacil CoA deidrogenasi a catena lunga; VLCAD: deficit dell'acil-CoA deidrogenase a catena molto lunga; CPT I: deficit di carnitina palmitoil-transferasi I; CPT II: deficit di carnitina palmitoil-transferasi II; CACT: deficit di carnitina/acilcarnitina translocasi; CUD: deficit del trasporto della carnitina; KTD: deficit di  $\beta$ -Ketothiolase; HMG: Difetti 3-idrossi-3-metilglutaril CoA liasi; MMA: acidemie metilmaloniche; PA: acidemie propioniche; IVA: acidemia isovalerica; GA I: acidemia glutarica tipo I; MCC: difetti 3-Metilcrotonil CoA carbossilasi; GAMTD: deficit di guanidinoacetato metiltransferasi.

### **1.4 Progetto di screening neonatale allargato della Regione Veneto**

L'avvio dello screening neonatale allargato in Veneto iniziò negli anni 2000 con un progetto pilota in collaborazione con l'USL di Belluno su un ristretto numero di neonati che è stato successivamente allargato agli ospedali di Feltre e Conegliano – Vittorio Veneto. Ad oggi sono stati sottoposti a screening circa 15.000 neonati presso l'Unità Operativa Complessa Malattie Metaboliche Ereditarie del Dipartimento di Pediatria dell'Azienda Ospedaliera di Padova. L'incidenza stimabile è di un affetto ogni 5.000 nati.

Con Deliberazione della Giunta Regionale n. 2171 dell'8 agosto 2008 lo screening neonatale allargato è diventato obbligatorio anche in Veneto e si è affidato all'Azienda Ospedaliera di Padova e all'Azienda Ospedaliera di Verona l'incarico di predisporre un progetto congiunto di esecuzione di screening neonatali ivi compreso lo screening neonatale allargato per le malattie metaboliche ereditarie.

Con Deliberazione della Giunta Regionale n. 3337 del 3 novembre 2009 è stato approvato il "Progetto congiunto di esecuzione di screening neonatali ivi compreso lo screening neonatale allargato per le malattie metaboliche ereditarie" (Allegato A della Deliberazione). Esso definisce le dimensioni del bacino d'utenza, le modalità di raccolta e trasporto dei campioni, il pannello di malattie, i tempi ed i costi.

#### **1.4.1 Le dimensioni del bacino d'utenza**

Nel progetto si ipotizza di creare una rete dello screening neonatale che comprenda il centro già in attività a Verona (Centro Regionale per lo Screening Malattie Metaboliche Ereditarie ed Endocrinologiche del Dipartimento di Pediatria dell'Azienda Ospedaliera di Verona) e un nuovo centro a Padova dove da tempo è già in atto un progetto pilota.

In termini di neonati da analizzare e di requisiti minimi il bacino veneto è riassumibile in 42 punti nascita con un numero di 47.098 neonati anno (dati 2006).

La distribuzione dei punti è la seguente:

Verona: 15 punti nascita delle provincie di Verona e Vicenza con circa 19.000 nati

Padova: 27 punti nascita delle provincie di Padova, Rovigo, Treviso, Venezia e Belluno con circa 27.000 nati.

I criteri per la definizione dei bacini e per l'attivazione dei centri di screening sono stati: la valorizzazione delle competenze e delle esperienze esistenti, la razionalizzazione di

## INTRODUZIONE

flussi di campioni e l'accorpamento di aree geografiche contigue considerando la collocazione dell'*equipe* clinica e la necessità di evitare spostamenti disagiati per le famiglie dei pazienti.

In considerazione della necessità di integrare diverse reti di competenze e centri diversi occorre un lungo periodo di sperimentazione organizzativa con frequenti revisioni del modello.

È ipotizzabile che il bacino si allarghi anche al Friuli Venezia Giulia e al Trentino Alto Adige, quindi il numero di soggetti da sottoporre allo screening raggiunge entità da sostenere lo sviluppo di due centri operativi sotto un'unica direzione. È importante, infatti che i due centri adottino lo stesso criterio sia per quanto riguarda le malattie da diagnosticare, che i tempi e metodi richiesti dallo screening. Il coordinamento unico dei centri è pertanto auspicabile al fine di ottenere un campione più omogeneo possibile. Inoltre l'attività di conferma diagnostica necessita di strumentazioni che sono peculiari e differenti da quelle previste per lo screening e che sono già operative presso l'Unità Complessa per le Malattie Metaboliche Ereditarie dell'Azienda Ospedaliera di Padova. Tutto ciò può essere utilizzato senza aggravamenti economici.

### **1.4.2 Le modalità di raccolta e trasporto dei campioni**

Le raccomandazioni più importanti per quanto riguarda la raccolta e l'invio dei campioni sono:

1. per la raccolta del campione si raccomanda di seguire gli standard NCCLS/CLSI;
2. si raccomanda di tenere nel dovuto conto le possibili variazioni dell'ematocrito e il loro effetto sui dosaggi;
3. anche se i campioni di sangue essiccato su carta possono essere trasportati e inviati al laboratorio a temperatura ambiente, particolare cura va posta nel non esporre i campioni a temperature eccessive, in particolare ove si usi la determinazione dell'attività enzimatica;
4. il trasporto deve avvenire in maniera da escludere qualsiasi contatto del campione con gli operatori o con gli altri campioni;
5. i tempi di consegna devono essere garantiti attraverso canali diretti o spedizionieri che garantiscono la consegna entro 24 ore. A tal fine il centro di Padova utilizza la rete già presente per la raccolta campioni presso l'istituto di medicina di laboratorio.

### 1.4.3 Il pannello di malattie

Sebbene a oggi non vi sia ancora un consenso né internazionale, né nazionale su quali malattie sia utile ed eticamente giusto diagnosticare alla nascita e la discussione su questo tema sia molto attiva e difficile tra gli esperti del campo, la proposta è quella di definire un pannello di malattie diagnosticabili con l'introduzione di uno screening esteso in MS/MS che si aggiunga a quelle attualmente oggetto di screening.

Sulla base delle possibilità diagnostiche e operative il progetto verrà suddiviso in due fasi:

**I fase:** diagnosi di malattie diagnosticabili e trattabili entro la prima settimana di vita

Fenilchetonuria (PKU)

Malattia delle urine a sciroppo d'acero (MSUD)

Tirosinemia tipo I (TYR I)

Glutarico aciduria tipo I (GA I)

Deficit cobalamina C/D (Cbl C/D)

Deficit dell'acil CoA deidrogenasi a catena media (MCAD)

Isovalerico aciduria (IVA)

**II fase:** diagnosi di malattie diagnosticabili e parzialmente trattabili entro i primi giorni di vita (72 ore) e di cui è necessario uno studio pilota

Citrullinemia (CIT)

Aciduria argino succinica (ASA)

Argininemia (ARG)

Deficit dell'acil CoA deidrogenasi a catena molto lunga (VLCAD)

Deficit dell'acil CoA deidrogenasi a catena lunga (LCHAD)

Deficit dell'acil CoA deidrogenasi a catena corta (SCAD)

Deficit delle acil CoA deidrogenasi (aciduria glutarica tipo II) (GA II)

Deficit della carnitina palmitoil transferasi tipo I (CPT I)

Deficit della carnitina palmitoil transferasi tipo II (CPT II)

Deficit della carnitina acilcarnitina translocasi (CACT)

Deficit del trasportatore delle carnitine (CUD)

Acidemia propionica (PA)

Acidemia metilmalonica (MMA)

## INTRODUZIONE

Malattia di Pompe (GSD II)

Malattia di Fabry (FD)

Mucopolisaccaridosi tipo I, II, VI (MPS I, II, VI)

### **1.5 La rete regionale per le malattie rare**

La disciplina in materia di esenzione dalla partecipazione alla spesa per i soggetti affetti da malattia rara è contenuta nel Decreto Ministeriale 18 maggio 2001 n. 279 che, oltre ad individuare le malattie rare che danno diritto all'esenzione, definisce le procedure per il riconoscimento del diritto, prevede l'istituzione di una rete assistenziale dedicata e l'istituzione del Registro nazionale delle malattie rare presso l'Istituto Superiore di Sanità.

La Rete è costituita da presidi accreditati del Sistema Sanitario Nazionale, in possesso di specifici requisiti di esperienza e competenza, appositamente individuati dalle Regioni quali centri abilitati a rilasciare la certificazione ai fini dell'esenzione e ad erogare prestazioni finalizzate alla diagnosi ed al trattamento delle malattie rare. Il regolamento definisce espressamente i criteri per l'individuazione dei presidi della rete sulla base delle esigenze assistenziali peculiari di tali malattie. In particolare, la documentata esperienza di attività diagnostica o terapeutica, specifica per i gruppi di malattie o per le singole malattie rare, e l'idonea dotazione di strutture di supporto e di servizi complementari, ivi inclusi, per le malattie che lo richiedano, servizi per l'emergenza e per la diagnostica biochimica e genetico- molecolare. Al fine di ottenere a livello nazionale un quadro complessivo della diffusione delle malattie rare e della loro distribuzione spaziale e temporale, ottimizzare gli interventi assistenziali volti alla tutela dei soggetti affetti e cooperare alle iniziative di livello internazionale, il Decreto stabilisce anche la creazione di Registri Regionali, i quali sono titolari di un debito informativo verso il Ministero e verso l'Istituto Superiore di Sanità, sede del Registro Nazionale, i cui contenuti sono stati stabiliti dall'Accordo Stato-Regioni del 10 maggio 2007.

Il sistema informatizzato di monitoraggio delle malattie rare attivo nella Regione Veneto, unificando i processi di certificazione dei pazienti, rilascio dell'esenzione ed accesso ai benefici previsti dal DM 279/2001, costituisce uno strumento importante per valutare l'impatto in popolazione e nei servizi sanitari che il complesso delle malattie

## INTRODUZIONE

rare comporta. Attraverso il sistema avviene la registrazione dei casi e dei flussi dei pazienti all'interno della rete di assistenza, sono implementate funzioni per la gestione clinico-assistenziale del paziente da parte di tutti i differenti attori che in fasi diverse e con differenti ruoli sono coinvolti nel processo di presa in carico, mediante il collegamento in rete dei Centri di Riferimento per le malattie rare, le Aziende ULSS, Distretti Socio-Sanitari e Servizi Farmaceutici. Il sistema che lega il monitoraggio delle malattie rare all'erogazione dell'assistenza sanitaria ai pazienti affetti, costituisce nel contempo un utile strumento a supporto della programmazione sanitaria regionale per la gestione e il controllo della spesa farmaceutica nell'ambito delle malattie rare, come la spesa per i medicinali orfani.

Il Registro si pone i seguenti obiettivi:

- generazione di informazioni epidemiologiche essenziali per attività di programmazione e controllo sia a livello regionale sia aziendale;
- annullamento dei tempi di attesa per l'ottenimento di benefici e prescrizioni, annullamento della necessità di recarsi in sportelli amministrativi per ottenere benefici e prescrizioni;
- creazione di protocolli omogenei per tutta l'area monitorata, definizione di linee-guida in base alla valutazione aggiornata delle evidenze derivanti dalla letteratura scientifica;
- definizione della storia naturale ed assistenziale del malato attraverso la stratificazione di un'informazione essenziale sempre disponibile in linea per i centri ai quali il malato si rivolge;
- creazione di una banca informativa comune a tutta la rete dei centri accreditati per malattie rare, base essenziale per lo sviluppo di ricerca clinica avanzata nel settore;
- monitoraggio in tempo reale delle attività intraprese, delle prestazioni erogate e dei relativi costi per ciascun paziente, controllo dell'utilizzo delle risorse e della spesa, sia per il governo locale che per quello regionale (Minichiello, 2010).



## 2. Le malattie metaboliche ereditarie

Si presentano in questo capitolo le malattie metaboliche ereditarie oggetto del programma di screening neonatale regionale.

Si riporta una prima parte “generale” riguardante l’approccio clinico ed una seconda parte “speciale” dedicata all’esposizione sintetica delle malattie metaboliche che rientrano nel programma di screening neonatale della Regione Veneto.

### 2.1 Classificazione ed approccio generale diagnostico e terapeutico

Gli errori congeniti del metabolismo sono singolarmente rari od eccezionali, ma nel loro insieme costituiscono un gruppo di malattie sempre più consistente, eterogeneo e complesso, anche grazie alle aumentate possibilità di identificare nuovi fenotipi biochimici (ad oggi ne sono state descritte oltre 500, e questo numero è destinato a crescere Sanjurjo et al. 2008).

Da un punto di vista clinico, tutti gli errori congeniti del metabolismo possono essere divisi in due grandi categorie:

1. Malattie che coinvolgono soltanto un sistema funzionale oppure un organo o sistema anatomico. Presentano sintomi clinici uniformi, e la diagnosi è di solito facile anche quando il danno di base biochimico determina conseguenze sistemiche.
2. Malattie nelle quali il difetto biochimico di base può compromettere una via metabolica comune ad un grande numero di cellule o organi oppure è limitato ad un organo ma provoca conseguenze umorali e sistemiche. I sintomi clinici che si presentano sono molto diversi. Il sistema nervoso centrale è frequentemente coinvolto nella malattia avanzata, e la diagnosi potrebbe essere resa difficile dalla presenza di anomalie secondarie. Questa categoria include la maggior parte degli errori congeniti del metabolismo intermedio, disordini del traffico intracellulare, e disordini lisosomiali.

La seconda categoria può essere suddivisa secondo la base patofisiologica in tre gruppi, utili a fini diagnostici.

**Gruppo 1:** disturbi della sintesi o del catabolismo delle molecole complesse, come i disordini lisosomiali, perossisomiali e i disturbi del traffico intracellulare. I sintomi

## LE MALATTIE METABOLICHE EREDITARIE

clinici sono permanenti, progressivi, indipendenti da eventi intercorrenti, e non correlati all'alimentazione.

**Gruppo 2:** errori congeniti del metabolismo intermedio che conducono ad intossicazione acuta o progressiva causata dall'accumulo di metaboliti tossici in prossimità del blocco metabolico.

Questo gruppo include le aminoacidopatie, la maggior parte delle acidurie organiche, i difetti congeniti del ciclo dell'urea, e le intolleranze ereditarie agli zuccheri. In queste condizioni, un intervallo libero dai sintomi è seguito da segni clinici di intossicazione acuta o cronica e da ricorrenti crisi metaboliche. La diagnosi si basa principalmente sulla cromatografia di aminoacidi ed acidi organici nel plasma e nelle urine. Il trattamento consiste nella rimozione delle tossine.

**Gruppo 3:** disordini legati a “deficit energetico”, nei quali i sintomi sono causati almeno in parte da una deficienza nella produzione o utilizzazione dell'energia conseguente ad un errore congenito del metabolismo intermedio nel fegato, miocardio, muscoli o cervello. Questo gruppo include glicogenosi, difetti della gluconeogenesi, acidemie lattiche congenite, difetti di ossidazione degli acidi grassi, disordini della catena respiratoria mitocondriale. Queste malattie presentano uno spettro clinico sovrapponibile, e le manifestazioni risultano talora da accumulo di composti tossici così come da un deficit di produzione dell'energia. Comunemente si riscontrano ipoglicemia, iperlattacidemia, severa ipotonia generalizzata, miopatia, cardiomiopatia, scarsa crescita, insufficienza cardiaca, sindrome della morte improvvisa infantile, e malformazioni congenite, suggerendo che il disturbo metabolico ha interessato le vie energetiche fetali (Scriver et al. 2001).

Nella pratica clinica, un utile approccio diagnostico e terapeutico alle malattie metaboliche ereditarie tiene conto sia del periodo di insorgenza che della sintomatologia clinica e di laboratorio.

Dal punto di vista della presentazione clinica, gli errori congeniti del metabolismo possono manifestarsi con crisi metabolica acuta neonatale, crisi successive e/o ricorrenti, come sindromi cronico-progressive, con segni o sintomi particolari.

1. Presentazione acuta nel periodo neonatale. Una malattia metabolica che esordisca nei primi giorni (o settimane) di vita presenta generalmente un quadro sintomatologico importante e, ove non si provveda in maniera tempestiva,

rapidamente ingravescente. Tale comportamento è quasi sempre dipendente dal fatto che il blocco metabolico (enzimatico) che sta alla base della malattia è completo. Il quadro clinico può presentarsi con una sintomatologia a prevalente compromissione neurologica (letargia, coma, talvolta convulsioni; tachipnea; difficoltà nell'alimentazione; vomito; calo ponderale importante) oppure epatica (epatomegalia, ittero, turbe della coagulazione) o più complessa. Essa insorge dopo un intervallo, della durata di alcune ore o giorni, libero dai sintomi propri della dismetabolia. Tipicamente essa si aggrava con l'alimentazione in rapporto alla introduzione di nutrienti implicati nel difetto metabolico (ad esempio aminoacidi, galattosio). I vari quadri possono simulare altre patologie neonatali ed impegnare a fondo nella diagnosi differenziale. Una valutazione critica dei sintomi e segni clinici e degli esami di laboratorio di prima istanza consente un primo orientamento diagnostico. Questo primo inquadramento consente di mettere prontamente in atto le prime misure terapeutiche che, in attesa della diagnosi definitiva, possono risultare vantaggiose e talora decisive per il controllo iniziale della dismetabolia. La conferma o precisazione della diagnosi richiede ulteriori esami specialistici realizzabili in laboratori ben attrezzati o in specifici centri diagnostici, tali esami diagnostici nonché il trattamento specifico sono definiti nella trattazione delle singole malattie metaboliche, cui si rimanda.

2. Crisi acute successive e/o ricorrenti. Si possono presentare nel lattante, ma anche nel bambino e nell'adolescente, dopo un periodo antecedente silente. La loro comparsa è generalmente tanto più tardiva quanto più parziale è il blocco metabolico (enzimatico). Nel lattante la crisi metabolica inizia in genere intorno ai 4 mesi di età quando l'apporto proteico tende ad aumentare. La sintomatologia è sovrapponibile a quella descritta per le crisi neonatali. Le malattie metaboliche da prendere in considerazione sono ancora le stesse del periodo neonatale, con qualche eccezione. Nel bambino le manifestazioni dismetaboliche acute e le loro cause sono sostanzialmente analoghe a quelle del lattante. Non è infrequente un decorso caratterizzato da crisi ricorrenti, con un intervallo libero da sintomi di durata variabile, anche di anni, consistenti per lo più in crisi di letargia, coma, la cui vera causa non di rado viene riconosciuta tardivamente essendo all'inizio scambiata con altre patologie. Il trattamento iniziale delle crisi acute è analogo a

## LE MALATTIE METABOLICHE EREDITARIE

quello iniziale delle crisi acute neonatali. A diagnosi raggiunta esso varia a seconda della malattia di base, cui si rimanda nello specifico delle malattie metaboliche trattate.

3. Sindromi cronico/progressive. Le malattie metaboliche ereditarie possono presentarsi in maniera cronico-progressiva. Non di rado la sintomatologia eclatante è preceduta da una sintomatologia insidiosa, e almeno nelle prime manifestazioni, fuorviante. Schematicamente essa può presentarsi sotto forma di disturbi di tipo neurologico, oppure digestivo oppure di compromissione muscolare od anche di interessamento multiviscerale. Il trattamento delle sindromi cronico/progressive non rivestendo caratteri di urgenza coincide con il trattamento della malattia metabolica di base cui si rimanda nello specifico delle malattie metaboliche trattate.
4. Specifici sintomi e segni clinici suggestivi di un difetto metabolico, ad esempio la presenza di particolari odori nelle urine, etc (Gaburro et al. 1997).

Con riferimento alla classificazione delle malattie metaboliche descritta sopra, si riporta nella Tabella 2.1 l'elenco delle patologie metaboliche ereditarie che rientrano nel progetto di screening neonatale allargato mediante tandem mass della Regione Veneto con i sinonimi e le sigle che saranno utilizzati in seguito.

Fra i disturbi metabolici che causano intossicazione troviamo alcune acidurie organiche, acidemia propionica, acidemia metilmalonica, acidemia isovalerica, acidemia glutarica tipo I, il deficit di cobalamina C/D; alcuni difetti del catabolismo degli aminoacidi, fenilchetonuria, malattia delle urine a sciroppo d'acero, tirosinemia, ed i difetti del ciclo dell'urea quali argininemia, acidemia arginosuccinica e citrullinemia.

Nel gruppo dei difetti del metabolismo energetico sono inclusi anche i difetti dell'ossidazione degli acidi grassi e della chetogenesi, dei quali alcuni rientranti nel progetto di screening allargato regionale: il deficit dell'acil-CoA deidrogenasi a catena molto lunga, il deficit dell'idrossiacil-CoA deidrogenasi a catena lunga, il deficit dell'acil-CoA deidrogenasi a catena media, il deficit dell'acil-CoA deidrogenasi a catena corta, l'acidemia glutarica tipo II, il deficit di carnitina palmitoil-transferasi I, il deficit di carnitina palmitoil-transferasi II, il deficit carnitina/acilcarnitina translocasi ed il deficit del trasporto della carnitina.

## LE MALATTIE METABOLICHE EREDITARIE

Fra le patologie lisosomiali che rientrano nel programma di screening allargato della Regione Veneto sono presenti la glicogenosi di tipo II, la malattia di Fabry e le mucopolisaccaridosi I, II e VI.

**Tabella 2.1 (1/2):** Classificazione delle patologie che rientrano nello screening neonatale della Regione Veneto

| <b>Patologia</b>   | <b>Sinonimi</b>  | <b>Sigla</b> |
|--|--|--------------|
| <b><i>Difetti del metabolismo degli acidi organici</i></b> |  |              |
| Acidemia Propionica  | Deficit di propionil-CoA carbolissasi<br>Glicinemia chetotica  | PA           |
| Acidemia metilmalonica                                     | Deficienza di Metilmalonil-CoA Mutasi  | MMA          |
| Deficit di Cobalamina C/D                                  | Acidemia metilmalonica e omocistinuria tipo CblC<br>Acidemia metilmalonica e omocistinuria tipo CblD   | Cbl C/D      |
| Acidemia Isovalerica                                       | Deficit della CoA-deidrogenasi dell'acido isovalerico  | IVA          |
| Acidemia Glutarica Tipo I                                  | Deficit di glutaril-CoA deidrogenasi   | GA I         |
| <b><i>Difetti del metabolismo degli aminoacidi</i></b>     |  |              |
| Fenilchetonuria  |  | PKU          |
| Tirosinemia tipo I   | Deficit di fumaril-acetoacetato idrolasi<br>Tirosinemia epatorenale<br>Tirosinemia ereditaria<br>Tirosinosi  | TYR I        |
| Malattia delle urine a sciroppo d'acero                    | Chetoaciduria a catene ramificate<br>Deficit di cheto-acido decarbossilasi<br>Deficit di alfa-chetoacido a catena ramificata deidrogenasi<br>Leucinosi | MSUD         |
| Argininemia  | Deficit di arginasi<br>Iperargininemia   | ARG          |
| Acidemia argininosuccinica                                 | Deficit di argininosuccinasi<br>Deficit di argininsuccinato liasi  | ASA          |
| Citrullinemia  | Deficit di argininosuccinato sintetasi<br>Deficit di acido argininsuccinico sintetasi  | CIT          |

*(continua a pagina successiva)*

## LE MALATTIE METABOLICHE EREDITARIE

**Tabella 2.1 (2/2):** Classificazione delle patologie che rientrano nello screening neonatale della Regione Veneto

| <b>Patologia</b>   | <b>Sinonimi</b>   | <b>Sigla</b>                            |
|--|---|---|
| <b><i>Difetti del metabolismo mitocondriale</i></b>  |   |   |
| Deficit dell'Acil CoA deidrogenasi a catena molto lunga  |   | VLCAD                                   |
| Deficit dell'idrossiacil CoA deidrogenasi a catena lunga   |   | LCHAD                                   |
| Deficit dell'acil CoA deidrogenasi a catena media  |   | MCAD                                    |
| Deficit dell'acil CoA deidrogenasi a catena corta  |   | SCAD                                    |
| Acidemia glutarica tipo II   | Deficit multiplo di deidrogenasi<br>Deficit di flavoproteina trasportatrice di elettroni<br>Deficit di flavoproteina trasportatrice di elettroni ubiquinone ossidoreduttasi | GA2                                     |
| Deficit di carnitina palmitoil-transferasi I   |   | CPT I                                   |
| Deficit di carnitina palmitoil-transferasi II  |   | CPT II                                  |
| Deficit carnitina/acilcarnitina translocasi  |   | CACT                                    |
| Deficit del trasporto della carnitina  | Deficit del trasportatore della carnitina<br>Difetto di captazione della carnitina  | CUD                                     |
| <b><i>Disordini lisosomiali</i></b>  |   |   |
| Malattia di Pompe  | Glicogenosi Tipo II   | GSD-II                                  |
| Malattia di Fabry  | Anginocheratoma diffuso<br>Deficit di alfa-galattosidasi A<br>Malattia di Anderson-Fabry  | MF                                      |
| Mucopolisaccaridosi tipo I<br>Sindrome di Hurler<br>Sindrome di Hurler- Scheie<br>Sindrome di Scheie | Deficit di alfa-L-iduronidasi   | MPS I<br>MPS I/H<br>MPS I/HS<br>MPS I/S |
| Mucopolisaccaridosi tipo II  | Malattia di Hunter<br>Deficit di iduronosolfatasi   | MPS II                                  |
| Mucopolisaccaridosi tipo VI  | Sindrome di Maroteaux-Lamy<br>Deficit di N acetilgalattosamina 4 solfatasi (arilsolfatasi b)  | MPS VI                                  |

Verranno trattate di seguito, particolarmente, le malattie metaboliche ereditarie oggetto del programma di screening neonatale allargato della Regione Veneto, fornendo maggiori dettagli sul meccanismo patogenetico, aspetti clinici e diagnostici, e sulle strategie terapeutiche.

### 2.2 I difetti del metabolismo degli acidi organici

#### 2.2.1 Acidurie organiche a catena ramificata

Gli aminoacidi essenziali a catena ramificata, Leucina, Isoleucina, Valina, sono transaminati a 2-oxo acidi e decarbossilati ossidativamente a formare derivati acil coenzima A (CoA) a catena ramificata. Isovaleril-CoA, derivato dalla Leucina; 2-metilbutiril-CoA, derivato dalla Isoleucina; e isobutiril-CoA, derivato dalla Valina, sono metabolizzati attraverso vie distinte ad intermedi, che entrano nel metabolismo generale. Difetti in queste vie metaboliche causano vari disordini metabolici noti come Acidurie organiche a catene ramificate.

In particolare, rientra fra i difetti degli enzimi della via catabolica dell'intermedio isovaleril-CoA, derivato dalla Leucina, l'acidemia isovalerica (IVA), la quale è causata da un deficit di isovaleril CoA-deidrogenasi. Il difetto enzimatico risulta in un accumulo di derivati di isovaleril-CoA, che includono acido isovalerico libero, di solito in concentrazioni aumentate particolarmente nel plasma e nelle urine (sebbene siano stati riportati livelli normali durante le fasi di remissione della malattia), il prodotto di coniugazione isovalerilglicina, la cui escrezione urinaria è aumentata durante gli episodi acuti ma è già molto alta in fase di remissione della patologia, l'acido 3-idrossiisovalerico, escreto nelle urine in quantità abnormi soltanto durante gli episodi acuti. La coniugazione con carnitina risulta nella formazione di isovalerilcarnitina, il cui elevato livello plasmatico è di considerevole importanza diagnostica.

L'acidemia propionica (PA) e l'acidemia metilmalonica (MMA) sono disordini della degradazione dell'acido propionico derivato in parte dal catabolismo degli aminoacidi essenziali Isoleucina, Valina, Metionina e Treonina. In particolare, il propionil-CoA è metabolizzato principalmente attraverso la conversione enzimatica a metilmalonil-CoA, da parte dell'enzima propionil-CoA carbossilasi, e, successivamente, isomerizzato a succinil-CoA, con coinvolgimento dell'enzima metilmalonil-CoA mutasi.

L'acidemia propionica, causata da una deficienza dell'enzima propionil-CoA carbossilasi, è caratterizzata da accumulo nel plasma e nelle urine di acido propionico libero e di altri derivati di propionil-CoA, fra questi propionilcarnitina, 3-idrossipropionato, e metilcitrato sono i principali metaboliti diagnostici.

L'acidemia metilmalonica isolata è dovuta ad una deficienza dell'enzima metilmalonil-CoA mutasi, un enzima vitamina-B12 dipendente. Il difetto enzimatico conduce ad un accumulo di acido metilmalonico nel plasma e nelle urine. A causa della inibizione secondaria dell'enzima propionil-CoA carbossilasi, la reazione di carbossilazione del propionil-CoA è infatti reversibile, anche il propionato ed altri metaboliti di propionil-CoA (propionilcarnitina, 3-idrossipropionato, metilcitrato) si accumulano nel sangue e nelle urine, sebbene il principale metabolita anormale in questa patologia sia rappresentato dal metilmalonato.

L'**acidemia isovalerica** presenta un'ereditarietà autosomica recessiva. La malattia può insorgere sia nel periodo neonatale come episodio acuto di grave acidosi metabolica e moderata chetosi con vomito, che può condurre a coma e morte, sia come forma cronica intermittente con episodi di acidosi metabolica a partire dal primo anno di vita. I pazienti che sopravvivono ad un episodio acuto neonatale vanno incontro allo sviluppo della forma cronica. Neutropenia, trombocitopenia, e pancitopenia, accompagnano spesso gli episodi acidotici. L'odore di "piedi sudati" dovuto all'acido isovalerico è di solito presente durante gli episodi acuti.

Il trattamento dietoterapico basato sulla restrizione di Leucina ed il trattamento con carnitina e/o glicina generalmente consente uno sviluppo normale a meno che non siano intervenuti danni neurologici permanenti durante la presentazione iniziale della patologia.

L'**acidemia propionica** insorge nella maggior parte dei casi in forma acuta neonatale, con letargia, vomito, difficoltà di alimentazione, ipotonia, in presenza di grave chetoacidosi metabolica (che richiede una vigorosa terapia alcalinizzante); iperammoniemia, disidratazione, convulsioni, epatomegalia, sono meno costanti. Altri pazienti hanno presentato più tardivamente chetoacidosi episodica, oppure encefalopatia acuta. Oltre agli scompensi metabolici acuti, le complicanze principali comprendono sequele neurologiche severe come atrofia cerebrale, convulsioni, ritardo mentale, comparsa di movimenti extrapiramidali, osteoporosi, pancreatite e cardiomiopatia.

Al trattamento dietetico basato sulla restrizione delle proteine si associa quello farmacologico, che consiste nella somministrazione di carnitina, e, recentemente, nella terapia orale antibiotica a base di metronidazolo, allo scopo di eliminare i batteri intestinali produttori di propionato.

L'acidemia propionica è un disordine autosomico recessivo che può essere causato da mutazioni nei geni PCCA o PCCB che codificano per le subunità  $\alpha$  e  $\beta$ , rispettivamente, dell'enzima propionil-CoA carbossilasi. La conoscenza delle correlazioni fenotipo-genotipo potrebbe fornire importanti informazioni per predire i futuri outcome metabolici e per l'implementazione di trattamenti personalizzati.

L'**acidemia metilmalonica isolata**, resistente alla vitamina B12, ha un'insorgenza clinica acuta neonatale o nei primi mesi, con vomiti, ipotonia, ritardo psicomotorio, episodi di chetoacidosi. Per quanto riguarda le possibili complicanze, va segnalato in primo luogo il rischio di insufficienza renale cronica, comparsa di segni extrapiramidali, particolarmente distonia, osteoporosi, cardiomiopatia e pancreatite.

Il trattamento consiste in una dieta ipoproteica rigida, associata anche alla somministrazione di carnitina e di terapia antibiotica a base di metronidazolo, come per l'acidemia propionica.

L'acidemia metilmalonica è un disordine ereditario dovuto ad un deficit di attività dell'enzima metilmalonil-CoA mutasi, che può essere causato da mutazioni a livello di molti differenti loci genici. La deficienza isolata risulta da mutazioni a livello del locus MUT, che codifica per l'apoenzima metilmalonil-CoA mutasi, causando una parziale, mut(-), o completa, mut (0), deficienza (forma non responsiva alla vitamina B12) oppure da mutazioni a livello dei due loci genici MMAA e MMAB richiesti per la biosintesi del suo cofattore, 5-deossiadenosilcobalamina (AdoCbl). Si ritiene che il prodotto genico di MMAA abbia un coinvolgimento nella traslocazione della cobalamina nei mitocondri per la sintesi di AdoCbl, mentre il prodotto genico di MMAB sia la cobalamina adenosiltransferasi. I due corrispondenti difetti nella biosintesi di AdoCbl, designati rispettivamente CblA e CblB, saranno descritti di seguito, fra i difetti del metabolismo intracellulare della Cobalamina (Scriver et al. 2001).

### **2.2.2 Difetti del metabolismo intracellulare della Cobalamina**

La cobalamina è una vitamina idrosolubile contenente cobalto. Le forme metabolicamente attive sono la metil- e l'adenosilcobalamina. Come metilcobalamina (MeCbl), agisce come cofattore dell'enzima metionina sintasi che interviene nella reazione di remetilazione dell'omocisteina nella metionina. Come adenosilcobalamina

(AdoCbl), agisce come cofattore dell'enzima mitocondriale metilmalonilCoA-mutasi, sopra menzionato.

Due disordini nella sintesi di AdoCbl, denominati CblA e CblB, sono associati con difetti funzionali a carico dell'enzima metilmalonilCoA-mutasi e sono caratterizzati da un quadro clinico e biochimico simile a quello visto nei pazienti con deficienza dell'enzima metilmalonilCoA-mutasi. Nella maggior parte dei pazienti affetti da CblA e CblB, supplementi farmacologici di cianocobalamina o idrossicobalamina comportano una riduzione dell'accumulo di metilmalonato, offrendo un valido supporto alla terapia dietetica basata sulla restrizione di proteine.

Altri tre disordini distinti nella formazione sia di AdoCbl sia di MeCbl, denominati CblC, CblD, CblF, sono associati con difetti funzionali sia della metilmalonilCoA-mutasi sia della metionina sintasi, e presentano aciduria metilmalonica e omocistinuria. L'aciduria metilmalonica in questi pazienti è caratteristicamente meno severa di quella sviluppata nei pazienti con deficienza isolata dell'enzima mutasi.

Il disordine CblF è dovuto a un deficit del rilascio lisosomiale della Cbl, dopo il suo legame con la transcobalamina II. Il preciso difetto nei disordini CblC e CblD non è ancora chiarito, tuttavia coinvolge un passaggio iniziale del metabolismo intracellulare della Cbl, ossia la riduzione citosolica dello stato di ossidazione  $3^+$  del cobalto centrale della Cbl, dopo efflusso della Cbl dai lisosomi. Come risultato, viene ostacolata la formazione sia di AdoCbl sia di MeCbl, e quindi il legame della Cbl ai due enzimi intracellulari.

Il difetto CblC, relativamente più frequente rispetto agli altri disordini del gruppo, insorge mediamente nel primo mese di vita con ipotonia, scarsa crescita, microcefalia, convulsioni, coma, e anomalie ematologiche come anemia megaloblastica, trombocitopenia, leucopenia, e neutropenia, e può talora manifestarsi come patologia multisistemica con insufficienza renale, miocardiopatia, retinopatia e sindrome emolitica-uremica.

Clinicamente, i pazienti con difetto CblC risultano più gravemente affetti del gruppo CblD, sebbene siano stati riportati casi di CblC, con esordio più tardivo della malattia, durante l'infanzia o l'adolescenza, con manifestazioni neurologiche che includono confusione, disorientamento, riduzione delle performance cognitive, mentre le anomalie ematologiche sono state riscontrate soltanto in metà di questi pazienti.

La terapia include dieta ipoproteica, dosi farmacologiche di idrossicobalamina, e supplementazione di betaina (Scriver et al. 2001).

### **2.2.3 L'aciduria glutarica tipo I**

L'acido 2-chetoadipico, un prodotto intermedio nel metabolismo della L-lisina, idrossi-L-lisina e L-triptofano subisce successive decarbossilazioni ossidative da parte di 2-chetoadipico deidrogenasi e glutaril-CoA deidrogenasi per formare rispettivamente glutaril-CoA e crotonil-CoA.

Il deficit di 2-chetoadipico deidrogenasi causa l'acidemia 2-chetoadipica, una condizione caratterizzata dall'accumulo e dall'escrezione di acido 2 chetoadipico, 2-aminoadipico, 2-idrossiadipico, probabilmente senza effetti avversi sul fenotipo.

Il deficit di glutaril-CoA deidrogenasi è alla base dell'acidemia glutarica tipo I (GA1), una malattia caratterizzata dal punto di vista clinico da distonia e discinesia, che compaiono durante i primi anni di vita.

Glutaril-CoA deidrogenasi (GCD) è un enzima mitocondriale chiave nella via catabolica degli aminoacidi L-triptofano, L-lisina e L-idrossilisina, che catalizza la trasformazione di glutaril-CoA in crotonil-CoA. La GCD è caratterizzata biochimicamente dall'accumulo di acido glutarico bicarbonico, 3-idrossiglutarico, acido glutaconico e glutarilcarnitina. Clinicamente la malattia è caratterizzata da una specifica neuropatologia, solo eccezionalmente si presenta con una sintomatologia metabolica classica, comprendente l'ipoglicemia o l'acidosi. Particolarmente rilevante è la degenerazione neuronale a livello di putamen e caudato. La TAC e la RMN dimostrano spesso atrofia frontotemporale e/o cisti aracnoidi, anche prima dell'insorgenza dei sintomi.

Il deficit di glutaril-CoA deidrogenasi presenta un'ereditarietà autosomica recessiva. La maggior parte dei pazienti GA1 è eterozigote per due diversi alleli mutati.

Il danno striatale e il fenotipo neurologico non si sviluppano in tutti i pazienti in modo uguale e c'è evidenza che la supplementazione precoce con L-carnitina, il trattamento aggressivo di infezioni intercorrenti con apporto di liquidi, glucosio ed insulina, e la restrizione dietetica di lisina e triptofano possano prevenire il danno neurologico in una buona parte dei casi (Scriver et al. 2001).

## 2.3 I difetti del metabolismo degli aminoacidi

### 2.3.1 Iperfenilalaninemia: deficienza di fenilalanina idrossilasi

Si definisce iperfenilalaninemia una condizione caratterizzata da un livello plasmatico di fenilalanina superiore a 120  $\mu\text{M}$  (cioè superiore a 2 mg/dl).

Le iperfenilalaninemie sono oggi considerate come fenotipi eterogenei causati da mutazioni a livello di geni codificanti enzimi coinvolti nel metabolismo della fenilalanina; questa viene idrossilata a tirosina a livello epatico, dall'enzima fenilalanina-idrossilasi (PAH) che richiede come cofattore la tetraidrobiopterina (BH<sub>4</sub>). Nella reazione di idrossilazione, la BH<sub>4</sub> viene ossidata a diidrobiopterina e poi nuovamente ridotta dalla diidropteridina-reduttasi (DHPR). Per la sintesi del cofattore BH<sub>4</sub> sono necessari gli enzimi guanosina-trifosfato-cicloidrolasi (GTP-CH) e la piruvolo-tetraidropterina-sintetasi (PTS).

Il deficit di fenilalanina-idrossilasi è la causa più comune di iperfenilalaninemia. Esso si trasmette con modalità autosomica recessiva. In aggiunta alla fenilchetonuria (PKU) o iperfenilalaninemia tipo I, il deficit di fenilalanina-idrossilasi può causare la iperfenilalaninemia persistente lieve o tipo II, e la forma persistente benigna o tipo III. Queste forme sono caratterizzate da un'attività residua di PAH maggiore rispetto al tipo I, da cui differiscono anche per la prognosi e l'approccio terapeutico. Il fenotipo clinico è correlato con i livelli di fenilalanina nel plasma, riflettendo il grado di deficienza dell'enzima PAH.

Nella forma classica di iperfenilalaninemia, o fenilchetonuria, l'errore metabolico consiste nel deficit dell'enzima PAH che trasforma la fenilalanina in tirosina. Questo blocco determina un aumento della fenilalanina plasmatica e dei suoi metaboliti urinari (acido fenilpiruvico, fenilattico, e fenilacetico), riduzione della tirosina plasmatica, diminuzione della sintesi di melanina, riduzione dei livelli plasmatici di 5-idrossitriptofano, dopamina e GABA.

I sintomi clinici della fenilchetonuria si manifestano in genere dopo i primi 4-6 mesi di vita. La fenilchetonuria è causa di ritardo mentale che può essere prevenuto quando la malattia è diagnosticata e trattata precocemente. Oggi, l'impiego diffuso dello screening neonatale di massa con il test di Guthrie o con cromatografia ha portato ad una riduzione del ritardo mentale nei soggetti fenilchetonurici.

## LE MALATTIE METABOLICHE EREDITARIE

I soggetti che non sono stati trattati in epoca precoce perché non sottoposti allo screening neonatale di massa o per errori di diagnosi, dal punto di vista clinico presentano un ritardo mentale molto grave e turbe del comportamento consistenti principalmente in irrequietezza, eccessiva irritabilità, crisi di ira; talvolta, ma piuttosto raramente, possono presentare un quadro riferibile a sindrome autistica. Si segnalano anche microcefalia, alterazioni aspecifiche dell'EEG, grave deficit del linguaggio, segni piramidali con incrementato tono muscolare, iperreflessia, sintomi parkinsoniani.

L'origine del grave ritardo psichico che affligge i pazienti fenilchetonurici può essere indicata nell'azione competitiva che gli elevati livelli di fenilalanina svolgono sul trasporto intracellulare di altri aminoacidi, in particolare tirosina e triptofano, diminuendone la disponibilità a livello del SNC e rendendo insufficienti i livelli disponibili dei neurotrasmettitori da essi derivati come serotonina, GABA e dopamina.

Nel primo anno di vita sono presenti per lo più manifestazioni cutanee di tipo eczematoso, inoltre può essere presente un colorito della cute, dei capelli e degli occhi più chiaro rispetto alla norma. Le urine hanno un particolare odore di muffa. Sono frequenti le crisi convulsive molto spesso tipo spasmi infantili: quando presenti, le crisi convulsive sono difficilmente trattabili. Soggetti tardivamente sottoposti a dietoterapia continuano a presentare un ritardo psicomotorio, ma le turbe comportamentali si riducono di intensità.

La diagnosi di fenilchetonuria si basa sul riscontro di:

- elevata fenilalanina (>2 mg/dl), con bassi livelli di tirosinemia; tale valutazione è effettuabile in prima istanza con un test di inibizione microbiologica (test di Guthrie, utilizzato nello screening neonatale) e quindi con cromatografia su colonna a scambio ionico;
- iperfenilalaninemia (superiore a 2 mg/dl), persistente 48-72 ore dopo carico orale di fenilalanina (180 mg/Kg);
- pressoché assente attività dell'enzima fenilalanina-idrossilasi epatica.

Un tempestivo e corretto intervento terapeutico evita le gravi alterazioni neurologiche e psichiche. Esso si basa sul trattamento dietetico, con apporto limitato di fenilalanina. Tale apporto deve essere comunque garantito, sebbene in minima quantità, essendo la fenilalanina un aminoacido essenziale per l'organismo. Si segnala inoltre recentemente

la terapia con BH4 nelle forme di PKU lievi, che rispondono al trattamento, il cui razionale d'uso consiste nel potenziamento dell'attività enzimatica residua.

Come già accenato all'inizio, la tetraidrobiopterina è cofattore dell'enzima PAH. Un deficit di BH4 comporta pertanto l'instaurarsi di una condizione di iperfenilalaninemia caratterizzata da progressivo e grave danno neurologico e psicomotorio. L'incidenza di tali forme, dette anche iperfenilalaninemie atipiche, è valutata pari all'1-3% di tutti i neonati iperfenilalaninemici. Il grave quadro encefalopatico che si presenta riconosce come meccanismo patogenetico la mancata produzione dei precursori dei neurotrasmettitori monoaminergici determinata dall'assenza della BH4, cofattore delle idrossilasi della tirosina, del triptofano e della fenilalanina. Non risponde alla terapia dietetica ma bensì alla somministrazione di BH4 ed in alcuni casi di neurotrasmettitori. (Scriver et al. 2001; Pavone e Ruddieri 2006)

### **2.3.2 Tirosinemia**

La L-tirosina è un aminoacido ottenuto dal nostro organismo attraverso due fonti, dieta ed idrossilazione della fenilalanina. La degradazione della tirosina avviene principalmente nel citoplasma degli epatociti; è un aminoacido sia glucogenico che chetogenico, poiché il suo catabolismo risulta nella formazione di fumarato ed acetoacetato. Il primo passaggio del catabolismo della tirosina è la conversione in 4-idrossifenilpiruvato catalizzata dall'enzima tirosina-aminotransferasi citosolica. In certe condizioni, la velocità di degradazione della tirosina è determinata dall'attività della tirosina-aminotransferasi. La transaminazione della tirosina può anche avvenire nel fegato ed in altri tessuti da parte della aspartato-aminotransferasi mitocondriale, tuttavia questo enzima gioca un ruolo minore in condizioni normali. I penultimi intermedi derivati dal catabolismo della tirosina, maleilacetoacetato e fumarilacetoacetato, possono essere ridotti a succinilacetoacetato, seguito dalla decarbossilazione a succinilacetone. Quest'ultimo derivato è il più potente inibitore noto dell'enzima acido 5-aminolevulinico deidratasi, coinvolto nella biosintesi dell'eme.

La maggior parte dei difetti enzimatici ereditari del catabolismo della tirosina conducono ad ipertirosinemia.

## LE MALATTIE METABOLICHE EREDITARIE

In particolare, la tirosinemia epatorenale detta anche **tirosinemia ereditaria di tipo I** è una malattia autosomica recessiva causata da un difetto dell'enzima fumarilacetoacetato idrolasi (FAH), ed è caratterizzata da grave alterazione epatica con quadri di cirrosi epatica macronodulare.

L'ipertirosinemia è presente nella maggior parte dei pazienti non trattati. La presenza di elevati livelli di succinilacetone nel plasma o nelle urine ha valore diagnostico per questa condizione.

In base alla differente età di comparsa dei sintomi clinici (che rappresenta un importante indicatore prognostico) si possono riconoscere:

- forme precocissime (prima dei 2 mesi di età);
- forme precoci (tra 2-6 mesi);
- forme a presentazione tardiva (dopo 6 mesi di età).

I sintomi clinici si presentano altamente variabili ed includono insufficienza epatica acuta, cirrosi, carcinoma epatocellulare, tubulopatia renale (Sindrome di Fanconi), sintomi di neuropatia periferica.

Nella forma a presentazione precoce e soprattutto tardiva prevale un quadro clinico caratterizzato da cirrosi epatica ingravescente con possibile evoluzione in epatocarcinoma, splenomegalia, nefropatia con rachitismo vitamina D resistente. Inoltre, sono stati descritti sintomi neurologici (atassia), spasmi e crisi ipertensive. Le urine emanano odore di cavolo.

La maggior parte dei pazienti mostra una parziale risposta alla restrizione dietetica di fenilalanina e tirosina. Recentemente è stata introdotta una terapia a base di NTBC (Nitisinone), un inibitore enzimatico che previene la formazione dei precursori di succinilacetone, attraverso l'inibizione della 4-idrossifenilpiruvato diossigenasi, i cui risultati sono stati incoraggianti quando associato anche alle dovute restrizioni alimentari (i pazienti trattati non hanno sviluppato crisi acute epatiche e neurologiche), tuttavia i dati disponibili non permettono conclusioni sul rischio a lungo termine di carcinoma epatocellulare nei pazienti trattati con il farmaco.

Il trapianto di fegato, quale possibilità terapeutica per la cura delle manifestazioni epatiche e per prevenire ulteriori crisi neurologiche, non è più necessario nella maggior parte dei pazienti trattati precocemente. (Scriver et al. 2001; Pavone e Ruddieri 2006)

### 2.3.3 Malattia delle urine a sciroppo d'acero (Leucinosi, MSUD)

La malattia delle urine a sciroppo d'acero è causata da un deficit funzionale del complesso  $\alpha$ -chetodeidrogenasi a catena ramificata (BCKD). Il blocco metabolico risulta nell'accumulo degli acidi a catena ramificata leucina, isoleucina e valina e i corrispondenti  $\alpha$ -cheto acidi a catena ramificata (Scriver et al. 2001).

Quando il paziente si presenta con sintomatologia clinica, si può fare facilmente diagnosi con l'analisi degli aminoacidi o con il profilo degli acidi organici. I BCAAs sono notevolmente aumentati nel sangue, nel liquido cerebrospinale e nelle urine, e la presenza di alloisoleucina è patognomonica per la MSUD.

Si tratta di un disturbo autosomico recessivo che presenta molte forme di espressioni fenotipiche.

Sulla base della modalità di presentazione clinica e della risposta biochimica alla somministrazione di tiamina, i pazienti con malattia delle urine a sciroppo d'acero (MSUD) possono essere ripartiti in cinque fenotipi clinici e biochimici: la malattia classica, quella intermedia, quella intermittente, quella tiamino-sensibile e quella con deficit di diidrolipoil-deidrogenasi (E3). L'attribuzione a ciascuna categoria dei casi riportati in letteratura è talora difficile, per la mancanza di criteri uniformi di classificazione.

La **forma classica** rappresenta la più grave e la più comune forma di questa malattia. I livelli di aminoacidi ramificati (BCCA), particolarmente della leucina, sono molto aumentati nel sangue, nel liquido cerebrospinale e nelle urine, e la presenza di alloisoleucina. I neonati affetti appaiono normali alla nascita, e i sintomi si sviluppano di solito tra i 4 e i 7 giorni di vita. L'allattamento materno può procrastinare l'esordio fino alla seconda settimana di vita. I primi segni sono la letargia e la suzione debole con scarso interesse per il cibo. A ciò seguono perdita di peso e segni neurologici progressivi di ipertonia e ipotonia alternate con estensione distonica degli arti superiori che ricorda la postura decerebrata. A questo punto diventano evidenti la chetosi e il tipico odore da sciroppo d'acero o da zucchero bruciato. È stata descritta ipoglicemia, che non è però una caratteristica fondamentale. Ne derivano convulsioni e coma, che possono portare a morte se non trattate. Occasionalmente si sono osservati turgore della fontanella e pseudotumor cerebri.

I pazienti con la **forma intermedia** di MSUD presentano un aumento persistente dei BCCA e disabilità neurologiche, ma non hanno una condizione clinica disastrosa nel periodo neonatale. Molti non hanno episodi acuti di scompenso metabolico. L'attività enzimatica residua nella MSUD intermedia è di solito maggiore che nella forma classica, e varia dal 3 al 30% del normale. Al momento attuale, sono stati descritti circa 20 pazienti con MSUD intermedia. La maggior parte di essi ha avuto la diagnosi tra i 5 mesi e i 7 anni, in occasione di valutazioni per ritardo di crescita e/o per convulsioni. Alcuni hanno avuto episodi di chetoacidosi, ma un'encefalopatia acuta si è sviluppata raramente. Tre pazienti hanno esordito con oftalmoplegia nel periodo neonatale.

I pazienti con la **forma intermittente** di MSUD hanno uno sviluppo precoce normale, con crescita ed intelligenza normali. Essi, tuttavia, sono a rischio di scompenso metabolico acuto in situazioni di stress. Mentre sono asintomatici, i parametri di laboratorio, compresi i BCCA plasmatici, sono normali. L'attività del complesso  $\alpha$ -chetoacidodeidrogenasi (BCKD) in questi pazienti varia dal 5 al 20% del normale. Vi sono molti casi descritti di pazienti con MSUD intermittente. I primi sintomi appaiono di solito tra i 5 mesi e i 2 anni, in associazione con un'otite media o altre infezioni, ma possono comparire più tardi, alla quinta decade di vita. Episodi di modificazioni acute del comportamento e di instabilità alla marcia possono evolvere in convulsioni e in stupor o coma. Una diagnosi corretta è importante per prevenire gli attacchi ricorrenti.

È stato descritto un certo numero di pazienti con apparente malattia **tiamino-sensibile**. La mancanza di criteri uniformi nei trial terapeutici rende difficile stabilire il grado di dipendenza dalla tiamina e confrontare i pazienti tra loro. In generale, questi pazienti non hanno malattia acuta neonatale, e il decorso clinico iniziale è simile a quello della MSUD intermedia.

Il deficit di **deficit di diidrolipoil-deidrogenasi (E3)** è molto raro: ne sono stati descritti meno di 20 casi. Il fenotipo clinico è simile a quello della MSUD intermedia, ma è accompagnato da grave acidosi lattica. I pazienti con deficit di E3, nei primissimi anni di vita, sono relativamente normali, anche se in due pazienti è stata descritta una modesta acidosi metabolica neonatale di breve durata (Scriver et al. 2001).

I cardini della gestione dietetica sono la normalizzazione della concentrazione ematica di BCAAs tramite riduzione dell'introduzione di questi tre aminoacidi essenziali (leucina, isoleucina e valina), provvedendo nel contempo ad una nutrizione adeguata a

garantire la crescita e lo sviluppo dei piccoli pazienti. La terapia dietetica dovrebbe continuare per tutta la vita del paziente.

Dosi farmacologiche di tiamina, da 10 a 1000 mg /die, insieme ad una moderata restrizione dell'introito proteico, possono essere efficaci nel prevenire gli episodi di chetoacidosi nei pazienti con MSUD tiamino-sensibile (Scriver et al. 2001).

### **2.3.4 Disordini del ciclo dell'urea**

Il catabolismo degli aminoacidi conduce alla formazione di ammonio libero, altamente tossico per il sistema nervoso centrale. L'ammonio viene detossificato ad urea attraverso una serie di reazioni note come ciclo di Krebs-Henseleit o ciclo dell'urea. Per la sintesi di urea sono necessari cinque enzimi: carbamilfosfato sintetasi (CPS), ornitina transcarbamilasi (OTC), argininsuccinato sintetasi (AS), argininsuccinato liasi (AL), ed arginasi. Un sesto enzima, N-acetilglutammato sintetasi, è inoltre richiesto per la sintesi di N-acetilglutammato, il quale è un attivatore dell'enzima carbamilfosfato sintetasi (CPS) (Nelson, Textbook of Pediatrics, XVI Edition, 2000).

La presentazione clinica dei pazienti con i difetti del ciclo dell'urea è praticamente identica, ma esiste una grande variabilità all'interno e fra queste malattie. Le manifestazioni cliniche possono comparire nel periodo neonatale, ed essere fatali, o in seguito, con gradi diversi di gravità. La somiglianza della presentazione clinica è dovuta all'iperammoniemia, comune a tutte queste malattie. La variabilità è presumibilmente una funzione della diversità delle mutazioni responsabili, e quindi del diverso grado di attività enzimatica. La variabilità, per quanto riguarda la gravità, può anche essere dovuta ad altri fattori genici, così come a conseguenze metaboliche dei vari deficit enzimatici; per esempio, il deficit di AL, simile per gravità al deficit di OTC, può non causare una malattia grave perché argininosuccinato, sintetizzato ex novo, può essere un prodotto del catabolismo azotato. Un'eccezione a questa regola generale si verifica nelle femmine portatrici di un allele OTC mutato su un cromosoma X; la variabilità nell'espressione in tali femmine è correlata anche alla proporzione di epatociti nei quali l'allele normale (o mutato) si trova sul cromosoma X attivo. Le altre malattie -deficit di CPS, AS e AL - sono ereditate come condizioni autosomico recessive. Tali malattie possono essere distinte l'una dall'altra solo attraverso appropriati esami di laboratorio; l'evidenza di trasmissione legata all'X suggerisce la presenza di deficit di OTC. Il deficit

di AL ha due caratteristiche distintive: epatomegalia grave, nella forma ad insorgenza precoce, ed alterazioni dei capelli (tricoressi nodosa) nella forma ad insorgenza tardiva. Alterazioni dei capelli simili sono state descritte anche nel deficit di AS.

A causa della drammatica presentazione clinica di queste malattie nel periodo neonatale e a causa delle conseguenze a lungo termine dell'iperammoniemia neonatale, è utile suddividere i difetti del ciclo dell'urea in due gruppi clinici: un gruppo con presentazione nel periodo neonatale ed un secondo con presentazione non nel periodo neonatale. Comunque, bisogna riconoscere che questa è una suddivisione arbitraria, imposta dalla presenza di mutazioni differenti e da altri fattori genomici, di uno spettro continuo di malattia.

Il gruppo ad **insorgenza neonatale** presenta un decorso clinico monotono nella sua regolarità. Il bambino, quasi sempre nato al termine di una gravidanza normale, senza alcun fattore di rischio prenatale o perinatale, con travaglio e parto normali, appare sano per almeno 24 ore. Tra le 24 e le 72 ore (occasionalmente molti giorni dopo) il bambino diventa letargico e necessita di stimoli per alimentarsi. Nel giro di ore possono comparire segni e sintomi aggiuntivi, quali vomito, letargia ingravescente ed ipotermia. Nonostante la rarità dell'evento sepsi nel decorso clinico di un bambino a termine senza apparenti fattori di rischio, una diagnosi sbagliata di sepsi è effettuata nella metà dei casi.

Il rilievo laboratoristico iniziale di alcalosi respiratoria (l'indicazione oggettiva più precoce di encefalopatia ed un rilievo costante nell'iperammoniemia neonatale prima dell'insorgenza di problemi emodinamici) spesso non viene riconosciuto. Altri dati di laboratorio di routine spesso non aggiungono altre informazioni, ad eccezione del livello sierico di azoto ureico, che può essere di 1 mg/dl. Senza trattamento l'encefalopatia progredisce e richiede la ventilazione meccanica. Viene spesso presa in considerazione la diagnosi di emorragia intracranica, se si nota una fontanella sporgente od un aumento di volume della testa; comunque, la TAC cerebrale rivela la presenza di edema. Se non è misurato il livello di ammonio plasmatico, la morte del neonato può essere attribuita a sepsi, emorragia intracranica o altre malattie comunemente associate alla prematurità, anche se il paziente è un neonato nato a termine. Purtroppo, spesso viene tralasciata la storia familiare. La presenza di consanguineità, di morti nel periodo

neonatale di fratelli o sorelle, l'analisi dell'albero genealogico sono dati frequentemente omessi, per poi essere scoperti dopo che la diagnosi viene effettuata.

Il riscontro di un aumento dei livelli plasmatici di ammonio indirizza la diagnosi verso un errore congenito del metabolismo. La diagnosi differenziale dell'iperammoniemia nel neonato è limitata ai deficit degli enzimi del ciclo dell'urea, ad un numero elevato di acidemie organiche, all'iperammoniemia transitoria del neonato (una malattia poco conosciuta caratterizzata da malattia sintomatica polmonare nelle prime 24 ore di vita ed iperammoniemia grave), ad herpes simplex.

Combinando le caratteristiche cliniche con i valori di aminoacidi plasmatici e l'escrezione urinaria di orotato, è possibile distinguere l'iperammoniemia transitoria del neonato, le acidemie organiche (come gruppo) e i singoli difetti del ciclo dell'urea.

Esistono alcune pubblicazioni che cercano di descrivere il fenotipo provocato dal deficit di NAG sintetasi; esse, tuttavia, non forniscono una descrizione chiara del fenotipo clinico o biochimico. Le principali caratteristiche riportate comprendono iperammoniemia grave, iperammoniemia lieve associata paradossalmente ad encefalopatia grave, diarrea ricorrente ed acidosi, disturbi del movimento, ipoglicemia, iperornitinemia, livelli plasmatici di arginina e citrullina inaspettatamente normali, così come il contenuto epatico di NAG. La diagnosi si basa sul saggio dell'attività dell'enzima epatico.

Nel **gruppo ad insorgenza tardiva**, tra le quattro malattie - deficit di CPS, OTC, AS e AL - esistono altre differenze fenotipiche, a parte le alterazioni dei capelli nel deficit di AL e forse anche nel deficit di AS (l'epatomegalia non sembra essere, nel deficit di AL ad insorgenza tardiva, un segno così costante come nella forma neonatale) e raramente la cristalluria acido orotica nel deficit di OTC. La variabilità, per quanto riguarda l'età di insorgenza, la gravità ed il grado di attività enzimatica residua, è simile tra i deficit dei quattro enzimi; esistono casi che si possono presentare dal primo anno di vita all'età adulta.

Il grande numero di ragazze nel gruppo ad insorgenza tardiva è una conseguenza del deficit sintomatico di OTC nelle femmine, nelle quali l'allele mutato è espresso nel cromosoma X attivo nella maggior parte degli epatociti. La variabilità nell'espressione fenotipica nelle femmine è piuttosto ampia. Nei neonati tali episodi possono essere associati allo svezzamento dal latte materno o al passaggio dalla formula proteica al

latte vaccino; nei bambini più grandi e negli adulti i sintomi possono essere correlati a pasti ad alto contenuto proteico. In tutti i pazienti le infezioni possono precipitare i sintomi, nonostante frequentemente un episodio possa verificarsi senza alcuna causa evidente. Gli episodi più lievi si risolvono spesso con l'interruzione dell'introito di proteine o con l'infusione intravenosa di glucosio. Molti di questi pazienti scelgono una dieta a basso contenuto proteico. Deve essere sottolineato che i pazienti con disturbi del ciclo dell'urea nei quali si sviluppa iperammoniemia, raramente presentano improvvisamente manifestazioni neurologiche quali apnea, crisi epilettiche o perdita di coscienza, a meno che non abbiano avuto danni cerebrali durante precedenti episodi di iperammoniemia. Piuttosto, l'iperammoniemia si manifesta con la comparsa, nel giro di alcuni giorni, di segni e sintomi attribuiti alla corteccia cerebrale, solo dopo i quali possono manifestarsi crisi epilettiche o altre manifestazioni neurologiche improvvise.

I sintomi principali di tali episodi di iperammoniemia comprendono vomito, alterazioni dello stato mentale manifestantisi con letargia, sonnolenza progressiva, irritabilità, agitazione, aggressività, disorientamento, atassia, ambliopia. Crisi epilettiche, ritardi di crescita e di sviluppo sono comuni, nonostante siano stati riportati casi di sviluppo normale. A parte l'iperammoniemia, gli esami di laboratorio di routine spesso rivelano un'alcalosi respiratoria, segno precoce di encefalopatia. Il ritardo e l'errore nella diagnosi sono comuni; il ritardo medio nella diagnosi è di 16 mesi. I sintomi possono essere attribuiti a colica, gastroenterite, vomito ricorrente, iperattività, encefalite, sindrome di Reye, epilessia, epatite anitterica, reazione a farmaci, glioma, abuso.

Fra le portatrici asintomatiche, alcune sono a rischio di sviluppare iperammoniemia sintomatica nel periodo del postpartum. Da quattro ad otto giorni dopo una gravidanza ed un periodo perinatale normali, può svilupparsi un tipico episodio di encefalopatia iperammoniemica che, se non trattato, determina edema cerebrale grave, compressione del tronco cerebrale e morte. (Scriver et al. 2001).

Le manifestazioni cliniche del **deficit di arginasi** sono molto diverse da quelle dei deficit di CPS, AS e ALD. I sintomi principali, tutti progressivamente ingravescenti, comprendono tetraplegia spastica, che colpisce di più gli arti inferiori rispetto ai superiori, crisi epilettiche, ritardo psicomotorio, iperattività, difficoltà di crescita, e, riportata in un caso, atetosi.

Può verificarsi che l'iperammoniemia sintomatica progredisca verso l'encefalopatia, ma, in questi caso, i livelli plasmatici di ammonio sono da tre a quattro volte i valori normali, raramente anche sei volte i valori normali. Nonostante esista variabilità fenotipica, con alcuni casi presumibilmente asintomatici a quattro anni di età, un'accurata analisi dei casi riportati suggerisce che le manifestazioni cliniche si verificano precocemente durante il primo anno di vita; esse comprendono irritabilità, pianto inconsolabile, anoressia, vomito, e tappe di sviluppo acquisite con ritardo. (Scriver et al. 2001).

Lo scopo della terapia dei difetti del ciclo dell'urea è di fornire una dieta con apporto sufficiente di proteine, arginina, ed energia per la crescita e lo sviluppo ed allo stesso tempo prevenire i disturbi metabolici, iperammoniemia e iperglutaminemia, associati a queste malattie. A questo scopo vengono impostate diete a basso contenuto proteico, diete con aminoacidi essenziali od una combinazione di aminoacidi essenziali e molti dei loro analoghi privi di azoto, da monitorare individualmente sulla base dei valori di ammoniemia e delle curve di crescita, onde evitare l'instaurarsi di stati di malnutrizione e di disturbi dell'accrescimento. Al trattamento dietoterapico viene associato quello farmacologico attraverso la somministrazione di L-arginina, la L-citrullina rappresenta un'alternativa valida nei casi di grave deficit di OTC/CPS (elimina un ulteriore gruppo azotato). Inoltre sono impiegati sodio benzoato e sodio fenilbutirrato i quali favoriscono l'attivazione delle vie alternative dell'escrezione azotata (Scriver et al. 2001).

### **2.4 I disordini del metabolismo mitocondriale**

#### **2.4.1 Disordini dell'ossidazione degli acidi grassi**

La beta-ossidazione mitocondriale gioca un ruolo fondamentale nella produzione di energia, soprattutto durante periodi di digiuno prolungato. Il percorso è complesso e include circa 20 passaggi tra cui l'uptake cellulare di acidi grassi, la loro attivazione in esteri acil-CoA, la transesterificazione in acilcarnitine, la traslocazione attraverso la membrana mitocondriale, la riesterificazione in esteri acil-CoA, la beta-ossidazione intramitocondriale, via metabolica a spirale, generante elettroni che sono trasferiti alle flavoproteine trasportatrici di elettroni, e acetilCoA, che è convertito in corpi chetonici a

livello epatico. La spirale ossidativa ad ogni ciclo accorcia la catena carboniosa degli acidi grassi di due atomi di carbonio con formazione di acetyl-CoA. Gli elettroni liberatisi durante il ciclo ossidativo vengono trasferiti alla catena respiratoria mitocondriale per la formazione dell'ATP utilizzando sistemi FAD- e NAD- dipendenti. L'acetyl-CoA prodotto al termine della beta ossidazione è utilizzato nel fegato per la sintesi dei corpi chetonici (3-idrossibutirrato e acetoacetato) mentre nel tessuto muscolare entra direttamente nel ciclo degli acidi tricarbossilici con liberazione di CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O e formazione di ATP.

Difetti ereditari di almeno 11 proteine coinvolte in tale via sono stati identificati nell'uomo. Tra questi distinguiamo difetti a carico del ciclo della carnitina e difetti di enzimi coinvolti nel ciclo della beta-ossidazione (Scriver et al. 2001).

### **Il ciclo della carnitina**

Il ciclo della carnitina è costituito da una fase citoplasmatica e da una mitocondriale. Nella prima interviene il carrier specifico, sodio-dipendente, che favorisce il passaggio della carnitina attraverso la membrana plasmatica delle cellule del miocardio, del muscolo scheletrico e del tubulo renale. La fase mitocondriale invece è composta da una serie successiva di step enzimatici: l'enzima carnitina palmitoiltransferasi (CPT) I favorisce la formazione dell'acilcarnitina a livello della membrana mitocondriale esterna a partire dagli acidi grassi legati al coenzima-A; l'enzima carnitina-acilcarnitina translocasi (CAT) permette il passaggio dell'acilcarnitina dalla membrana alla matrice mitocondriale; l'enzima CPT II scinde il legame dell'acido grasso con la carnitina rigenerando all'interno della matrice mitocondriale gli esteri del coenzima-A.

Il **deficit del trasportatore della carnitina** si manifesta, generalmente, nella prima infanzia con una grave cardiomiopatia dilatativa associata a miopatia; raramente i pazienti presentano ipoglicemia ipochetotica mentre sono frequenti sintomi di tipo collassiale. Può essere presente una anemia, il tracciato elettrocardiografico mostra caratteristiche onde T appuntite e i livelli plasmatici della carnitina totale appaiono estremamente ridotti. La malattia risponde in maniera spettacolare al trattamento con carnitina (3-5 grammi al giorno) con completa risoluzione della sintomatologia.

Il **deficit di CPT 1** esordisce generalmente nei primi mesi di vita con un quadro di grave insufficienza epatica con ipoglicemia ipochetotica, in alcuni casi, associata ad

acidosi renale. Caratteristicamente i pazienti possono mostrare un'elevazione dei livelli plasmatici della carnitina.

Il **deficit di carnitina-acilcarnitina translocasi** rappresenta il difetto dell'ossidazione degli acidi grassi a prognosi più infausta: i pazienti manifestano fin dai primi giorni di vita una epatopatia con ipoglicemia ipochetotica associata ad iperammoniemia persistente. Sono presenti inoltre gravi disturbi del ritmo cardiaco che portano quasi sempre a morte entro il primo anno di vita.

Il **deficit di CPT 2** si presenta con due fenotipi distinti: una forma miopatica che esordisce in età adulta con mioglobinuria intermittente e una forma neonatale fatale con epatopatia, cardiomiopatia, ipotonia muscolare, spesso associata a malformazioni a livello renale e cerebrale (Scriver et al. 2001).

### **Il ciclo della beta ossidazione**

Quattro successivi passaggi enzimatici permettono il progressivo accorciamento della catena carboniosa degli acidi grassi, attivati come esteri del coenzima-A, per la produzione dell'acetil-CoA.

La prima tappa consiste nella ossidazione dell'acido grasso con formazione di un doppio legame ad opera di deidrogenasi FAD dipendenti; a seconda della lunghezza dell'acido grasso, intervengono quattro specifici isoenzimi (VLCAD, MCAD, SCAD).

Le tre tappe successive sono mediate dalla acil-CoA idratasi, dalla 3-idrossiacil-CoA deidrogenasi e dalla 3-chetoacil-CoA tiolasi; questi tre funzioni vengono svolte da un complesso multienzimatico chiamato proteina trifunzionale. Il ciclo ossidativo si ripete in maniera spiraliforme fino alla completa trasformazione dell'acido grasso in acetil-CoA. È importante sottolineare che gli acidi grassi a catena media e corta non necessitano per il loro ingresso all'interno dei mitocondri del sistema attivo di trasporto operato dalla carnitina.

Il **deficit di acil-CoA deidrogenasi a catena media (MCAD)** rappresenta la forma più comune dei difetti di ossidazione degli acidi grassi. La malattia è molto frequente nei paesi anglosassoni e negli Stati Uniti e colpisce prevalentemente individui di origine nord europea mentre è più rara nelle popolazioni provenienti dal sud dell'Europa. Il deficit di MCAD è una malattia che propriamente riguarda l'ossidazione epatica degli acidi grassi. La presentazione più comune è un episodio di grave ipoglicemia

ipochetotica scatenato dal digiuno e che generalmente si manifesta nei primi due anni di vita. Sono anche stati descritti casi di morte improvvisa del lattante (SIDS). L'accumulo di intermedi degli acidi grassi determina la presenza a livello plasmatico ed urinario di alcuni metaboliti, alcuni dei quali sono comuni ad altri difetti della beta-ossidazione es. acidi dicarbossilici, mentre altri sono unici e caratteristici del deficit di MCAD (es. ottanol-carnitina). Una singola mutazione missense è rintracciabile nel 90% dei geni mutati MCAD che causano la malattia.

Il **difetto di acil-CoA deidrogenasi a catena lunga (VLCAD)** si presenta con due distinti fenotipi clinici: la cardiomiopatia ipertrofica (VLCAD-C) e una forma meno severa caratterizzata da ipoglicemia ipochetotica ricorrente (VLCAD-H).

Il **deficit di acil-CoA deidrogenasi a catena corta (SCAD)** è stato descritto in pochi pazienti che presentavano quadri clinici eterogenei caratterizzati da chetoacidosi, ipotonia muscolare e ritardo psicomotorio.

La proteina trifunzionale è localizzata nella parte interna della membrana mitocondriale. Il deficit di tale proteina dal punto di vista clinico presenta delle caratteristiche peculiari rispetto agli altri difetti dell'ossidazione degli acidi grassi, infatti oltre ai sintomi comuni alle altre malattie, i pazienti possono presentare ipoglicemia ipochetotica nell'infanzia e nei primi anni di vita, ipotonia e spesso cardiopatia ipertrofica fatale, o morte improvvisa. Sono state descritte forme ad insorgenza più tardiva con neuropatia periferica sensitivo-motoria, episodi di rabdomiolisi o affaticabilità muscolare dovuta a miopatia.

L'**LCHAD** è uno dei costituenti della proteina trifunzionale. Il deficit isolato di attività di LCHAD è una condizione autosomica recessiva che si presenta con ipotonia, ipoglicemia ipochetotica durante il digiuno o infezioni intercorrenti, associata a cardiomiopatia ipertrofica ad insorgenza prima dei due anni di vita. Successivamente molti pazienti sviluppano una retinopatia e una neuropatia periferica.

Nelle gestanti eterozigoti con feti affetti da LCHAD, deficit di proteina trifunzionale e di CPT1, sono state osservate manifestazioni gravi quali la sindrome HELLP e AFLP (Scriver et al. 2001).

### **2.4.2 L'aciduria glutarica tipo II**

La flavoproteina responsabile del trasporto degli elettroni (ETF) e la citocromo coenzima Q ossidoreduttasi (ETF-QO) sono proteine codificate a livello nucleare attraverso cui gli elettroni sono trasferiti dalle flavoproteine acilCoA deidrogenasi, dimetilglicina deidrogenasi e sarcosina deidrogenasi alla catena respiratoria. Deficit multipli o di ciascuna di queste proteine, ereditati in maniera autosomica recessiva, possono causare l'aciduria glutarica tipo 2.

ETF nella matrice mitocondriale funziona da accettore di elettroni per almeno nove flavoproteine deidrogenasi ed è riossidata ad opera di citocromo coenzima Q ossidoreduttasi (ETF-QO) nella parte interna della membrana mitocondriale. ETF-QO riduce a sua volta l'ubiquinone, il quale comunica con il pool di ubiquinone della catena respiratoria principale.

Molte mutazioni patogeniche sono state identificate sia a livello del gene che codifica per ETF-QO che per la subunità alfa dell'ETF. Questi deficit bloccano non solo l'ossidazione degli acidi grassi, ma anche l'ossidazione degli aminoacidi ramificati della lisina e dell'acido glutarico.

Dal punto di vista anatomico-patologico la malattia è caratterizzata da degenerazione lipidica a livello di cellule del parenchima epatico, epitelio tubulare renale e miocardio. Il deficit completo di ETF-QO è spesso associato alla presenza di anomalie congenite, le più frequenti delle quali sono cisti e displasia renale.

I deficit completi gravi esordiscono nel periodo neonatale con sopravvivenza limitata alle prime settimane di vita. Forme meno gravi possono essere presenti nell'infanzia, nell'adolescenza e anche nell'età adulta, manifestandosi soprattutto con miocardiopatia progressiva e miopatia prossimale (Scriver et al. 2001).

### **2.5 I disordini lisosomiali**

Le malattie da accumulo lisosomiale costituiscono il 1-5% degli errori congeniti del metabolismo. In queste patologie vi è un deficit di un enzima a localizzazione nei lisosomi. I lisosomi sono organuli cellulari che contengono numerose idrolasi acide deputate alla degradazione di macromolecole come proteine, carboidrati complessi, acidi nucleici, lipidi, ecc. Il deficit di un enzima lisosomiale porta, di conseguenza all'accumulo di un prodotto metabolico intermedio con conseguente danno strutturale e

disfunzione cellulare, a causa della compromissione funzionale dell'apparato lisosomiale, dell'azione citotossica di alcune sostanze accumulate.

Le malattie lisosomiali rappresentano un gruppo eterogeneo che conta più di 40 disordini genetici, molti dei quali risultanti da una mutazione in un gene che codifica per un enzima intralisosomiale. Comunque, altre proteine essenziali coinvolte nel metabolismo e nel trasporto lisosomiale dei prodotti immagazzinati, come proteine di membrana, proteine di trasporto, enzimi che processano altre proteine lisosomiali, risultano implicati nei disordini da accumulo lisosomiale (Marsden e Levy 2010).

La diagnosi biochimica si basa sull'individuazione del materiale di accumulo nei liquidi biologici e sulla determinazione dell'attività enzimatica specifica su leucociti e fibroblasti.

Le malattie lisosomiali sono patologie croniche, altamente invalidanti, con decorso progressivo; l'esordio avviene dopo un intervallo libero necessario perché il materiale accumulato raggiunga livelli funzionalmente significativi. Per alcune forme l'insorgenza può avvenire tardivamente in età giovanile o, più raramente, in età adulta.

Una terapia enzimatica sostitutiva è oggi disponibile per vari disordini lisosomiali (Scriver et al. 2001; Gaburro et al. 1997).

### **2.5.1 La glicogenosi tipo II (malattia di Pompe o deficit di maltasi acida)**

Le glicogenosi sono un gruppo di malattie ereditarie in cui il metabolismo del glicogeno è alterato. Virtualmente, tutte le proteine coinvolte nella sintesi o nella degradazione del glicogeno, e nella loro regolazione, sono state identificate come causa di qualche tipo di glicogenosi. In questi disordini il glicogeno è alterato per quantità, per qualità o per entrambe. Fegato e muscolo contengono abbondanti quantità di glicogeno e rappresentano i tessuti più gravemente colpiti da queste malattie (Scriver et al 2001).

La presentazione clinica della **glicogenosi tipo II** comprende un ampio spettro di fenotipi, tutti caratterizzati da miopatia di vario grado, ma che differiscono a seconda dell'età di insorgenza, del coinvolgimento dei vari organi, e della percentuale di mortalità. La forma più grave è quella classica che esordisce nel lattante, descritta da Pompe, con importante cardiomegalia, ipotonia, epatomegalia e morte per insufficienza cardiorespiratoria, di solito prima dei 2 anni di età. All'estremo opposto si trova una forma che esordisce in età adulta, con miopatia prossimale lentamente progressiva, che

si manifesta tra la seconda e la sesta decade, e che coinvolge fundamentalmente solo il muscolo scheletrico. Tra questi due estremi c'è un gruppo eterogeneo di quadri clinici, denominati varianti ad esordio infantile tardivo, adulto o muscolare, che generalmente si manifestano dopo la prima infanzia, con coinvolgimento prevalentemente muscolare, di solito senza che sia interessato il cuore, e con un decorso molto più lentamente progressivo di quello della forma classica. La debolezza muscolare prossimale ingravescente con compromissione della funzione respiratoria domina il quadro e la morte di solito è dovuta proprio ad insufficienza respiratoria.

La glicogenosi tipo II si trasmette come un carattere autosomico recessivo, ed è causata da un difetto dell'attività dell'alfa-glicosidasi acida. Il deficit enzimatico provoca accumulo di glicogeno di normale struttura in numerosi tessuti.

La diagnosi clinica è confermata dalla virtuale assenza (nella malattia ad esordio infantile) o dalla marcata riduzione (nella malattia ad esordio tardivo) di attività della alfa-glucosidasi acida in biopsie muscolari e in colture di fibroblasti (Scriver et al. 2001).

Oltre al trattamento sintomatico è disponibile la terapia enzimatica sostitutiva (alglucosidasi acida umana ricombinate). I benefici di questa terapia non sono ancora definiti per la forma a insorgenza tardiva.

### **2.5.2 La malattia di Fabry**

La malattia di Fabry (MF) è una malattia ereditaria, legata al cromosoma X, da accumulo lisosomiale dovuta ad un difetto genetico del gene GLA che codifica la proteina dell'enzima alfa-galattosidasi. La deficienza dell'idrolasi lisosomiale alfa-galattosidasi (GalA), che è coinvolta nell'eliminazione dei glicosfingolipidi, porta ad un progressivo accumulo di globotriasilceramide (GB3) in molti tessuti e nell'endotelio vascolare. L'accumulo nelle cellule endoteliali provoca una occlusione dei piccoli vasi sanguigni ed uno stato pretrombotico. L'interessamento delle cellule renali, inclusi i podociti, si manifesta con proteinuria e progressiva insufficienza renale. Una cardiomiopatia e una disfunzione dei muscoli striati risulta da un deposito di materiale nelle cellule muscolari. Altre cellule affette sono le cellule muscolari lisce, le cellule delle ghiandole sudoripare con una anomala produzione di sudore, le fibre muscolari che fanno rizzare i peli, i macrofagi tissutali, i neuroni centrali in alcune aree, i neuroni

ganglionari gastrointestinali, gli astrociti e le cellule meningeae. L'interessamento delle cellule dei gangli del sistema nervoso autonomo può essere fra le cause delle crisi di dolore nella MF. Nessun gruppo etnico è esente. Nei maschi emizigoti, gli angiocheratomi cutanei, le acro parestesie e lo scarso sudore sono fra i sintomi più precoci, che iniziano di solito nell'infanzia. Le più tardive complicazioni, potenzialmente letali, sono la cardiomiopatia, le patologie cerebrovascolari e gastrointestinali e l'insufficienza renale. Il fenotipo nelle femmine eterozigoti è molto variabile, dovuto in parte alla casuale inattivazione del cromosoma X. Mentre una volta era descritto come un disordine recessivo, legato al cromosoma X con sintomi clinici poco frequenti nelle donne, dati più recenti suggeriscono che le donne possono certamente essere affette dalle tipiche manifestazioni della MF. (Scriver et al. 2001).

Recentemente è stata introdotta un'opzione terapeutica specifica (terapia sostitutiva enzimatica che usa l'enzima umano ricombinante alfa-galattosidasi alfa o beta); tuttavia, la sua efficacia e la sicurezza nel tempo non sono ancora state accertate. La cura tradizionale si basa sull'uso di analgesici per controllare il dolore, sulla nefroprotezione (Ace-inibitori e bloccanti del recettore dell'angiotensina) e sui farmaci antiaritmici, mentre il trapianto renale o la dialisi vengono riservati ai pazienti affetti da insufficienza renale cronica terminale (Germain 2010).

### **2.5.3 Le mucopolisaccaridosi**

Le mucopolisaccaridosi rappresentano un gruppo di patologie da accumulo lisosomiale causate dal deficit degli enzimi che catalizzano la degradazione dei glicosaminoglicani (mucopolisaccaridi). A seconda del tipo di deficit enzimatico può essere ostacolata la degradazione del dermatansolfato, dell'eparansolfato, del cheratansolfato, del condroitinsolfato e dell'acido ialuronico, singolarmente o in combinazione. L'accumulo lisosomiale dei glicosaminoglicani porta alla disfunzione delle cellule, dei tessuti e degli organi. Sono noti 11 enzimi carenti che danno origine a sette forme distinte di Mucopolisaccaridosi.

Le Mucopolisaccaridosi condividono molti sintomi clinici, sebbene con diversi gradi. I sintomi comprendono un decorso cronico e progressivo, un interessamento multisistemico, organomegalia, disostosi multipla, e anomalie facciali. Possono essere colpiti l'udito, la vista, la respirazione, la funzione cardiovascolare, la motilità articolare.

Un grave ritardo mentale è presente nella Mucopolisaccaridosi IH (Sindrome di Hurler), nella forma grave di Mucopolisaccaridosi II (Sindrome di Hunter), e in tutti i sottotipi di Mucopolisaccaridosi III (Sindrome di Sanfilippo), mentre negli altri tipi l'intelligenza può rimanere normale. Le lesioni ossee della Mucopolisaccaridosi IV (Sindrome di Morquio) sono specifiche di questo disordine. Vi è una similitudine clinica tra i vari tipi di deficit enzimatici, e al contrario, un vasto spettro di gravità clinica in ogni carenza enzimatica. (Scriver et al. 2001).

### 2.5.3.1 Mucopolisaccaridosi tipo I

È una malattia sistemica da accumulo lisosomiale, causata da deficit di alfa-L-iduronidasi e caratterizzata da deterioramento fisico progressivo con escrezione urinaria di dermatan solfato ed eparan solfato. Esistono tre fenotipi riconoscibili che costituiscono uno spettro clinico variabile da forme gravi a forme lievi: la **sindrome di Hurler**, la **sindrome di Hurler-Scheie** e la **sindrome di Scheie** (un tempo chiamata Mucopolisaccaridosi tipo V) (MeSH MEDLINE/PubMed).

La **Sindrome di Hurler** (Mucopolisaccaridosi IH) rappresenta un disordine progressivo che coinvolge molti organi e tessuti e che porta a morte nell'infanzia. Un bambino con Sindrome di Hurler appare normale alla nascita ma può avere ernie inguinali e/o ombelicali. La diagnosi di Sindrome di Hurler viene fatta solitamente tra i 4 e i 18 mesi di vita; è suggestiva la combinazione di deformità ossee, ricorrenti infezioni respiratorie e nasali, ernie inguinali ed ombelicali, lineamenti facciali grossolani, epatosplenomegalia e lingua ingrossata.

Per alcuni dei bambini affetti con meno di un anno di vita, la presentazione della patologia è stata una miocardiopatia fatale, con conferma autoptica di fibroelastosi endocardica. L'insufficienza cardiaca può precedere il riconoscimento del disordine perché le manifestazioni precoci della Sindrome di Hurler possono essere subdole o aspecifiche.

I pazienti con Sindrome di Hurler possono essere abnormemente grandi nell'infanzia, ma vi è poi una decelerazione della crescita tra i 6 e i 18 mesi, con una altezza massima riportata di 110 centimetri. Il ritardo dello sviluppo risulta evidente dai 12 ai 24 mesi, con una massima età funzionale ottenibile di 2-4 anni, seguita poi da un progressivo deterioramento.

## LE MALATTIE METABOLICHE EREDITARIE

La maggior parte dei bambini affetti sviluppa delle limitate capacità linguistiche, a causa del ritardo dello sviluppo, della perdita di udito cronica, e dell'ingrossamento della lingua. Un certo grado di perdita dell'udito è probabilmente riscontrabile in tutti i pazienti, legato di solito alla combinazione di problemi di conduzione e neurosensoriali. La maggior parte dei bambini con Sindrome di Hurler ha infezioni respiratorie alte ed otiti ricorrenti, respiro rumoroso, e secrezioni nasali persistenti e copiose. Nel primo anno di vita si sviluppa anche un progressivo offuscamento corneale, e in alcuni pazienti può esserci glaucoma.

L'idrocefalo comunicante è solitamente accompagnato da aumento di pressione intracranica. Nel corso della malattia può svilupparsi precocemente una compromissione grave e generalizzata delle arterie coronariche.

Le cause di morte sono solitamente la malattia respiratoria ostruttiva, le infezioni respiratorie, e le complicazioni cardiache. La maggior parte dei pazienti affetti da sindrome di Hurler muiono a circa dieci anni. (Scriver et al. 2001).

La **Sindrome di Scheie** rappresenta una forma lieve di mucopolisaccaridosi tipo I caratterizzata da rigidità articolare, valvulopatia aortica, offuscamento corneale, e pochi altri sintomi. I lineamenti facciali sono caratteristicamente grossolani, ma statura ed intelligenza sono normali. Le articolazioni della mano sono colpite in modo importante, con conseguente deformazione ad artiglio. I pazienti affetti da Sindrome di Scheie possono avere piede rigido e doloroso, piede cavo, e ginocchio valgo. Le deformità articolari delle mani e dei piedi, assieme alla sindrome del tunnel carpale, possono portare a limitazione funzionale. Le manifestazioni oculari includono il glaucoma e la degenerazione retinica che, assieme all'offuscamento corneale, possono contribuire ad un significativo indebolimento della vista. In alcuni pazienti si sviluppa una malattia ostruttiva delle vie aeree che causa apnea del sonno, che rende necessaria una tracheostomia.

La comparsa di sintomi significativi si ha solitamente dopo i 5 anni, e la diagnosi viene fatta comunemente tra i 10 e i 20 anni (Nelson, Textbook of Pediatrics, XVI Edition, 2002). I pazienti affetti da Sindrome di Scheie hanno una speranza di vita potenzialmente normale.

La **sindrome di Hurler/Scheie** presenta un fenotipo clinico a metà strada tra la Sindrome di Hurler e la Sindrome di Scheie. È caratterizzata da un progressivo coinvolgimento somatico, disostosi multipla, e scarsa o nulla disfunzione intellettiva.

Possono svilupparsi offuscamento corneale, rigidità articolare, sordità, valvulopatia. Alcuni pazienti affetti da Sindrome di Hurler/Scheie hanno una micrognazia che crea un viso caratteristico. Sono descritti pachimeningite cervicale e compressione del midollo cervicale, dovuti all'accumulo di mucopolisaccaridi nella dura, ma l'idrocefalo comunicante sembra essere meno comune in pazienti di cui è conservata anche l'intelligenza. Può esserci una spondilolistesi della colonna inferiore che porta ad una compressione del midollo, come nei pazienti con Sindrome Scheie (Scriver et al. 2001). La comparsa dei sintomi è solitamente tra i 3 e gli 8 anni, e la sopravvivenza in età adulta è comune. Contribuiscono alla mortalità l'interessamento cardiaco e la malattia ostruttiva delle vie aeree. (Nelson, Textbook of Pediatrics, XVI Edition, 2000). I pazienti affetti da Sindrome di Hurler/Scheie muiono nella seconda o terza decade di vita.

La terapia sintomatica della mucopolisaccaridosi tipo I deve essere implementata da un team multidisciplinare. Sebbene il trapianto di midollo osseo si associ a gravi rischi (ad esempio, la reazione di rigetto del trapianto), era l'unica alternativa terapeutica prima dell'immissione in commercio come farmaco orfano dell'enzima sostitutivo (laronidasi). Somministrata per perfusione ogni settimana, può migliorare la funzione polmonare e la mobilità articolare. Il trattamento precoce rallenta l'evoluzione della malattia. Tuttavia, non è efficace contro le lesioni neurologiche.

### **2.5.3.2 Mucopolisaccaridosi tipo II**

È una patologia da accumulo lisosomiale caratterizzata da un progressivo deterioramento fisico e causata dal deficit dell'enzima L-iduronosolfato solfatasi. Questa patologia differisce dalla mucopolisaccaridosi di tipo I per la più lenta progressione, per l'assenza di offuscamento corneale, per la trasmissione X-linked, anziché autosomica recessiva (MeSH MEDLINE/PubMed).

La Sindrome di Hunter comprende due forme cliniche distinte, la forma lieve e la forma grave. La forma grave ha caratteristiche simili alla Sindrome di Hurler, eccetto che per l'assenza di opacità corneale e per la progressione più lenta del deterioramento somatico

e del coinvolgimento del sistema nervoso centrale. La forma lieve è analoga alla Sindrome di Hurler/Scheie o alla sindrome di Scheie, con una maggiore aspettativa di vita, una progressione più lenta del deterioramento somatico, e con mantenimento dell'intelligenza. La comparsa di lesioni cutanee ad acciottolato, di colore avorio sul dorso, sulle braccia, e sulla faccia laterale della coscia è unica nella Sindrome di Hurler, ma la loro presenza non si correla con la severità della malattia (Scriver et al. 2001). L'eruzione cutanea può essere il segno più precoce di Sindrome di Hunter, in modo particolare nella forma lieve che si presenta con sviluppo e crescita normali (Demitsu et al. 1999).

La **forma grave** della Sindrome di Hunter si caratterizza per dei lineamenti facciali grossolani, la bassa statura, le deformazioni ossee, la rigidità articolare, e il ritardo mentale. L'inizio della malattia è di solito tra i due e i quattro anni di età, con un progressivo coinvolgimento neurologico e somatico. I pazienti possono avere una grave degenerazione della retina, ma la cornea rimane caratteristicamente chiara. La diarrea cronica, legata all'interessamento del sistema nervoso autonomico, e forse anche ad una disfunzione della mucosa, è un problema fastidioso in molti dei pazienti giovani.

La maggior parte dei pazienti va incontro a infezioni aeree ricorrenti e ad un progressivo deterioramento dell'udito. La presenza di idrocefalo comunicante di grado da moderato a grave esacerba probabilmente la degenerazione del sistema nervoso centrale dopo i sette-dieci anni a causa dell'aumentata pressione intracranica. L'idrocefalo comunicante può essere presente al momento della diagnosi e progredire lentamente in molti anni.

Alcuni pazienti affetti in forma più grave hanno delle manifestazioni simili alla Sindrome di Hurler, una precoce insorgenza di crisi epilettiche e ptosi. Questo fenotipo è connesso ad un'ampia delezione che coinvolge più geni.

Un diffuso interessamento neurologico, simile a quello dell'ultimo stadio della Sindrome di Sanfilippo, precede la morte, che avviene solitamente tra i 10 e i 15 anni, anche se può avvenire prima. Le cause di morte sono solitamente una malattia ostruttiva delle vie aeree, l'insufficienza cardiaca dovuta alla disfunzione delle valvole, l'ispessimento miocardico, l'ipertensione polmonare, il restringimento delle arterie coronarie, e la miocardiopatia.

La **forma più lieve** di Sindrome di Hunter si caratterizza per la sopravvivenza in età adulta. Possono svilupparsi anche in questi pazienti delle manifestazioni viste in quelli

affetti dalla forma grave, ma con un ridotto ritmo di progressione. La perdita di udito interessa probabilmente la totalità dei pazienti. Sono comuni la sindrome del tunnel carpale e la rigidità articolare, che possono portare ad una perdita di funzionalità. La mielopatia cervicale dovuta ad un restringimento del canale spinale e alla compressione dei nervi può essere più comune di quanto generalmente si riconosca. È stata osservata una discreta opacità corneale, documentabile attraverso una lampada a fessura. L'elettroretinografia ha evidenziato una disfunzione della retina, ma molto meno estesa rispetto a quella presente nella forma grave. È stato documentato un papilledema cronico senza incremento della pressione endocranica, dovuto probabilmente alla deposizione di glicosaminoglicani nella sclera, che causa compressione del nervo ottico a livello intrasclerale.

Alcuni pazienti con Sindrome di Hunter di tipo lieve sono sopravvissuti fino alla quinta e sesta decade di vita, con un massimo di età raggiunta di 87 anni; tuttavia la morte può avvenire anche in giovane età adulta o in tarda adolescenza, solitamente per ostruzione delle vie aeree o per insufficienza cardiaca. (Scriver et al. 2001).

In aggiunta al trattamento sintomatico, che richiede un approccio multidisciplinare, non viene consigliato il trapianto allogenico di midollo osseo, in quanto non previene il ritardo mentale. È in commercio la terapia enzimatica sostitutiva con infusione dell'enzima ricombinante (idursulfasi) in qualità di farmaco orfano finalizzato al trattamento a lungo termine dei pazienti. Le sperimentazioni cliniche hanno mostrato un miglioramento della deambulazione e del quadro respiratorio e miglioramenti significativi a livello epatico, splenico e cardiaco. Tuttavia, non sono stati descritti miglioramenti del quadro neurologico.

### **2.5.3.3 Mucopolisaccaridosi tipo VI (Sindrome di Maroteaux Lamy)**

La mucopolisaccaridosi di tipo VI è caratterizzata da eccessiva secrezione urinaria di condroitinsolfato, nanismo e sordità. È causata dal deficit dell'enzima N-acetilgalattosamina-4-solfatasi (arilsolfatasi B) (MeSH MEDLINE/PubMed).

Lo sviluppo mentale nei pazienti affetti da Sindrome di Maroteaux-Lamy è solitamente normale, sebbene la compromissione fisica e visiva possano impedire una buona performance psicomotoria.

Sono state distinte tre forme della malattia: grave, intermedia, lieve (Villani et al. 1998).

## LE MALATTIE METABOLICHE EREDITARIE

Il coinvolgimento somatico nella forma grave è simile a quello riscontrabile nella Sindrome di Hurler. Alla nascita possono essere presenti una testa ingrossata e un petto deformato. Sono comuni le ernie inguinali e ombelicali. La crescita può essere normale nei primi cinque anni di vita ma sembra bloccarsi dopo i 6 e gli 8 anni, con un'altezza definitiva nei pazienti gravemente affetti che va da 110 a 140 centimetri. Le opacità corneali sono facilmente identificabili con una lampada a fessura. Nel primo anno di vita si sviluppa una limitazione dei movimenti articolari (del ginocchio, dell'anca, del gomito), e il bambino assume una posizione accovacciata.

Nei bambini si nota una deformità ad artiglio della mano, secondaria alla contrattura in flessione delle dita. Sono comuni le sindromi da intrappolamento nervoso, in modo particolare la sindrome del tunnel carpale. I lineamenti del viso possono essere solo moderatamente interessati in alcuni pazienti, ma in altri assumono le caratteristiche grossolane della Sindrome di Hurler. L'epatomegalia è sempre presente dopo i 6 anni, e in metà dei pazienti si riscontra una splenomegalia. La pelle è descritta come 'tirata', e si riscontra anche un lieve irsutismo. Alla fine della prima decade di vita il paziente affetto in modo grave da Sindrome di Maroteaux-Lamy presenta un tronco accorciato con un addome protuberante e una prominente lordosi lombare. Il coinvolgimento cardiaco predominante nella forma più lieve è rappresentato dalle disfunzioni valvolari aortica e mitrale, dovute principalmente alle valvole stenotiche ispessite e calcifiche.

È un frequente reperto nei pazienti con forma più lieve di MPS IV la compressione del midollo spinale da parte della dura ispessita, con risultante mielopatia, e sviluppo di anomalie dei corpi vertebrali.

La maggior parte dei pazienti affetti dalla forma grave di MPS VI sono deceduti nella seconda o terza decade di vita per insufficienza cardiaca (Scriver et al. 2001).

La presa in carico multidisciplinare permette un trattamento sintomatico idoneo. Il trapianto allogenico di midollo osseo è efficace nei confronti del danno cardiaco, dei dismorfismi e dell'epatomegalia, ma ha effetti minimi sui sintomi ossei e articolari.

Al momento, la terapia sostitutiva enzimatica con infusioni settimanali dell'enzima ricombinante galsulfasi è l'opzione terapeutica di elezione, anche se i suoi effetti sui sintomi ossei sono limitati (Valayannopoulos et al. 2010).

**2.6 Una sintesi delle opzioni terapeutiche disponibili per il trattamento della malattia metabolica di base**

Come indicato dai criteri di Wilson e Jungner, già esposti, è fondamentale che siano noti e disponibili delle terapie per la cura delle patologie oggetto di un programma di screening. La diagnosi precoce può consentire una terapia in grado di far regredire il danno metabolico in atto capovolgendo una diagnosi nella maggior parte dei casi infausta, o limitare il danno e gli esiti a distanza.

Si riporta, nella Tabella 2.2, una sintesi delle terapie ad oggi disponibili per trattare la malattia metabolica di base delle patologie oggetto del programma di screening allargato regionale, descritti nelle sezioni di trattazione delle specifiche patologie.

## LE MALATTIE METABOLICHE EREDITARIE

**Tabella 2.2 (1/2):** Terapia delle malattie metaboliche che rientrano nello screening neonatale della Regione Veneto

| sigla   | Possibile esordio delle sintomatologie in epoca neonatale | Dieta speciale  | Trattamenti della malattia metabolica di base  |
|---|---|---|--|
| <b>Difetti del metabolismo degli acidi organici</b> |   |   |  |
| PA  | Sì  | Dieta a basso contenuto proteico, restrizione di Ile, Val, Met, Thr                             | L-carnitina; eventualmente metronidazolo allo scopo di eliminare i batteri intestinali produttori di propionato.       |
| MMA   | Sì  | Dieta a basso contenuto proteico, restrizione di Ile, Val, Met, Thr                             | Idrossicobalamina nelle forme varianti responsive (CblA e CblB); altrimenti trattamento come per l'aciduria propionica |
| Cbl C,D   | Sì  | Dieta a basso contenuto proteico  | Idrossicobalamina per via intramuscolare oppure orale, betaina, folati per via orale                                   |
| IVA   | Sì  | Dieta a basso contenuto proteico, restrizione di Leu  | L-carnitina e/o glicina  |
| GA I  | No  | Restrizione dietetica di Lys- e Trp   | L-carnitina, supplementazione di riboflavina   |
| <b>Difetti del metabolismo degli aminoacidi</b>     |   |   |  |
| PKU   | Sì  | Restrizione dietetica di Phe  | Recentemente terapia BH4 nella iperfenilalaninemia moderata, quando responsiva   |
| TYR I   | Sì  | Restrizione dietetica di Phe e Tyr  | Nitisono (NTBC)  |
| MSUD  | Sì  | Dieta a basso contenuto proteico, restrizione di aminoacidi a catena ramificata (Leu, Val, Ile) | Tiamina nella forma tiamino-sensibile  |
| ARG   | Sì  | Dieta a basso contenuto proteico; miscela di aminoacidi essenziali                              | L-arginina; L-citrullina è un'alternativa valida nei casi di grave deficit di OTC/CPS.                                 |
| ASA   | Sì  |   | Sodio-benzotato e/o sodio-fenilbutirrato (per eliminare l'ammonio)<br>Supplementazione di vitamine e oligoelementi.    |
| CIT   | Sì  |   |  |

*(continua a pagina successiva)*

## LE MALATTIE METABOLICHE EREDITARIE

**Tabella 2.2 (2/2):** Terapia delle malattie metaboliche che rientrano nello screening neonatale della Regione Veneto

| sigla  | Possibile esordio delle sintomatologie in epoca neonatale | Dieta speciale   | Farmaci   |
|--|---|--|---|
| <b>Difetti del metabolismo mitocondriale</b> |   |  |   |
| VLCAD  | Si  | La gestione alimentare di questi pazienti mira a:<br>1. limitare l'assunzione di grassi;<br>2. massimizzare l'assunzione di carboidrati;<br>3. evitare il digiuno.<br>4. pasti frequenti | Somministrazione di L-carnitina nel deficit primitivo di carnitina (CUD).<br>L-carnitina in MCAD (dimostrata utile in condizioni di stress metabolico) e in GA2.<br>Un possibile ruolo della terapia con carnitina nei disordini di ossidazione degli acidi grassi, associati con deficienza secondaria di carnitina, rimane controverso.<br>Riboflavina in GA2 |
| LCHAD  | Si  |  |   |
| MCAD   | Si  |  |   |
| SCAD   | Si  |  |   |
| GA2  | Si  |  |   |
| CPT I  | No  |  |   |
| CPT II                                       | Si  |  |   |
| CACT   | Si  |  |   |
| CUD  | No  |  |   |
| <b>Disordini lisosomiali</b>                 |   |  |   |
| GSD-II Infantile Adulta                      | No  | Elevato apporto di proteine con supplementazione di Ala  | Terapia enzimatica sostitutiva (alglucosidasi acida umana ricombinante). Non sono stati determinati i benefici del farmaco nei pazienti con forma tardiva della malattia di Pompe   |
| MF   | No  |  | Terapia enzimatica sostitutiva (algasidasi alfa o algasidasi beta)  |
| MPS I  |   |  | Terapia enzimatica sostitutiva per il trattamento delle manifestazioni non neurologiche della patologia (laronidasi)  |
| MPS I/H                                      | No  |  |   |
| MPS I/HS                                     | No  |  |   |
| MPS I/S                                      | No  |  |   |
| MPS II                                       | No  |  | Terapia enzimatica sostitutiva con infusione dell'enzima ricombinante (idursulfase). E' indicato per terapia a lungo termine.   |
| MPS VI                                       | No  |  | Terapia enzimatica sostitutiva (galsulfase)   |

(Scriver et al. 2001; Fernandes et al. 2006)

### **3. I programmi di screening neonatale allargato**

In alcuni paesi i programmi di screening neonatale allargato con la tecnologia tandem mass sono già attivi da diversi anni e in letteratura si trovano dei lavori che ne descrivono l'organizzazione e i risultati in termini di casi diagnosticati, falsi positivi, positivi al test, valori predittivi positivi e falsi negativi.

Da questi lavori saranno estratte le informazioni che ci possono essere utili per la pianificazione dello screening in particolare:

1. l'incidenza delle patologie considerate al fine di conoscere la diffusione delle stesse e di capire quanti sono i casi attesi in Veneto;
2. l'organizzazione del programma di screening e i criteri decisionali adottati nelle varie fasi dello screening;
3. i positivi al test di primo livello per i vari cut-off, sensibilità, specificità e valori predittivi positivi per valutare gli attesi al test di conferma diagnostica;
4. i test di conferma diagnostica per la programmazione e l'organizzazione degli stessi.

In questa analisi ci rifaremo ai lavori pubblicati sui programmi di screening già esistenti in Europa (Germania e Portogallo), negli Stati Uniti (California, North Carolina, New England e Minnesota), in Australia e, per quanto riguarda l'Italia, in Toscana. Le patologie lisosomiali non rientrano invece nei programmi di screening già esistenti, quindi per l'incidenza saranno considerati degli studi di popolazione e per i dati di accuratezza diagnostica degli studi pilota.

In questa fase di programmazione si confronteranno anche i criteri stilati dalla Società Italiana per lo Studio delle Malattie Metaboliche Ereditarie e dalla Società Italiana per gli Screening Neonatali nel 2008 derivanti da un'ampia rassegna della letteratura.

#### **3.1 L'incidenza delle patologie**

I programmi di screening che abbiamo studiato differiscono in primo luogo per il numero di patologie considerate che varia da 11 in California a 43 in Toscana. Una prima dimensione della casistica interessata ci viene fornita dal dato globale dell'incidenza di malattia metabolica diagnosticata attraverso lo screening neonatale che varia da 1:6.500 in California a 1:2.000 in Toscana (Tabella 3.1). Le incidenze in

## I PROGRAMMI DI SCREENING NEONATALE ALLARGATO

California e Australia sono molto più basse perché non includono la fenilchetonuria che, come vedremo, è la patologia più comune tra quelle sottoposte a screening.

**Tabella 3.1:** Neonati sottoposti a screening, numero di patologie che rientrano nei programmi di screening e incidenza globale delle patologie sottoposte a screening.

| <b>Regione/Nazione<br/>Ref.</b> | <b>Anni</b>                  | <b>Neonati<br/>sottoposti a<br/>screening</b> | <b>Numero<br/>patologie</b> | <b>Incidenza<br/>totale</b> |
|---------------------------------|------------------------------|---|-----------------------------|-----------------------------|
| Toscana<br>La Marca 2008        | 2002-2007                    | 160.000                                       | 43                          | 1:2.000                     |
| Portogallo<br>Vilarinho 2010    | 2005-2008                    | 316.243                                       | 24                          | 1:2.396                     |
| Germania<br>Schulze 2003        | aprile 1998 - settembre 2001 | 250.000                                       | 23                          | 1:2.400                     |
| California<br>Feuchtbaum 2006   | gennaio 2002 - giugno 2003   | 353.894                                       | 11                          | 1:6.500                     |
| New-England<br>Zytkovicz 2001   | 1999-2000                    | Da 164.000<br>a 257.000 *                     | 23                          | n.d.                        |
| North Carolina<br>Frazier 2006  | 1997-2005                    | 944.078                                       | 21                          | 1:4.300                     |
| Australia<br>Wilcken 2003       | 1998-2002                    | 362.000                                       | 31                          | 1:6.370                     |

\* Numeri diversi per patologia

La Tabella 3.2 riporta le incidenze stimate attraverso i programmi di screening neonatale o gli studi pilota già presenti negli altri paesi, mentre la Tabella 3.3 i dati di incidenza nella popolazione pediatrica in assenza di programmi di screening.

Tra i paesi dove sono presenti dei programmi di screening l'incidenza di acidemia propionica (PA) varia da 1:362.000 in Australia a 1:80.000 neonati in Toscana, l'acidemia metilmalonica (MMA) da 1:316.000 in Portogallo a 1:160.000 in Toscana, l'acidemia isoalericica (IVA) da 1:362.000 in Australia a 1:62.500 in Germania.

L'incidenza del deficit di cobalamina C/D (Cbl C/D) varia da 1:362.000 in Australia a 1:125.000 in Germania, e l'acidemia glutarica di tipo 1 (GA I) da 1:354.000 in California a 1:51.000 in Portogallo.

La malattia metabolica più frequente è la fenilchetonuria che interessa 1:23.000 neonati in Toscana fino a 1:10.400 neonati in Germania. L'incidenza della tirosinemia di tipo I è di 1:181.000 casi in Australia e di 1:79.000 casi in Portogallo, nessun caso è stato riscontrato in Toscana e North Carolina.

## I PROGRAMMI DI SCREENING NEONATALE ALLARGATO

La malattia delle urine a sciroppo d'acero è stata diagnosticata in 1:940.000 neonati in North-Carolina fino a 1:105.000 neonati in Portogallo, nessun caso è stato riscontrato in Toscana.

I disordini del ciclo dell'urea sono meno frequenti, in particolare l'argininemia (ARG) ha un'incidenza di un caso su 354.000 in California e di 1:316.000 neonati in Portogallo, e non è stato riscontrato alcun caso tra i 362.000 neonati sottoposti a screening in Australia e i 160.000 in Toscana. L'incidenza di arginemia arginino succinica (ASA) varia da 1:940.000 in North Carolina a 1:164.000 neonati in New England. Non sono stati riscontrati casi tra i 160.000 neonati sottoposti a screening in Toscana e i 250.000 in Germania. La citrullinemia ha un'incidenza che varia da 1:362.000 in Australia a 1:53.000 neonati in Toscana.

Tra i disordini degli acidi grassi il più frequente è il deficit dell'acil-CoA deidrogenasi a catena media con un'incidenza che varia da 1:27.000 in California a 1:9.000 neonati in Portogallo. Il programma di screening toscano ha individuato un caso ogni 26.668. Il deficit dell'acil-CoA deidrogenasi a catena molto lunga (VLCAD) ha un'incidenza da 1:250.000 in Germania a 1:79.000 neonati in North Carolina; il deficit dell'idrossiacil-CoA deidrogenasi a catena lunga (LCHAD) da 1:354.000 in California a 1:105.000 casi in Portogallo, mentre non sono stati riscontrati casi tra i 160.000 neonati toscani. Più frequente è il deficit dell'acil-CoA deidrogenasi a catena corta (SCAD) che è stato diagnosticato in uno ogni 130.000 neonati sottoposti a screening in North-Carolina fino a 1:20.000 neonati in California, l'incidenza in Toscana è di 1:53.000. Non sono stati registrati casi di acidemia glutarica di tipo II (GA II) in Toscana, mentre è stata riscontrata in 1:940.000 neonati della North Carolina fino a 1:105.000 neonati portoghesi. In Toscana non sono stati diagnosticati casi di deficit di carnitina palmitoil-tranferasi tipo I o II, deficit del trasporto della carnitina o della carnitina/acilcarnitina translocasi e anche in altri programmi di screening l'incidenza è pari a zero oppure molto bassa. Tra queste patologie la più frequente è il deficit del trasporto della carnitina che si presenta in 1:22.000 neonati in Minnesota, in 1:105.000 neonati portoghesi, in 1:120.000 in Australia e in 1:250.000 in Germania.

Per la malattia di Pompe e la malattia di Fabry sono disponibili dati di incidenza da programmi di screening con tecniche diverse dalla spettrometria tandem mass. A Taiwan l'incidenza della malattia di Pompe è di 1:33.000 neonati (Chien et al. 2008).

## I PROGRAMMI DI SCREENING NEONATALE ALLARGATO

L'incidenza della malattia di Fabry nei maschi sottoposti a screening in Italia è stata di 1:3.100 (Spada et al. 2006), mentre a Taiwan di 1:1.250 (Hwu et al. 2009).

Per alcune di queste patologie è stata stimata l'incidenza nella popolazione pediatrica italiana (Tabella 3.3). Si tratta di uno studio prospettico condotto tra il 1985 e il 1997 nei pazienti tra 0 e 17 anni con diagnosi di patologia metabolica effettuata presso 23 centri italiani. Le incidenze sono risultate essere:

- acidemia propionica: 1:166.123 (IC 95%: 1:99.823-1:280.538)
- acidemie metilmaloniche: 1:61.775 (IC 95%: 1:45.416-1:84.330)
- malattia delle urine a sciroppo d'acero: 1:126.493 (IC 95%: 1:81.210-1:199.112)
- acidemia arginino succinica: 1:189.740 (IC 95%: 1:110.097-1:333.398)

L'incidenza dei disordini lisosomiali è stata calcolata in uno studio australiano retrospettivo basato sulle diagnosi postnatali e prenatali di queste patologie da gennaio 1980 a dicembre 1996. Tutte le diagnosi venivano effettuate nei due centri di riferimento per la diagnosi delle malattie metaboliche attivi in Australia in quel periodo. Sono riportati i risultati di altri studi che calcolano la prevalenza alla nascita delle patologie lisosomiali in UK, Germania, Olanda e Repubblica Ceca.

La frequenza della malattia di Pompe è stimata da 1:201.000 nati in Australia a 1:76.000 in Olanda. In Italia l'incidenza è stata di 1:120.700. Lo studio olandese riporta l'incidenza separatamente per la forma infantile e la forma adulta: la seconda è la più frequente e colpisce un individuo ogni 50.000, mentre la forma infantile ha una incidenza di 1:142.800.

L'incidenza della malattia di Fabry varia da 1:117.000 a 1:40.000. Lo studio condotto in Repubblica Ceca fornisce l'incidenza separatamente per maschi e femmine che è di 1:192.300 e 1:130.000 rispettivamente.

Tra le mucopolisaccaridosi, la MPS di tipo I è la più frequente con un'incidenza che varia da 1:144.900 in Germania a 1:84.000 in Olanda e la sua forma più frequente è la sindrome di Hurler. Per la MPS tipo II si riscontra un caso ogni 232.500 in Repubblica Ceca fino a 1:82.816 in Italia. La prevalenza alla nascita della mucopolisaccaridosi tipo VI varia da 1:2.000.000 in Repubblica Ceca a 1:248.000 in Australia.

## I PROGRAMMI DI SCREENING NEONATALE ALLARGATO

**Tabella 3.2:** Incidenza delle malattie metaboliche stimata nei programmi di screening

| sigla   | Toscana       | Portogallo     | Germania *            | California      | North-Carolina | New England    | Minnesota    | Australia    |
|---|---------------|----------------|-----------------------|-----------------|----------------|----------------|--------------|--------------|
|   | La Marca 2008 | Vilarinho 2010 | Schulze 2003          | Feuchtbaum 2006 | Frazier 2006   | Zytkivicz 2001 | Lindner 2010 | Wilcken 2003 |
| <b>Difetti del metabolismo degli acidi organici</b> |               |                |                       |                 |                |                |              |              |
| PA  | 1:80.000      | 1:316.243      | 1:250.000             | 1:32.000        | 1:300.000      | 1:82.000       | §§           | 1:362.000    |
| MMA   | 1:160.000     | 1:316.243      | (1:250.000)           |                 | 1:90.000       | 0              | §§           | 0            |
| Cbl C,D   | 1:160.000     | 1:316.243      | 1:125.000             | §               |                |                | §§           | 1:362.000 *  |
| IVA   | 1:160.000     | 1:105.141      | 1:62.500              | §               | 1:130.000      | 0              | §§           | 1:362.000    |
| GA I  | 1:160.000     | 1:51.707       | 1:83.300              | 1:354.000       | 1:190.000      | 0              | §§           | 1:181.000    |
| <b>Difetti del metabolismo degli aminoacidi</b>     |               |                |                       |                 |                |                |              |              |
| PKU/H-HPE   | 1:4.000       | 1:8.322        | 1:4.500               | §               |                | 1:14.278       |              |              |
| PKU   | 1:22.857      | 1:12.163       | 1:10.400              | §               | 1:19.000       | 1:36.714       | §§           | **           |
| H-PHE   | 1:5.000       | 1:26.354       | 1:8.000               | §               |                | 1:23.364       |              |              |
| TYR I   | 0             | 1:79.061       | 1:250.000             | §               | 0              | 0              | §§           | 1:181.000    |
| MSUD  | 0             | 1:105.141      | 1:250.000 (1:125.000) | 1:177.000       | 1:940.000      | 1:257.000      | §§           | 1:362.000    |
| ARG   | 0             | 1:316.243      | n.r.                  | 1:354.000       | n.r.           | 1:164.000      | §§           | 0            |
| ASA   | 0             | 1:316.243      | 0                     | §               | 1:940.000      | 1:164.000      | §§           | 1:181.000    |
| CIT   | 1:53.333      |                | 1:250.000 (1:41.700)  | §               | 1:190.000      | 0              | §§           | 1:362.000    |
| CIT I   | 1:80.000      | 1:158.122      | -                     | -               | -              | -              | -            | 0            |
| CIT II  | 1:160.000     | n.r.           | -                     | -               | -              | -              | -            | 1:362.000    |
| <b>Difetti del metabolismo mitocondriale</b>        |               |                |                       |                 |                |                |              |              |
| VLCAD   | 1:160.000     | 1:105.141      | (1:250.000)           | 1:177.000       | 1:79.000       | 1:164.000      | 1:94.568     | 1:121.667    |
| LCHAD   | 0             | 1:105.141      | 1:250.000             | 1:354.000       | 1:300.000      | 0              | 1:75.654     | 0            |
| MCAD  | 1:26.668      | 1:9.036        | 1:20.800 (1:15.600)   | 1:27.000        | 1:13.000       | 1:16.400       | 1:10.508     | 1:21.294     |
| SCAD  | 1:53.333      | n.r.           | (1:83.300)            | 1:20.000        | 1:130.000      | 1:32.800       | 1:25.218     | 1:72.400     |
| GA2   | 0             | 1:105.141      | 1:250.000             | 1:177.000       | 1:940.000      | 0              | 1:378.272    | 0            |
| CPT I   | 0             | 1:316.243      | 0                     | §               | n.r.           | n.r.           | <1:378.272   | 0            |
| CPT II  | 0             | 1:158.122      | 1:250.000             | §               | 1:940.000      | 1:164.000      | 1:378.272    | 0            |
| CACT  | 0             | n.r.           |                       |                 | 0              | 0              |              | 1:362.000    |
| CUD   | 0             | 1:105.141      | 1:250.000             | §               | 0              | n.r.           | 1:22.251     | 1:120.667    |

\* Germania: tra parentesi le forme intermedie

n.r.: non rilevato, patologia che non rientra nel programma di screening

§: dato non disponibile, l'articolo riporta solo le patologie che hanno avuto casi, per le altre non è chiaro se rientravano nello studio pilota o se non ci sono stati casi.

§§: dato non disponibile, l'articolo si riferisce ai difetti dell'ossidazione degli acidi grassi

\* Solo Cbl C      \*\*: la fenilchetonuria non è stata considerata nell'articolo perché già oggetto di programma di screening

## I PROGRAMMI DI SCREENING NEONATALE ALLARGATO

**Tabella 3.3:** Incidenza delle malattie metaboliche stimata con studi di popolazione

|   | Italia                         | Australia (solo post natale) | Australia (post-natale+prenatale) | UK          | Germania     | Repubblica Ceca            | Olanda                      |   |
|---|--------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|-------------|--------------|----------------------------|-----------------------------|---|
| sigla   | Dionisi-Vici 2002              | Meikle 1999                  | Meikle 1999                       | Moore 2008  | Baehner 2005 | Poupetová 2010             | Poorthuis 1999              | Altri studi   |
| <b>Difetti del metabolismo degli acidi organici</b> |                                |                              |                                   |             |              |                            |                             |   |
| PA  | 1:166.023<br>(99.823-280.538)  |                              |                                   |             |              |                            |                             |   |
| MMA   | 1:61.775<br>(45.416-84.330)    |                              |                                   |             |              |                            |                             |   |
| <b>Difetti del metabolismo degli aminoacidi</b>     |                                |                              |                                   |             |              |                            |                             |   |
| MSUD  | 1:126.493<br>(81.210-199.112)  |                              |                                   |             |              |                            |                             |   |
| ASA   | 1:189.740<br>(110.097-333.398) |                              |                                   |             |              |                            |                             |   |
| <b>Disordini lisosomiali</b>                        |                                |                              |                                   |             |              |                            |                             |   |
| GSD-II  | 1:120.743<br>(78.326-187.969)  | 1:201.000                    | 1:146.000                         |             |              |                            | 1:76.336                    | da 1:588.000 a 1:763.000<br>Kemper AR 2007;<br>da 1:40.000-1:300.000<br>Chien YH 2008 |
| GDS II - infantile                                  |                                |                              |                                   |             |              |                            | 1:142.857                   |   |
| GDS II - adulta                                     |                                |                              |                                   |             |              |                            | 1:50.000                    |   |
| MF  |                                | 1:117.000                    | 1:117.000                         |             |              |                            |                             | da 1:117.000 a 1:40.000<br>O'Mahony C 2010  |
| MF Maschi   |                                |                              |                                   |             |              | 1:193.605 *<br>1:99.592 ** | 1:476.190 *<br>1:238.095 ** |   |
| MF Femmine  |                                |                              |                                   |             |              | 1:129.591 *                |                             |   |
| MPS I   |                                | 1:111.000                    | 1:88.000                          | 1:93.458    | 1:144.928    | 1:138.628                  | 1:84.033                    |   |
| MPS I/H   |                                |                              |                                   | 1:131.579   | 1:163.934    |                            |                             |   |
| MPS I/HS  |                                |                              |                                   | 1:416.666   | 1:3.333.333  |                            |                             |   |
| MPS I/S   |                                |                              |                                   | 1:1.428.571 | 1:2.000.000  |                            |                             |   |
| MPS II  | 1:82.816<br>(50.567-137.611)   | 1:162.000                    | 1:136.000                         |             | 1:156.250    | 1:233.652                  | 1:149.254                   |   |
| MPS VI  |                                | 1:248.000                    | 1:235.000                         |             | 1:434.783    | 1:2.057.529                | 1:666.667                   |   |

\* Denominatore: maschi + femmine

\*\* Denominatore: maschi

### **3.2 L'organizzazione dei programmi di screening**

In questo paragrafo saranno analizzati i lavori presenti in letteratura sui programmi screening da un punto di vista organizzativo.

#### **3.2.1 Lo screening in Toscana e le linee guida nazionali**

Per quanto riguarda l'Italia faremo riferimento sia al lavoro di La Marca et al. 2008 che riporta l'esperienza della regione Toscana, sia agli aspetti organizzativi di nostro interesse raccomandati dalle linee guida nazionali (SISMME-SISN).

##### **3.2.1.1 Toscana**

Il lavoro di La Marca et al. 2008 descrive i risultati di sei anni di esperienza nello screening neonatale metabolico allargato in Toscana. Tra gennaio 2002 e ottobre 2004 è stato eseguito uno studio pilota sui neonati delle provincie di Firenze, Prato e Pistoia e successivamente lo screening è stato esteso a tutta la regione. Nel periodo di studio lo screening ha interessato 160.000 neonati.

Il protocollo prevede che i prelievi vengano eseguiti tra le 48 e le 72 ore di vita e spediti giornalmente per corriere al laboratorio per lo screening neonatale. Il pannello di analiti usato per lo screening neonatale consiste in 14 aminoacidi, 48 acilcarnitine e 21 rapporti per un totale di 43 patologie. Quando un risultato dello screening è positivo vengono seguite due diverse procedure:

- (a) in caso di patologia a rischio di grave decompensazione metabolica nel periodo neonatale, il bambino viene immediatamente richiamato da uno specialista di malattie metaboliche e vengono eseguiti i test di conferma;
- (b) per tutte le altre patologie la *nursery* richiama il neonato per ripetere il test. Se anche i risultati del secondo test sono positivi viene eseguito il test di conferma.

I neonati con peso inferiore ai 1.800 grammi e i neonati in nutrizione parenterale o che hanno subito trasfusione hanno un protocollo specifico. Su questi neonati vengono eseguiti, oltre il prelievo tra 48 e 72 ore di vita, dei prelievi successivi con le seguenti tempistiche:

- sui neonati prematuri (<1.800 grammi) due successivi prelievi a 15 e a 30 giorni;
- sui bambini in nutrizione parenterale (inclusi i prematuri) un secondo prelievo 48 ore dopo la fine della nutrizione parenterale;

## I PROGRAMMI DI SCREENING NEONATALE ALLARGATO

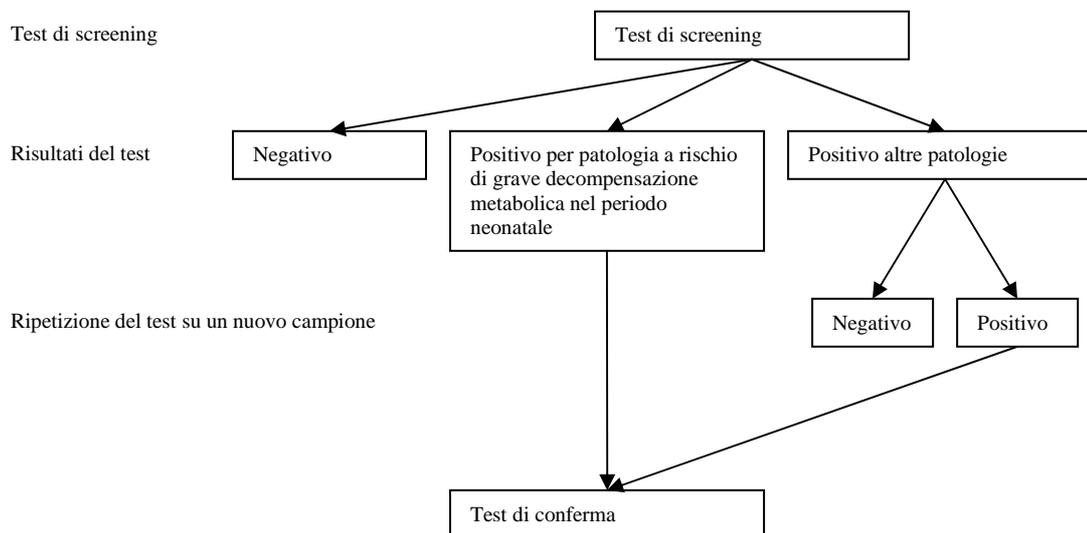
- sui neonati che hanno avuto una trasfusione, un secondo prelievo 7 giorni dopo la trasfusione.

Il risultato dello screening è considerato positivo se supera uno o più cut-off considerando i marker primari, i marker secondari o i rapporti. Durante il progetto pilota si usarono come cut-off le medie  $\pm 2$  deviazioni standard di tutti gli analiti interessati. Nel 2004 aumentarono gli analiti considerati ed il *recall rate* arrivò all'1,47%. Per alcuni analiti il cut-off fu modificato considerando le medie  $\pm 4,5$  deviazioni standard.

Il cut-off iniziale per C3 (propionil carnitina) era inizialmente di 3,3  $\mu\text{mol/L}$ . Per ridurre il *recall rate* fu portato a 5,65  $\mu\text{mol/L}$  e fu introdotto il *second tier test*. Il cut-off iniziale per la tirosina era 200, successivamente è stato introdotto nel panel il succinilacetone che è un marker specifico per questa patologia. Questo ha permesso di portare il cut-off della tirosina a 250. Con gli attuali marker il *recall rate* totale è dello 0,32%.

Nella discussione viene riferito di due falsi negativi: uno di acidemia metilmalonica con omocistinuria (Cbl C) e uno di tirosinemia di tipo I.

**Figura 3.1:** Flow-chart della procedura di screening in Toscana



### 3.2.1.2 Le linee guida nazionali

Vista la potenza della tecnologia tandem mass di diagnosticare un così elevato numero di patologie e poiché il pannello di malattie da sottoporre a screening non è condiviso a

## I PROGRAMMI DI SCREENING NEONATALE ALLARGATO

livello internazionale, la SISN-SISMME ha conferito ad ogni condizione un diverso grado di priorità legato al grado di evidenza e alla forza della raccomandazione.

Tra le patologie che rientrano nello screening della regione Veneto, alle seguenti è stata attribuita una forte raccomandazione e una chiara evidenza del miglioramento di salute: acidemia propionica, acidemia metilmalonica, acidemia isovalerica, aciduria glutarico di tipo I, fenilchetonuria, tirosinemia di tipo I, malattia delle urine a sciroppo d'acero, MCAD, VLCAD, LCHAD, aciduria glutarica di tipo II, deficit del trasporto della carnitina, deficit di carnitina palmitoil tranferasi tipo I. Le rimanenti patologie rientrano tra quelle che si raccomanda di adottare per una discreta evidenza del miglioramento di salute.

Solo per la fenilchetonuria e l'MCAD la forte raccomandazione è conseguenza dell'evidenza di studi ben progettati e ben condotti su popolazioni rappresentative.

Nelle linee guida non si fa alcun riferimento alla malattia di Pompe, alla malattia di Fabry e alle mucopolisaccaridosi.

Le linee guida suggeriscono i marker dei metaboliti e stabiliscono i criteri per definire i valori di riferimento e calcolare i cut-off.

Viene suggerita l'analisi di 5.000 campioni di neonati sani a termine e il confronto delle statistiche ottenute sugli analiti con i dati della letteratura. I cut-off devono essere definiti sulla base della distribuzione dei valori nella popolazione di riferimento e della distribuzione dei valori nei soggetti affetti. I cut-off devono ricadere nel *range* definito dal 99° percentile della popolazione di riferimento e il 5° percentile della distribuzione dei valori dei positivi. La distribuzione delle popolazioni di riferimento va confrontata con quella delle diverse mandate analitiche e se si osservano significativi scostamenti dalla misura di tendenza centrale, sono raccomandati aggiustamenti dei cut-off.

Le raccomandazioni sui soggetti prematuri, con trasfusioni o in nutrizione parenterale rispecchiano quanto previsto dal programma di screening della Regione Toscana.

Il campione che risulta al di fuori del punto di cut-off deve essere sottoposto a ripetizione del test entro 12 ore e prima di procedere al richiamo del paziente.

Nel caso di conferma del test è raccomandata un'analisi decisionale che tenga conto dell'entità della lesione biochimica osservata, del contesto essenziale cui far riferimento e su questa base classificare il soggetto come a basso o alto rischio.

## I PROGRAMMI DI SCREENING NEONATALE ALLARGATO

L'interpretazione dei risultati dello screening e le decisioni a essa correlate devono essere basate sui livelli assoluti dei metaboliti analizzati, sui livelli relativi dei metaboliti contigui alla via metabolica, sulla identificazione dei quadri clinici, sulla correlazione tra i rilievi positivi e negativi, sui dati relativi al singolo paziente (nutrizione parenterale, uso di farmaci, stato clinico, etc) e su eventuali re-test eseguiti prima del richiamo.

Nei casi a basso rischio si richiede per vie ordinarie un secondo campione, nei casi ad alto rischio si allerta l'*equipe* medica e si procede al richiamo che prevede l'applicazione dei test di conferma diagnostica e la visita del paziente.

La raccomandazione è di affidare al pediatra di famiglia il compito di comunicare ai genitori i risultati positivi. Il pediatra avrebbe un duplice compito: quello della conferma del rischio in base alla situazione clinica pregressa e quello dell'informazione alla famiglia: ambedue questi compiti devono tendere al comune obiettivo di una comunicazione che sia tanto equilibrata da non creare ansie immotivate e da non portare alla sottovalutazione del caso. Per questi test di conferma (con l'eccezione dei test genomici) è considerato essenziale mantenere un tempo totale di attesa <12 ore. Al punto nascita rimane il compito di comunicare i risultati negativi.

### 3.2.2 Portogallo

Il lavoro di Vilarinho et al. 2010 descrive il programma di screening neonatale metabolico allargato in Portogallo che ha avuto inizio nel 2004 e, pur non essendo obbligatorio, ha una copertura del 99,8%.

Durante il primo anno lo screening includeva solo le regioni del nord e del centro e successivamente è stato esteso all'intero paese incluse le isole di Madeira e le Azzorre. Vengono sottoposte a screening 24 patologie. Il lavoro si riferisce agli ultimi quattro anni e interessa 316.243 neonati.

Il protocollo prevede che i campioni di sangue vengano prelevati tra il 3° ed il 6° giorno di vita.

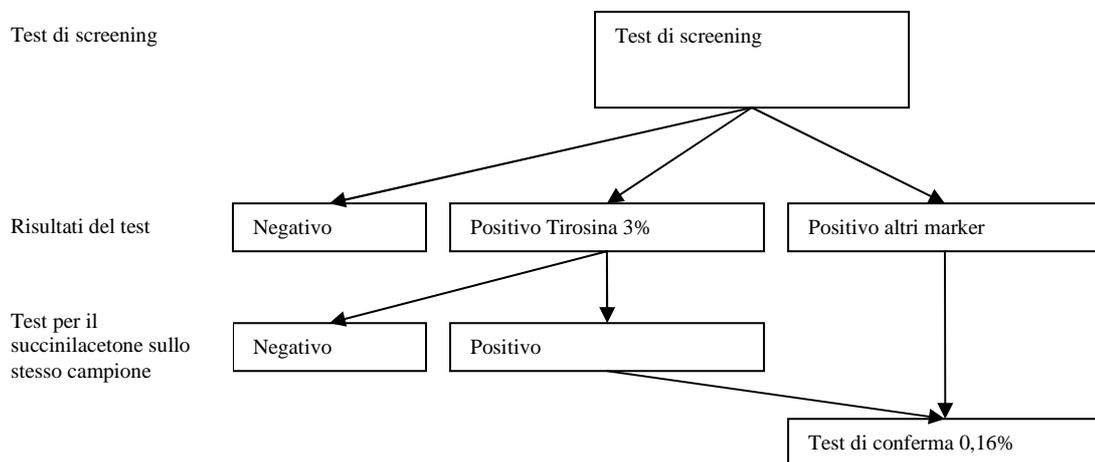
Per tutte le patologie, esclusa la tirosinemia di tipo I, che risultano positive allo screening viene eseguito direttamente il test di conferma. I cut-off sono stati stabiliti sulla base di una revisione della letteratura e dell'analisi dei dati di uno studio pilota sui primi 100.000 neonati sottoposti a screening (Figura 3.2).

## I PROGRAMMI DI SCREENING NEONATALE ALLARGATO

Per la tirosinemia di tipo I, se il livello di tirosina è superiore a 250, viene eseguito un secondo test sullo stesso campione per misurare il succinilacetone. Nel periodo considerato il 3% dei neonati aveva un livello di tirosina superiore al cut-off per i quali è stato richiesto il suddetto test.

Il *recoll rate* è stato dello 0,16%. Sono stati individuati 132 neonati con patologia metabolica. I falsi positivi sono stati 379 (0,12%), la specificità è stata del 99,9% mentre i valori predittivi positivi sono stati del 26%. La sensibilità del test per ciascuna patologia è stata del 100%: non ci sono stati falsi negativi.

**Figura 3.2:** Flow-chart della procedura di screening in Portogallo



### 3.2.3 Germania

Il lavoro di Schulze et al. 2003 descrive i risultati del programma di screening nella regione tedesca del Baden-Württemberg in un periodo di 42 mesi che va da aprile 1998 a settembre 2001, interessa 250.000 neonati e prevede lo screening di 23 patologie.

Il protocollo prevede che il prelievo venga effettuato tra il 3° e il 7° giorno di vita e i campioni vengano spediti per posta al laboratorio di screening. Ai neonati gravemente pretermine (<32 settimane di età gestazionale) viene eseguito un secondo prelievo dopo il 14° giorno di vita.

Giornalmente la gestione dei dati è divisa in due parti principali:

- 1) interpretazione tecnica dei dati;

## I PROGRAMMI DI SCREENING NEONATALE ALLARGATO

### 2) interpretazione clinica e decisioni.

La prima parte riguarda la definizione dei positivi sulla base dei risultati del test. Per ciascun marker o rapporto è stato preso come cut-off il percentile 99,5 o il percentile 0,05 calcolati su 10.000 neonati sani. Ciascun marker che supera il cut-off viene flaggato automaticamente e viene ripetuto il test sullo stesso campione di sangue. Un campione viene considerato vero-positivo se entrambi i test sono positivi. Per certe discrepanze tra il primo ed il secondo test, ne viene effettuato un terzo e si considera come risultato la media dei due risultati più vicini. Si considerano le discrepanze in cui il primo test eccede il cut-off di >30% ed il secondo test è normale.

Se un marker è flaggato sia al primo che al secondo test si passa alla seconda fase.

La seconda parte riguarda la decisione di inviare o meno al test di secondo livello (test di conferma diagnostica) i neonati che superano il cut-off. Degli esperti in malattie metaboliche decidono se il test è anormale (positivo) o normale (negativo) usando un sistema di stima che include la forza della deviazione dal cut-off e il profilo globale dei metaboliti. Il sistema di stima è stato ottimizzato sulla base di misurazioni in pazienti con patologia conclamata, *report* in letteratura, analisi della sensibilità e specificità diagnostica dei risultati di precedenti screening e l'esperienza dell'investigatore. In caso l'esperto stabilisca che il risultato dello screening è positivo, viene prelevato un nuovo campione sul neonato e viene ripetuto il test oppure il neonato viene inviato a un centro di trattamento se ulteriori ritardi possono mettere in pericolo la sua salute. Al momento in cui il neonato viene richiamato, viene prelevato anche un campione di urine. Per i positivi anche al secondo test, lo specialista in malattie metaboliche informa il responsabile medico o ostetrico per contattare la famiglia e indirizzarla presso il centro di riferimento per la diagnosi definitiva.

Nel periodo di studio considerato, durante la prima fase sono stati flaggati il 13,8% dei campioni (Figura 3.3) e dopo il re-test sono stati sottoposti all'analisi degli esperti il 5,8% dei neonati. Nella seconda fase sono stati richiamati per il secondo test lo 0,38% dei neonati.

Con lo screening sono stati individuati 106 veri positivi ma questa lunga procedura ha fatto sì che per 9 dei 106 casi diagnosticati, i sintomi si siano presentati prima che i risultati del test di screening fossero disponibili: in 6 pazienti ci fu una diagnosi prima

## I PROGRAMMI DI SCREENING NEONATALE ALLARGATO

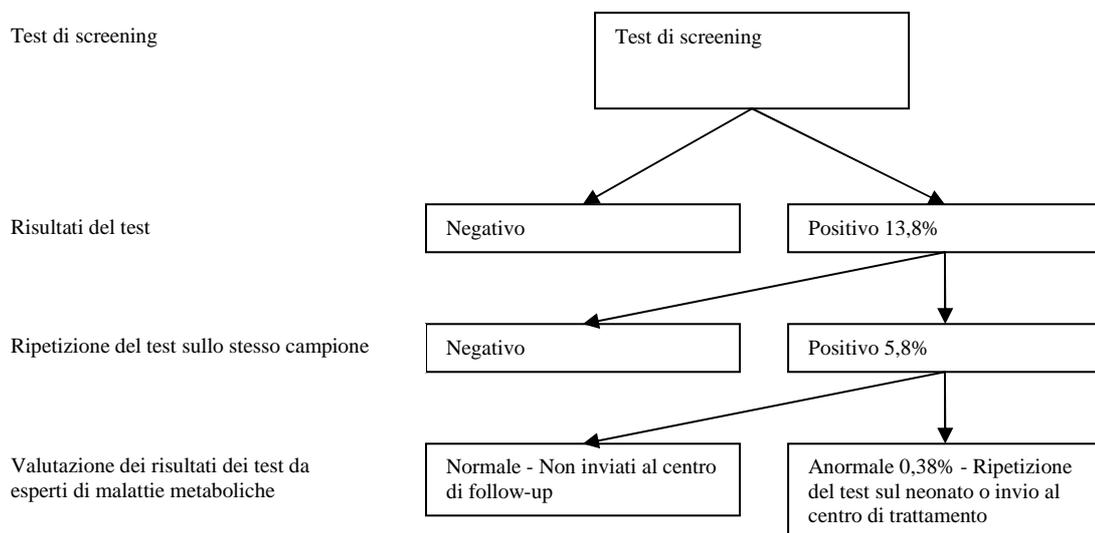
che i risultati del test fossero disponibili ed in 3 la diagnosi coincide con il test di screening. L'efficienza diagnostica del test è stata del 94%.

Per la fenilchetonuria è stato eseguito il confronto tra la tecnica tandem mass e il test di determinazione enzimatica della fenilalanina che è stato condotto in parallelo: la nuova tecnologia porta ad avere una proporzione più bassa di falsi positivi 0,05% vs 0,23%.

Con la tecnologia tandem mass si sono verificati ben 4 falsi negativi per HPE che sono stati individuati con il test di determinazione enzimatica della fenilalanina.

Attraverso l'invio sistematico a tutti gli ospedali pediatrici della Germania e ai centri di riferimento per le malattie metaboliche non sono stati identificati altri falsi negativi.

**Figura 3.3:** Flow-chart della procedura di screening in Germania



### 3.2.4 California

L'articolo di Feuchtbaum et al. 2006 presenta i risultati dello studio pilota condotto tra il gennaio 2002 e il giugno 2003 in California. Lo studio pilota era considerato un progetto di ricerca e la partecipazione dei reparti era volontaria. Lo screening veniva offerto ai genitori solo nei reparti che partecipavano allo studio. I genitori erano liberi di scegliere se sottoporre o meno il loro bambino allo screening. Nel periodo considerato i neonati in California sono stati 755.673 ma lo studio pilota ne ha interessati 353.892, cioè il 47%.

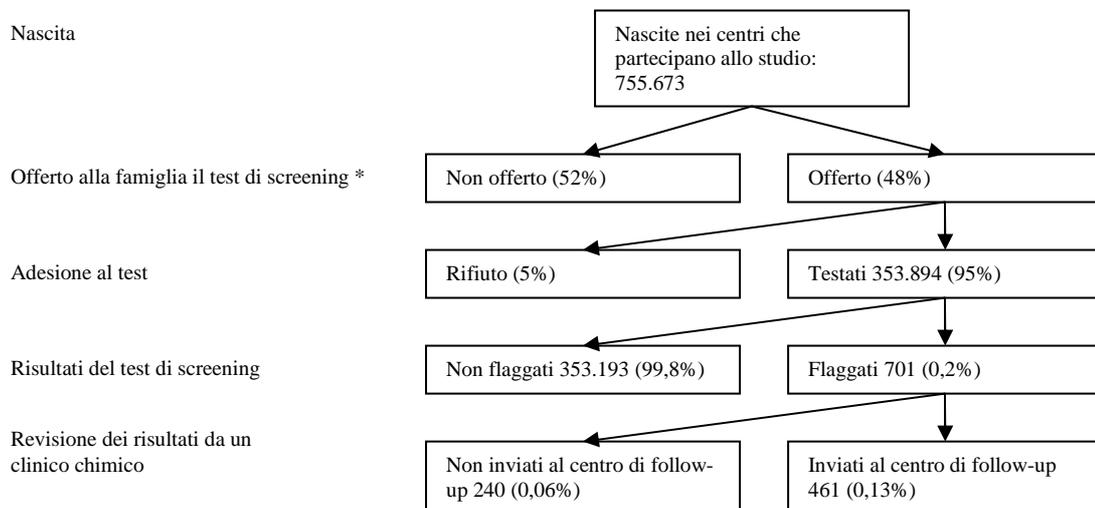
## I PROGRAMMI DI SCREENING NEONATALE ALLARGATO

Nell'articolo non è stato specificato il momento del prelievo.

Per stabilire i cut-off sono state analizzate la code delle distribuzioni e i percentili di 10.000 campioni prima dello studio pilota e sono stati stabiliti i marker primari e secondari. Sono stati stabiliti i cut-off di 24 acilcarnitine e 14 aminoacidi. Altre 6 acilcarnitine sono state riportate ma gli autori non ritengono che i cut-off calcolati siano appropriati. I cut-off sono stati rivalutati dopo 3 mesi cioè dopo aver testato circa 40.000 campioni ed una terza volta dopo circa 60.000 campioni. Prima di iniziare lo studio pilota sono stati analizzati anche i campioni di 45 casi noti.

Tutti i risultati positivi del test sono stati rivisti da un biochimico clinico che decideva se il caso dovesse essere riferito al centro di follow-up (Figura 3.4). Non sono stati riferiti valori elevati di alcune patologie a esordio precoce non associate a segni clinici. Tutti i valori elevati sono stati inviati al centro di riferimento per le malattie metaboliche per la conferma diagnostica.

**Figura 3.4:** Flow-chart della procedura di screening in California



\* Molti ospedali hanno rifiutato la partecipazione allo studio a causa della raccolta del consenso informato.

Durante i primi cinque mesi dello screening i neonati positivi al test di screening sono stati lo 0,49%, dopo l'adattamento dei cut-off avvenuto nel corso dello studio si è arrivati allo 0,07%. Considerando l'intero periodo la proporzione di neonati positivi al test di screening è stata dello 0,2%, mentre la proporzione di neonati sottoposti a screening inviati al test di conferma diagnostica è stata dello 0,13%.

Durante il periodo dello studio tra i neonati sottoposti a screening si sono verificati tre falsi negativi: un caso di LCHADD e uno di MSUD che sarebbero stati individuati con i livelli di cut-off rivisti e un caso di VLCADD che era stato individuato con la diagnosi prenatale e trattato, di conseguenza il deficit non poteva essere individuato successivamente.

### **3.2.5 New England**

Il lavoro di Zytovicz et al. 2001 descrive i risultati dello studio pilota iniziato nel New England nel febbraio del 1999. Il progetto prevedeva l'uso della spettrometria tandem mass per 4 malattie metaboliche il cui screening era già obbligatorio (MCAD, PKU, MSUD e HCU) e altre 19 patologie. I genitori firmavano il consenso informato oppure potevano rifiutare l'esame. Poiché altri stati vicini aderirono allo studio ma le patologie che interessavano i singoli stati erano diverse, il numero di neonati sottoposti a screening varia da 164.000 a 257.000.

Il protocollo prevedeva che i campioni venissero prelevati da 1 a 3 giorni dopo la nascita. Il laboratorio iniziava l'analisi il giorno stesso che riceveva i campioni, non è specificato quando e come venivano inviati al laboratorio di analisi.

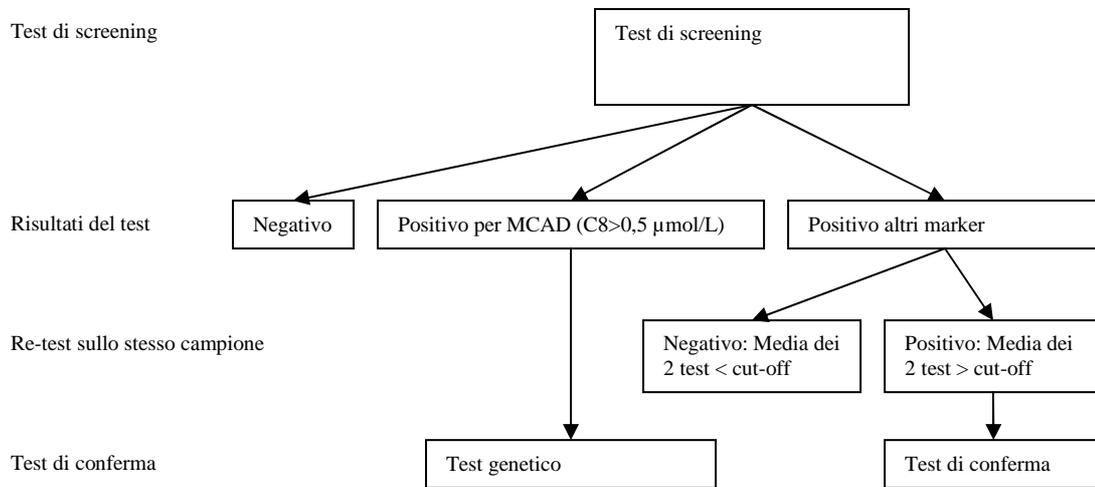
I campioni che risultavano positivi al primo test, venivano riesaminati. Veniva calcolata la media dei due risultati e se la media superava il cut-off il neonato veniva inviato al follow-up. I risultati del test erano disponibili il giorno successivo. I risultati del re-test erano disponibili dopo 28 ore dal ricevimento del campione.

Per l'MCAD si procedeva diversamente: i test con C8 (octanoil carnitina)  $>0,5 \mu\text{mol/L}$  venivano subito analizzati per 985A→G (analisi genetica).

Non sono state rilevate informazioni sui falsi negativi ma si ritiene che l'esperienza dei due anni di studio pilota non sia sufficiente a fornire una stima accurata degli stessi.

Il lavoro pone un'attenzione particolare ai neonati ricoverati in terapia intensiva neonatale o di peso molto basso. Una proporzione elevata di questi neonati risulta positiva al test di screening e nella discussione si dichiara la necessità di stabilire dei cut-off diversi per età del prelievo e peso del bambino.

**Figura 3.5:** Flow-chart della procedura di screening in New-England



### 3.2.6 North Carolina

Il lavoro di Frazier et al. 2006 descrive l'esperienza di otto anni (dal 1997 al 2005, studio pilota dal 1997 al 1999) di programma di screening neonatale metabolico allargato in North Carolina.

Il prelievo veniva effettuato quando il neonato aveva almeno 24 ore di vita. I campioni venivano spediti via posta o corriere al laboratorio di analisi (*North Carolina State Public Health Laboratory*). Il volume di attività era di circa 118.000 bambini l'anno.

Oltre alla tandem mass i campioni erano sottoposti a screening anche per la galattosemia, l'ipotiroidismo congenito, l'iperplasia surrenalica congenita, l'emoglobinopatia e il deficit di biotidiasi.

I cut-off erano di 4 deviazioni standard superiori alla media dei primi 2.000 campioni, i cut-off sono stati successivamente modificati. Sono stati previsti due cut-off: uno più basso chiamato cut-off *borderline*, uno più elevato chiamato cut-off diagnostico.

Se i risultati del primo test superavano il cut-off, veniva rieseguito il test sullo stesso campione. Il tempo medio intercorso tra la raccolta del campione e la stesura dei rapporti per i risultati anormali è stato di 7,7 giorni.

I risultati *borderline* con la richiesta di ripetere il prelievo venivano inviati per posta dal laboratorio al punto nascita e al medico di base del neonato. Se il campione per ripetere

## I PROGRAMMI DI SCREENING NEONATALE ALLARGATO

il test non perveniva entro due settimane, i genitori del neonato venivano contattati con lettera raccomandata.

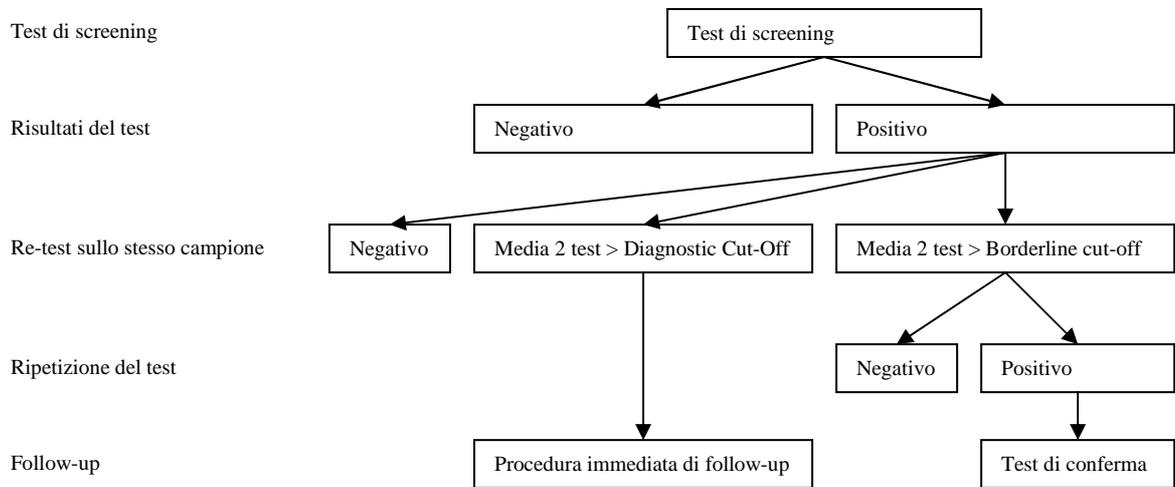
I risultati che superavano il cut-off diagnostico venivano comunicati diversamente. Il laboratorio contattava lo specialista in patologie metaboliche responsabile del follow-up che immediatamente contattava il medico di base del paziente e in alcuni casi contattava anche la famiglia. Queste procedure prevedevano che il paziente fosse indirizzato presso il centro di malattie metaboliche entro 24-28 ore dal contatto con il medico di base. Fax, e-mail e rapporti via web seguivano la telefonata con il medico di base.

Il bambino che invece aveva un primo risultato *borderline* e un secondo risultato *borderline* seguiva la stessa procedura di follow-up. I test di conferma venivano eseguiti con l'obiettivo di iniziare il trattamento tra il 10° ed il 14° giorno di vita.

Nel periodo di studio sono stati individuati 6 falsi negativi: si tratta di bambini che non presentavano valori elevati per i cut-off utilizzati in quel periodo, erano due casi di GA I, un caso di MMA (Cbl A), un caso di deficit di  $\beta$ - ketothiolase, un caso di MSUD e uno di TYR I.

La proporzione di positivi al *borderline* cut-off è stata dello 0,45% con una proporzione di valori predittivi positivi del 33%, mentre la proporzione di positivi al cut-off diagnostico è stata dello 0,03% con il 60% di valori predittivi positivi.

**Figura 3.6:** Flow-chart della procedura di screening in California



### 3.2.7 Australia

Il lavoro di Wiley et al. del 1999 descrive il progetto pilota dello screening neonatale per le malattie metaboliche con la tecnologia tandem mass che è iniziato nel 1997. Il successivo lavoro di Wilcken et al. del 2003 valuta invece l'efficacia dello screening neonatale confrontando le diagnosi nel periodo precedente lo screening con quelle successive e ne fornisce l'incidenza. Lo screening neonatale con la tandem mass spettrometria è stato introdotto nel New South Wales e nell'Australian Capital Territory nel 1998, nel South Australia nel 1999, e nel Victoria nel 2002 ed ha interessato circa 362.000 neonati.

Lo studio pilota è stato necessario per definire i cut-off. Se un analita superava il 99,5° percentile, veniva eseguito il re-test e se necessarie ulteriori analisi. Se l'analita presentava valori *borderline*, veniva ripetuto il test su un nuovo campione. I livelli dei cut-off sono stati stabiliti, infatti sulla base della popolazione dello studio pilota e dall'analisi di campioni in archivio di bambini con diagnosi conclamata.

I campioni venivano prelevati tra le 48 e le 72 ore di vita del neonato. I risultati venivano inseriti in un *database* e un algoritmo particolare li confrontava con dei valori di riferimento. L'articolo parla di test su un nuovo campione o di follow-up urgente ma la procedura per definire i positivi al primo livello non è chiara. Attualmente i risultati

sono disponibili entro 24 ore. I test di conferma vengono eseguiti in laboratori di genetica.

Tra i 362.000 neonati sottoposti a screening lo 0,15% ha richiesto un secondo test oppure un follow-up urgente e i valori predittivi positivi sono stati del 10%. Durante il periodo dello screening 57 casi sono stati diagnosticati: di questi 48 tramite lo screening, mentre 6 hanno avuto una diagnosi definitiva prima che i risultati dello screening fossero disponibili.

Durante il periodo considerato sono stati rilevati ben 7 falsi negativi, un caso per ognuna delle seguenti patologie: tirosinemia di tipo I, tirosinemia di tipo II, aciduria glutarica di tipo I, deficit di cobalamina C, deficit dell'acil-CoA deidrogenase a catena molto lunga, iperglicemia non chetotica, deficienza 3-chetotiolase.

### **3.2.8 Studi pilota sullo screening della malattia di Pompe, della malattia di Fabry e delle mucopolisaccaridosi**

Le patologie lisosomiali non rientrano nei programmi di screening con la tecnologia tandem mass attualmente attivi, anche se si prevede che diventeranno parte dei programmi di screening esistenti nel prossimo futuro. Negli Stati Uniti lo screening neonatale per le patologie lisosomiali con la tecnica tandem mass diventerà obbligatorio in 4 stati (Illinois, Missouri, Mississippi e New Mexico) dal 2012. Al momento lo screening neonatale con la tecnologia tandem mass per la malattia di Pompe e la malattia di Fabry è stato oggetto in Austria di studi pilota (Dajnoki et al. 2008; Dajnoki et al. 2010).

In questo paragrafo vengono descritti i diversi approcci sullo screening delle malattie lisosomiali riportati in letteratura.

I primi lavori riguardano lo screening con la valutazione dell'attività enzimatica. A Taiwan, dove la malattia di Pompe è più frequente rispetto alla popolazione mondiale, nel 2005 ha avuto inizio uno studio pilota per valutare la fattibilità dello screening con il metodo fluorometrico per l'attività enzimatica per determinare l'attività dell' $\alpha$ -glucosidasi (Chien et al. 2008). Lo studio è stato condotto nel National Taiwan University Hospital che copre circa il 45% dei nati a Taiwan. In una popolazione di 206.088 neonati sono stati individuati attraverso lo screening 6 casi di malattia di Pompe: 5 a esordio precoce e 1 a esordio tardivo. I neonati con patologia a esordio

## I PROGRAMMI DI SCREENING NEONATALE ALLARGATO

precoce hanno iniziato la terapia enzimatica prima dei 30 giorni di vita. Alla diagnosi erano tutti asintomatici, ma c'era evidenza di disfunzione cardiaca e deposito di glicogeno nei muscoli. Nei neonati non sottoposti a screening la diagnosi veniva effettuata in media a 4 mesi di età. Il neonato con esordio tardivo non presentava problemi cardiaci nel periodo neonatale e iniziò la terapia a sostituzione enzimatica a 14 mesi a seguito di problemi motori progressivi. I neonati che iniziarono il trattamento precoce a seguito delle screening neonatale risultarono con funzionalità cardiaca nella norma, crescita e apprendimento appropriati per l'età.

Studi pilota per la malattia di Fabry sono stati condotti a Taiwan e in Italia. Il programma pilota condotto a Taiwan (Hwu et al. 2009) riguardava 171.977 neonati. L'incidenza della malattia di Fabry risultò essere circa 1:1.250 maschi dei quali l'86% presentava mutazioni associate al fenotipo a insorgenza tardiva. Furono sottoposte a screening anche 81.679 femmine e tra queste furono diagnosticati 2 casi.

Il lavoro di Spada et al. del 2006 descrive lo screening di 37.104 neonati maschi italiani tra i quali fu individuata un'incidenza di 1:3.100 neonati prevalentemente con mutazione della forma a insorgenza tardiva.

Veniamo ora allo screening con la tecnologia tandem mass. In Austria (Dajnoki et al. 2008) è stato condotto uno studio pilota per valutare l'utilità della spettrometria tandem mass per misurare l'attività di GAA per la malattia di Pompe. Sono stati sottoposti a screening 10.279 neonati che comprendevano sia neonati a termine che pretermine. Il campione veniva prelevato tra le 48 e le 72 ore di vita e veniva analizzato nell'arco di due settimane. Sono stati prelevati anche campioni da 29 soggetti con patologia sia nella forma infantile (14) sia nella forma adulta (15) e da 229 adulti sani. Tutti i pazienti con la malattia di Pompe presentavano  $GAA < 2$  senza differenze tra la forma adulta e la forma infantile. La tandem mass è stata considerata un metodo efficace per lo screening neonatale di questa patologia. Il *recall rate* è stato dello 0,039% molto basso se confrontato con altri marker. Gli autori ritengono che il *recall rate* possa essere ulteriormente ridotto quando i test molecolari del gene GAA su spot sarà implementato come test di secondo livello. Per i pazienti con forma adulta i benefici di un programma di screening non sono evidenti ma possono aiutare ad evitare ritardi significativi nella diagnosi, procedure diagnostiche invasive e prevenire conseguenze a lungo termine.

Meno efficace si è rivelato invece lo screening con la tecnologia tandem mass per la malattia di Fabry. Sempre in Austria (Dajnoki et al. 2010) è stata svolta un'analisi degli enzimi per la validazione della tecnica tandem mass per la malattia di Fabry. Sono stati analizzati 5.025 campioni da maschi, 4.677 campioni da femmine nati in Austria e che comprendevano sia neonati a termine che pretermine. I campioni venivano prelevati tra le 48 e le 72 ore di vita e analizzati nell'arco di due settimane. Il cut-off è stato fissato a  $GLA < 3,18$ . Dall'analisi di 9 maschi e 32 femmine con patologia è emerso che con questo cut-off il 16% delle femmine con patologia non sarebbero state richiamate per il retest. Il *recall rate* è dello 0,38%. La proporzione di falsi negativi nelle femmine è la stessa usando come tecnica di screening il metodo fuorimetrico per l'analisi dell'attività enzimatica.

Per quanto riguarda lo screening della mucopolisaccaridosi di tipo I e II, dei campioni sono stati analizzati con la spettrometria tandem mass e descritti. Per la mucopolisaccaridosi di tipo VI lo screening neonatale è oggetto di test pilota in molti laboratori che partecipano a progetti collaborativi in Europa, negli Stati Uniti e in Australia (Valayannopoulos et al. 2010).

L'efficacia delle terapie al momento disponibili e la diagnosi di malattia in neonati che presentano il fenotipo a esordio tardivo è oggetto di discussione sull'opportunità di effettuare gli screening neonatali per queste patologie.

### **3.2.9 Confronti tra i programmi di screening**

I lavori considerati forniscono notevoli informazioni oltre che sull'incidenza, che abbiamo già visto nel paragrafo precedente, anche sull'organizzazione dello screening in particolare sul momento del prelievo e sulla tempistica, sui protocolli per i prematuri, su come definire un positivo al test di primo livello e sull'accuratezza diagnostica (sensibilità, specificità, valori predittivi positivi).

Il momento del prelievo varia tra i diversi programmi di screening. L'intervallo è molto ristretto in Toscana e Australia, dove il prelievo viene effettuato nel terzo giorno di vita (tra le 48 e le 72 ore), mentre è più largo in Portogallo (tra il 3° ed il 6° giorno di vita) ed in Germania (tra il 3° e il 7° giorno di vita). Viene eseguito invece più precocemente in North Carolina e New England dove viene eseguito dal secondo giorno di vita.

## I PROGRAMMI DI SCREENING NEONATALE ALLARGATO

Queste tempistiche possono essere diverse per i neonati prematuri o in nutrizione parenterale.

Il lavoro di Zytovicz et al. 2001 pone particolare attenzione ai neonati ricoverati in terapia intensiva neonatale o di peso molto basso perché i profili dei metaboliti in questa popolazione sono diversi rispetto alla popolazione generale. Questi neonati costituiscono più della metà dei neonati che superavano i cut-off pur essendo circa il 5% della popolazione screenata. Considerando inoltre che il valore di riferimento di alcuni marker cambia nelle prime settimane di vita, Zytovicz sottolinea l'importanza di stabilire dei cut-off aggiustati per età del neonato e peso e dei criteri di screening diversi per questi neonati.

Solo i lavori sui programmi della Toscana e della Germania specificano i protocolli che vengono eseguiti per i neonati prematuri. A questi neonati, oltre al prelievo che viene effettuato alla stessa età dei neonati a termine, vengono effettuati dei prelievi successivi. I due programmi differiscono sia nella definizione della popolazione da sottoporre a questi particolari protocolli sia nella tempistica e nel numero dei prelievi. In Toscana questa procedura riguarda i neonati al di sotto dei 1.800 grammi, i neonati in nutrizione parenterale o che hanno subito trasfusione, mentre in Germania i neonati al di sotto delle 32 settimane di età gestazionale.

In Toscana sono previsti, oltre il prelievo tra 48 e 72 ore, dei prelievi successivi con le seguenti tempistiche:

- ai neonati di peso <1.800 grammi: due successivi prelievi a 15 e a 30 giorni;
- ai bambini in nutrizione parenterale (inclusi i prematuri): un secondo prelievo 48 ore dopo la fine della nutrizione parenterale;
- ai neonati che hanno avuto una trasfusione: un secondo prelievo 7 giorni dopo la trasfusione.

In Germania invece viene eseguito un secondo prelievo dopo il 14° giorno di vita.

La procedura per definire un neonato positivo al test di screening prevede vari passaggi. Diversi lavori specificano che, in caso di risultato positivo, lo stesso campione venga ritestato. I criteri per stabilire la positività stando ai valori del test e del re-test sono diversi. Le linee guida nazionali della SISMME-SISN suggeriscono la media tra i valori ottenuti nei due test. In Germania e Australia un campione viene considerato positivo se entrambe i test sono positivi. In particolare in Germania per certe discrepanze tra il

## I PROGRAMMI DI SCREENING NEONATALE ALLARGATO

primo ed il secondo test, ne viene effettuato un terzo e si considera come risultato la media dei due risultati più vicini. Si considerano le discrepanze se il primo test eccede il cut-off di >30% e il secondo test è normale. Nel New England e in North Carolina invece un risultato è considerato positivo se la media dei due test è positiva.

I lavori di Germania e California riportano inoltre il coinvolgimento di uno o più esperti per valutare la positività al test e l'invio alle fasi successive.

La ripetizione del test su un nuovo campione è prevista in Toscana, Germania e North Carolina: in Toscana e Germania limitatamente alle patologie non a rischio di grave decompensazione metabolica nel periodo neonatale, mentre in North Carolina limitatamente ai valori che superano il cut-off *borderline* e non quello diagnostico. Anche le linee guida nazionali suggeriscono la ripetizione del test su un nuovo campione se la patologia è a basso rischio.

La tempistica non è un elemento da sottovalutare. Si è riscontrato che, a volte, i risultati del test di screening arrivano dopo i sintomi e la diagnosi di malattia. Alcuni lavori citano i tempi entro cui sono disponibili i risultati. In New England i risultati del re-test sono disponibili dopo 28 ore dal ricevimento del campione. In North Carolina il tempo medio intercorso tra la raccolta del campione e la stesura del rapporto per i risultati anormali è di 7,7 giorni e i test di conferma vengono eseguiti con l'obiettivo di iniziare il trattamento tra il 10° ed il 14° giorno di vita. In Australia i risultati del test sono disponibili entro 24 ore.

Per evitare che la diagnosi preceda i risultati del test, alcuni programmi prevedono dei protocolli più rapidi per alcune patologie. Come già detto, in Toscana e Germania i positivi al test per le patologie a rischio di grave decompensazione metabolica nel periodo neonatale, non eseguono il test su un nuovo campione ma vengono immediatamente richiamati da uno specialista di malattie metaboliche e vengono eseguiti i test di conferma. Nel New England è previsto che, se il risultato del test è positivo per l'MCAD, vengano subito effettuate le analisi per 985A→G (analisi genetica) senza effettuare il re-test sullo stesso campione. Particolarmente interessante è la procedura eseguita in North Carolina che prevede la presenza di due cut-off: uno *borderline* e uno diagnostico (più elevato). I neonati che al test re-test superano il cut-off diagnostico vengono immediatamente inviati ai test di conferma diagnostica senza ripetere il test su un nuovo campione.

## I PROGRAMMI DI SCREENING NEONATALE ALLARGATO

Altre informazioni importanti per l'organizzazione dello screening sono i metaboliti che vengono considerati con i rispettivi cut-off per definire la positività del test di screening e i test di secondo livello che vengono adottati (Tabella 3.4).

I primi saranno riportati nei paragrafi successivi per Toscana, Portogallo, Germania, New England e Australia, mentre i test di conferma diagnostica sono riportati solo nei lavori di Portogallo e Germania.

Mentre, come abbiamo già visto l'incidenza viene riportata per tutte le patologie, la proporzione di positivi al test di primo livello non è riportata in tutti i lavori: Toscana, Portogallo e Australia forniscono il dato globale, Germania e California per patologia, mentre dai lavori del New England e del North Carolina lo si ricava dai valori per metabolita. In quasi tutti i lavori vengono riportati i falsi negativi.

**Tabella 3.4:** Informazioni disponibili nei lavori

|                       | <b>Cut-off</b> | <b>Test di secondo livello</b> | <b>Positivi al primo livello</b> | <b>Falsi negativi</b> |
|-----------------------|----------------|--------------------------------|----------------------------------|-----------------------|
| <b>Toscana</b>        | Per patologia  | Non descritto                  | Globale                          | Per patologia         |
| <b>Portogallo</b>     | Per patologia  | Descritto                      | Globale                          | Per patologia         |
| <b>Germania</b>       | Per patologia  | Descritto                      | Per patologia                    | Per patologia         |
| <b>California</b>     | No             | Non descritto                  | Per patologia                    | Per patologia         |
| <b>New England</b>    | Per marker     | Non descritto                  | Per marker                       | No                    |
| <b>North Carolina</b> | No             | Non descritto                  | Per marker                       | Per patologia         |
| <b>Australia</b>      | Per patologia  | Non descritto                  | Globale                          | Per patologia         |

### 3.3 I cut-off e i positivi al test di primo livello

Le linee guida SISMME-SISN non riportano i cut-off da utilizzare ma solo i marker delle patologie che sono riportati in Tabella 3.5.

I cut-off utilizzati sono stati specificati nei lavori di Toscana, Portogallo, Germania, North Carolina, New England e Australia. Mentre i primi cinque riportano i cut-off dei metaboliti specificando a quale patologia si riferiscono (Tabella 3.6), il lavoro australiano non specifica le patologie (Tabella 3.7).

La prima cosa evidente è che non in tutti i paesi sono utilizzati gli stessi metaboliti per una certa patologia e le differenze sono ancora più marcate per i rapporti. Per la malattia di Pompe e la malattia di Fabry sono disponibili solo i cut-off degli studi pilota condotti in Austria che sono stati rispettivamente alfa-glucosidasi acida  $GAA < 2$  (Dajnoki et al. 2008) e alfa-galattosidasi  $GLA < 3,18$  (Dajnoki et al. 2010).

## I PROGRAMMI DI SCREENING NEONATALE ALLARGATO

La decisione sui cut-off da utilizzare si basa sulla revisione della letteratura ma soprattutto sull'analisi di un certo numero di campioni analizzati prima di iniziare lo screening. Anche le linee guida nazionali (SISMME-SISN) danno indicazioni in tal senso.

In Toscana durante il progetto pilota si usarono come cut-off le medie  $\pm 2$  deviazioni standard di tutti gli analiti interessati. Nel corso del tempo per alcuni analiti il cut-off fu modificato considerando le medie  $\pm 4,5$  deviazioni standard.

In Portogallo i cut-off sono stati stabiliti sulla base di una revisione della letteratura e dell'analisi dei dati di uno studio pilota sui primi 100.000 neonati sottoposti a screening e anche in Germania si considerano come cut-off il percentile 99,5 o il percentile 0,05 calcolati su 10.000 neonati sani.

In California per stabilire i cut-off sono state analizzate la code delle distribuzioni e i percentili di 10.000 campioni prima dello studio pilota e sono stati stabiliti i marker primari e secondari. I cut-off sono stati rivalutati dopo tre mesi cioè dopo aver testato circa 40.000 campioni ed una terza volta dopo circa 60.000 campioni. Prima di iniziare lo studio pilota sono stati analizzati anche i campioni di 45 casi noti.

In North-Carolina i cut-off erano di 4 deviazioni standard superiori alla media dei primi 2.000 campioni e i cut-off sono stati successivamente modificati nel tempo. Sono previsti due cut-off: uno più basso chiamato cut-off *borderline*, uno più elevato chiamato cut-off diagnostico.

Anche in Australia i cut-off si basano sui dati dello studio pilota e sull'analisi di campioni conservati che avevano avuto la diagnosi di patologia metabolica.

I PROGRAMMI DI SCREENING NEONATALE ALLARGATO

**Tabella 3.5:** Marker per lo screening delle patologie definiti dalla SISMMME-SISN

| <b>Patologia</b> | <b>Marker primario</b>         | <b>Rapporti</b>                        |
|------------------|--------------------------------|--|
| PA               | C3                             | C3/C2 C3/C16                           |
| MMA              |                                |  |
| Mut              | C3                             | C3/C2 C3/C16                           |
| Clb C, D         | C3                             | C3/C2 C3/C16 C3/Met                    |
| IVA              | C5                             | C5/C0 C5/C2 C5/C3                      |
| GA I             | C5DC                           | C5CD/C5OH C5CD/C8<br>C5CD/C16          |
| PKU              | Phe                            | Phe/Tyr                                |
| TYR I            | Tyr SUAC                       | Tyr/Cit                                |
| MSUD             | Val Ile+Leu                    | Val/Phe (Ile+Leu)/Phe<br>(Ile+Leu)/Ala |
| ARG              | -                              | -                                      |
| ASA              | Cit                            | Cit/Arg                                |
| CIT              | Cit                            | Cit/Arg                                |
| VLCAD            | C14:2 C14:1 C14                | C14:1/C16                              |
| LCHAD            | C16:1OH C16OH<br>C18:1OH C18OH | C16OH/C16                              |
| MCAD             | C6 C8 C10:1 C10                | C8/C2 C8/C10                           |
| SCAD             | C4                             | C4/C2 C4/C3 C4/C8                      |
| GA II            | C5-C18 saturi o insaturi       | Tutti i rapporti applicabili           |
| CPT I            | C0                             | C0/(C16+C18)                           |
| CPT II           | C16 C18:2 C18:1 C18            | C0/(C16+C18)                           |
| CACT             | C16 C18:2 C18:1 C18            | C0/(C16+C18)                           |
| CUD              | C0                             | (C0+C2+C3+C16+C18:1)/Cit               |

## I PROGRAMMI DI SCREENING NEONATALE ALLARGATO

**Tabella 3.6 (1/2):** Cut-off utilizzati nei programmi di screening ( $\mu\text{mol/L}$ )

| Patologia | Toscana (La Marca 2008)        |                                  |   | Portogallo (Vilarinho 2010)                            | Germania (Schulze 2003)                                |                                    | North Carolina (Frazier 2006)                    |  | New England (Zytkivicz 2001) |                   |                |
|-----------|--------------------------------|----------------------------------|---|--|--|------------------------------------|--|--|------------------------------|-------------------|----------------|
|           | Marker primario                | Marker secondario                | Rapporti  | Marker e rapporti                                      | Marker   | Rapporti                           | Borderline                                       | Diagnostico                                      | Marker primario              | Marker secondario | Rapporti       |
| PA        | C3 (>3.3)                      | Gly n/ (>721)                    | C3/C0 (>0.13)<br>C3/C4 (>12.5)<br>C3/C16 (>1.6)       | C3 (>6.23)<br>e C3/C2 (>0.3)                           | C3 (>6.8)  | C3/C0 (>0.19)<br>C3/C2 (>0.39)     | C3 (>4.82) e<br>C3/C2 (>0.15)                    | C3 (>9.0) e<br>C3/C2 (>0.15)                     | C3 (>8)                      |                   |                |
| MMA       | C3 (>3.3)                      | C4CD n/ (>0.54)<br>Gly n/ (>721) | C3/C0 (>0.13)<br>C3/C4 (>12.5)<br>C3/C16 (>1.6)       |  | C3 (>6.8) o<br>MMA (>1)                                | C3/C0 (>0.19)<br>C3/C2 (>0.39)     |  |  | C3 (>8) o<br>MMA>0.8         |                   |                |
| C1b C, D  |                                |                                  |   |  | C3 (>6.23)<br>Met (<12) e<br>C3/Met (>0.4)             |                                    |  |  |                              |                   |                |
| IVA       | C5 (>0.56)                     |                                  | C5/C3 (>0.29)<br>C5/C4 (>1.36)<br>C5/C8 (>4.2)        | C5 (>1)  | C5 (>2)  | C5/C2 (>0.06)                      | C5 (>1.16)                                       | C5 (>2.5)  | C5 (>1.2)                    |                   |                |
| GA I      | C5CD (>0.18)                   |                                  | C5CD/C4 (>0.5)<br>C5CD/C8 (>0.11)<br>C5CD/C12 (>0.84) | C5CD (>0.2)  | Glut (>0.14)   | Glut/C8 (>1.8)<br>Glut/C16 (>0.06) |  | C5CD (>0.38)                                     | C5CD (>0.21)                 |                   |                |
| PKU       | Phe (>120)                     | Tyr n/ (10-250)                  | Phe/Tyr (>1.58)                                       | Phe (>150) e<br>Phe/Tyr (>1.5)                         | Phe (>150)   | Phe/Tyr (>1.7)                     | [Phe (>157) e<br>Phe/Tyr (>3.0)]<br>o Phe (>200) | [Phe (>250) e<br>Phe/Tyr (>3.0)]<br>o Phe (>300) | Phe (>139)                   |                   | Phe/Tyr (>1.5) |
| TYR I     | SA (>2)                        | Tyr (>250)                       |   | Tyr (>250)<br>e positivo al<br>succinylacetone<br>test | Tyr (>200) e<br>positivo al<br>succinylacetone<br>test |                                    | Tyr (>500)                                       | Tyr (>900)                                       | Tyr (>442)                   |                   | Tyr/Phe (>6)   |
| MSUD      | ISO/Leu (>195)<br>e Val (>210) |                                  |   | XLeu (>342)<br>e Val (>350)                            | Leu(Ile) (>490)<br>e Val (>390)                        |                                    | Val (>301)                                       | [Val (>275) e<br>Leu (>450)] o<br>Val (>500)     | Leu (>373)                   |                   | Leu/Phe (>5)   |
| ARG       | Arg (>20)                      |                                  |   | Arg (>50)  |  |                                    |  |  | Arg (>132)                   |                   | Arg/Orn (>1)   |
| ASA       | Asa (>1)                       | Cit (>25)                        |   | Asa (>1)   | Asa (>1)   |                                    | Cit (>76)  | Cit (>150)                                       | Cit (>100)                   |                   | Cit/Arg (>2)   |
| CIT       | Cit (>25)                      |                                  |   | Cit (>46)  | Cit (>65)  | Orn/Cit (<1.5)<br>Cit/Arg (>15)    | Cit (>76)  | Cit (>150)                                       | Cit (>100)                   |                   | Cit/Arg (>2)   |

## I PROGRAMMI DI SCREENING NEONATALE ALLARGATO

**Tabella 3.6 (2/2):** Cut-off utilizzati nei programmi di screening ( $\mu\text{mol/L}$ )

| Patologia | Toscana (La Marca 2008)  |  |  | Portogallo (Vilarinho 2010)   | Germania (Schulze 2003)   |   | North Carolina (Frazier 2006) |   | New England (Zytkivicz 2001)                 |   |          |
|-----------|--|--|--|---|---|---|-------------------------------|---|--|---|----------|
|           | Marker primario  | Marker secondario                                    | Rapporti   | Marker e rapporti   | Marker  | Rapporti  | Borderline                    | Diagnostico   | Marker primario                              | Marker secondario                       | Rapporti |
| VLCAD     | C14:1 (>0.44)  | C14 n/ (>0.57)<br>C16 n/ (>0.56)<br>C18:1 n/ (>2.43) | C14:1/C4 (>1.42)<br>C14:1/C5 (>3.69)<br>C14:1/C8 (>3.51) | C14:1 (>0.46)<br>e C14:2 (>0.17)  | C14:1 (>0.43)<br>o C14 (>0.76)  |   |                               | [C14:1 (>0.75) e<br>C14:1/C12:1 (>3.0)]<br>o C14 (>0.97) o<br>C16 (>10.26) o<br>C18:1 (>4.08)                   | C14:1 (>0.9)                                 |   |          |
| LCHAD     | C16OH (>0.1)   |  |  | C16:OH (>0.10)<br>C18:1OH (>0.07)<br>C18OH (>0.06) e<br>C16OH/C16 (>0.04) | C14OH (>0.12) e/o<br>C16:1OH (>0.22)<br>C16OH (>0.20)<br>C18:1OH (>0.12)<br>C18OH (>0.11) |   |                               | C16OH (>0.18) o<br>C18:1OH (>0.14)  | C16OH (>0.1)                                 |   |          |
| MCAD      | C6 (>0.25)<br>C8 (>0.31)<br>C10:1 (>0.29)<br>C14:1 (>0.44)   | C10 (>0.36)  | C8/C6 (>3)<br>C8/C10 (>1.6)                              | C8 (>0.3) e<br>C8/C10 (>2.5)  | C6 (>0.21) e/o<br>C8 (>0.32)<br>C10:1 (>0.28)<br>C10 (>0.48)                              | C8/C2 (>0.02)<br>C8/C10 (>1.6)<br>C8/C12 (>1.6) |                               | C8 (>0.73) e<br>C8/C10 (>3) o<br>C10 (>0.46) o<br>C10:1 (0.31)  | C8 (>0.5)                                    | C6, C10:1<br>cut-off non<br>specificati |          |
| SCAD      | C4 (>0.92)   |  |  |   | C4 (>2)   |   | C4 (>2.15)                    | C4 (>5.0)   | C4 (>1.9)                                    |   |          |
| GA II     | C4 (>0.92)<br>C5 (>0.56)<br>C5CD (>0.18)<br>C6 (>0.25)<br>C8 (>0.31)<br>C12 (>0.69)<br>C14 (>0.57)<br>C16 (>5.6) |  |  | Valori elevati<br>da C4 a C18   | Valori elevati<br>da C4 a C18   |   |                               | C4 (>5.0)<br>C5 (>2.5)<br>C5CD (>0.38)<br>C6 (>0.63)<br>C8 (>0.73)<br>C12 (>0.9)<br>C14 (>0.97)<br>C16 (>10.26) | C8 (>0.5) e<br>C10 valore<br>non specificato | C5 (>1.2)                               |          |
| CPT I     | C16 (<5.6)<br>C18 (<1.77)  | CO n/ (8-45)   | C0/(C16 + C18)<br>(>15)                                  | C0/(C16 + C18)<br>(>30)   | C0 (>90) e<br>C16 (<1.7)<br>C18 (<0.6)  | C0/(C16 + C18)<br>(>70)                         |                               |   |  |   |          |
| CPT II    | C16 (>5.6)<br>C18:1 (>2.43)  |  | (C16 + C18:1)/<br>C2 (>0.21)                             | C0/(C16 + C18)<br>(<3)  | C0 (<10) e<br>C16 (>10.6)<br>C18 (>3.2)   | C0/(C16 + C18)<br>(<3)                          |                               | C16 (>10.26)<br>C18:1 (>4.08)   | C16 (>12)                                    |   |          |
| CACT      | C16 (>5.6)   |  |  |   |   |   |                               |   |  |   |          |
| CUD       | C0 (<8)  | Ctot   |  | C0 (<7)   | C0 (<10)<br>e AC (<5)   |   | C0 (<=13)                     |   |  |   |          |

## I PROGRAMMI DI SCREENING NEONATALE ALLARGATO

**Tabella 3.7:** Cut-off utilizzati nel programma di screening australiano ( $\mu\text{mol/L}$ ) (Wiley et al. 1999)

| <b>Metabolita</b> | <b>Cut-off</b> |
|-------------------|----------------|
| Ala               | >900           |
| Cit               | >75            |
| Gly               | >1000          |
| Xleu              | >500           |
| Met               | >80            |
| Phe               | >150           |
| Tyr               | >500           |
| C0                | <5 e >125      |
| C2                | <8 e >160      |
| C3                | >9             |
| C4                | >1,6           |
| C5                | >1,4           |
| C5OH              | >1,0           |
| C6                | >0,8           |
| C8                | >1,0           |
| C10               | >1,5           |
| C10:1             | >1,8           |
| C14               | >1,5           |
| C14:1             | >1,5           |
| C16               | >8,5           |

Phe: fenilalanina, Tyr: tirosina, Leu: leucina, Ile: isoleucina, Xleu: leucina/isoleucina/allo-isoleucina, Val: valina, Cit: citrullina, Asa: acido arginino succinico, Arg: arginina, Met: metionina, Orn: ornitina, Gly: glicina, MMA: metilmalonil, Glut: glutaril, C0: carnitina libera, C2: acetil carnitina, C3: propionil carnitina, C4: butiril carnitina, C4DC: metil malonil carnitina, C5: isovaleril carnitina, C5OH: 3-idrossi isovaleril carnitina o 2-metil 3-idrossi- butiril carnitina, C5DC: glutarilcarnitina/3-idrossi decanoilcarnitina, C6: esanoil carnitina, C6DC: adipoil/metilglutaril/carnitina, C8: octanoil carnitina, C10: decanoil carnitina, C10:1 decanoil carnitina, C12: dodecanoil carnitina, C14: miristoil carnitina, C14OH: 3-idrossi miristoil carnitina, C14:1: miristoleil carnitina, C14:1OH: 3-idrossi miristoleil carnitina, C14:2: tetradecadienil carnitina, C16: palmitoil carnitina, C16OH: 3-idrossi palmitoil carnitina, C16:1OH: 3-idrossi palmitoleil carnitina, C18: stearoil carnitina, C18:OH: 3-idrossi stearoil carnitina, C18:1 oleil carnitina, C18:1OH: 3-idrossi oleil carnitina, C12: dodecanoil carnitina, AC: totale acilcantine (da C3 a C18), HMG: 3-idrossi-3-metilglutaril, SA: succinil acetone, GLA: alfa-galattosidasi A, GAA: alfa-glucosidasi acida.

Trattandosi di popolazioni diverse con criteri diversi per definire i positivi al test di primo livello, si rileva una certa variabilità nelle proporzioni di positivi. Per questa analisi si considereranno anche i dati di un lavoro sul Minnesota (limitatamente ai disordini degli acidi grassi) che finora non è stato preso in esame perché non descrive l'organizzazione dello screening. La Tabella 3.8 descrive i positivi al test di primo livello che sono ricavabili dai lavori della Germania, della California, del New England e per la malattia di Pompe e la malattia di Fabry dagli studi pilota svolti in Austria. Gli

## I PROGRAMMI DI SCREENING NEONATALE ALLARGATO

altri lavori descrivono il *recall rate* totale e non ci permettono di effettuare dei confronti o delle stime per il nostro programma di screening poiché i pannelli di patologie sono diversi.

I valori predittivi positivi sono molto bassi per la maggior parte delle patologie e questo indica una frequenza di falsi positivi piuttosto elevata. Trattandosi di patologie rare ed essendo le proporzioni di positivi al test inferiori allo 0,1%, i valori di specificità (capacità del test di escludere la malattia quando è assente) sono per tutte le patologie superiori al 99,9%.

**Tabella 3.8:** Proporzione di positivi al test di screening e valori predittivi positivi (VPP)

| Patologia   | Germania<br>Schulze 2003 |        | California<br>Feuchtbau 2006 |        | Minnesota<br>Lindner 2010 |      | New England<br>Zytkovicz 2001 |      | Austria<br>Dajnoki |
|---|--------------------------|--------|------------------------------|--------|---------------------------|------|-------------------------------|------|--------------------|
|   | Pos 1 liv                | VPP    | Pos 1 liv                    | VPP    | FP                        | PPV  | Pos 1 liv                     | VPP  | Pos 1 liv          |
| <b>Difetti del metabolismo degli acidi organici</b> |                          |        |                              |        |                           |      |                               |      |                    |
| PA  | 0,0004%                  | 100%   | 0,0144%                      | 12,0%  | §§                        | §§   | 0,0220%                       | 6%   |                    |
| MMA   | 0,0828%                  | 1,91%  |                              |        | §§                        | §§   |                               |      |                    |
| Cbl C/D   | 0,0008%                  | 100%   | §                            | §      | §§                        | §§   |                               |      |                    |
| IVA   | 0,0156%                  | 10,81% | §                            | §      | §§                        | §§   | 0,0213%                       | 0%   |                    |
| GA I  | 0,0248%                  | 4,84%  | 0,0014%                      | 20,0%  | §§                        | §§   | 0,0195%                       | 0%   |                    |
| <b>Difetti del metabolismo degli aminoacidi</b>     |                          |        |                              |        |                           |      |                               |      |                    |
| PKU   | 0,0692%                  | 32,35% | §                            | §      | §§                        | §§   | 0,0358%                       | 20%  |                    |
| TYR I   | 0,0212%                  | 1,92%  | §                            | §      | §§                        | §§   | 0,0256%                       | 0%   |                    |
| MSUD  | 0,0100%                  | 8,00%  | 0,0113%                      | 2,5%   | §§                        | §§   | 0,0074%                       | 5%   |                    |
| ARG   | n.r.                     | n.r.   | 0,0057%                      | 5,0%   | §§                        | §§   | 0,0037%                       | 17%  |                    |
| ASA   | 0,0000%                  | -      | §                            | §      | §§                        | §§   | 0,0122%                       | 5%   |                    |
| CIT   | 0,0072%                  | 33,33% | §                            | §      | §§                        | §§   |                               |      |                    |
| <b>Difetti del metabolismo mitocondriale</b>        |                          |        |                              |        |                           |      |                               |      |                    |
| VLCAD   | 0,0132%                  | 3,13%  | 0,0006%                      | 50,0%  | 0,003%                    | 27%  | 0,0024%                       | 25%  |                    |
| LCHAD   | 0,0048%                  | 9,09%  | 0,0000%                      | -      | <0,001%                   | 83%  | 0,0030%                       | 0%   |                    |
| MCAD  | 0,0248%                  | 25,81% | 0,0042%                      | 86,7%  | 0,003%                    | 78%  | 0,0283%                       | 20%  |                    |
| SCAD  | 0,0156%                  | 11,54% | 0,0254%                      | 21,6%  | 0,006%                    | 42%  | 0,0201%                       | 15%  |                    |
| GA2   | 0,0036%                  | 11,11% | 0,0006%                      | 100,0% | 0,001%                    | 33%  | n.d.                          | n.d. |                    |
| CPT I   | 0,0016%                  | 0,00%  | §                            | §      | <0,001%                   | 0,0% | n.r.                          | n.r. |                    |
| CPT II  | 0,0192%                  | 2,08%  | §                            | §      | 0,002%                    | 14%  | 0,0012%                       | 50%  |                    |
| CACT  |                          |        | §                            | §      |                           |      |                               |      |                    |
| CUD   | 0,0356%                  | 1,15%  | §                            | §      | 0,004%                    | 50%  | n.r.                          | n.r. |                    |
| <b>Disordini lisosomiali</b>                        |                          |        |                              |        |                           |      |                               |      |                    |
| GSD-II  | n.r.                     | n.r.   | n.r.                         | n.r.   | n.r.                      | n.r. | n.r.                          | n.r. | 0,039%             |
| MF  | n.r.                     | n.r.   | n.r.                         | n.r.   | n.r.                      | n.r. | n.r.                          | n.r. | 0,38%              |

§: dato non disponibile, l'articolo riporta il dato solo per le patologie che hanno avuto casi, per le altre non è chiaro se rientravano nello studio pilota o se non ci sono stati casi.

§§: dato non disponibile, l'articolo si riferisce ai difetti dell'ossidazione degli acidi grassi.

n.r.: la patologia non rientra nel programma di screening

n.d.: i dati relativi ai marker della GA II non sono stati riportati nell'articolo.

FP: falsi positivi

### 3.4 Il monitoraggio dei falsi negativi

Un discorso a parte meritano invece i falsi negativi cioè i soggetti che vengono classificati dal test come negativi ma che in realtà sono malati e non vengono quindi sottoposti precocemente a trattamento terapeutico o dietetico.

È quindi importante che venga previsto un monitoraggio dei falsi negativi.

I lavori che sono stati citati discutono la presenza o meno di falsi negativi. In realtà si tratta di pochi casi e molto spesso in momenti precedenti la rivisitazione dei cut-off. Sono quindi eventi che non si sarebbero verificati in un momento successivo. In particolare ciò è stato rilevato in California (un caso di LCHADD e uno di MSUD) e in North Carolina (due casi di GA I, un caso di MMA-Cbl A, un caso di  $\beta$ KT def, un caso di MSUD e uno di TYR I). In California si è rilevato anche un altro falso negativo di VLCADD che era però stato individuato con la diagnosi prenatale.

In Portogallo non sono stati rilevati falsi negativi, mentre in Toscana si riporta di due casi (uno di acidemia metilmalonica con omocistinuria (Cbl C) e uno di tirosinemia di tipo I).

Da non sottovalutare ben 4 falsi negativi per HPE che sono stati individuati in Germania con il test di determinazione enzimatica della fenilalanina. Dalla Tabella 3.6 si può vedere che la Germania presenta dei cut-off per la fenilchetonuria più elevati rispetto agli altri paesi europei (Italia e Portogallo).

Infine in Australia sono stati rilevati ben 7 falsi negativi: tirosinemia di tipo I, tirosinemia di tipo II, aciduria glutarica di tipo I, deficit di cobalamina C, deficit dell'acil-CoA deidrogenase a catena molto lunga, iperglicemia non chetotica, deficienza 3-chetotiolase. Per l'aciduria glutarica di tipo I, il deficit di cobalamina C, il deficit dell'acil-CoA deidrogenase a catena molto lunga sono stati rivisti i cut-off, mentre per le altre patologie un abbassamento dei cut-off avrebbe significato un innalzamento eccessivo del *recall rate*. I due falsi negativi di tirosinemia riportavano infatti valori di tirosina rispettivamente del 95° e del 94° percentile mentre i due casi di iperglicemia non chetotica, deficienza 3-chetotiolase valori molto bassi rispetto al cut-off.

Non sono riportati falsi negativi nello studio pilota per la malattia di Pompe. Per la malattia di Fabry la proporzione di falsi negativi per le femmine è molto elevata (16%) mentre non si registrano falsi negativi tra i maschi.

### **3.5 I test di conferma diagnostica**

Lo screening neonatale non è una diagnosi definitiva ma, come già detto, identifica un soggetto che potrebbe avere una malattia. È quindi necessario che il neonato risultato positivo al test di screening venga richiamato per i test di conferma diagnostica (test di secondo livello).

Il tipo di contatto che viene utilizzato per il richiamo non è sempre specificato nei lavori considerati.

In alcuni programmi è a carico del punto nascita o del pediatra di famiglia, in altri è il centro screening o il centro per la conferma diagnostica che richiama il neonato. A volte, come in Toscana, vengono usate entrambe le procedure, l'una in caso di patologia non grave e l'altra in caso di rischio di salute per il neonato. Le linee guida nazionali SISMME-SISN spostano invece il peso di questo intervento sul pediatra di famiglia.

Nella Tabella 3.9 vengono messi a confronto i test per la conferma diagnostica eseguiti presso i centri di secondo livello. Sono riportati quelli suggeriti dagli autori Zschocke e Hoffmann (2005), dalla SISMME-SISN e quelli attualmente usati nei programmi di Germania e Portogallo. Le linee guida nazionali sui test di conferma diagnostica fanno riferimento al lavoro di Rinaldo et al. 2007 al quale si rimanda per i relativi riferimenti bibliografici.

## I PROGRAMMI DI SCREENING NEONATALE ALLARGATO

**Tabella 3.9 (1/4): Test di conferma diagnostica**

| <b>Patologie</b> | <b>Zschocke 2005</b>  | <b>SISMME-SISN</b>  | <b>Portogallo (Vilarinho 2010)</b>  | <b>Germania (Schulze 2003)</b>   |
|------------------|---|---|---|--|
| PA               | Acidi organici nelle <b>urine</b> : ↑ 3-OH-propionato e metilcitrato, ↑ chetoni C5 e C6; ↓ carnitina; acilcarnitine: ↑ propionilcarnitina<br>Aminoacidi nel <b>plasma</b> : ↑ Gly, Ala                  | Acidi organici urinari: Ac. 3-OH propionico, tigilglicine, metilcitrato<br>Dosaggio della vitamina B12.   | Valori elevati nelle urine<br>acido 3-OH- propionato, proprionilglicina, trigliclicina e metilcitrati; analisi molecolare | Attività enzimatica nei fibroblasti; trigliclicina, acido 3-OH- propionato, metilcitrati nelle urine; ammonio nel plasma |
| MMA              | Acidi organici nelle <b>urine</b> : ↑ metilmalonico, acidi 3-OH-propionico e metilcitrato; ↓ carnitina; acilcarnitine<br>Aminoacidi nel <b>plasma</b> : : ↑ Gly, Ala                                    | Acidi organici urinari Ac. Metilmalonico, 3-OH propionico, tigilglicina, metilcitrato<br>Analisi di complementazione.<br>Dosaggio della vitamina B12. | Valori elevati nelle urine di acido metilmalonico e metilcitrato; analisi molecolare                                      | Attività enzimatica nei fibroblasti; acido metilmalonico nelle urine; ammonio e omocisteina nel plasma                   |
| C1b C/D          | Acidi organici nelle <b>urine</b> : ↑ metilmalonico<br>↑ omocisteina nel <b>plasma</b><br>Cobalamina e TCII nella norma   |   | Omocisteina totale elvata nel plasma; malori elevate nelle urine di acido metilmalonico; analisi molecolare               |  |
| IVA              | Acidi organici nelle <b>urine</b> : ↑↑ isovalerilglicina, acido 3-OH-isovalerico; ↓ carnitina; acilcarnitine: ↑ isovalerilcarnitina   | Acidi organici urinari: ac. 3-OH isovalerico, isovaleril glicina  | Valori elevati nelle urine di isovalerilglicina e acido 3-OH-isovalerico; analisi molecolare                              | Attività enzimatica nei fibroblasti; acido 3-OH-isovalerico e isovalerilglicinanelle urine                               |
| GAI              | Acidi organici nelle <b>urine</b> : ↑ acido glutarrico, acido 3-OH-glutarico (diagnostico); ↓ carnitina; acilcarnitine: ↑ glutarilcarnitina<br><b>Test enzimatici</b><br><b>Analisi delle mutazioni</b> | Acidi organici Urinari: Ac. Glutarico, Ac 3-OH glutarico, 2-OH glutarico, adipico, suberico, sebaco etilmalonico, 3-OH isovalerico, isobutirrico.     | Acido 3-OH-glutarico nelle urine; analisi molecolare o attività enzimatica nei fibroblasti                                | Attività enzimatica nei fibroblasti; acido glutarrico e acido 3-OH-glutarico nelle urine;                                |

## I PROGRAMMI DI SCREENING NEONATALE ALLARGATO

**Tabella 3.9 (2/4):** Test di conferma diagnostica

| Patologie | Zschocke 2005  | SISMME-SISN   | Portogallo (Vilarinho 2010)  | Germania (Schulze 2003)   |
|-----------|--|---|--|---|
| PKU       | Aminoacidi nel <b>plasma</b> : ↑ Phe, n.↓ Tyr  | Aminoacidi plasmatici: fenilalanina, tirosina<br>Metaboliti delle pterine nelle urine<br>Attività della Diidropteridina reductasi                                     | PKU: Phe > 360μM;<br>HPA: Phe> 150μM e <360μM  | PKU: Phe>600 μM;<br>non-PKU-HPA: Phe>150 e <600 Mm  |
| TYRI      | Acidi organici nelle <b>urine</b> : ↑ succinilacetone, ↑ 4-OH-fenilderivati<br>Aminoacidi nel <b>plasma</b> : (n-)↑ Tyr, ↑ Met(!)<br>Porfirine nelle <b>urine</b> : ↑δ-Acido aminolevulinico<br><b>Siero</b> : (n-) ↑ α-fetoproteina | Acidi organici urinari: succinilacetone<br>Aminoacidi plasmatici: Tirosina >1000 μM all'esordio   | Succinilacetone nelle urine e analisi molecolare                                     | Succinilacetone nelle urine, aumentato α-fetoproteina nel siero                             |
| MSUD      | Aminoacidi nel <b>plasma</b> : ↑ Val, ↑↑ Leu, Ile, alloisoleucina (diagnostico)<br>Acidi organici nelle <b>urine</b> : ↑ cheto- e idrossiacidi a catena ramificata   | Aminoacidi plasmatici Isoleucina, Leucina, valina, alloisoleucina<br>Acidi organici urinari   | Aminoacidi nel plasma e presenza di alloisoleucina; analisi molecolare               | Aminoacidi nel plasma e presenza di alloisoleucina;<br>Attività enzimatica nei fibroblasti; |
| ARG       | Aminoacidi nel <b>plasma</b> : ↑↑ Arg<br>↑↑ acido orotico nelle <b>urine</b><br>test enzimatici negli <b>eritrociti</b>  | Aminoacidi urinari/plasmatici: Citrullina, Argininosuccinato  | Ammonio e arginina nel plasma;<br>acido orotico nelle urine;<br>analisi molecolare   |   |
| ASA       | Aminoacidi nelle <b>urine</b> : ↑↑ acido arginosuccinico<br>Aminoacidi nel <b>plasma</b> : ↑ Cit, ↓ Arg<br>↑ acido orotico nelle <b>urine</b><br>test enzimatici negli <b>eritrociti</b> e nei <b>fibroblasti</b>                    |   | Asa nelle urine; analisi molecolare  | Attività enzimatica nei fibroblasti; Asa nelle urine  |
| CIT       | Aminoacidi nel <b>plasma</b> : ↑↑ Cit, ↓ Arg<br>↑ acido orotico nelle <b>urine</b><br>test enzimatici nei <b>fibroblasti</b>   | Aminoacidi urinari/plasmatici: Citrullina, Argininosuccinato<br>Ammonemia, bilirubina, fosfatasi alcalina, GGT. Test genetici possono distinguere tipo I dal Tipo II. | Ammonio e citrullina nel plasma;<br>acido orotico nelle urine;<br>analisi molecolare | Aminoacidi nel plasma; attività enzimatica nei fibroblasti                                  |

I PROGRAMMI DI SCREENING NEONATALE ALLARGATO

**Tabella 3.9 (3/4):** Test di conferma diagnostica

| Patologie | Zschocke 2005   | SISMME-SISN   | Portogallo (Vilarinho 2010)  | Germania (Schulze 2003)  |
|-----------|---|---|--|--|
| VLCAD     | <b>Acilcarnitine:</b> ↑ C14:1, rapporto C14:1/C12:1<br>Acidi organici nelle <b>urine:</b> acidi dicarbossilici C6-C14   |   | Analisi molecolare o attività enzimatica nei fibroblasti/linfociti | Aattività enzimatica nei fibroblasti/linfociti   |
| LCHAD     | ↑ lattato (3-idrossipalmitoil-CoA inibisce la PHD)<br><b>Acilcarnitine:</b> ↑ cimposti idrossilati C14-OH, C16-OH, C18-OH, C18:1-OH<br>Acidi organici nelle <b>urine:</b> C6-C14 acidi idrossi-dicarbossilici<br><b>Analisi delle mutazioni</b> (E510Q) | Dosaggio acilcarnitine: C16-OH, C18-OH, C18:1OH; Acidi organici urinari:<br>Aciduria 3-idrossi dicarbossilica con limitata chetosi 80-90% degli alleli mostra la mutazione G1528C.<br>La diagnosi differenziale con il deficit di TFP richiede dosaggio attività enzimatica | Analisi molecolare o attività enzimatica nei fibroblasti/linfociti | Attività enzimatica nei fibroblasti/linfociti  |
| MCAD      | <b>Acilcarnitine:</b> ↑ rapporto C8, C6, ↑ C8/C10; Acidi grassi nelle <b>urine:</b> C6-C10 acidi dicarbossilici, suberilglicina, esanoilglicina<br><b>Analisi delle mutazioni</b> (E329E)   | Dosaggio acilcarnitine e acidi organici urinari: Acilcarnitine C6, C8, C10<br>Analisi molecolare per mutazione predominante A985G   | Analisi molecolare o attività enzimatica nei fibroblasti/linfociti | Attività enzimatica nei fibroblasti/linfociti; analisi delle mutazioni; carico di fenilpropionato; suberilglicina, esanoilglicina nelle urine. |
| SCAD      | <b>Acilcarnitine:</b> ↑ C4<br>Acidi organici nelle <b>urine:</b> acido etilmalonico, butirrilglicina<br><b>Test enzimatici</b><br><b>Analisi delle mutazioni</b>  | <b>Acidi organici urinari:</b> Acidi etilmalonico e Metilsuccinico<br>Il profilo dell'ossidazione degli acidi grassi sui Fibroblasti è indicato quando il dosaggio degli acidi organici urinari è dubbio.   |  | Attività enzimatica nei fibroblasti/muscoli; analisi delle mutazioni; acido etilmalonico nelle urine   |
| GA II     | <b>Acilcarnitine:</b> ↑ tutti i composti C4-C18; Acidi organici nelle <b>urine:</b> ↑ acido lattico, glutarico, etilmalonico, dicarbossilici<br><b>Test enzimatici</b>  | Acidi organici Urinari: Ac. Glutarico, Ac 3-OH glutarico, 2-OH glutarico, adipico, suberico, sebacico etilmalonico, 3-OH isovalerico, isobutirrico.   | Analisi molecolare o attività enzimatica nei fibroblasti           | Attività enzimatica nei fibroblasti; acido lattico, glutarico, etilmalonico nelle urine  |
| CPT I     | <b>Profilo delle carnitine:</b> N-↑ carnitina totale/libera, <20% acilcarnitine<br><b>Acilcarnitine:</b> N-↑ carnitina libera, ↓ C16, C18, C18:1<br>Acidi organici nelle <b>urine:</b> non presente dicarbossilica aciduria                             | Carnitina libera totale; Bassi livelli di carnitina libera e totale. Elevati livelli di Carnitina urinaria.<br>Ridotto uptake di carnitina nei fibroblasti  | Analisi molecolare o attività enzimatica nei fibroblasti           | Attività enzimatica nei fibroblasti/linfociti  |

## I PROGRAMMI DI SCREENING NEONATALE ALLARGATO

**Tabella 3.9 (4/4): Test di conferma diagnostica**

| Patologie      | Zschocke 2005   | SISMME-SISN  | Portogallo (Vilarinho 2010)                              | Germania (Schulze 2003)  |
|----------------|---|--|--|--|
| CPT II         | <b>Siero:</b> ↓ carnitina totale 40-80% acilcarnitina<br><b>Acilcarnitine:</b> ↑ rapporto (C16+C18:1)/C2<br>Acidi organici nelle <b>urine:</b> non dicarbossilico aciduria  | Carnitina libera totale; Bassi livelli di carnitina libera e totale. Elevati livelli di Carnitina urinaria.<br>Ridotto uptake di carnitina nei fibroblasti | Analisi molecolare o attività enzimatica nei fibroblasti | Attività enzimatica nei fibroblasti/linfociti  |
| CACT           | <b>Siero:</b> ↓↓ carnitina totale 80-100% acilcarnitina<br><b>Acilcarnitine:</b> ↑↑ C16, C18, C18:1, ↓ carnitina libera<br>Acidi organici nelle <b>urine:</b> ± dicarbossilica aciduria   | Carnitina libera totale; Bassi livelli di carnitina libera e totale. Elevati livelli di Carnitina urinaria.<br>Ridotto uptake di carnitina nei fibroblasti |  | Attività enzimatica nei fibroblasti/linfociti  |
| CUD            | <b>Siero:</b> ↓↓↓ carnitina totale (<5-10% normale)<br><b>Urina:</b> N-↑ carnitina libera<br><b>Acilcarnitine:</b> di solito ↓↓ tutti i composti<br><b>Acidi organici:</b> acidi dicarbossilici assenti (o in minima quantità)              | Carnitina libera totale; Bassi livelli di carnitina libera e totale. Elevati livelli di Carnitina urinaria.<br>Ridotto uptake di carnitina nei fibroblasti | Analisi molecolare o carnitina uptake nei fibroblasti    | Carnitine uptake in fibroblasts; mutational analyses; decreased tubular carnitine reabsorption |
| GSD-II (Pompe) | <b>Urine:</b> escrezione patologica di oligosaccaridi; Linfociti vacuolati<br>Altre indagini metaboliche nella norma; ACG tipico + eco<br><b>Test enzimatici:</b> leucociti, fibroblasti, muscoli, fegato<br><b>Analisi delle mutazioni</b> |  |  |  |
| FD             | <b>Test enzimatici</b> (plasma, siero, leucociti o fibroblasti); Spesso con risultati falsi negativi nelle donne eterozigote; <b>Analisi delle mutazioni</b>  |  |  |  |
| MPS I-II-VI    | <b>Urine:</b> ↑ GAG; Elettroforesi GAG<br><b>Test enzimatici</b> (leucociti, fibroblasti)   |  |  |  |

## **4. Le stime sull'impatto dello screening in Veneto**

Dopo aver confrontato le altre esperienze di programmi di screening neonatale allargato, in questo capitolo sarà valutato l'impatto dello stesso in Veneto, nella popolazione e nei servizi. Saranno presentate la stima dei casi di patologia che ci si attende di individuare, la stima dei positivi al test di screening che necessitano del test di conferma diagnostica e l'impatto nei servizi sanitari regionali.

### **4.1 I casi attesi**

La stima dei casi attesi in Veneto per anno è stata fatta considerando per ogni patologia l'incidenza minima e massima presentate nei lavori discussi nei capitoli precedenti e applicata alla popolazione dei neonati della Regione Veneto in un anno.

Le stime saranno effettuate sulla popolazione dei nati del 2009 che sono stati 47.367 e sono riportate nella Tabella 4.1.

Per i disordini del metabolismo degli aminoacidi, le acidurie organiche e i disordini del metabolismo mitocondriale i casi attesi sono stati calcolati sulle incidenze ricavate dai programmi di screening, mentre per i disordini lisosomiali i casi attesi potrebbero essere leggermente sottostimati poiché sono stati calcolati partendo dalle incidenze degli studi di popolazione. Ciò è particolarmente evidente per la malattia di Fabry della quale disponiamo del dato da studi di popolazione sia del dato dello screening limitatamente ai maschi: ci si attende un caso l'anno stando alle stime di popolazione, mentre i casi attesi nei maschi vanno da 8 a 20 stando ai dati dei programmi di screening.

In un anno in Veneto ci si attende un numero di casi che va da 6 a 24 escludendo la malattia di Fabry.

LE STIME SULL'IMPATTO DELLO SCREENING IN VENETO

**Tabella 4.1:** Casi attesi di malattie metaboliche in Veneto in un anno

| sigla   | Incidenza altri studi |                 | Casi attesi  |               | Un caso atteso ogni: (anni) |             |
|---|-----------------------|-----------------|--------------|---------------|-----------------------------|-------------|
|   | Min                   | Max             | Min          | Max           | Min                         | Max         |
| <b>Difetti del metabolismo degli acidi organici</b> |                       |                 |              |               |                             |             |
| PA  | 1:362.000             | 1:80.000        | 0,131        | 0,592         | 7,6                         | 1,7         |
| MMA   | 1:316.243             | 1:160.000       | 0,150        | 0,296         | 6,7                         | 3,4         |
| Cbl C,D   | 1:362.000             | 1:125.000       | 0,131        | 0,379         | 7,6                         | 2,6         |
| IVA   | 1:362.000             | 1:62.500        | 0,131        | 0,758         | 7,6                         | 1,3         |
| GA I  | 1:354.000             | 1:51.707        | 0,134        | 0,916         | 7,5                         | 1,1         |
| <b>Totale attesi</b>                                | <b>1:69.966</b>       | <b>1:16.106</b> | <b>0,677</b> | <b>2,941</b>  | <b>1,5</b>                  | <b>0,3</b>  |
| <b>Difetti del metabolismo degli aminoacidi</b>     |                       |                 |              |               |                             |             |
| PKU   | 1:36.714              | 1:10.400        | 1,290        | 4,555         | 0,8                         | 0,2         |
| TYR I   | 1:250.000 (0)         | 1:79.071        | 0,189        | 0,599         | 5,3                         | 1,7         |
| MSUD  | 1:940.000 (0)         | 1:105.141       | 0,050        | 0,451         | 19,8                        | 2,2         |
| ARG   | 1:354.000 (0)         | 1:164.000       | 0,134        | 0,289         | 7,5                         | 3,5         |
| ASA   | 1:940.000 (0)         | 1:164.000       | 0,050        | 0,289         | 19,8                        | 3,5         |
| CIT   | 1:362.000             | 1:53.333        | 0,131        | 0,888         | 7,6                         | 1,1         |
| <b>Totale attesi</b>                                | <b>1:25.687</b>       | <b>1:6.699</b>  | <b>1,844</b> | <b>7,071</b>  | <b>0,5</b>                  | <b>0,1</b>  |
| <b>Difetti del metabolismo mitocondriale</b>        |                       |                 |              |               |                             |             |
| VLCAD   | 1:177.000             | 1:79.000        | 0,268        | 0,600         | 3,7                         | 1,7         |
| LCHAD   | 1:354.000 (0)         | 1:75.654        | 0,134        | 0,626         | 7,5                         | 1,6         |
| MCAD  | 1:26.668              | 1:9.036         | 1,776        | 5,242         | 0,6                         | 0,2         |
| SCAD  | 1:130.000             | 1:20.000        | 0,364        | 2,368         | 2,7                         | 0,4         |
| GA2   | 1:940.000 (0)         | 1:105.141       | 0,050        | 0,451         | 19,8                        | 2,2         |
| CPT I   | 1:378.272 (0)         | 1:316.243       | 0,125        | 0,150         | 8,0                         | 6,7         |
| CPT II  | 1:940.000 (0)         | 1:158.122       | 0,050        | 0,300         | 19,8                        | 3,3         |
| CACT  | 0                     | 1:362.000       | 0,000        | 0,131         | -                           | 7,6         |
| CUD   | 1:250.000             | 1:22.251        | 0,189        | 2,129         | 5,3                         | 0,5         |
| <b>Totale attesi</b>                                | <b>1:16.024</b>       | <b>1:3.948</b>  | <b>2,956</b> | <b>11,997</b> | <b>0,3</b>                  | <b>0,1</b>  |
| <b>Disordini lisosomiali</b>                        |                       |                 |              |               |                             |             |
| GSD-II §  | 1:201.000             | 1:76.336        | 0,236        | 0,621         | 4,2                         | 1,6         |
| MF §  | 1:117.000             | 1:40.000        | 0,405        | 1,184         | 2,5                         | 0,8         |
| MF maschi   | 1:3.100               | 1:1.250         | 7,869        | 19,515        | 0,1                         | 0,05        |
| MPS I §   | 1:144.928             | 1:84.033        | 0,327        | 0,564         | 3,1                         | 1,8         |
| MPS II §  | 1:233.652             | 1:82.816        | 0,203        | 0,572         | 4,9                         | 1,7         |
| MPS VI §  | 1:2.057.529           | 1:235.000       | 0,023        | 0,202         | 43,4                        | 5,0         |
| <b>Totale attesi §§</b>                             | <b>1:7.559</b>        | <b>1:1.976</b>  | <b>6,266</b> | <b>23,968</b> | <b>0,16</b>                 | <b>0,04</b> |

§ Stime ottenute da studi di popolazione.

§§ Esclusa la malattia di Fabry.

#### **4.2 I positivi al test di screening attesi**

La proporzione di positivi attesi al test di primo livello è stata stimata considerando l'esperienza dei paesi dove i programmi di screening sono già attivi. Sono state considerate per ogni patologia le proporzioni minime e massime che si sono riscontrate nei vari programmi che usano cut-off diversi, purtroppo non comparabili o non sempre riportati negli articoli (Tabella 4.2). Per la glicogenosi di tipo II e per la malattia di Fabry sono disponibili solo i dati di studi pilota condotti in Austria, mentre per le mucopolisaccaridosi non ci sono ancora dati disponibili e si ipotizzerà un valore medio delle proporzioni dei positivi al primo livello delle altre patologie, escludendo la malattia di Fabry che presenta un valore molto elevato.

In totale ci si attende un numero annuo di richieste di test di conferma diagnostica compreso tra 285 e 393. Circa 180 di queste richieste riguardano la malattia di Fabry che presenta una proporzione di positivi al test di primo livello dello 0,38%.

Questi neonati devono essere indirizzati in brevissimo tempo presso il centro di riferimento per la diagnosi definitiva. L'informazione ai genitori sui risultati positivi del test sarà comunicata nel nostro progetto di screening dal punto nascita come già succede da anni per gli altri screening neonatali attivi in Regione.

**Tabella 4.2:** Proporzioni di positivi al test si primo livello e numero atteso per anno

| sigla   | Positivi I liv. altri studi |               | Positivi attesi |              |
|---|-----------------------------|---------------|-----------------|--------------|
|   | Min                         | Max           | Min             | Max          |
| <b>Difetti del metabolismo degli acidi organici</b> |                             |               |                 |              |
| PA+MMA+ Cbl C/D                                     | 0,0144%                     | 0,0840%       | 6,8             | 39,8         |
| IVA   | 0,0156%                     | 0,0213%       | 7,4             | 10,1         |
| GA I  | 0,0014%                     | 0,0248%       | 0,7             | 11,7         |
| <b>Difetti del metabolismo degli aminoacidi</b>     |                             |               |                 |              |
| PKU   | 0,0358%                     | 0,0692%       | 17,0            | 32,8         |
| TYR I   | 0,0212%                     | 0,0256%       | 10,0            | 12,1         |
| MSUD  | 0,0074%                     | 0,0113%       | 3,5             | 5,4          |
| ARG   | 0,0037%                     | 0,0057%       | 1,8             | 2,7          |
| ASA+CIT   | 0,0072%                     | 0,0122%       | 3,4             | 5,8          |
| <b>Difetti del metabolismo mitocondriale</b>        |                             |               |                 |              |
| VLCAD   | 0,0006%                     | 0,0132%       | 0,3             | 6,3          |
| LCHAD   | 0,0030%                     | 0,0048%       | 1,4             | 2,3          |
| MCAD  | 0,0042%                     | 0,0283%       | 2,0             | 13,4         |
| SCAD  | 0,0156%                     | 0,0254%       | 7,4             | 12,0         |
| GA2   | 0,0006%                     | 0,0036%       | 0,3             | 1,7          |
| CPT I   | 0,0016%                     | 0,0016%       | 0,8             | 0,8          |
| CPT II+CACT   | 0,0012%                     | 0,0192%       | 0,6             | 9,1          |
| CUD   | 0,0356%                     | 0,0356%       | 16,9            | 16,9         |
| <b>Disordini lisosomiali</b>                        |                             |               |                 |              |
| GSD-II  | 0,0390%                     | 0,0390%       | 18,5            | 18,5         |
| MF  | 0,38%                       | 0,38%         | 180,0           | 180,0        |
| MPS   | 0,0122% §                   | 0,0250% §     | 5,8             | 11,8         |
| <b>Totale</b>                                       | <b>0,600%</b>               | <b>0,830%</b> | <b>284,6</b>    | <b>393,2</b> |
| <b>Totale esclusa la malattia di Fabry</b>          | <b>0,220%</b>               | <b>0,450%</b> | <b>104,6</b>    | <b>213,2</b> |

§ Valore medio dei positivi al primo livello delle altre patologie esclusa la malattia di Fabry.

### 4.3 Il dimensionamento dei centri di primo e secondo livello

In questo paragrafo sarà affrontato il problema del dimensionamento dei centri di primo e secondo livello.

Come già spiegato, i centri che si occuperanno dello screening per le malattie metaboliche ereditarie con la tecnologia tandem mass sono situati presso le Aziende Ospedaliere di Padova e Verona, mentre il centro di Padova si occuperà dei test di secondo livello per tutto il bacino d'utenza. In generale per centro di primo livello si intende il laboratorio che effettua il test di primo livello mentre il centro di secondo livello svolge le attività di conferma diagnostica.

Per quanto riguarda il primo livello, la delibera regionale prevede che i laboratori siano operativi sei giorni su sette. Di conseguenza il dimensionamento deve considerare sia la chiusura settimanale sia l'andamento delle nascite nel tempo. Da una parte i picchi, cioè richieste giornaliere elevate di test di primo livello, non devono generare ritardi nella processazione del campione, dall'altra il centro non deve essere sovradimensionato.

Per quanto riguarda il dimensionamento del centro di secondo livello, abbiamo visto nel paragrafo precedente che la proporzione di positivi a test di primo livello è piuttosto elevata ma che la diagnosi definitiva deve essere effettuata in tempi molto brevi in particolare per alcune patologie a rischio di grave decompensazione metabolica.

Il problema del dimensionamento sarà affrontato attraverso un modello di simulazione dinamica. La simulazione è la realizzazione di un modello della realtà che consente di valutare e prevedere lo svolgersi dinamico di una serie di eventi che si verificano secondo certe condizioni stabilite dall'analista o dall'utente. I vantaggi della simulazione sono:

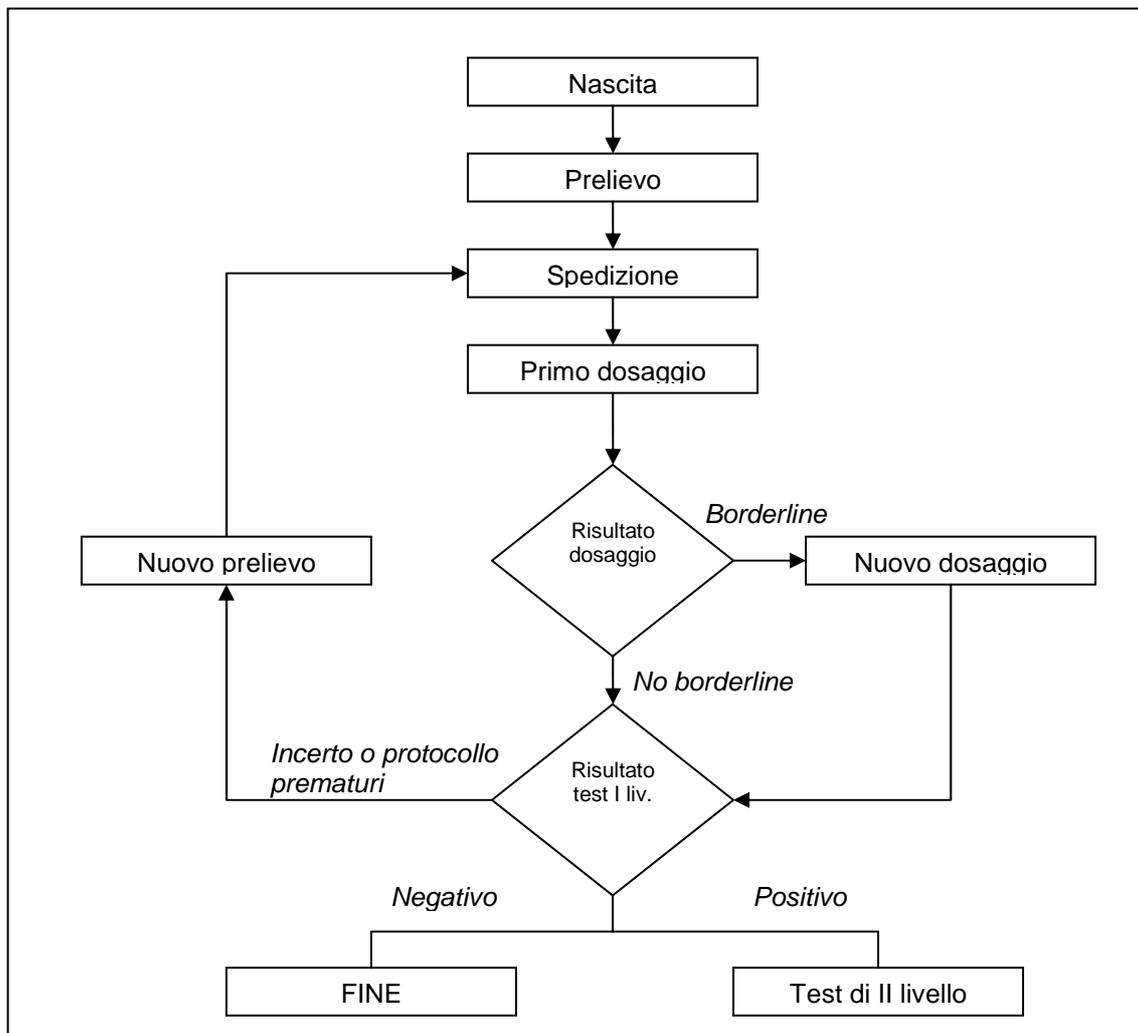
- la riduzione dei costi poiché gli esperimenti svolti direttamente sul sistema reale sono molto onerosi;
- la maggior comprensione del fenomeno e ripetibilità poiché nella realtà non è possibile sperimentare il sistema più di una volta senza che vi siano variazioni nei parametri iniziali. Nella simulazione invece la stessa sequenza di eventi può essere ripetuta anche in condizioni diverse e i risultati possono essere confrontati;
- la riduzione dei tempi: l'esecuzione di un esperimento su un sistema reale richiede molto tempo mentre l'esecuzione al calcolatore della simulazione richiede pochi minuti;
- la sicurezza e la legalità: sperimentare nuove soluzioni nella realtà può essere pericoloso o addirittura illegale mentre con la simulazione le varie idee possono essere testate e si può capire con sicurezza quale sia la migliore.

### **4.3.1 La progettazione concettuale**

Il modello concettuale è descritto nella Figura 4.1 e prevede che tutti i neonati vengano sottoposti al prelievo per il test di primo livello. Il prelievo viene spedito al laboratorio screening dove viene sottoposto a un primo dosaggio cioè viene testato per la prima volta. Se il risultato è *borderline* il campione viene ritestato cioè sottoposto a un secondo dosaggio. A seguito di uno o più dosaggi, il test può risultare positivo, negativo

oppure non adeguato o non sufficiente perché svolto su popolazioni (prematuro, neonati in nutrizione parenterale o che hanno ricevuto trasfusioni) che necessitano di un secondo prelievo immediato o a distanza di tempo. I neonati positivi al test di primo livello saranno sottoposti alle visite e ai test di secondo livello secondo priorità diverse che dipendono dalla patologia per cui sono risultati positivi.

**Figura 4.1:** Flow chart del modello concettuale per la simulazione.



#### 4.3.2 L'analisi dei dati

Per poter costruire un modello per lo studio del dimensionamento dei centri è necessario conoscere le informazioni sulle richieste ai servizi di screening e di conferma diagnostica come:

## LE STIME SULL'IMPATTO DELLO SCREENING IN VENETO

- la distribuzione delle nascite nel tempo;
- la proporzione di campioni che necessitano di un secondo dosaggio;
- la proporzione di neonati che vengono sottoposti a un secondo prelievo;
- le proporzioni di positivi attesi al test di primo livello per patologia;
- l'ordine di priorità nelle visite in base alla gravità della patologia e alla necessità di iniziare tempestivamente una terapia.

Il dati sulle nascite si riferiscono all'anno 2009 e sono state fornite dall'Unità di Epidemiologia e Medicina di Comunità dell'Università degli Studi di Padova. La fonte dei dati è il Certificato di Assistenza al Parto (CEDAP) che viene compilato per tutti i nati dai punti nascita della regione e sarà dettagliatamente descritto nel capitolo successivo.

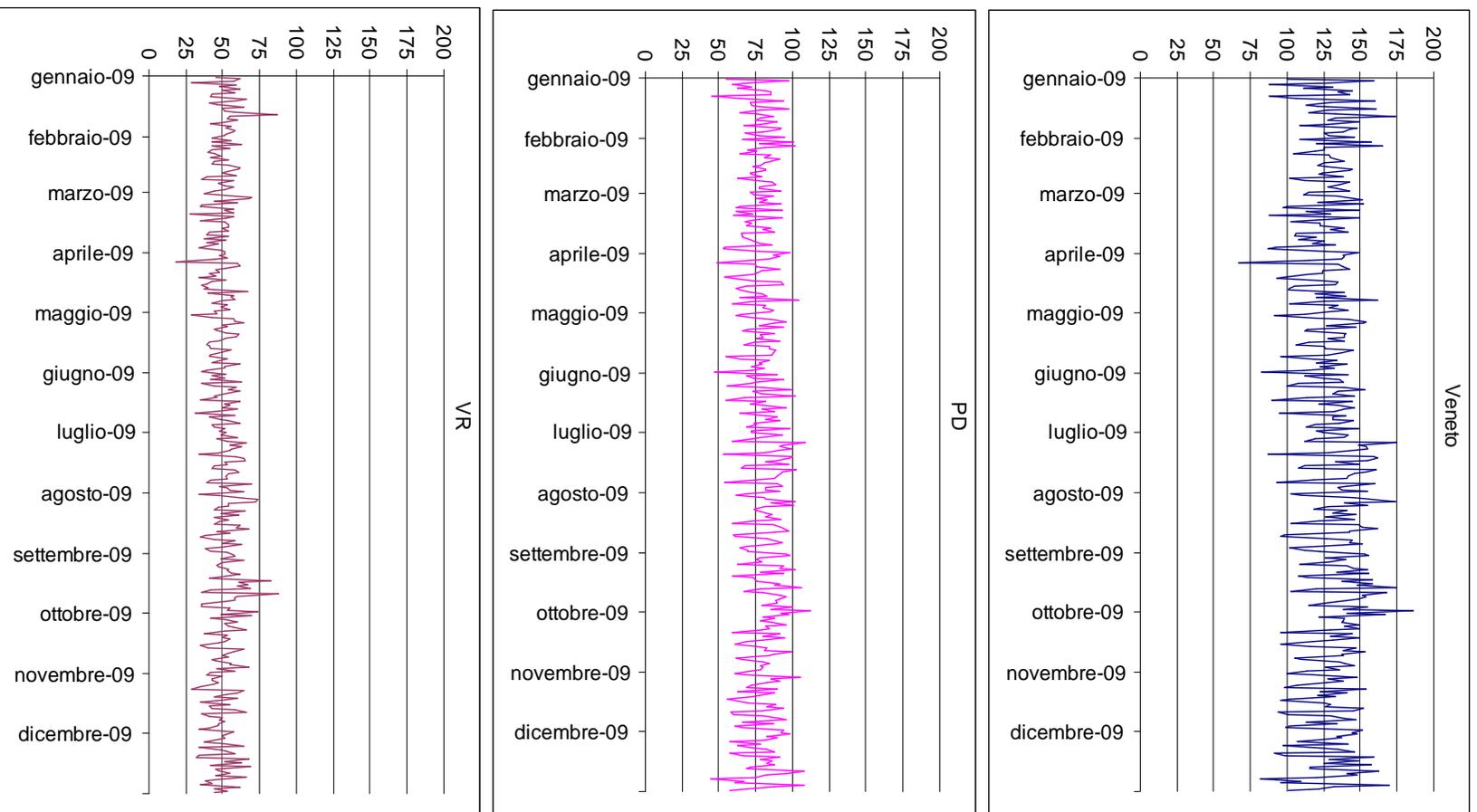
Nel 2009 nei punti nascita delle Regione Veneto ci sono stati 47.367 nati vivi (Tabella 4.3), 28.940 nei punti nascita delle province di Venezia, Padova, Rovigo, Treviso e Belluno i cui campioni del test di screening dovrebbero afferire al centro di primo livello di Padova e 18.427 nei punti nascita delle province di Verona e Vicenza i cui campioni dovrebbero afferire presso il centro screening di Verona. In media 79 nati al giorno nascono nei punti nascita che afferiscono a Padova e 50 nei punti nascita che afferiscono a Verona. Il numero di nati al giorno è però molto variabile.

**Tabella 4.3.:** Distribuzione dei nati per centro screening di riferimento

| <b>Centro screening<br/>di riferimento</b> | <b>Nati</b>   |              | <b>Nati al giorno</b> |            |
|--|---------------|--------------|-----------------------|------------|
|  | <b>Totale</b> | <b>Media</b> | <b>Min</b>            | <b>Max</b> |
| Padova                                     | 28.940        | 79           | 44                    | 112        |
| Verona                                     | 18.427        | 50           | 18                    | 88         |
| <b>Totale</b>                              | <b>47.367</b> | <b>130</b>   | <b>67</b>             | <b>186</b> |

Dalla Figura 4.2. Si può notare che l'andamento delle nascite presenta dei picchi di minimo settimanali. Dall'analisi dei dati per giorno si è riscontrato che questi picchi di minimo coincidono con le giornate di sabato e domenica. Il numero medio giornaliero di nati per giorno della settimana è riportato in Tabella 4.4.

**Figura 4.2:** Distribuzione delle nascite per giorno della settimana e per centro screening di riferimento – Dati CEDAP Anno 2009

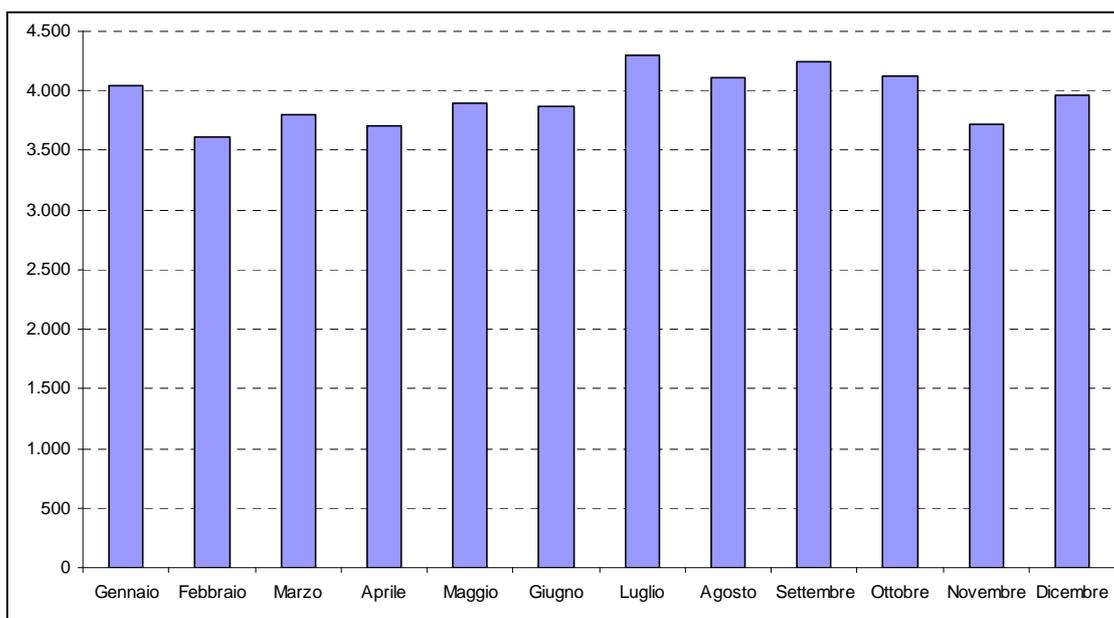


**Tabella 4.4:** Distribuzione giornaliera dei nati per giorno della settimana

| Giorno della settimana | Nati          |              |           |            |
|------------------------|---------------|--------------|-----------|------------|
|                        | Totale        | Media        | Min       | Max        |
| Lunedì                 | 7.393         | 142,2        | 93        | 175        |
| Martedì                | 7.053         | 135,6        | 97        | 174        |
| Mercoledì              | 7.403         | 142,4        | 113       | 186        |
| Giovedì                | 6.941         | 131,0        | 88        | 155        |
| Venerdì                | 7.271         | 139,8        | 82        | 175        |
| Sabato                 | 5.875         | 113,0        | 88        | 146        |
| Domenica               | 5.431         | 104,4        | 67        | 139        |
| <b>Totale</b>          | <b>47.367</b> | <b>129,8</b> | <b>67</b> | <b>186</b> |

La Figura 4.3 mostra inoltre, come ci si aspettava, un andamento stagionale delle nascite con dei picchi nei mesi estivi.

**Figura 4.3:** Distribuzione delle nascite per mese



Il numero atteso di nati al giorno sarà quindi funzione del giorno della settimana e del mese ed è stato stimato attraverso un modello di regressione lineare che si esprime con la seguente formula:

$$\mu_{ij} = \alpha + \beta_i + \delta_j \quad i=1 \dots 12 \text{ (mesi dell'anno)} \quad j=1 \dots 7 \text{ (giorni della settimana)}$$

I coefficienti sono riportati in Tabella 4.5.

**Tabella 4.5:** Coefficienti per la stima del numero medio di nati al giorno.

| <b>Parametro</b> | <b>Valore</b> |
|------------------|---------------|
| $\alpha$         | 105,48        |
| $\beta_1$        | 0,00          |
| $\beta_2$        | -1,57         |
| $\beta_3$        | -7,78         |
| $\beta_4$        | -7,39         |
| $\beta_5$        | -3,90         |
| $\beta_6$        | -2,32         |
| $\beta_7$        | 7,15          |
| $\beta_8$        | 2,86          |
| $\beta_9$        | 10,42         |
| $\beta_{10}$     | 2,45          |
| $\beta_{11}$     | -6,13         |
| $\beta_{12}$     | -3,59         |
| $\delta_1$       | 37,70         |
| $\delta_2$       | 30,97         |
| $\delta_3$       | 37,51         |
| $\delta_4$       | 26,24         |
| $\delta_5$       | 34,99         |
| $\delta_6$       | 8,22          |
| $\delta_7$       | 0,00          |

Le proporzioni di campioni da sottoporre a un secondo dosaggio e le proporzioni di neonati che necessitano di un secondo prelievo non sono disponibili e saranno ipotizzate nella simulazione a 10% e 2% rispettivamente, mentre per le proporzioni attese dei positivi al test di primo livello facciamo riferimento ai valori del Paragrafo precedente.

Le patologie oggetto di screening sono state suddivise in tre gruppi in base alla priorità nella necessità di intervento terapeutico o dietetico precoce. I tre gruppi sono riportati nella Tabella 4.6 e sono costituiti da:

1. patologie ad alta priorità (+++) cioè che richiedono inizio di terapia entro la prima settimana di vita;
2. patologie a media priorità (++) che richiedono di inizio di terapia entro la seconda settimana di vita;
3. patologie a bassa priorità (+) che non necessitano di terapia nelle prime due settimane di vita.

Sono patologie a bassa priorità la malattia di Fabry e le mucopolisaccaridosi, sono di media priorità l'aciduria glutarica di tipo I, la fenilchetonuria, l'MCAD, il deficit del

## LE STIME SULL'IMPATTO DELLO SCREENING IN VENETO

trasporto della carnitina, il deficit di carnitina palmitoil transferasi di tipo I e la malattia di Pompe. Tutte le altre patologie sono ad alta priorità.

**Tabella 4.6:** Priorità nella necessità di intervento terapeutico e dietetico precoce.

| <b>Patologia</b>   | <b>Sigla</b> | <b>Priorità</b> |
|--|--------------|-----------------|
| <b>Difetti del metabolismo degli acidi organici</b>      |              |                 |
| Acidemia Propionica                                      | PA           | +++             |
| Acidemia metilmalonica                                   | MMA          | +++             |
| Deficit di cobalamina C/D                                | Cbl C/D      | +++             |
| Acidemia Isovalerica                                     | IVA          | +++             |
| Acidemia Glutarica Tipo I                                | GA I         | ++              |
| <b>Difetti del metabolismo degli aminoacidi</b>          |              |                 |
| Fenilchetonuria  | PKU          | ++              |
| Tirosinemia tipo I                                       | TYR I        | +++             |
| Malattia delle urine allo sciroppo d'acero               | MSUD         | +++             |
| Argininemia  | ARG          | +++             |
| Acidemia argino succinica                                | ASA          | +++             |
| Citrullinemia  | CIT          | +++             |
| <b>Difetti del metabolismo mitocondriale</b>             |              |                 |
| Deficit dell'Acil CoA deidrogenasi a catena molto lunga  | VLCAD        | +++             |
| Deficit dell'idrossiacil CoA deidrogenasi a catena lunga | LCHAD        | +++             |
| Deficit dell'acil CoA deidrogenasi a catena media        | MCAD         | ++              |
| Deficit dell'acil CoA deidrogenasi a catena corta        | SCAD         | +++             |
| Acidemia glutarica tipo II                               | GA2          | +++             |
| Deficit di carnitina palmitoil-transferasi I             | CPT I        | ++              |
| Deficit di carnitina palmitoil-transferasi II            | CPT II       | +++             |
| Deficit carnitina/acilcarnitina translocasi              | CACT         | +++             |
| Deficit del trasporto della carnitina                    | CUD          | ++              |
| <b>Disordini lisosomiali</b>                             |              |                 |
| Glicogenosi tipo II (Malattia di Pompe)                  | GSD-II       | ++              |
| Malattia di Fabry  | MF           | +               |
| Mucopolisaccaridosi                                      | MPS          | +               |

In base ai dati presentati nella Tabella 4.2, per le patologie ad alta priorità ci si attende in un anno una proporzione di positivi al test di primo livello compresa tra 0,091% e 0,226% per un numero di neonati che va da 43 a 107. Per le patologie a media priorità queste proporzioni sono comprese tra 0,082% e 0,163% (39-77 neonati), mentre per le patologie a bassa priorità tra 0,392% e 0,405% (186-192 neonati).

#### 4.3.3 L'implementazione del modello

Il modello è stato implementato con il Software MicroSaint 3.2, sviluppato dalla Micro Analysis and Design Inc Simulation Software nel 1985 e reso disponibile dall'Università degli Studi di Padova. Il modello è rappresentato nella Figura 4.4.

Esso descrive una rete che viene percorsa da delle entità che richiedono dei servizi. Nel nostro caso le entità sono i neonati, i campioni prelevati e i dosaggi.

Gli oggetti che sono rappresentati nel modello sono i seguenti:

- **le ellissi (*task*)** che rappresentano le attività e prevedono in genere il trascorrere del tempo e l'uso di risorse;
- **i rettangoli striati** che rappresentano le code;
- **i rombi** che rappresentano le decisioni che possono essere di tre tipi:
  - **multiple:** le entità scelgono tutte le strade che si aprono davanti;
  - **tattiche:** le entità scelgono un percorso in base al verificarsi di una determinata condizione;
  - **probabilistiche:** le entità scelgono un percorso in base a una determinata probabilità.

Il *Task 1* rappresenta lo start e al suo interno sono definiti i valori di alcune variabili che saranno poi richiamate dal programma durante la simulazione. Nel nostro caso vengono definiti i coefficienti del modello che descrive l'andamento delle nascite durante i giorni della settimana e i mesi dell'anno. Esso viene percorso una sola volta e serve per inizializzare la procedura di simulazione.

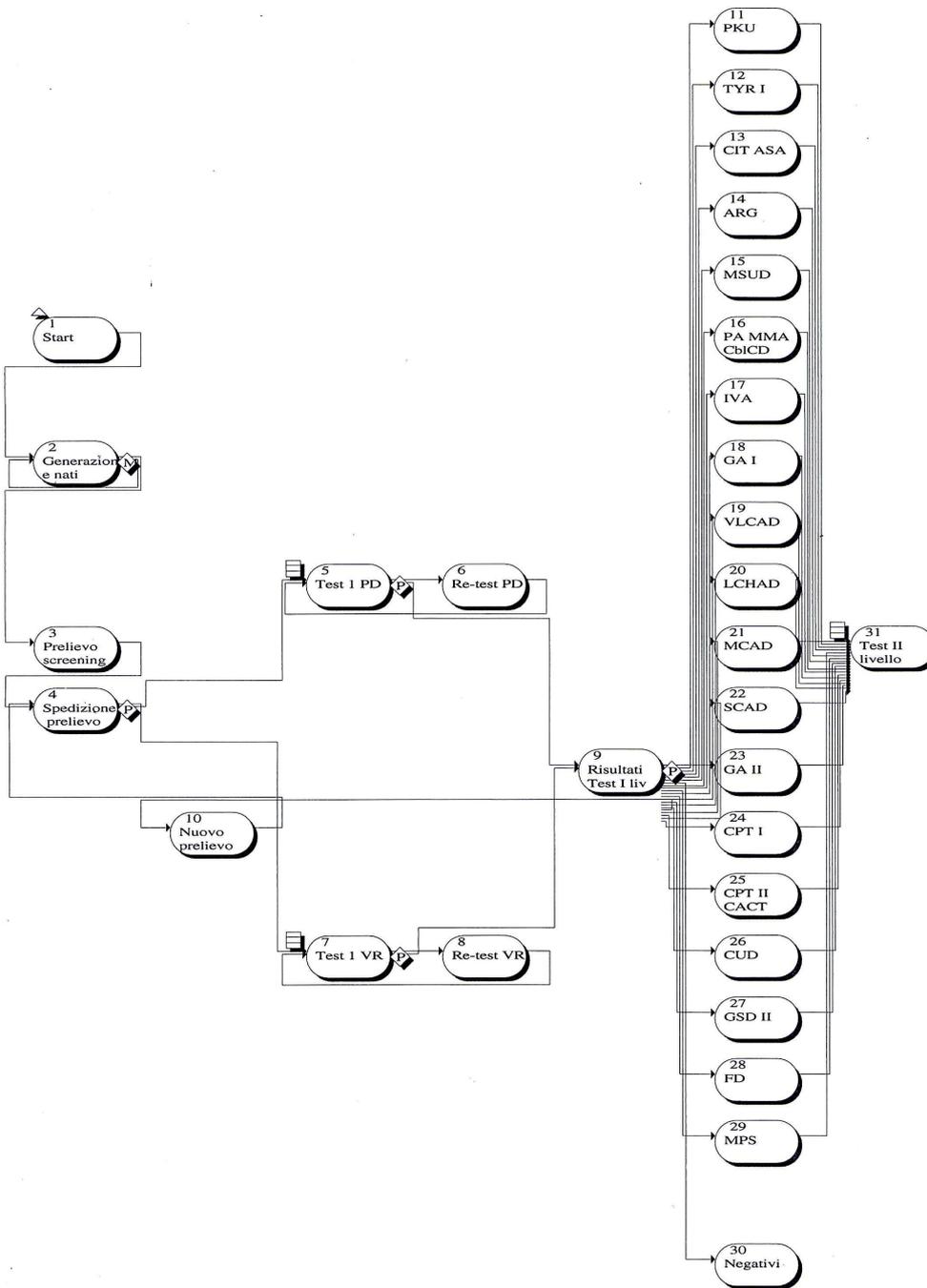
Il *Task 2* genera i neonati in modo casuale indipendente. Il tempo che intercorre tra nascite consecutive segue una distribuzione esponenziale con media pari all'inverso del numero di nati attesi in quel giorno secondo i parametri stabiliti nel *Task 1*. Il *Task* è seguito da una decisione multipla poiché ogni neonato generato, oltre a passare all'attività conseguente, avvia la generazione del neonato successivo dopo l'intervallo di tempo calcolato.

Il *Task 3* descrive il tempo che intercorre tra la nascita e il prelievo. Il prelievo avviene tra le 48 e le 72 ore di vita, quindi si assume che questo tempo segua una distribuzione rettangolare di media 2,5 giorni e ampiezza 1 giorno.

# LE STIME SULL'IMPATTO DELLO SCREENING IN VENETO

**Figura 4.4:** Modello di simulazione del test di primo e di secondo livello per lo screening neonatale per le malattie metaboliche ereditarie

Network 0 2011\_01\_17\_Modello\_Screening\_DISEGNO



## LE STIME SULL'IMPATTO DELLO SCREENING IN VENETO

Il *Task 4* descrive la spedizione dei campioni dal punto nascita al centro screening. Secondo quanto stabilito dalla delibera regionale i campioni devono pervenire al centro screening entro 24 ore dal prelievo quindi assumiamo che la durata del trasporto presenti una distribuzione rettangolare con media 0,6 e ampiezza 0,8. All'uscita dal *Task 4* i neonati vengono divisi in base a quelli il cui prelievo afferisce al centro screening di Padova e quelli il cui prelievo afferisce al centro screening di Verona secondo un criterio probabilistico (61% e 39% rispettivamente).

I *Task 5* e *7* descrivono l'esecuzione del dosaggio sul campione. La fila d'attesa che si forma davanti ai due *Task* è dovuta sia alla chiusura domenicale del centro sia alla capacità massima dei centri screening. La capacità dei centri screening è data dal numero totale di dosaggi che il centro riesce a processare contemporaneamente. Il tempo richiesto per l'esecuzione di un dosaggio è stato fissato a 24 ore. L'esecuzione del *task* si blocca la domenica. All'uscita dei due *task* segue una decisione probabilistica che divide i campioni in quelli che necessitano di un nuovo dosaggio (re-test sullo stesso campione) oppure no. La probabilità di richiesta di un nuovo dosaggio è stata fissata a 10%. I campioni che necessitano di un nuovo dosaggio passano per i *Task 6* e *8* e rientrano per i *Task 5* e *7* rispettivamente, ma con una priorità più alta nella coda.

Al termine della processazione del campione, che può richiedere uno o più dosaggi, il centro screening fornisce i risultati del test (*Task 9*): questo viene descritto tramite a una decisione probabilistica. Le probabilità sono state definite nel paragrafo precedente. Il risultato può essere positivo per una determinata patologia, negativo oppure rinviato a un secondo prelievo.

I neonati che necessitano di un secondo prelievo vanno al *Task 10* che produce un tempo di ritardo tra il primo e il secondo prelievo. Essi vanno poi al *Task 4* e ricominciano la processazione del campione.

I casi positivi passeranno per uno dei *Task* da 11 a 29 all'interno dei quali sarà assegnata loro una determinata priorità.

I neonati con risultato negativo del test passeranno per il *Task 30* e usciranno dal sistema.

Il *Task 31* è il *task* che descrive l'attività del centro di secondo livello al quale giungono tutti i positivi al primo livello. Il centro effettua le visite dal lunedì al venerdì e visita una paziente alla volta. In questo *task* viene definita la capacità del centro. Fuori del

*task* c'è una coda: i neonati attenderanno la visita di secondo livello in base alle priorità stabilite.

#### 4.3.4 I risultati

Al fine di dimensionare i centri di primo e secondo livello è stato previsto che il modello calcoli i tempi che intercorrono tra la fine della spedizione e i risultati del test di primo livello e il tempo che intercorre tra il risultato positivo al primo livello e l'entrata al centro di secondo livello.

La simulazione ci permette di cambiare la capacità dei centri, sia di primo sia di secondo livello per vedere come reagisce il sistema e cambiano i tempi di attesa al fine di trovare la soluzione ottima. Proveremo a cambiare anche le proporzioni di positivi al primo livello in base ai dati della letteratura.

La simulazione ha prodotto in un anno 47.488 nati, 48.394 prelievi per il test di primo livello e 4.718 richieste di un secondo dosaggio sui campioni esaminati.

Poiché il tempo fissato per un dosaggio è di 24 ore, la capacità indica il numero di dosaggi massimo eseguibili in una giornata.

Sono state effettuate delle prove di simulazione cambiando le capacità giornaliere massime. Il tempo intercorso per la processazione del campione per il test di primo livello è riportato nella Tabella 4.7 separatamente per i due centri screening.

**Tabella 4.7:** Tempo intercorso per la processazione del campione per il test di primo livello.

|                       | Centro screening Padova |            |            |            | Centro screening Verona |            |            |            |
|-----------------------|-------------------------|------------|------------|------------|-------------------------|------------|------------|------------|
|                       | 1°<br>sim.              | 2°<br>sim. | 3°<br>sim. | 4°<br>sim. | 1°<br>sim.              | 2°<br>sim. | 3°<br>sim. | 4°<br>sim. |
| Capacità              | 105                     | 115        | 125        | 140        | 65                      | 75         | 85         | 90         |
| <b>Tempo medio</b>    |                         |            |            |            |                         |            |            |            |
| Su tutti i neonati    | 3,7                     | 1,6        | 1,5        | 1,4        | 13,2                    | 1,6        | 1,5        | 1,4        |
| Neonati senza re-test | 3,6                     | 1,5        | 1,4        | 1,3        | 13,0                    | 1,4        | 1,3        | 1,3        |
| Neonati con re-test   | 4,8                     | 2,6        | 2,5        | 2,5        | 14,2                    | 2,6        | 2,5        | 2,5        |
| Tempo massimo         | 8,2                     | 3,4        | 3,1        | 3,1        | 20,0                    | 3,2        | 3,1        | 3,1        |
| % neonati >3 giorni   | 56,3                    | 1,8        | 1,7        | 1,4        | 100,0                   | 2,0        | 1,5        | 1,7        |
| Tasso di occupazione  | 99%                     | 90%        | 83%        | 73%        | 100%                    | 89%        | 78%        | 74%        |

Il numero di dosaggi giornalieri totale è stato stabilito in base al numero massimo di nati al giorno che è di circa 190, poi è stato successivamente aumentato e diminuito del 10%. La prima simulazione mostra una situazione di collasso di entrambi i centri di primo livello con tempi di processazione del campione che possono arrivare anche a 20 giorni. La seconda simulazione mostra una situazione decisamente migliore: il tempo medio di processazione del campione risulta notevolmente ridotto ma il tasso di occupazione dei centri rimane piuttosto alto. Nella terza e nella quarta simulazione il tempo medio di processazione non diminuisce molto, ma migliora il tasso di occupazione che è decisamente basso nella quarta simulazione. Non si riesce a eliminare la proporzione di neonati che richiede tre giorni per la processazione del campione in quanto si tratta di neonati che richiedono il secondo dosaggio a cavallo della domenica. Il sistema deve quindi garantire che i centri di primo livello siano in grado di effettuare almeno 210 dosaggi al giorno.

Ora andiamo a lavorare al dimensionamento del centro di secondo livello tenendo come dimensione del centro di primo livello quella testata con la terza simulazione. Sono stati calcolati sia i tempi di attesa dal risultato del test di primo livello al momento della visita di conferma diagnostica sia il tempo che intercorre dalla nascita alla conferma diagnostica. La simulazione è stata provata sia con la proporzione minima sia con la proporzione massima di positivi al primo livello e i risultati sono riportati in Tabella 4.8.

Nel caso con le proporzioni minime di positivi al primo livello, si vede come l'aumento del numero di visite possibili settimanali presso il centro di secondo livello di una sola unità cambi notevolmente i risultati in particolare per i casi con bassa priorità. I tempi medi di attesa dalla nascita dei casi con media priorità vanno da 6,7 giorni nella prima simulazione a 5,7 nella quarta simulazione, mentre per i casi ad alta priorità variano da 6,2 a 5,5. C'è comunque una quota di positivi al primo livello che effettua la visita di secondo livello nell'ottavo o nel nono giorno di vita, cioè dopo il limite stabilito di una settimana. Questa quota è ineliminabile poiché l'ambulatorio ferma la propria attività nel fine settimana. Il tasso di occupazione è accettabile con una capacità di sette visite la settimana.

LE STIME SULL'IMPATTO DELLO SCREENING IN VENETO

**Tabella 4.8:** Risultati della simulazione per il dimensionamento del centro di secondo livello.

|  | Positività al primo livello MINIMA |               |              |              | Positività al primo livello MASSIMA |              |              |
|--|------------------------------------|---------------|--------------|--------------|-------------------------------------|--------------|--------------|
|  | 1° sim.                            | 2° sim.       | 3° sim.      | 4° sim.      | 1° sim.                             | 2° sim.      | 3° sim.      |
| <b>Capacità settimanale</b>  | <b>5</b>                           | <b>6</b>      | <b>7</b>     | <b>8</b>     | <b>8</b>                            | <b>10</b>    | <b>12</b>    |
| <b>Tempo medio di attesa per la visita di secondo livello dai risultati di primo livello</b>   |                                    |               |              |              |                                     |              |              |
| Priorità +++   | 1,0                                | 0,8           | 0,7          | 0,4          | 0,7                                 | 0,7          | 0,4          |
| Priorità ++  | 1,8                                | 1,5           | 0,8          | 0,6          | 1,4                                 | 0,7          | 0,4          |
| Priorità +   | 74,0                               | 22,9          | 2,9          | 1,2          | 13,0                                | 1,5          | 0,7          |
| <b>Tempo massimo di attesa per la visita di secondo livello dai risultati di primo livello</b> |                                    |               |              |              |                                     |              |              |
| Priorità +++   | 3,2                                | 2,8           | 3,2          | 2,4          | 2,7                                 | 2,7          | 2,3          |
| Priorità ++  | 8,6                                | 8,3           | 3,6          | 3,1          | 5,1                                 | 4,3          | 2,7          |
| Priorità +   | 104,0                              | 48,4          | 12,8         | 5,6          | 31,2                                | 8,5          | 4,4          |
| <b>Tempo medio di attesa per la visita di secondo livello dalla nascita</b>                    |                                    |               |              |              |                                     |              |              |
| Priorità +++   | 6,2                                | 5,9           | 5,7          | 5,5          | 5,7                                 | 5,7          | 5,6          |
| Priorità ++  | 6,7                                | 6,6           | 5,9          | 5,7          | 6,5                                 | 5,8          | 5,5          |
| Priorità +   | 78,8                               | 28,0          | 8,0          | 6,3          | 17,8                                | 6,6          | 5,8          |
| <b>Tempo massimo di attesa per la visita di secondo livello dalla nascita</b>                  |                                    |               |              |              |                                     |              |              |
| Priorità +++   | 8,4                                | 7,9           | 8,2          | 7,5          | 7,7                                 | 7,7          | 7,5          |
| Priorità ++  | 13,5                               | 13,4          | 8,7          | 8,2          | 10,2                                | 9,4          | 7,8          |
| Priorità +   | 108,8                              | 53,5          | 17,9         | 10,7         | 36,0                                | 13,6         | 9,5          |
| <b>% neonati tempi di attesa lunghi dalla nascita</b>  |                                    |               |              |              |                                     |              |              |
| Priorità +++ >7 giorni   | 21,4<br>(n=12)                     | 14,0<br>(n=7) | 6,8<br>(n=4) | 7,4<br>(n=4) | 10,8<br>(n=11)                      | 8,8<br>(n=9) | 1,9<br>(n=2) |
| Priorità ++ >14 giorni   | 1,4<br>(n=1)                       | 0,0           | 0,0          | 0,0          | 0,0                                 | 0,0          | 0,0          |
| Priorità + >21 giorni  | 96,3                               | 62,5          | 0,0          | 0,0          | 37,5                                | 0,0          | 0,0          |
| <b>Tasso di occupazione</b>  | <b>100%</b>                        | <b>100%</b>   | <b>84%</b>   | <b>67%</b>   | <b>100%</b>                         | <b>80%</b>   | <b>63%</b>   |

Nel caso con le proporzioni massime di positivi al primo livello, un dimensionamento di 10 visite a settimana porterebbe a un buon tasso di occupazione. Anche in questo caso una proporzione di positivi al primo livello con alta priorità che effettua la visita dopo il settimo giorno di vita è ineliminabile per le stesse motivazioni.

### **4.5 Conclusioni**

In questo capitolo è stato illustrato come può essere affrontato il problema del dimensionamento dei centri in fase di progettazione di un programma di screening o quando si intende apportare delle modifiche strutturali, come la creazione o la chiusura di un centro, quando il programma di screening è già attivo.

Nella nostra simulazione abbiamo analizzato i risultati modificando solo le capacità dei centri e le proporzioni di positivi al primo livello perché erano quelle più utili per le nostre finalità.

In realtà si possono studiare varie evoluzioni del fenomeno che dipendono da altri parametri come il numero di nascite, la proporzione di campioni che necessitano di un secondo dosaggio, la proporzione dei neonati che necessitano di un secondo prelievo, le priorità per la visita di secondo livello o da altri fattori organizzativi come il tempo di spedizione, il tempo di processazione del campione e i giorni di chiusura di centri di primo e secondo livello.

La nostra simulazione ha dimostrato che al primo livello è necessario un dimensionamento di almeno 210 dosaggi al giorno, mentre al secondo livello è necessario un dimensionamento di almeno dieci visite a settimana che potrebbero essere ridotte qualora la proporzione di positivi al primo livello fosse più bassa di quella stimata. Un'altra evoluzione che si renderà necessario studiare in futuro sarà l'allargamento del bacino d'utenza alle regioni contigue Friuli Venezia Giulia e Trentino Alto Adige che renderà necessario un ridimensionamento dei centri.

Il modello è applicabile, con opportuni adattamenti, ad altre realtà dove lo screening neonatale per le malattie metaboliche ereditarie con la tecnologia tandem mass è attivo.

## 5. La progettazione del sistema di raccolta dati

L'attivazione di un programma di screening deve prevedere anche un sistema di raccolta dati che permetta di avere in ogni momento le informazioni sul neonato, sul test di primo livello e sul test di secondo livello.

### 5.1 La progettazione di un database

La progettazione di un applicativo prevede la fase di progettazione concettuale e la fase di progettazione logica.

#### 5.1.1 La progettazione concettuale

Il primo passo della progettazione concettuale è **la raccolta dei requisiti** che prevede la completa individuazione dei problemi che il sistema da realizzare deve risolvere e le caratteristiche che tale sistema dovrà avere. Per caratteristiche si intendono gli aspetti statici (i dati) e gli aspetti dinamici (le operazioni sui dati).

Successivamente si procede con **l'analisi dei requisiti** che consiste nel chiarimento e nell'organizzazione delle specifiche dei requisiti. I requisiti di una applicazione provengono, in genere, dalle seguenti fonti di informazione:

- gli utenti dell'applicazione (tramite opportune interviste, documentazione scritta che gli utenti possono aver predisposto a tale scopo);
- tutta la documentazione esistente che ha qualche attinenza con il problema in studio: moduli, regolamenti interni, procedure aziendali, normative;
- eventuali realizzazioni preesistenti ovvero applicazioni che si devono rimpiazzare o che devono interagire in qualche maniera con il sistema da realizzare. (Azteni et al. 1996)

In questa fase si può costruire **il diagramma dei casi d'uso** che è un diagramma che descrive le funzioni e i servizi offerti da un sistema, e come gli attori che si interfacciano con il sistema percepiscono e utilizzano questi servizi e funzioni. Gli elementi del modello principali utilizzati nel diagramma dei casi d'uso sono il sistema, gli attori e i casi d'uso.

Il sistema è rappresentato come un rettangolo vuoto. Gli elementi del modello che rappresentano le caratteristiche del sistema sono posizionati all'interno del rettangolo

mentre quelli che rappresentano entità esterne sono posizionati all'esterno. In molti diagrammi il simbolo per il sistema viene omesso in quanto la distinzione fra concetti relativi al sistema e concetti relativi al suo contesto può essere considerata implicita.

Gli attori sono rappresentati graficamente nel diagramma da un'icona che rappresenta un uomo stilizzato (*stickman*). Un attore rappresenta un ruolo coperto dalle entità che interagiscono col sistema e comprende gli utenti umani, altri sistemi *software*, dispositivi *hardware*, etc. Un ruolo corrisponde a una certa famiglia di interazioni correlate che l'attore intraprende col sistema.

Un caso d'uso è rappresentato graficamente come un'ellisse che ne contiene il nome e rappresenta una funzione o servizio offerto dal sistema a uno o più attori. La funzione deve essere completa e significativa dal punto di vista degli attori che vi partecipano.

L'associazione congiunge gli attori con i casi d'uso a cui essi partecipano. Un attore può essere associato a più casi d'uso, e viceversa. L'associazione viene rappresentata con una linea.

Le relazioni di inclusione e di estensione fra casi d'uso sono rappresentate graficamente da una freccia tratteggiata che collega due casi d'uso con l'indicazione degli stereotipi «*include*» e «*extend*» rispettivamente.

Il primo sta ad indicare che la funzione rappresentata dal caso d'uso alla base della freccia include completamente la funzione rappresentata dal caso d'uso alla punta della freccia. La seconda indica che la funzione rappresentata dal caso d'uso alla base della freccia può essere impiegata nel contesto della funzione rappresentata dal caso d'uso alla punta, ovvero ne rappresenta una sorta di arricchimento.

Le relazioni di estensione e inclusione rappresentano concetti piuttosto vicini, ma differenziati dall'orientamento delle frecce: «*include*» indica una parte che viene sempre eseguita durante l'esecuzione del caso d'uso alla base della freccia; «*extend*» indica una parte che può essere eseguita in determinate circostanze del caso d'uso alla punta della freccia (Bennett et al. 2002).

Infine si procede con il predisporre uno **schema entità relazione** in grado di fornire un'opportuna rappresentazione della realtà di cui il *database* sarà il modello. Si tratta di mettere in relazione quanto prodotto nelle precedenti analisi.

Il modello **entità-relazione** (E-R) è un **modello concettuale di dati** che contiene alcuni costrutti atti a descrivere la realtà di interesse in maniera semplice, indipendente dai criteri di organizzazione dei dati nel computer (Azteni et al. 1996).

I costrutti sono le entità, le relazioni, gli attributi, le cardinalità, gli identificatori e le generalizzazioni.

Le **entità** sono classi di oggetti (fatti, persone, cose) con proprietà comuni e con esistenza “autonoma” ai fini dell’applicazione di interesse. Ogni entità viene rappresentata graficamente mediante un rettangolo con il nome dell’entità all’interno. Un’occorrenza (o istanza) di un’entità è un oggetto della classe. Nello schema concettuale vengono rappresentate le entità, non le singole istanze.

Le **relazioni** (o associazioni) rappresentano legami logici fra due o più entità della nostra applicazione. Possono esserci relazioni tra un’entità e se stessa: relazioni ricorsive. Ogni relazione viene rappresentata graficamente da un rombo con il nome della relazione all’interno e da linee che la connettono alle sue entità.

Gli **attributi** descrivono proprietà di entità o relazioni. Associa ad ogni occorrenza di un’entità (o di una relazione) un elemento del dominio dell’attributo.

La **cardinalità** delle relazioni ci dà il numero minimo e massimo di istanze di relazione per ogni istanza di una entità cui quella relazione si riferisce. In base alla cardinalità esistono relazioni uno a uno (1-1), uno a molti (1-N) e molti a molti (M-N) ...

Gli **identificatori** specificano quei concetti (attributi e/o entità) che servono a identificare univocamente le occorrenze di un’entità. Generalmente sono uno o più attributi della stessa entità (chiave interna).

Le **generalizzazioni** rappresentano legami logici tra una entità E, detta entità padre e una o più entità  $E_1, E_2, \dots, E_n$  dette figlie, di cui E è più generale nel senso che le comprende come caso particolare (Azteni et al. 1996).

### 5.1.2 La progettazione logica

L’obiettivo della progettazione logica è quello di costruire uno schema logico in grado di descrivere, in maniera corretta ed efficiente, tutte le informazioni contenute nello schema entità relazione prodotto nella fase di progettazione concettuale. Lo **schema logico** sarà quindi costituito dalle tabelle che andranno create e popolate, con le relazioni che devono sussistere tra di esse e tutti i vincoli cui saranno sottoposte le

relazioni. Saranno elencati i tracciati record descrittivi dei relativi campi. L'accesso ai dati dovrà essere esente da ambiguità attraverso la presenza di chiavi primarie cioè di attributi che consentono di individuare univocamente un'entità all'interno di una tabella. Per mettere in relazione entità in tabelle diverse sarà stabilita la presenza di specifici elementi chiave comuni per entità distinte.

### **5.2 La progettazione del sistema di raccolta dati dello screening neonatale allargato per le malattie metaboliche**

In questo paragrafo verranno seguite le fasi di progettazione concettuale e di progettazione logica precedentemente descritte.

#### **5.2.1 La progettazione concettuale**

##### **5.2.1.1 La raccolta dei requisiti**

Il sistema di raccolta dei dati dello screening neonatale per le malattie metaboliche ereditarie dovrà raccogliere le informazioni su neonato e prelievo che viene effettuato presso il punto nascita, le informazioni sulla processazione e sui risultati del test di primo livello e su eventuali re-test dello stesso campione e le informazioni sul test di secondo livello e tutti gli esami diagnostici che esso richiede.

##### **5.2.1.2 L'analisi dei requisiti**

I centri coinvolti nel sistema di monitoraggio sono i punti nascita, i centri che effettuano il test di primo livello (centri screening) e il centro che effettua il test di secondo livello.

Il sistema di screening delle malattie metaboliche ereditarie si va ad inserire in un contesto regionale dove sono già attivi da una parte un sistema di raccolta dati su tutte le nascite che avvengono nel territorio regionale, dall'altra nella rete regionale di assistenza dei pazienti con malattia rara, tra le quali rientrano le malattie metaboliche, che prevede anche un sistema di raccolta dati delle stesse.

Il punto nascita raccoglie già le informazioni sul neonato attraverso il Certificato di Assistenza al Parto, mentre il centro di secondo livello è già attivo nella compilazione del Registro Malattie Rare.

Il nuovo sistema di raccolta dati prevede quindi un collegamento tra questi due sistemi già implementati dei quali vengono successivamente descritti il contesto di riferimento e il funzionamento.

### ***Il Certificato di Assistenza al Parto (CEDAP)***

Il CEDAP fu istituito nel luglio 2001 con Decreto Ministeriale 396 ed è entrato in vigore dal 1 gennaio 2002 colmando una lacuna informativa che si era venuta a creare in Italia a seguito della soppressione del modello ISTAT di rilevazione delle nascite (legge del 15 marzo 1997).

Ogni punto nascita ha l'obbligo di compilare il CEDAP per ogni parto e inviare i dati raccolti all'Osservatorio regionale che li fornisce, a sua volta, al Ministero della Salute.

Ad ogni regione è lasciata facoltà di aggiungere altre informazioni utili oltre a quelle richieste nel CEDAP ministeriale.

Per le nostre finalità si farà di seguito riferimento al modello CEDAP introdotto dall'Osservatorio della Patologia in Età Pediatrica della Regione Veneto e adottato da tutti i Punti Nascita presenti sul territorio regionale. Attualmente in Veneto è disponibile un sistema informatizzato in cui confluiscono tutti i CEDAP regionali consentendo in questo modo una più rapida elaborazione.

I CEDAP vengono compilati direttamente via Web, tramite rete intranet/extranet regionale, e quindi sono immediatamente disponibili nel database dell'Osservatorio il quale fa una costante azione di controllo e di consulenza; in questo modo già nel 2003 si è potuta avere copertura totale dei punti nascita, un numero di CEDAP pari alle nascite effettivamente avvenute e un'ottima qualità dei dati con una diminuzione del numero di dati mancanti.

Il Certificato di Assistenza al Parto è composto di sei sezioni:

1. *Sezione Generale*: contiene le informazioni relative a dove è avvenuto il parto (Regione, Comune, USL) e i dati principali della puerpera (nome, cognome, codice fiscale).
2. *Sezione A. Informazioni socio-demografiche sui genitori*: contiene le informazioni relative a madre e padre (data e luogo di nascita, residenza, stato civile, titolo di studio, condizione professionale, storia riproduttiva della madre,

eventuale esposizione a fattori di rischio, come ad esempio il fumo, per il padre).

3. *Sezione B. Informazioni sulla gravidanza:* contiene le informazioni su visite ed indagini prenatali svolte durante la gravidanza, presenza di eventuali patologie o metodo di fecondazione assistita, decorso della gravidanza, esposizione ad eventuali fattori di rischio per la madre, età gestazionale.
4. *Sezione C. Informazioni sul parto e sul neonato:* si divide in due sezioni ovvero *C1* dedicata al parto (luogo del parto, modalità del travaglio, presentazione del neonato, modalità del parto, data e ora, personale presente in sala, eventuali complicanze materne) e *C2* legata al neonato (misure antropometriche del neonato ed informazioni sul suo stato di salute).
5. *Sezione D. Informazioni su cause di nati-mortalità:* sono specificate le cause, le patologie, codificate secondo il sistema di classificazione nazionale ICD-9-CM, che hanno portato a questo evento.
6. *Sezione E. Informazioni su presenza di malformazioni:* anche in questo caso sono riportate le patologie, mediante codice ICD-9-CM, con eventuali riferimenti se la patologia è ereditaria.

La Sezione A e B è compilata dalla puerpera la restante parte del certificato è invece completata dal personale sanitario.

### ***Il Registro Malattie Rare***

Il Registro Malattie Rare ha sede presso l'Unità di Epidemiologia e Medicina di Comunità del Dipartimento di Pediatria dell'Università di Padova. L'area di monitoraggio è rappresentata dall'intero territorio della Regione Veneto. Il sistema informativo collega tutti i Centri regionali accreditati per le malattie rare, deputati alla diagnosi e registrazione dei casi attraverso il sistema informatizzato, il personale dei Distretti Sanitari e dei Servizi Farmaceutici territoriali delle 21 Aziende ULSS regionali.

Nel sistema informativo vengono registrati i pazienti diagnosticati affetti da una delle malattie rare definite dal Decreto Ministeriale 279 del 2001. La registrazione avviene ad opera di medici dei Centri accreditati abilitati alla certificazione, i quali accedono al sistema attraverso *login* e *password* personali. Nel sistema vengono registrati sia i

pazienti residenti in Veneto, certificati in uno dei Centri della Regione, sia i pazienti residenti in Veneto, certificati fuori Regione. In questo caso l'inserimento avviene ad opera degli utenti dei Distretti Sanitari delle ULSS di residenza, attraverso un'apposita funzione del sistema informativo e a seguito di certificato emesso in forma cartacea da un centro extra-regionale, purché accreditato.

Per ciascun paziente i dati raccolti sono: nome, cognome, codice fiscale, data di nascita, luogo di nascita, luogo di residenza, data della diagnosi, nome di malattia diagnosticata, gruppo nosologico di appartenenza secondo le categorie del Decreto, nome della malattia di riferimento del Decreto, se trattasi di malattia compresa o sinonimo, codici ICD e MIM assegnati automaticamente dal sistema, nome del medico che ha redatto il certificato. Per i pazienti certificati fuori Regione vengono richiesti i seguenti campi aggiuntivi: nome del medico che ha effettuato la diagnosi, data di compilazione del certificato, nome ed indirizzo del Centro presso il quale è stata effettuata la diagnosi. I Distretti e/o i Centri Elaborazione dati CED provvedono all'aggiornamento degli elenchi degli esenti, comunicando attraverso una apposita funzione di segnalazione presente nel sistema i nominativi dei deceduti e la data del decesso. Altri dati raccolti a partire dal 2006 sono: utilizzo di farmaci orfani, data di esordio della sintomatologia, con la necessità di specificare se questa informazione è desunta dalla documentazione clinica o riferita dal paziente. Il Registro inoltre permette di gestire la prescrizione di prodotti dietetici e farmaci, attraverso apposite funzioni e quindi raccoglie anche i dati che si riferiscono ai trattamenti, laddove inseriti dai Centri. A partire dal 2006 è stata anche predisposta la funzione "epicrisi", che funge da cartella clinica sintetica compilabile *on-line*, dove è possibile registrare in campi di testo liberi i principali eventi clinici (Minichiello 2010).

### **Il flusso dell'informazione**

Nell'analisi dei requisiti è necessario descrivere il flusso dell'informazione, gli attori coinvolti e che ruolo essi avranno nel sistema di raccolta dati.

Il flusso dell'informazione sullo screening neonatale è riportato in Figura 5.1.

Dopo poche ore dalla nascita del bambino, il punto nascita chiede ai genitori il consenso per effettuare il prelievo per screening neonatale e in caso di risposta affermativa

## LA PROGETTAZIONE DEL SISTEMA DI RACCOLTA DATI

effettua il prelievo. Il punto nascita, che routinariamente compila *on-line* il Certificato di Assistenza al Parto del bambino, provvede a:

- inserire nella scheda del paziente la data e l'ora del prelievo e la data e l'ora del primo pasto;
- apporre un identificativo sul campione prelevato costituito inizialmente da codice ospedale, data e ora di nascita, codice braccialetto, id record;
- inviare il campione al centro screening;
- salvare i dati inseriti in modalità definitiva e inviarli al centro screening.

Il sistema deve prevedere anche una stampa di etichette del codice identificativo che il punto nascita appone sul test.

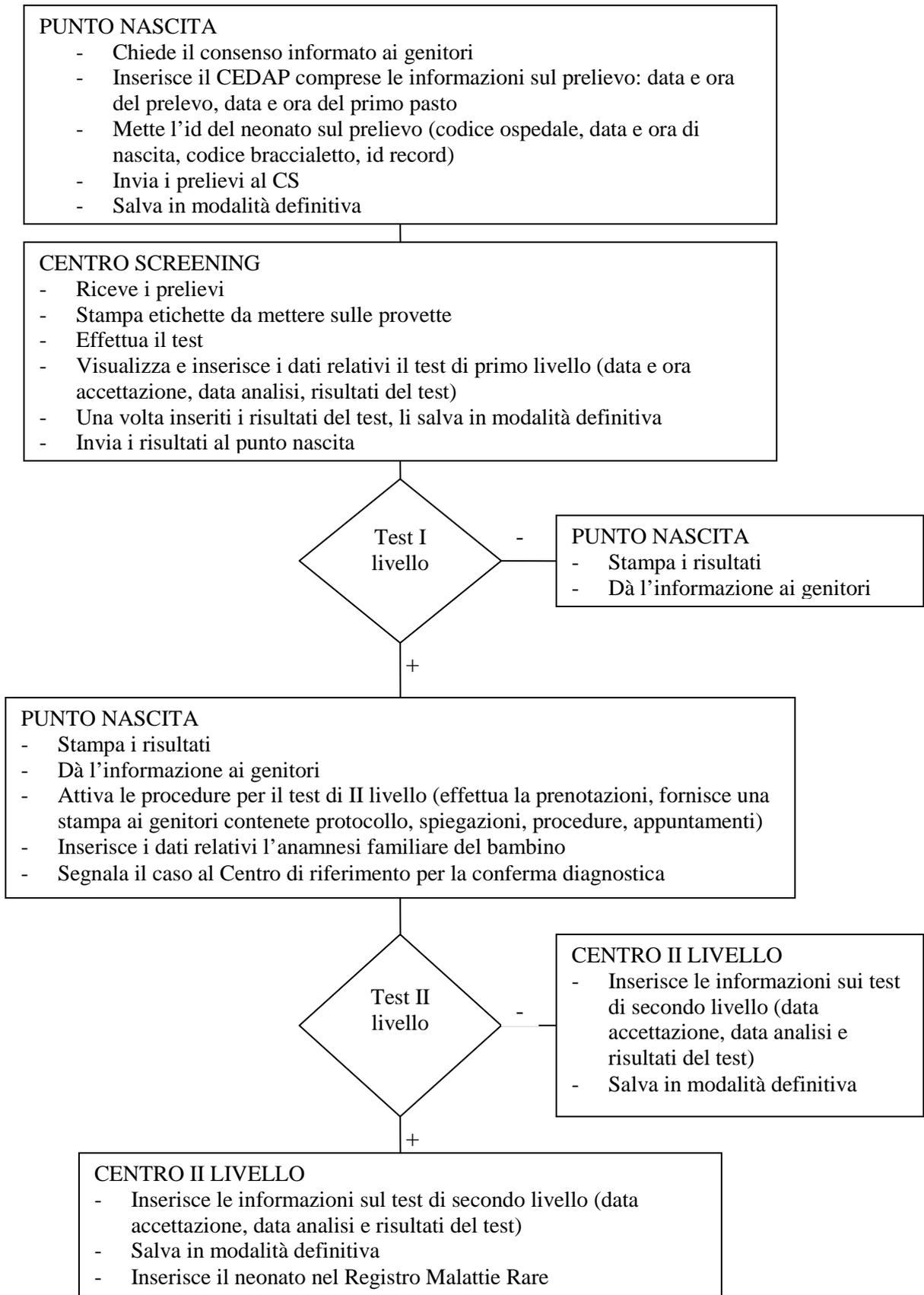
Il centro screening, una volta ricevuti i campioni, effettua il test. Anche in questo caso il sistema deve prevedere una stampa di etichette del codice identificativo in modo che il centro screening le possa apporre sulle provette. Il centro screening inserisce le informazioni sul test (data e ora di accettazione del campione, data e ora di analisi, risultato del test).

Una volta effettuato il test, il centro screening inserisce i risultati, salva in modalità definitiva e li invia al punto nascita.

Il punto nascita riceve i risultati del test e ne dà comunicazione ai genitori. In caso di risultato positivo attiverà le procedure per il test di secondo livello indirizzando il neonato presso il centro di riferimento, fissando l'appuntamento per la visita e i test di secondo livello. Sarà prevista la stampa di un protocollo da fornire alla famiglia contenente procedure, con spiegazioni e appuntamenti. Il punto nascita inserirà a questo punto anche informazioni sull'anamnesi familiare del bambino che saranno inviate al centro accreditato.

Il centro di riferimento inserirà le informazioni sulla visita e sui test di secondo livello: data accettazione, data analisi e risultati del test. In caso di risultato positivo si aprirà automaticamente l'applicativo delle Malattie Rare per l'inserimento e la certificazione del paziente.

**Figura 5.1:** Il flusso dell'informazione

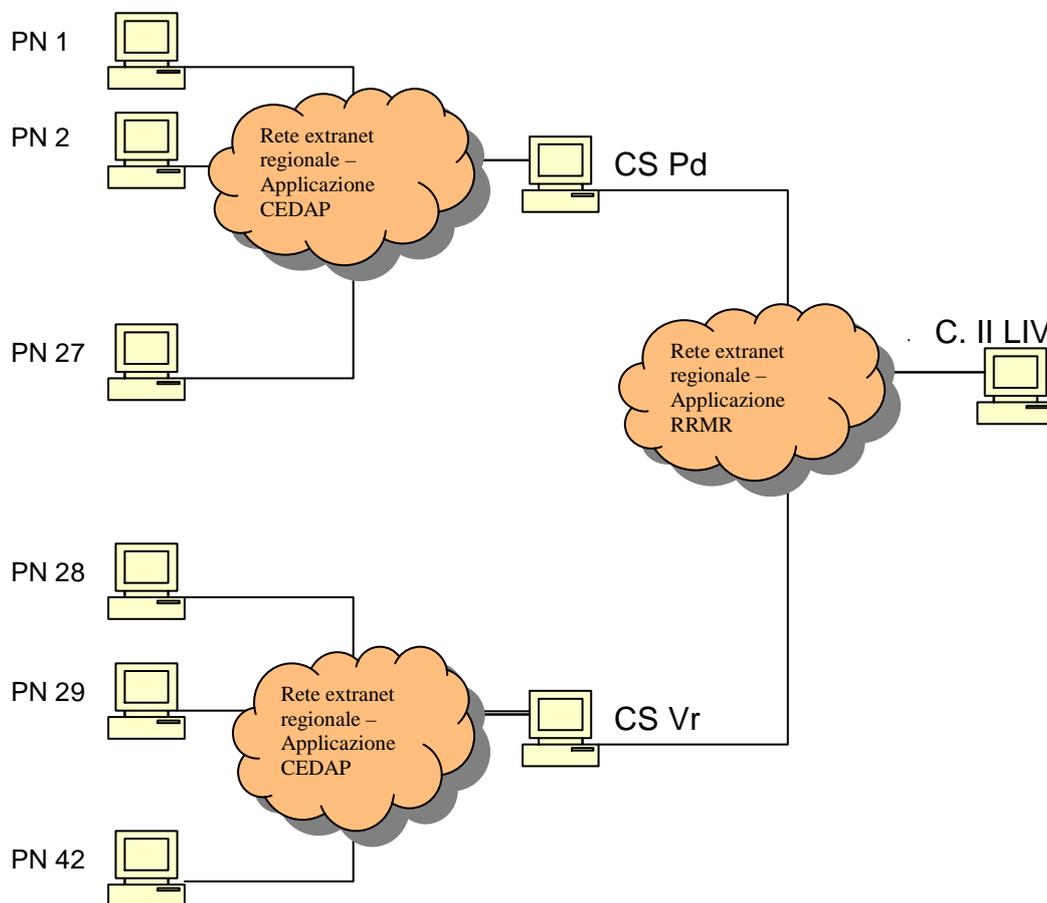


## LA PROGETTAZIONE DEL SISTEMA DI RACCOLTA DATI

Come già detto il sistema di raccolta dati vede coinvolti i punti nascita, i due centri per lo screening neonatale di primo livello e il centro di riferimento per il test di secondo livello.

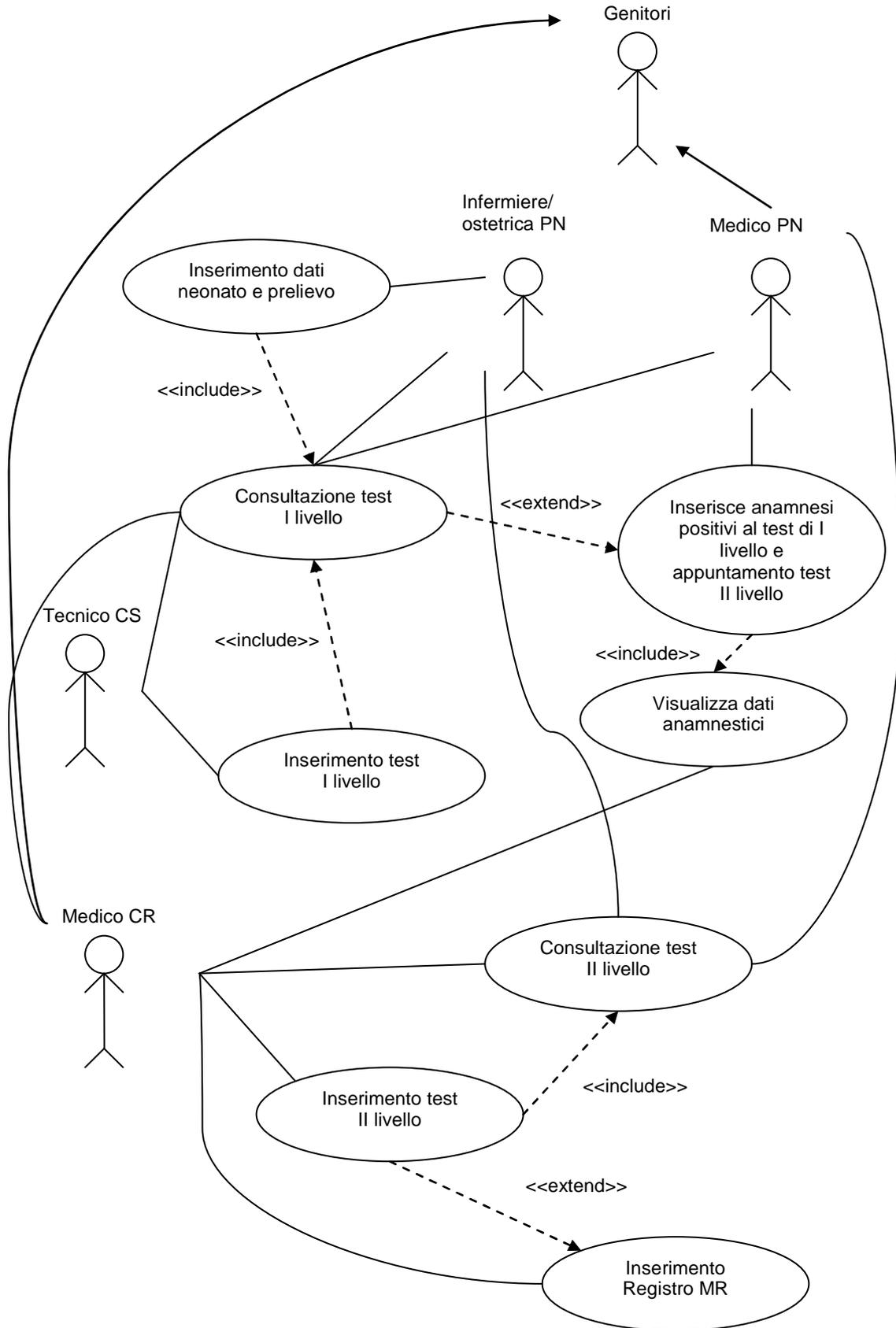
Il sistema di raccolta dati è quindi un sistema in rete che viene rappresentato nella Figura 5.2. Ci sono 27 punti nascita che afferiscono al laboratorio di screening di Padova, e 15 punti nascita che afferiscono al laboratorio di screening di Verona. Il centro di riferimento per le malattie metaboliche ereditarie di Padova è centro di II livello e vi afferiscono tutti i neonati positivi al test di primo livello.

**Figura 5.2:** La rete del sistema informativo



La fase successiva prevede la definizione degli operatori coinvolti e di quali informazioni possono visualizzare o inserire e modificare. Questa fase prevede la creazione del diagramma dei casi d'uso riportato nella Figura 5.3.

**Figura 5.3:** Diagramma dei casi d'uso (PN: punto nascita, CS: centro screening I livello, CR: centro di riferimento II livello)



Gli attori sono: l'operatore del punto nascita che inserisce i dati del Cedap (infermiere o ostetrica) e il medico del punto nascita, il tecnico del centro screening, e il medico del centro di riferimento per la conferma diagnostica.

L'operatore del punto nascita inserisce il CEDAP, effettua il prelievo sul neonato e inserisce i dati relativi al prelievo. Può consultare in qualsiasi momento lo stato del test di primo livello e del test di secondo livello. Il medico del punto nascita può effettuare delle operazioni in più rispetto all'infermiere/ostetrica: la visualizzazione dello stato del test di primo livello ha una *extend* in quanto, in caso di risultato positivo del test, il medico prende l'appuntamento per il test di secondo livello e inserisce i dati anamnestici del bambino da inviare al centro di secondo livello.

Il tecnico del centro screening consulta e inserisce i risultati del test di primo livello.

Il medico del centro di riferimento per la conferma diagnostica consulta i risultati del test di primo livello per i casi positivi, consulta e inserisce i dati relativi al test di secondo livello, consulta la scheda anamnestica del paziente inserita dal punto nascita e in caso di risultato positivo al test di secondo livello inserisce il paziente nel Registro Malattie Rare.

### **5.2.1.3 Il modello entità-relazione**

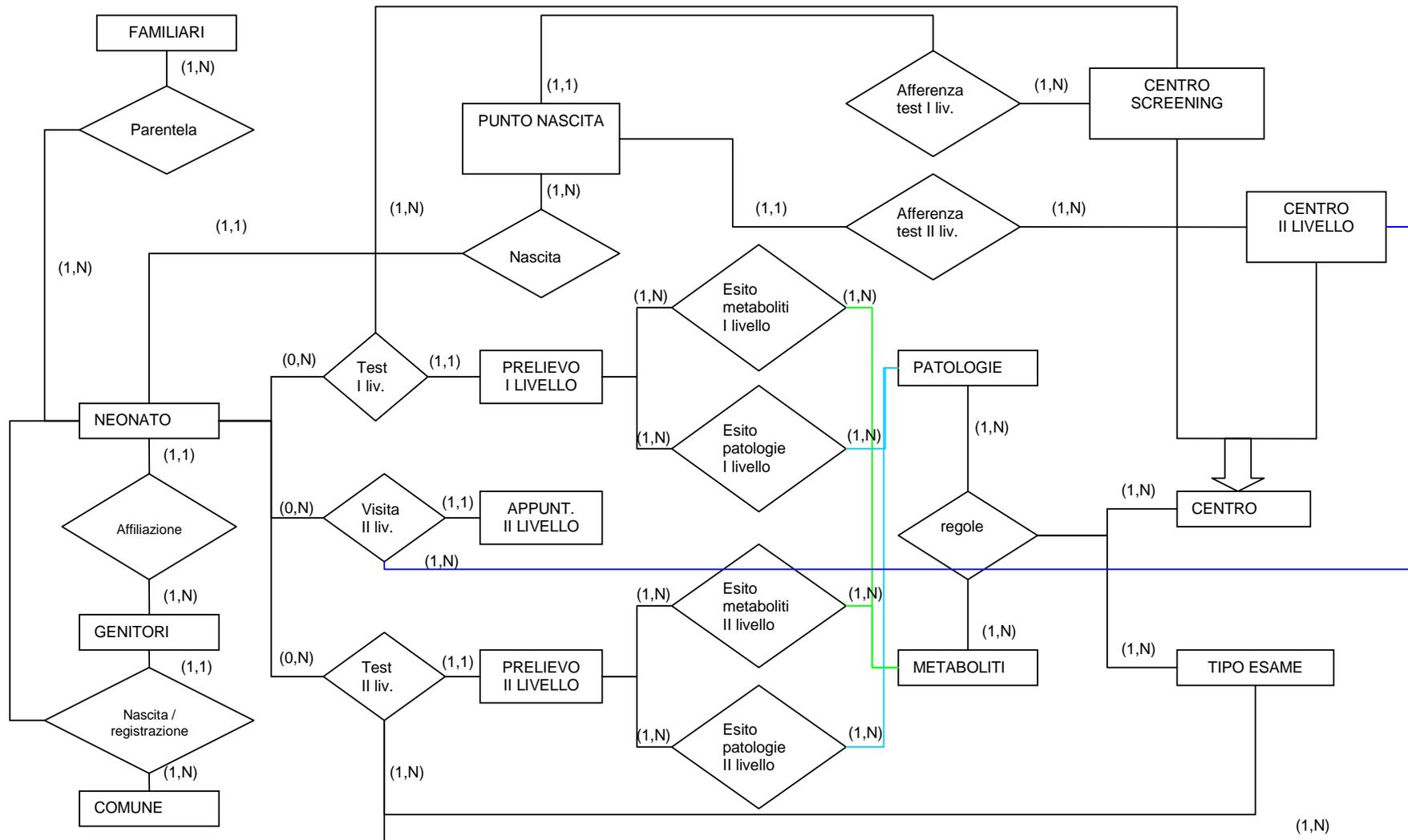
Il modello entità relazione è riportato nella Figura 5.4. Gli attributi non sono riportati nel modello ma sono descritti successivamente in tabelle riassuntive per problemi di spazio (Tabella 5.2 e Tabella 5.3).

Le entità del nostro modello sono le seguenti: il neonato, i genitori, i familiari, il comune, il punto nascita, il centro screening, il centro di II livello, il prelievo per il test di primo livello, il prelievo per il test di secondo livello, l'appuntamento per la visita di secondo livello, le patologie, i metaboliti e il tipo di esame. Il centro screening e il centro di II livello sono entità figlie di un'entità padre chiamata Centro.

Le relazioni sono: nascita, affiliazione, parentela, residenza, afferenza test di primo livello, afferenza test di secondo livello, test di primo livello, il test di secondo livello, visita al secondo livello, esito metaboliti primo livello, esito patologie primo livello, esito metaboliti secondo livello, esito patologie secondo livello e regole.

## LA PROGETTAZIONE DEL SISTEMA DI RACCOLTA DATI

**Figura 5.4:** Modello Entità-Relazione



## LA PROGETTAZIONE DEL SISTEMA DI RACCOLTA DATI

**Tabella 5.2:** Sintesi delle entità che popolano il modello entità-relazione

| <b>Entità</b>             | <b>Descrizione</b>  | <b>Attributi</b>   | <b>Identificatore</b>                      |
|---------------------------|---|--|--|
| Neonato                   | Neonato registrato presso i punti nascita della rete regionale  | ID neonato, nome, cognome, data di nascita, indirizzo, CAP, comune, telefono, codice braccialetto, id record Cedap, punto nascita, sesso, data ora primo pasto, età gestazionale, peso alla nascita, nutrizione parenterale, data fine nutrizione parenterale, trasfusioni, data ultima trasfusione, consenso al test di screening | ID neonato                                 |
| Genitore                  | Genitori dei neonati  | ID genitori, nome madre, cognome madre, data di nascita della madre, comune di nascita della madre, codice fiscale della madre, nome padre, cognome padre, data di nascita del padre, comune di nascita del padre, codice fiscale del padre, informazioni sulla gravidanza della madre, storia riproduttiva della madre            | ID genitori                                |
| Familiari                 | Familiari del neonato   | ID familiare, grado di parentela, anamnesi   | ID familiare                               |
| Comune                    | Comune  | ID comune, codice Istat del comune, descrizione, catasto, data inizio validità, data fine validità   | ID comune, data inizio validità            |
| Punto Nascita             | Punti nascita della rete regionale  | ID ospedale, codice ospedale, descrizione, Aulss, comune, data inizio validità, data fine validità   | ID ospedale, data inizio validità          |
| Centro screening          | Centri screening della rete regionale   | ID centro screening, codice presidio, descrizione, comune, data inizio validità, data fine validità  | ID centro screening, data inizio validità  |
| Centro di secondo livello | Centri per la conferma diagnostica delle malattie metaboliche presenti nella rete regionale           | ID centro II livello, codice presidio, descrizione, comune, data inizio validità, data fine validità   | ID centro II livello, data inizio validità |
| Prelievo I livello        | Prelievo effettuato dal punto nascita per il test di screening  | ID prelievo, data prelievo, progressivo prelievo, data accettazione, data analisi, id utente punto nascita, id utente centro screening   | ID prelievo                                |
| Appuntamento II livello   | Visita che viene effettuata con lo specialista del centro di secondo livello                          | ID visita, data visita, codice utente cs, medico, codice utente centro secondo livello   | ID visita                                  |
| Prelievo II livello       | Prelievo effettuato per la conferma diagnostica   | ID esame, data appuntamento, data accettazione, data analisi, ID tipo esame, id utente punto nascita, id utente centro II livello  | ID esame, ID tipo esame                    |
| Tipo esame                | Tipo di esame che viene effettuato sul neonato  | ID tipo esame, descrizione, data inizio validità, data fine validità   | ID tipo esame, data inizio validità        |
| Metaboliti                | Metaboliti che vengono analizzati sia per il test di primo livello sia per il test di secondo livello | ID metabolita, sigla metabolita, descrizione metabolita, data inizio validità, data fine validità  | ID metabolita                              |
| Patologie                 | Patologie che vengono sottoposte a screening  | ID patologia, sigla patologia, descrizione patologia, codice ICD9-CM della patologia, data inizio validità, data fine validità   | ID patologia                               |

## LA PROGETTAZIONE DEL SISTEMA DI RACCOLTA DATI

**Tabella 5.3:** Sintesi delle relazioni che popolano il modello entità-relazione.

| <b>Relazione</b>            | <b>Descrizione</b>   | <b>Entità coinvolte</b>  | <b>Attributi</b>  |
|-----------------------------|--|--|---|
| Nascita                     | Associa un neonato al suo punto nascita  | Neonato (1, 1)<br>Punto Nascita (1, N)   |   |
| Affiliazione                | Associa un neonato ai genitori   | Neonato (1, 1)<br>Genitori (1, N)  |   |
| Parentela                   | Associa il neonato ai familiari  | Neonato (1, 1)<br>Familiari (1, N)   |   |
| Afferenza test I livello    | Associa un punto nascita al centro screening di riferimento per il test di primo livello                   | Punto nascita (1, 1)<br>Centro Screening (1, N)  | Data inizio validità,<br>data fine validità                 |
| Afferenza test II livello   | Associa un punto nascita al centro di riferimento per la conferma diagnostica (centro di II livello)       | Punto nascita (1, 1)<br>Centro II livello (1, N)   | Data inizio validità,<br>data fine validità                 |
| Test di I livello           | Associa un neonato ai prelievi per il test di primo livello  | Neonato (0, N)<br>Prelievo I livello (1, 1)<br>Centro I livello (1,N)                        |   |
| Visita di II livello        | Associa un neonato alla visita con il medico del centro di secondo livello                                 | Neonato (0, N)<br>Visita II livello (1, 1)<br>Centro I livello (1,N)                         |   |
| Test di II livello          | Associa un neonato ai prelievi per il test di secondo livello e al tipo di esame cui viene sottoposto      | Neonato (0, N)<br>Prelievo II livello (1, 1)<br>Tipo esame (1, N)<br>Centro II livello (1,N) |   |
| Esito metabolita I livello  | Associa a ogni prelievo di I livello i risultati di ogni metabolita  | Prelievo I livello (1, N)<br>Metaboliti (1, N)   | Dosaggio, Risultato   |
| Esito patologia I livello   | Associa a ogni prelievo di I livello i risultati di ogni patologia   | Prelievo I livello (1, N)<br>Patologia (1, N)  | Dosaggio,<br>Positivo/negativo                              |
| Esito metabolita II livello | Associa a ogni test di II livello i risultati di ogni metabolita   | Prelievo II livello (1, N)<br>Metaboliti (1, N)  | Dosaggio, Valore  |
| Esito patologia II livello  | Associa a ogni test di II livello i risultati di ogni patologia  | Prelievo II livello (1, N)<br>Patologia (1, N)   | Dosaggio,<br>Positivo/negativo                              |
| Regole                      | Stabilisce per ogni patologia, per ogni centro, per ogni tipo di esame i metaboliti utilizzati e i cut-off | Patologia (1, N)<br>Metabolita (1, N)<br>Centro (1, N)<br>Esame (1, N)                       | Dosaggio, Cut-off, data inizio validità, data fine validità |

### 5.2.2 La progettazione logica

In questa fase sarà tradotto il modello entità relazione in uno schema logico che descriverà tutte le tabelle che andranno create e popolate con le relazioni e i vincoli cui saranno sottoposti.

Lo schema logico è riportato nella Figura 5.5. Graficamente sono presenti i principali collegamenti tra tabelle, per gli altri si rimanda alla descrizione.

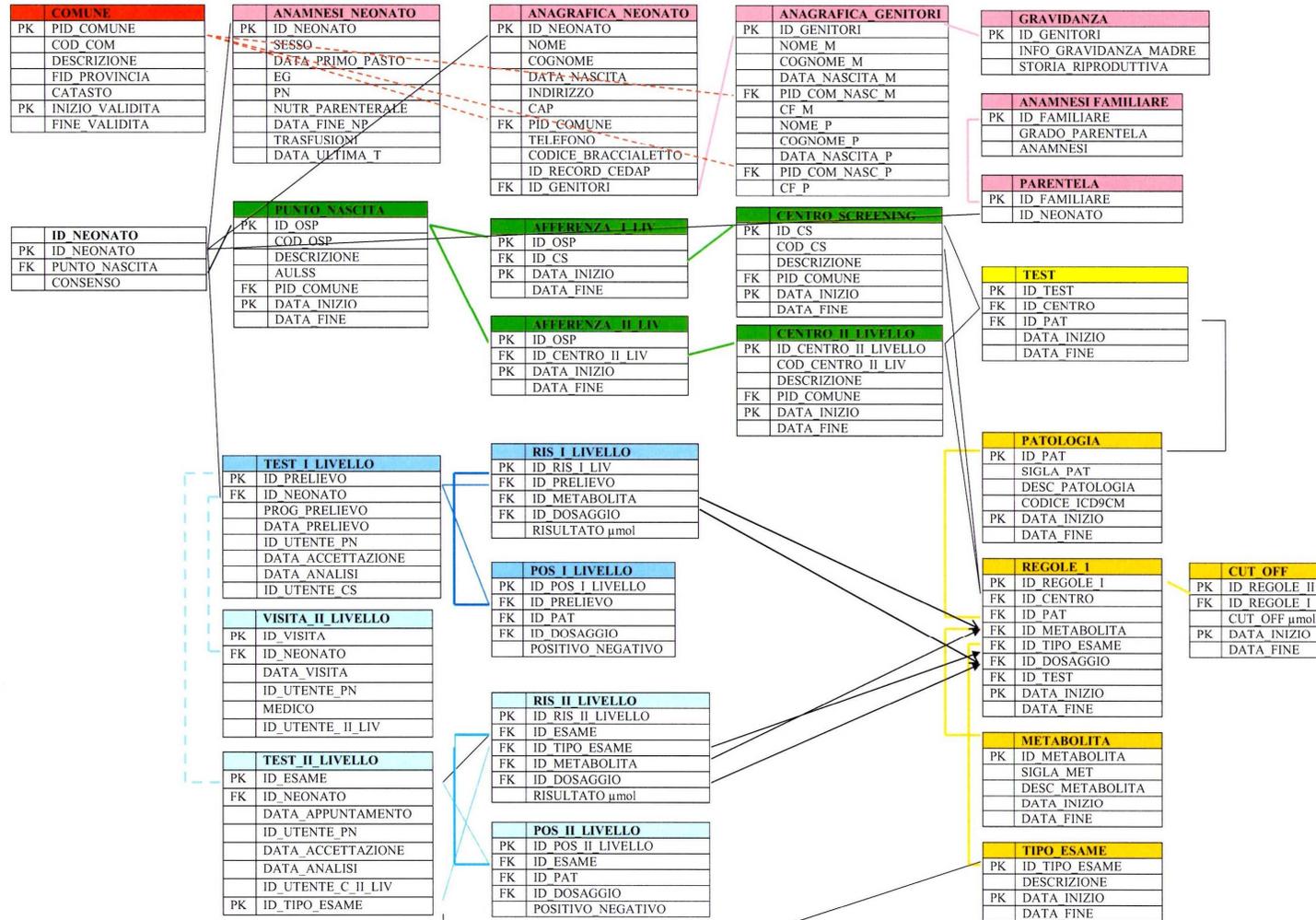
Le tabelle dello schema logico hanno colori diversi che servono a dividere le informazioni per blocchi: le tabelle rosa sono le tabelle provenienti dal CEDAP, in verde le tabelle sui centri della rete, in blu le tabelle sul test di I livello, in azzurro le tabelle sul test di secondo livello, in arancione le tabelle sulle patologie, i metaboliti e i tipi di esame che rientrano nelle regole per stabilire la positività del neonato a vari livelli dello screening. La tabella ID è quella che permette il collegamento tra i blocchi del CEDAP, dei centri del test di primo e secondo livello. La tabella gialla permette invece il collegamento tra il centro che effettua il test sia di I sia di II livello e la tabella delle regole: in pratica il database prevede che ogni centro possa effettuare screening su patologie diverse, usando metaboliti diversi per la stessa patologia e anche cut-off diversi. I centri di secondo livello possono usare anche esami diversi per una stessa patologia.

Il database è progettato in modo che possano essere cambiate in qualsiasi momento queste regole e che nuovi centri possano essere inseriti. Laddove necessario, infatti, le tabelle sono state storicizzate: cioè sono state inserite la data di inizio e di fine di validità degli elementi che la popolano.

Le chiavi primarie (PK) sono i campi della tabella che permettono di individuare univocamente un elemento all'interno della tabella, mentre le chiavi esterne (FK) sono chiavi primarie di un'altra tabella con la quale permettono il collegamento.

# LA PROGETTAZIONE DEL SISTEMA DI RACCOLTA DATI

Figura 5.5: Schema logico del database.



## LA PROGETTAZIONE DEL SISTEMA DI RACCOLTA DATI

L'entità Neonato è stata suddivisa in tre tabelle riportate di seguito: la tabella ID Neonato che contiene il codice identificativo del neonato, il codice del punto nascita e il consenso al test di screening, la tabella Anagrafica Neonato che contiene i dati anagrafici e la tabella Anamnesi Neonato che contiene le informazioni sull'età gestazionale, il peso alla nascita, la nutrizione parenterale ed eventuali trasfusioni. Le spiegazioni di ciascuna variabile all'interno delle tabelle sono riportate di seguito.

**Tabella: ID\_NEONATO**

| Chiave | NOME CAMPO    | DESCRIZIONE   | TIPO     |
|--------|---------------|---|----------|
| PK     | ID_NEONATO    | Codice identificativo del neonato                             | Stringa  |
| FK     | PUNTO_NASCITA | Codice identificativo del punto nascita                       | Stringa  |
|        | CONSENSO      | Consenso al test di screening<br>Valori possibili: 0=no, 1=sì | Numerica |

**Tabella: ANAGRAFICA\_NEONATO**

| Chiave | NOME CAMPO          | DESCRIZIONE   | TIPO     |
|--------|---------------------|---|----------|
| PK     | ID_NEONATO          | Codice identificativo del neonato   | Stringa  |
|        | NOME                | Nome del neonato  | Stringa  |
|        | COGNOME             | Cognome del neonato   | Stringa  |
|        | DATA_NASCITA        | Data di nascita del neonato   | Data ora |
|        | INDIRIZZO           | Indirizzo del neonato: coincide con l'indirizzo che viene fornito dai familiari del neonato | Stringa  |
|        | CAP                 | Codice Avviamento Postale del neonato<br>(Come il campo indirizzo)                          | Stringa  |
| FK     | PID_COMUNE          | Codice comune del neonato<br>(Come il campo indirizzo)                                      | Stringa  |
|        | TELEFONO            | Recapito telefonico che i genitori forniscono al punto nascita                              | Stringa  |
|        | CODICE_BRACCIALETTO | Codice del braccialetto del neonato   | Stringa  |
|        | ID_RECORD_CEDAP     | Identificativo del flusso Cedap   | Stringa  |
| FK     | ID_GENITORI         | Codice identificativo dei genitori  | stringa  |

**Tabella: ANAMNESI\_NEONATO**

| <b>Chiave</b> | <b>NOME CAMPO</b> | <b>DESCRIZIONE</b>   | <b>TIPO</b> |
|---------------|-------------------|--|-------------|
| PK            | ID_NEONATO        | Codice identificativo del neonato                                      | stringa     |
|               | SESSO             | Sesso del neonato<br>Valori possibili: 1=M, 2=F                        | numerico    |
|               | DATA_PRIMO_PASTO  | Data del primo pasto<br>Valori possibili<br>> DATA_NASCITA             | Data ora    |
|               | EG                | Età gestazionale<br>Valori possibili: 20-42                            | numerico    |
|               | PN                | Peso alla nascita  | numerico    |
|               | NUTR_PARENTERALE  | Nutrizione parenterale<br>Valori possibili: 0=no, 1=sì                 | numerico    |
|               | DATA_FINE_NP      | Data fine nutrizione parenterale<br>Valori possibili<br>> DATA_NASCITA | Data ora    |
|               | TRASFUSIONI       | Trasfusioni nelle prime 72 h<br>Valori possibili: 0=no, 1=sì           | numerico    |
|               | DATA_ULTIMA_T     | Data ultima trasfusione<br>Valori possibili<br>> DATA_NASCITA          | Data ora    |

Anche l'entità Genitori è stata divisa in due tabelle: Anagrafica genitori che contiene i loro dati anagrafici e Gravidanza che contiene le caratteristiche della gravidanza e la storia riproduttiva della madre. Queste due tabelle si collegano a quelle del neonato attraverso il campo ID\_GENITORI che si trova anche nella tabella Anagrafica neonato. Il collegamento è di tipo molti a uno poiché i genitori possono avere dei gemelli.

**Tabella: ANAGRAFICA\_GENITORI**

| <b>Chiave</b> | <b>NOME CAMPO</b> | <b>DESCRIZIONE</b>                 | <b>TIPO</b> |
|---------------|-------------------|------------------------------------|-------------|
| PK            | ID_GENITORI       | Codice identificativo dei genitori | Stringa     |
|               | NOME_M            | Nome della madre                   | Stringa     |
|               | COGNOME_M         | Cognome della madre                | Stringa     |
|               | DATA_NASCITA_M    | Data di nascita della madre        | data        |
| FK            | PID_COM_NASC_M    | PID comune di nascita della madre  | Stringa     |
|               | CF_M              | Codice fiscale della madre         | Stringa     |
|               | NOME_P            | Nome del padre                     | Stringa     |
|               | COGNOME_P         | Cognome del padre                  | Stringa     |
|               | DATA_NASCITA_P    | Data di nascita del padre          | data        |
| FK            | PID_COM_NASC_M    | PID comune di nascita del padre    | Stringa     |
|               | CF_M              | Codice fiscale del padre           | Stringa     |

**Tabella: GRAVIDANZA**

| Chiave | NOME CAMPO          | DESCRIZIONE                        | TIPO    |
|--------|---------------------|------------------------------------|---------|
| PK     | ID_GENITORI         | Codice identificativo dei genitori | Stringa |
|        | INFO_GRAV_MADRE     | Informazioni sulla gravidanza      | Stringa |
|        | STORIA_RIPRODUTTIVA | Storia riproduttiva della madre    | Stringa |

La tabella Anamnesi Familiare contiene le informazioni sull'anamnesi dei familiari del neonato e la tabella Parentela permette il collegamento tra il neonato e il familiare.

**Tabella: PARENTELA**

| Chiave | NOME CAMPO   | DESCRIZIONE                         | TIPO    |
|--------|--------------|-------------------------------------|---------|
| PK     | ID_FAMILIARE | Codice identificativo del familiare | Stringa |
| PK     | ID_NEONATO   | Codice identificativo del neonato   | Stringa |

**Tabella: ANAMNESI FAMILIARE**

| Chiave | NOME CAMPO      | DESCRIZIONE  | TIPO     |
|--------|-----------------|--|----------|
| PF     | ID_FAMILIARE    | Codice identificativo del parente  | Stringa  |
|        | GRADO PARENTELA | Grado di parentela con il neonato<br>Es. 1=madre 2=padre 3= fratello etc | Numerica |
|        | ANAMNESI        | Anamnesi del parente   | Stringa  |

La tabella Comune riporta i comuni italiani e si collega alle tabelle Anagrafica neonato, Anagrafica genitori, Punto nascita, Centro screening e Centro di secondo livello attraverso il suo identificativo.

**Tabella: COMUNE**

| Chiave | NOME CAMPO      | DESCRIZIONE                      | TIPO    |
|--------|-----------------|----------------------------------|---------|
| PK     | PID_COMUNE      | Codice identificativo del comune | Stringa |
|        | COD_COM         | Codice Istat comune              | Stringa |
|        | DESCRIZIONE     | Denominazione del comune         | Stringa |
|        | CATASTO         | Codice catastale                 | Stringa |
| PK     | INIZIO_VALIDITA | Data inizio validità del record  | data    |
|        | FINE_VALIDITA   | Data fine validità del record    | data    |

La tabella Punto nascita contiene le informazioni che descrivono il punto nascita. È collegata alle tabelle Centro screening e Centro di II livello attraverso le tabelle di

## LA PROGETTAZIONE DEL SISTEMA DI RACCOLTA DATI

relazione Afferenza I livello che contiene la chiave del punto nascita e la chiave del centro screening e Afferenza al centro di II livello che contiene la chiave del punto nascita e la chiave del centro di secondo livello.

**Tabella: PUNTO\_NASCITA**

| Chiave | NOME CAMPO  | DESCRIZIONE   | TIPO    |
|--------|-------------|---|---------|
| PK     | ID_OSP      | Codice identificativo del punto nascita   | Stringa |
|        | COD_OSP     | Codice dei presidi ospedalieri  | Stringa |
|        | DESCRIZIONE | Denominazione del punto nascita   | Stringa |
| FK     | PID_COMUNE  | Codice identificativo della tabella comuni, indica il comune dove è sito il punto nascita | Stringa |
|        | AULSS       | Azienda unità locale socio sanitaria dove è sito il comune                                | Stringa |
| PK     | DATA_INIZIO | Data inizio validità del codice identificativo  | data    |
|        | DATA_FINE   | Data fine validità del codice identificativo  | data    |

**Tabella: CENTRO\_SCREENING**

| Chiave | NOME CAMPO  | DESCRIZIONE   | TIPO    |
|--------|-------------|---|---------|
| PK     | ID_CS       | Codice identificativo del centro screening che effettua il test di I livello              | Stringa |
|        | COD_CS      | Codice dei presidi ospedalieri  | Stringa |
|        | DESCRIZIONE | Denominazione del centro screening  | Stringa |
| FK     | PID_COMUNE  | Codice identificativo della tabella comuni, indica il comune dove è sito il punto nascita | Stringa |
| PK     | DATA_INIZIO | Data inizio validità del codice identificativo  | data    |
|        | DATA_FINE   | Data fine validità del codice identificativo  | data    |

**Tabella: AFFERENZA\_I LIVELLO**

| Chiave | NOME CAMPO  | DESCRIZIONE  | TIPO    |
|--------|-------------|--|---------|
| PK     | ID_OSP      | Codice identificativo del punto nascita                          | Stringa |
| FK     | ID_CS       | Codice identificativo del centro screening                       | Stringa |
| PK     | DATA_INIZIO | Data inizio dell'afferenza del centro screening al punto nascita | data    |
|        | DATA_FINE   | Data fine dell'afferenza del centro screening al punto nascita   | data    |

**Tabella: CENTRO\_II\_LIVELLO**

| <b>Chiave</b> | <b>NOME CAMPO</b>     | <b>DESCRIZIONE</b>  | <b>TIPO</b> |
|---------------|-----------------------|---|-------------|
| PK            | ID_CENTRO_II_LIVELLO  | Codice identificativo del centro di II livello  | Stringa     |
|               | COD_CENTRO_II_LIVELLO | Codice dei presidi ospedalieri  | Stringa     |
|               | DESCRIZIONE           | Denominazione del centro di secondo livello   | Stringa     |
| FK            | PID_COMUNE            | Codice identificativo della tabella comuni, indica il comune dove è sito il punto nascita | Stringa     |
| PK            | DATA_INIZIO           | Data inizio validità del codice identificativo  | data        |
|               | DATA_FINE             | Data fine validità del codice identificativo  | data        |

**Tabella: AFFERENZA\_II\_LIVELLO**

| <b>Chiave</b> | <b>NOME CAMPO</b>    | <b>DESCRIZIONE</b>                                  | <b>TIPO</b> |
|---------------|----------------------|---|-------------|
| PK            | ID_OSP               | Codice identificativo del punto nascita             | Stringa     |
| FK            | ID_CENTRO_II_LIVELLO | Codice identificativo del centro di II livello      | Stringa     |
| PK            | DATA_INIZIO          | Data inizio dell'afferenza del centro di II livello | data        |
|               | DATA_FINE            | Data fine dell'afferenza del centro di II livello   | data        |

La tabella Test è la tabella che collega il centro alle Patologie: essa definisce per ogni centro quali patologie vengono testate.

**Tabella: TEST**

| <b>Chiave</b> | <b>NOME CAMPO</b> | <b>DESCRIZIONE</b>   | <b>TIPO</b> |
|---------------|-------------------|--|-------------|
| PK            | ID_TEST           | Codice identificativo delle patologie testate nei centri                 | Stringa     |
| FK            | ID_CENTRO         | Codice identificativo del centro di I o II livello                       | Stringa     |
| FK            | ID_PAT            | Codice identificativo della patologia                                    | Stringa     |
|               | DATA_INIZIO       | Data inizio validità del test sulla patologia presso il centro screening | data        |
|               | DATA_FINE         | Data fine validità del test sulla patologia presso il centro screening   | data        |

## LA PROGETTAZIONE DEL SISTEMA DI RACCOLTA DATI

Le entità Patologia, Metabolita e Tipo esame servono a censire e descriverli rispettivamente.

**Tabella: TIPO ESAME**

| Chiave | NOME CAMPO    | DESCRIZIONE                             | TIPO    |
|--------|---------------|---|---------|
| PK     | ID_TIPO_ESAME | Codice identificativo del tipo di esame | Stringa |
|        | DESCRIZIONE   | Denominazione del tipo di esame         | Stringa |
| PK     | DATA_INIZIO   | Data inizio validità tipo di esame      | data    |
|        | DATA_FINE     | Data fine validità tipo di esame        | data    |

**Tabella: PATOLOGIA**

| Chiave | NOME CAMPO     | DESCRIZIONE                                   | TIPO    |
|--------|----------------|---|---------|
| PK     | ID_PAT         | Codice identificativo della patologia         | Stringa |
|        | SIGLA_PAT      | Sigla della patologia (Es. MMA, PA, IVA, ...) | Stringa |
|        | DESC_PATOLOGIA | Denominazione della patologia                 | Stringa |
|        | CODICE_ICD9_CM | Codice ICD9-CM della patologia                | Stringa |
| PK     | DATA_INIZIO    | Data inizio validità della patologia          | data    |
|        | DATA_FINE      | Data fine validità della patologia            | data    |

**Tabella: METABOLITA**

| Chiave | NOME CAMPO      | DESCRIZIONE  | TIPO    |
|--------|-----------------|--|---------|
| PK     | ID_METABOLITA   | Codice identificativo del metabolita   | Stringa |
|        | SIGLA_MET       | Sigla del metabolita: es. C5 C6, per i rapporti es C5/C6 avrà come sigla C5_C6 | Stringa |
|        | DESC_METABOLITA | Denominazione del metabolita   | Stringa |
| PK     | DATA_INIZIO     | Data inizio validità del metabolita  | data    |
|        | DATA_FINE       | Data fine validità del metabolita  | data    |

La relazione Regole è stata divisa nella progettazione logica in due tabelle: Regole I e Cut-off. La prima definisce per ogni centro, patologia, esame e dosaggio quali metaboliti vengono usati, mentre la seconda definisce per ciascun *record* della precedente tabella quali sono i valori di riferimento che costituiscono i cut-off.

LA PROGETTAZIONE DEL SISTEMA DI RACCOLTA DATI

Tabella: **REGOLE\_I**

| Chiave | NOME CAMPO    | DESCRIZIONE  | TIPO     |
|--------|---------------|--|----------|
| PK     | ID_REGOLE_I   | Codice identificativo delle regole sui metaboliti  | Stringa  |
| FK     | ID_CENTRO     | Codice identificativo del centro di I o II livello   | Stringa  |
| FK     | ID_TEST       | Codice identificativo delle patologie testate nei centri   | Stringa  |
| FK     | ID_PAT        | Codice identificativo patologia  | Stringa  |
| FK     | ID_METABOLITA | Codice identificativo metabolita   | Stringa  |
| FK     | ID_TIPO_ESAME | Codice identificativo tipo di esame  | Stringa  |
| FK     | ID_DOSAGGIO   | Ordine progressivo del dosaggio su uno stesso campione<br>1= 1° dosaggio<br>2= 2° dosaggio<br>3= 3° dosaggio | Numerica |
| PK     | DATA_INIZIO   | Data inizio validità della regola  | data     |
|        | DATA_FINE     | Data fine validità della regola  | data     |

Tabella: **CUT\_OFF**

| Chiave | NOME CAMPO   | DESCRIZIONE   | TIPO     |
|--------|--------------|---|----------|
| PK     | ID_REGOLE_II | Codice identificativo dei cut-off utilizzati sui metaboliti per patologia e per centro                                    | Stringa  |
| FK     | ID_REGOLE_I  | Codice identificativo delle regole sui metaboliti   | Stringa  |
|        | CUT_OFF      | Valore soglia che viene usato come cut-off per distinguere i positivi dai negativi<br>Viene espresso in $\mu\text{mol/L}$ | Numerico |
| PK     | DATA_INIZIO  | Data inizio validità dell'uso dei cut-off   | data     |
|        | DATA_FINE    | Data fine validità dell'uso dei cut-off   | data     |

Le tabelle in blu definiscono il test di primo livello. Ogni neonato può effettuare più di un prelievo e la tabella Test I livello ne raccoglie le informazioni. Trattandosi di una relazione zero a molti non è necessario costruire una tabella di relazione tra la tabella Id\_neonato e Test\_primo\_livello: è sufficiente ripetere l'identificativo del neonato in quest'ultima tabella che funzionerà come chiave esterna.

## LA PROGETTAZIONE DEL SISTEMA DI RACCOLTA DATI

**Tabella: TEST\_I LIVELLO**

| <b>Chiave</b> | <b>NOME CAMPO</b> | <b>DESCRIZIONE</b>  | <b>TIPO</b> |
|---------------|-------------------|---|-------------|
| PK            | ID_PRELIEVO       | Codice identificativo del prelievo  | Stringa     |
| FK            | ID_NEONATO        | Codice identificativo del neonato   | Stringa     |
|               | PROG_PRELIEVO     | Ordine progressivo del prelievo (1, 2, ... n)   | Numerica    |
|               | DATA_PRELIEVO     | Data e ora del prelievo<br>Valori possibili:>DATA_NASCITA   | Data ora    |
|               | ID_UTENTE_PN      | Codice utente del punto nascita che ha inserito i dati del prelievo   | Stringa     |
|               | DATA_ACCETTAZIONE | Data e ora di accettazione del campione presso il centro screening  | Data ora    |
|               | DATA_ANALISI      | Data e ora di analisi del campione presso il centro screening   | Data ora    |
|               | ID_UTENTE_CS      | Codice utente del centro screening che ha inserito i dati del dell'accettazione e dell'analisi del campione | Stringa     |

Per ogni prelievo vengono analizzati molti metaboliti e ne viene riportato il valore nella tabella Ris\_I livello. Per ogni prelievo si possono fare più test cioè un campione può essere testato più di una volta. La ripetizione del test sullo stesso campione è registrata dalla variabile dosaggio che indica a quale test si riferisce il risultato.

**Tabella: RIS\_I LIVELLO**

| <b>Chiave</b> | <b>NOME CAMPO</b> | <b>DESCRIZIONE</b>   | <b>TIPO</b> |
|---------------|-------------------|--|-------------|
| PK            | ID_RIS_I_LIV      | Codice identificativo del risultato sio metaboliti   | Stringa     |
| FK            | ID_PRELIEVO       | Codice identificativo del prelievo   | Stringa     |
| FK            | ID_METABOLITA     | Codice identificativo del metabolita   | Stringa     |
| FK            | ID_DOSAGGIO       | Ordine progressivo del dosaggio su uno stesso campione<br>1= 1° dosaggio<br>2= 2° dosaggio<br>3= 3° dosaggio | Numerica    |
|               | RISULTATO         | Valori dei metaboliti risultato del test<br>Viene espresso in $\mu\text{mol/L}$                              | Numerica    |

La tabella pos\_I livello riporta per ogni patologia e per ogni dosaggio se il risultato è positivo o negativo o se è necessario un ulteriore dosaggio in base alle regole che vengono applicate sui metaboliti.

## LA PROGETTAZIONE DEL SISTEMA DI RACCOLTA DATI

**Tabella: POS\_I\_LIVELLO**

| <b>Chiave</b> | <b>NOME CAMPO</b> | <b>DESCRIZIONE</b>  | <b>TIPO</b> |
|---------------|-------------------|---|-------------|
| PK            | ID_POS_I_LIVELLO  | Codice identificativo del risultato   | Stringa     |
| FK            | ID_PRELIEVO       | Codice identificativo del prelievo  | Stringa     |
| FK            | ID_PATOLOGIA      | Codice identificativo della patologia   | Stringa     |
| FK            | ID_DOSAGGIO       | Ordine progressivo del dosaggio su uno stesso campione<br>1= 1° dosaggio<br>2= 2° dosaggio<br>3= 3° dosaggio      | Numerica    |
|               | POSITIVO_NEGATIVO | Risultato del test sulle patologie applicando le regole.<br>Valori possibili 1=positivo, 0=negativo, 2=borderline | Numerica    |

La stessa procedura riguarda il test di secondo livello che è accompagnato anche da una visita che viene registrata in una tabella a parte. In questo caso le regole che stabiliscono la positività per una patologia dipendono anche dal tipo di esame.

**Tabella: VISITA\_II\_LIVELLO**

| <b>Chiave</b> | <b>NOME CAMPO</b>      | <b>DESCRIZIONE</b>   | <b>TIPO</b> |
|---------------|------------------------|--|-------------|
| PK            | ID_VISITA              | Codice identificativo della visita presso il centro di secondo livello   | Stringa     |
| FK            | ID_NEONATO             | Codice identificativo del neonato  | Stringa     |
|               | DATA_VISITA            | Data e ora della visita  | Data ora    |
|               | ID_UTENTE_PN           | Codice utente del punto nascita che ha inserito i dati dell'appuntamento per la visita di secondo livello  | Stringa     |
|               | MEDICO                 | Nome del medico che effettua la visita   | Stringa     |
|               | ID_UTENTE_C_II_LIVELLO | Codice utente del centro di secondo livello che ha inserito i dati dell'appuntamento per la visita di secondo livello o di un eventuale nuovo appuntamento |             |

LA PROGETTAZIONE DEL SISTEMA DI RACCOLTA DATI

**Tabella: TEST\_II\_LIVELLO**

| <b>Chiave</b> | <b>NOME CAMPO</b>      | <b>DESCRIZIONE</b>   | <b>TIPO</b> |
|---------------|------------------------|--|-------------|
| PK            | ID_ESAME               | Codice identificativo dell'esame di secondo livello  | Stringa     |
| FK            | ID_NEONATO             | Codice identificativo del neonato  | Stringa     |
|               | DATA_APPUNTAMENTO      | Data e ora del dell'appuntamento   | Data ora    |
|               | ID_UTENTE_PN           | Codice utente del punto nascita che ha inserito i dati dell'appuntamento per la visita di secondo livello            | Stringa     |
|               | DATA_ACCETTAZIONE      | Data e ora di accettazione del campione presso il centro di secondo livello  | Data ora    |
|               | DATA_ANALISI           | Data e ora di analisi del campione presso il centro do secondo livello   | Data ora    |
|               | ID_UTENTE_C_II_LIVELLO | Codice utente del centro di secondo livello che ha inserito i dati del dell'accettazione e dell'analisi del campione | Stringa     |
| PK            | ID_TIPO_ESAME          | Codice identificativo del tipo di esame effettuato   | Stringa     |

**Tabella: RIS\_II\_LIVELLO**

| <b>Chiave</b> | <b>NOME CAMPO</b> | <b>DESCRIZIONE</b>  | <b>TIPO</b> |
|---------------|-------------------|---|-------------|
| PK            | ID_RIS_II_LIVELLO | Codice identificativo del risultato sui metaboliti  | Stringa     |
| FK            | ID_ESAME          | Codice identificativo del prelievo per il test di secondo livello   | Stringa     |
| FK            | ID_TIPO_ESAME     | Codice identificativo del tipo di esame effettuato  | Stringa     |
| FK            | ID_METABOLITA     | Codice identificativo del metabolita  | Stringa     |
| FK            | ID_DOSAGGIO       | Ordine progressivo del test su uno stesso campione<br>1= test sul campione<br>2= primo re-test sullo stesso campione<br>3=secondo re-test sullo stesso campione | Numerica    |
|               | RISULTATO         | Valori dei metaboliti risultato del test<br>Viene espresso in $\mu\text{mol/L}$   | Numerica    |

LA PROGETTAZIONE DEL SISTEMA DI RACCOLTA DATI

Tabella: **POS\_II\_LIVELLO**

| <b>Chiave</b> | <b>NOME CAMPO</b> | <b>DESCRIZIONE</b>   | <b>TIPO</b> |
|---------------|-------------------|--|-------------|
| PK            | ID_POS_II_LIVELLO | Codice identificativo del risultato  | Stringa     |
| PK            | ID_ESAME          | Codice identificativo del test di secondo livello  | Stringa     |
| FK            | ID_PATOLOGIA      | Codice identificativo della patologia  | Stringa     |
| FK            | ID_DOSAGGIO       | Ordine progressivo del dosaggio su uno stesso campione<br>1= 1° dosaggio<br>2= 2° dosaggio<br>3= 3° dosaggio       | Numerica    |
|               | POSITIVO_NEGATIVO | Risultato del test sulle patologie applicando le regole.<br>Valori possibili 1=positivo, 0=negativo, 2=border-line | Numerica    |

### 5.3 Le viste

In questo paragrafo saranno riportate a titolo di esempio alcune viste che compariranno agli operatori che si interfacceranno con questo database.

Il punto nascita inserisce il CEDAP del neonato attraverso l'applicativo già in uso.

**Modifica Cedap**  
(i campi contrassegnati con l'asterisco \* sono **OBBLIGATORI**) Tipologia utenza: OSSERVATORIO

**PUNTO NASCITA**

| REGIONE | AZIENDA USL        | ISTITUTO/AZIENDA OSPEDALIERA | COMUNE DI EVENTO   |
|---------|--------------------|------------------------------|--------------------|
| VENETO  | ULSS 15 CITTADELLA | O.C. CAMPOSAMPIERO           | CAMPOSAMPIERO (PD) |

**INFORMAZIONI SUL PARTO**

Luogo del parto: 1: Istituto di cura pubblico o privato

Modalit  del travaglio: Se indotto tipo di induzione:

\* Genere del parto:  Semplice  Plurimo

Se parto plurimo numero dei nati: Numero ordine del gemello nel presente parto:

di cui non riconosciuti:

Vitalit :  Nato vivo  Nato morto

Punteggio Apgar dopo cinque minuti dalla nascita: Genitali Esterni(compilazione ostetrica):

Presentazione del neonato: Modalit  del parto:

Data e ora del parto (gg/mm/aaaa hh:mm):

Tecniche controllo dolore: Se cesareo: tipo di anestesia:

**COMPLICANZE MATERNE**

Proflassi Rh:  SI  NO

Complicanze materne:  SI  NO

**PERSONALE PRESENTE AL PARTO**

Personale sanitario presente al parto:

Ostetrica/:  SI  NO Ostetrico-ginecologo:  SI  NO

Pediatra-neonatalogo:  SI  NO Anestesista:  SI  NO Altro personale sanitario o tecnico:  SI  NO

Familiari o persone di fiducia presenti al parto:

**INFORMAZIONI SUL NEONATO**

Il padre riconosce il bambino:  SI  No  Meno di 16 anni

Cognome: Nome:

Detto:

Numero di braccialetto: Cartella clinica:

Sesso: Tipo di genitali esterni:

Peso (g): Lunghezza (cm):

Circonferenza cranica (cm): Necessita di rianimazione:  SI  NO

Tipo di rianimazione:

Necessit  di ricovero del nato in reparto di cure intensive neonatali:  SI  NO

Decesso immediatamente dopo il parto (entro un'ora):  SI  NO

Presenza di malformazioni:  SI  NO

**SPOSTARSI ALL'INTERNO DELLE SEZIONI DEL CEDAP**

In questa schermata nella sezione "Informazioni sul neonato" sar  predisposta una modifica che riguarda l'inserimento delle informazioni sullo screening neonatale. Il

## LA PROGETTAZIONE DEL SISTEMA DI RACCOLTA DATI

punto nascita inserisce quindi la data e l'ora del prelievo e la data e l'ora del primo pasto.

|  |  |  |   |   |
|--|--|--|---|---|
| Pediatra-neonatalogo: <input type="radio"/> SI <input type="radio"/> NO  | Anestesista: <input type="radio"/> SI <input type="radio"/> NO               | Altro personale sanitario o tecnico: <input type="radio"/> SI <input type="radio"/> NO |   |   |
| Familiari o persone di fiducia presenti al parto: <input type="text"/>   |  |  |   |   |
| <b>INFORMAZIONI SUL NEONATO</b>  |  |  |   |   |
| Il padre riconosce il bambino: <input type="radio"/> Si <input type="radio"/> No <input type="radio"/> Meno di 16 anni   |  |  |   |   |
| Cognome: <input type="text"/>  | Nome: <input type="text"/>   |  |   |   |
| Detto: <input type="text"/>  |  |  |   |   |
| Numero di braccialetto: <input type="text"/>   | Cartella clinica: <input type="text"/>                                       |  |   |   |
| Sesso: <input type="text"/>  | Tipo di genitali esterni: <input type="text"/>                               |  |   |   |
| Peso (gr): <input type="text"/>  | Lunghezza (cm): <input type="text"/>   |  |   |   |
| Circonferenza cranica (cm): <input type="text"/>   | Necessita di rianimazione: <input type="radio"/> SI <input type="radio"/> NO |  |   |   |
| Tipo di rianimazione: <input type="text"/>   |  |  |   |   |
| Necessità di ricovero del nato in reparto di cure intensive neonatali: <input type="radio"/> SI <input type="radio"/> NO |  |  |   |   |
| Decesso immediatamente dopo il parto (entro un'ora): <input type="radio"/> SI <input type="radio"/> NO                   |  |  |   |   |
| Presenza di malformazione/i: <input type="radio"/> SI <input type="radio"/> NO   |  |  |   |   |
| Screening metabolici <input checked="" type="checkbox"/>   | Data prelievo (gg/mm/aaaa hh:mm): <input type="text"/>                       | Ore trascorse dalla nascita <input type="text"/>                                       |   |   |
|  | Data ora primo pasto (gg/mm/aaaa hh:mm): <input type="text"/>                | Ore trascorse dal pasto <input type="text"/>   |   |   |
| <b>SPOSTARSI ALL'INTERNO DELLE SEZIONI DEL CEDAP</b>   |  |  |   |   |
| <input type="button" value="INDIETRO"/>  | <input type="button" value="STATO DELLO SCREENING"/>                         | <input type="button" value="GEMELLO SUCCESSIVO"/>                                      | <input type="button" value="MALFORMATO"/> | <input type="button" value="NATO MORTO"/> |

Cliccando sul tasto “Stato della screening” si apre la seguente schermata che permette di visualizzare per ogni neonato lo stato dello screening. Le informazioni che potrà visualizzare, oltre a data e ora del prelievo da lui stesso inserite, riguardano sia i prelievi e i risultati del test di primo livello (data e ora di accettazione del campione da parte del centro screening, data e ora di analisi, risultato del test di primo livello) sia il test di secondo livello (data appuntamento e risultati).

I risultati dello screening saranno non disponibili (n.d.) fino a quando il centro screening non li avrà inseriti.

# LA PROGETTAZIONE DEL SISTEMA DI RACCOLTA DATI

| PUNTO NASCITA  |                              |                               |                                |                 |        |
|--|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-----------------|--------|
| REGIONE  | AZIENDA USL                  | ISTITUTO/AZIENDA OSPEDALIERA  | COMUNE DI EVENTO               |                 |        |
| VENETO   | ULSS 15 CITTADELLA           | O.C. CAMPOSAMPIERO            | CAMPOSAMPIERO (PD)             |                 |        |
| CRUSCOTTO NATO – STATO DELLO SCREENING                     |                              |                               |                                | STAMPA          | CHIUDI |
|  | TEST I LIVELLO<br>I PRELIEVO | TEST I LIVELLO<br>II PRELIEVO | TEST I LIVELLO<br>III PRELIEVO | TEST II LIVELLO |        |
| Data appuntamento  |                              |                               |                                |                 |        |
| Data prelievo  | 31/05/2010 10:20             |                               |                                |                 |        |
| Data accettazione  | 01/06/2010 08:20             |                               |                                |                 |        |
| Data analisi   | 01/06/2010 08:20             |                               |                                |                 |        |
|  | RISULTATI                    | RISULTATI                     | RISULTATI                      | RISULTATI       |        |
| Fenilchetonuria  | n.d.                         |                               |                                |                 |        |
| Tirosinemia tipo I   | n.d.                         |                               |                                |                 |        |
| Citrullinemia  | n.d.                         |                               |                                |                 |        |
| Argininemia  | n.d.                         |                               |                                |                 |        |
| Aciduria argininosuccinica                                 | n.d.                         |                               |                                |                 |        |
| M. urine allo sciroppo d'acero                             | n.d.                         |                               |                                |                 |        |
| Acidemia Propionica  | n.d.                         |                               |                                |                 |        |
| Acidemia Metilmalonica                                     | n.d.                         |                               |                                |                 |        |
| Deficit cobalamina C/D                                     | n.d.                         |                               |                                |                 |        |
| Isovalerico acidemia                                       | n.d.                         |                               |                                |                 |        |
| Glutarico aciduria tipo I                                  | n.d.                         |                               |                                |                 |        |
| Deficit acil CoA deidrogenasi a catena media (MCAD)        | n.d.                         |                               |                                |                 |        |
| Deficit acil CoA deidrogenasi a catena molto lunga         | n.d.                         |                               |                                |                 |        |
| Deficit acil CoA deidrogenasi a catena lunga               | n.d.                         |                               |                                |                 |        |
| Deficit acil CoA deidrogenasi a catena corta               | n.d.                         |                               |                                |                 |        |
| Deficit acil CoA deidrogenasi (aciduria glutarica tipo II) | n.d.                         |                               |                                |                 |        |
| Deficit carnitina palmitoiltrasferasi tipo I               | n.d.                         |                               |                                |                 |        |
| Deficit carnitina palmitoiltrasferasi tipo II              | n.d.                         |                               |                                |                 |        |
| Deficit Carnitina acilcarnitina traslocasi                 | n.d.                         |                               |                                |                 |        |
| Deficit trasportatore (OCTN2) della Carnitine              | n.d.                         |                               |                                |                 |        |
| Malattie di Pompe  | n.d.                         |                               |                                |                 |        |
| Malattia di Fabry  | n.d.                         |                               |                                |                 |        |
| Mucopolisaccaridosi tipo I, II e VI                        | n.d.                         |                               |                                |                 |        |

I centri screening di primo livello possono visualizzare le informazioni sullo screening che sono state precedentemente inserite dai punti nascita. Possono effettuare inoltre una ricerca sia per stato dello screening sia per patologia. La maschera della ricerca è la seguente:

**CENTRO SCREENING 1° LIVELLO**

REGIONE: **VENETO**      AZIENDA USL: **A.O. PADOVA**

**RICERCA**

Imposta i criteri di selezione
 

Punto Nascita

Cognome       Id nato

Nome

Data inizio (gg/mm/aaaa)       **Fatologia con positività al**

Data fine (gg/mm/aaaa)       **test I livello**

Stato

Prelievo  
 Prelievo  
 Accettazione  
 Analisi

FENILCHETONURIA  
 M. URINE ALLO SCIROPP  
 TIROSINEMIA TIPO I  
 CITRULLINEMIA  
 ISOVALERICO ACIDEMIA  
 GLUTARICO ACIDURIA TIPO I  
 DEFICIT COBALAMINA CD  
 DEFICIT ACIL COA DEIDROGENAS  
 CITRULLINEMIA  
 ACIDURIA ARGININOSUCCINICA

## LA PROGETTAZIONE DEL SISTEMA DI RACCOLTA DATI

La ricerca fornisce come risultato una lista di neonati:

| CENTRO SCREENING 1° LIVELLO |      |                            |            |                   |               |         |  |
|-----------------------------|------|----------------------------|------------|-------------------|---------------|---------|--|
| REGIONE<br>VENETO           |      | AZIENDA USL<br>A.O. PADOVA |            |                   |               |         |  |
| Elenco pazienti             |      |                            |            |                   |               |         |  |
| Pag. 1                      |      |                            |            |                   |               |         |  |
| Cognome                     | Nome | Comune nasc.               | Data nasc. | Codice fiscale    | Punto nasc.   | id nato |  |
| > BA                        | EN   | CASTELFRANCO VENETO        | 10/10/2001 | BLDNR001R10C111E  | CAMPOSAMPIERO | 10      |  |
| > BA                        | GI   | ODERZO                     | 19/11/2007 | BTTGD107S59F999A  | CAMPOSAMPIERO | 19      |  |
| > BO                        | GI   | CASTELFRANCO VENETO        | 20/04/2003 | BRDGC03D20C111M   | CAMPOSAMPIERO | 20      |  |
| > DR                        | AN   | CODIGORO                   | 14/10/1903 | DRGNLS03R54C014J  | CAMPOSAMPIERO | 14      |  |
| > CA                        | AU   | ADRIA                      | 05/01/2000 | CVLRA00A45A059X   | CAMPOSAMPIERO | 05      |  |
| > GA                        | MA   | MODENA                     | 22/08/2000 | GLLMTT00M22F257D  | CAMPOSAMPIERO | 22      |  |
| > GU                        | RO   | MOTTA DI LIVENZA           | 16/09/1908 | GRRS080P56F770H   | CAMPOSAMPIERO | 16      |  |
| > HU                        | AM   | PIOVE DI SACCO             | 21/03/1998 | HDRMBR98C61G693E  | CAMPOSAMPIERO | 21      |  |
| > OB                        | AL   | PADOVA                     | 27/01/1994 | BJKLC94A27G224H   | CAMPOSAMPIERO | 27      |  |
| > OB                        | EM   | PADOVA                     | 27/01/1994 | BJKMNL94A27G224R  | CAMPOSAMPIERO | 07      |  |
| > PI                        | IL   | MILANO                     | 05/08/1996 | PCCLR196M45F205S  | CAMPOSAMPIERO | 05      |  |
| > PI                        | CA   | ASIAGO                     | 17/05/2001 | PRBCLT01E57A465C  | CAMPOSAMPIERO | 17      |  |
| > QU                        | DA   | VENEZIA                    | 31/10/1986 | QNCDOV086R31L736S | CAMPOSAMPIERO | 31      |  |
| > RO                        | BA   | SOAVE                      | 02/11/1982 | RSSB8R82S42I775N  | CAMPOSAMPIERO | 02      |  |

Per ogni neonato il centro screening di primo livello può visualizzare una schermata relativa lo stato dello screening contenente le informazioni per ogni prelievo su data e ora del prelievo, data di accettazione, data di analisi e i risultati di primo livello compresi eventuali risultati del re-test sullo stesso campione.

| CENTRO SCREENING 1° LIVELLO                                |    |                            |    |                                   |             |              |       |
|--|----|----------------------------|----|-----------------------------------|-------------|--------------|-------|
| REGIONE<br>VENETO  |    | AZIENDA USL<br>A.O. PADOVA |    |                                   |             |              |       |
| Ricerca  |    |                            |    |                                   |             |              |       |
| Cognome  | BA | Nome                       | EN | Punto nascita: O.C. Camposampiero |             |              |       |
|  |    |                            |    | I PRELIEVO                        | II PRELIEVO | III PRELIEVO |       |
| Data prelievo  |    |                            |    | 31/05/2010 10:20                  |             |              |       |
| Data accettazione  |    |                            |    | 01/06/2010 08:20                  |             |              |       |
| Data analisi   |    |                            |    | 01/06/2010 08:20                  |             |              |       |
| ELENCO SCREENING   |    |                            |    | RISULTATI                         |             | RISULTATI    |       |
|  |    |                            |    | DOS 1                             | DOS 2       | DOS 1        | DOS 2 |
| Fenilchetonuria  |    |                            |    | n.d.                              | n.d.        |              |       |
| Tirosinemia tipo I   |    |                            |    | n.d.                              | n.d.        |              |       |
| Citrullinemia  |    |                            |    | n.d.                              | n.d.        |              |       |
| Argininemia  |    |                            |    | n.d.                              | n.d.        |              |       |
| Aciduria argininosuccinica                                 |    |                            |    | n.d.                              | n.d.        |              |       |
| M. urine allo sciroppo d'acero                             |    |                            |    | n.d.                              | n.d.        |              |       |
| Acidemia Propionica  |    |                            |    | n.d.                              | n.d.        |              |       |
| Acidemia Metilmalonica                                     |    |                            |    | n.d.                              | n.d.        |              |       |
| Deficit cobalamina C/D                                     |    |                            |    | n.d.                              | n.d.        |              |       |
| Isovalerico acidemia                                       |    |                            |    | n.d.                              | n.d.        |              |       |
| Glutarico aciduria tipo I                                  |    |                            |    | n.d.                              | n.d.        |              |       |
| Deficit acil CoA deidrogenasi a catena media (MCAD)        |    |                            |    | n.d.                              | n.d.        |              |       |
| Deficit acil CoA deidrogenasi a catena molto lunga         |    |                            |    | n.d.                              | n.d.        |              |       |
| Deficit acil CoA deidrogenasi a catena lunga               |    |                            |    | n.d.                              | n.d.        |              |       |
| Deficit acil CoA deidrogenasi a catena corta               |    |                            |    | n.d.                              | n.d.        |              |       |
| Deficit acil CoA deidrogenasi (aciduria glutarica tipo II) |    |                            |    | n.d.                              | n.d.        |              |       |
| Deficit carnitina palmitoiltrasferasi tipo I               |    |                            |    | n.d.                              | n.d.        |              |       |
| Deficit carnitina palmitoiltrasferasi tipo II              |    |                            |    | n.d.                              | n.d.        |              |       |
| Deficit Carnitina acilcarnitina traslocasi                 |    |                            |    | n.d.                              | n.d.        |              |       |
| Deficit trasportatore (OCTN2) della Carnitine              |    |                            |    | n.d.                              | n.d.        |              |       |
| Malattia di Pompe  |    |                            |    | n.d.                              | n.d.        |              |       |
| Malattia di Fabry  |    |                            |    | n.d.                              | n.d.        |              |       |
| Mucopolisaccaridiosi tipo I, II e VI                       |    |                            |    | n.d.                              | n.d.        |              |       |

## LA PROGETTAZIONE DEL SISTEMA DI RACCOLTA DATI

Una volta conclusa la processazione del campione, se i risultati sono negativi il centro di primo livello visualizzerà la seguente schermata:

| CENTRO SCREENING I° LIVELLO                                |                   |                            |       |           |                                   |             |       |
|--|-------------------|----------------------------|-------|-----------|-----------------------------------|-------------|-------|
| REGIONE<br>VENETO  |                   | AZIENDA USL<br>A.O. PADOVA |       |           |                                   |             |       |
| Ricerca  | Cognome           | BA                         | Nome  | EN        | Punto nascita: O.C. Camposampiero |             |       |
|  |                   |                            |       |           | I PRELIEVO                        | II PRELIEVO |       |
|  | Data prelievo     |                            |       |           | 31/05/2010 10:20                  |             |       |
|  | Data accettazione |                            |       |           | 01/06/2010 08:20                  |             |       |
|  | Data analisi      |                            |       |           | 01/06/2010 08:20                  |             |       |
| ELENCO SCREENING   |                   | RISULTATI                  |       | RISULTATI |                                   | RISULTATI   |       |
|  |                   | DOS 1                      | DOS 2 | DOS 1     | DOS 2                             | DOS 1       | DOS 2 |
| Fenilchetonuria  |                   | Negativo                   |       |           |                                   |             |       |
| Tirosinemia tipo I   |                   | Negativo                   |       |           |                                   |             |       |
| Citullinemia   |                   | Negativo                   |       |           |                                   |             |       |
| Argininemia  |                   | Negativo                   |       |           |                                   |             |       |
| Aciduria argininosuccinica                                 |                   | Negativo                   |       |           |                                   |             |       |
| M. urine allo sciroppo d'acero                             |                   | Negativo                   |       |           |                                   |             |       |
| Acidemia Propionica  |                   | Negativo                   |       |           |                                   |             |       |
| Acidemia Metilmalonica                                     |                   | Negativo                   |       |           |                                   |             |       |
| Deficit cobalamina C/D                                     |                   | Negativo                   |       |           |                                   |             |       |
| Isovalerico acidemia                                       |                   | Negativo                   |       |           |                                   |             |       |
| Glutarico aciduria tipo I                                  |                   | Negativo                   |       |           |                                   |             |       |
| Deficit acil CoA deidrogenasi a catena media (MCAD)        |                   | Negativo                   |       |           |                                   |             |       |
| Deficit acil CoA deidrogenasi a catena molto lunga         |                   | Negativo                   |       |           |                                   |             |       |
| Deficit acil CoA deidrogenasi a catena lunga               |                   | Negativo                   |       |           |                                   |             |       |
| Deficit acil CoA deidrogenasi a catena corta               |                   | Negativo                   |       |           |                                   |             |       |
| Deficit acil CoA deidrogenasi (aciduria glutarica tipo II) |                   | Negativo                   |       |           |                                   |             |       |
| Deficit carnitina palmitoiltrasferasi tipo I               |                   | Negativo                   |       |           |                                   |             |       |
| Deficit carnitina palmitoiltrasferasi tipo II              |                   | Negativo                   |       |           |                                   |             |       |
| Deficit Carnitina acilcarnitina traslocasi                 |                   | Negativo                   |       |           |                                   |             |       |
| Deficit trasportatore (OCTN2) della Carnitine              |                   | Negativo                   |       |           |                                   |             |       |
| Malattie di Pompe  |                   | Negativo                   |       |           |                                   |             |       |
| Malattia di Fabry  |                   | Negativo                   |       |           |                                   |             |       |
| Mucopolisaccaridosi tipo I, II e VI                        |                   | Negativo                   |       |           |                                   |             |       |

e i risultati saranno visibili al punto nascita che provvederà a stamparli e a inviarli ai genitori del neonato.

| PUNTO NASCITA  |                              |                               |                                |                 |        |
|--|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-----------------|--------|
| REGIONE  | AZIENDA USL                  | ISTITUTO/AZIENDA OSPEDALIERA  | COMUNE DI EVENTO               |                 |        |
| VENETO   | ULSS 15 CITTADELLA           | O.C. CAMPOSAMPIERO            | CAMPOSAMPIERO (PD)             |                 |        |
| CRUSCOTTO NATO – STATO DELLO SCREENING                     |                              |                               |                                | STAMPA          | CHIUDI |
|  | TEST I LIVELLO<br>I PRELIEVO | TEST I LIVELLO<br>II PRELIEVO | TEST I LIVELLO<br>III PRELIEVO | TEST II LIVELLO |        |
| Data appuntamento  |                              |                               |                                |                 |        |
| Data prelievo  | 31/05/2010 10:20             |                               |                                |                 |        |
| Data accettazione  | 01/06/2010 08:20             |                               |                                |                 |        |
| Data analisi   | 01/06/2010 08:20             |                               |                                |                 |        |
| ELENCO SCREENING   | RISULTATI                    | RISULTATI                     | RISULTATI                      | RISULTATI       |        |
| Fenilchetonuria  | Negativo                     |                               |                                |                 |        |
| Tirosinemia tipo I   | Negativo                     |                               |                                |                 |        |
| Citullinemia   | Negativo                     |                               |                                |                 |        |
| Argininemia  | Negativo                     |                               |                                |                 |        |
| Aciduria argininosuccinica                                 | Negativo                     |                               |                                |                 |        |
| M. urine allo sciroppo d'acero                             | Negativo                     |                               |                                |                 |        |
| Acidemia Propionica  | Negativo                     |                               |                                |                 |        |
| Acidemia Metilmalonica                                     | Negativo                     |                               |                                |                 |        |
| Deficit cobalamina C/D                                     | Negativo                     |                               |                                |                 |        |
| Isovalerico acidemia                                       | Negativo                     |                               |                                |                 |        |
| Glutarico aciduria tipo I                                  | Negativo                     |                               |                                |                 |        |
| Deficit acil CoA deidrogenasi a catena media (MCAD)        | Negativo                     |                               |                                |                 |        |
| Deficit acil CoA deidrogenasi a catena molto lunga         | Negativo                     |                               |                                |                 |        |
| Deficit acil CoA deidrogenasi a catena lunga               | Negativo                     |                               |                                |                 |        |
| Deficit acil CoA deidrogenasi a catena corta               | Negativo                     |                               |                                |                 |        |
| Deficit acil CoA deidrogenasi (aciduria glutarica tipo II) | Negativo                     |                               |                                |                 |        |
| Deficit carnitina palmitoiltrasferasi tipo I               | Negativo                     |                               |                                |                 |        |
| Deficit carnitina palmitoiltrasferasi tipo II              | Negativo                     |                               |                                |                 |        |
| Deficit Carnitina acilcarnitina traslocasi                 | Negativo                     |                               |                                |                 |        |
| Deficit trasportatore (OCTN2) della Carnitine              | Negativo                     |                               |                                |                 |        |
| Malattie di Pompe  | Negativo                     |                               |                                |                 |        |
| Malattia di Fabry  | Negativo                     |                               |                                |                 |        |
| Mucopolisaccaridosi tipo I, II e VI                        | Negativo                     |                               |                                |                 |        |

## LA PROGETTAZIONE DEL SISTEMA DI RACCOLTA DATI

Se i risultati del test di primo livello sono positivi, il centro screening visualizzerà la seguente schermata:

| CENTRO SCREENING 1° LIVELLO                                |  |             |    |                    |             |              |       |
|--|--|-------------|----|--------------------|-------------|--------------|-------|
| REGIONE  |  | AZIENDA USL |    | PUNTO NASCITA      |             |              |       |
| VENETO   |  | A.O. PADOVA |    | O.C. Camposampiero |             |              |       |
| Ricerca  |  | Cognome     | BA | Nome               | EN          |              |       |
|  |  |             |    | I PRELIEVO         | II PRELIEVO | III PRELIEVO |       |
| Data prelievo  |  |             |    | 31/05/2010 10:20   |             |              |       |
| Data accettazione  |  |             |    | 01/06/2010 08:20   |             |              |       |
| Data analisi   |  |             |    | 01/06/2010 08:20   |             |              |       |
| ELENCO SCREENING   |  |             |    | RISULTATI          |             | RISULTATI    |       |
|  |  |             |    | DOS 1              | DOS 2       | DOS 1        | DOS 2 |
| Fenilchetonuria  |  |             |    | Negativo           |             |              |       |
| Tirosinemia tipo I   |  |             |    | Negativo           |             |              |       |
| Citrullinemia  |  |             |    | Negativo           |             |              |       |
| Argininemia  |  |             |    | Negativo           |             |              |       |
| Aciduria argininosuccinica                                 |  |             |    | Negativo           |             |              |       |
| M. urine allo sciroppo d'acero                             |  |             |    | Negativo           |             |              |       |
| Acidemia Propionica  |  |             |    | Negativo           |             |              |       |
| Acidemia Metilmalonica                                     |  |             |    | Negativo           |             |              |       |
| Deficit cobalamina C/D                                     |  |             |    | Negativo           |             |              |       |
| Isovalerico acidemia                                       |  |             |    | Negativo           |             |              |       |
| Glutarico aciduria tipo I                                  |  |             |    | Border-line        | Positivo    |              |       |
| Deficit acil CoA deidrogenasi a catena media (MCAD)        |  |             |    | Negativo           |             |              |       |
| Deficit acil CoA deidrogenasi a catena molto lunga         |  |             |    | Negativo           |             |              |       |
| Deficit acil CoA deidrogenasi a catena lunga               |  |             |    | Negativo           |             |              |       |
| Deficit acil CoA deidrogenasi a catena corta               |  |             |    | Negativo           |             |              |       |
| Deficit acil CoA deidrogenasi (aciduria glutarica tipo II) |  |             |    | Negativo           |             |              |       |
| Deficit carnitina palmitoiltrasferasi tipo I               |  |             |    | Negativo           |             |              |       |
| Deficit carnitina palmitoiltrasferasi tipo II              |  |             |    | Negativo           |             |              |       |
| Deficit Carnitina acilcarnitina traslocasi                 |  |             |    | Negativo           |             |              |       |
| Deficit trasportatore (OCTN2) della Carnitine              |  |             |    | Negativo           |             |              |       |
| Malattie di Pompe  |  |             |    | Negativo           |             |              |       |
| Malattia di Fabry  |  |             |    | Negativo           |             |              |       |
| Mucopolisaccaridiosi tipo I, II e VI                       |  |             |    | Negativo           |             |              |       |

Il centro screening invia i dati al punto nascita che li visualizza, li stampa, li comunica ai genitori del neonato e provvede a prendere appuntamento per il test di secondo livello.

| PUNTO NASCITA  |                    |                              |                    |                |                  |
|--|--------------------|------------------------------|--------------------|----------------|------------------|
| REGIONE  | AZIENDA USL        | ISTITUTO/AZIENDA OSPEDALIERA | COMUNE DI EVENTO   |                |                  |
| VENETO   | ULSS 15 CITTADELLA | O.C. CAMPOSAMPIERO           | CAMPOSAMPIERO (PD) |                |                  |
| CRUSCOTTO NATO – STATO DELLO SCREENING                     |                    |                              |                    | STAMPA         | CHIUDI           |
|  |                    | TEST I LIVELLO               | TEST I LIVELLO     | TEST I LIVELLO | TEST II LIVELLO  |
|  |                    | I PRELIEVO                   | II PRELIEVO        | III PRELIEVO   |                  |
| Data appuntamento  |                    |                              |                    |                | 04/06/2010 08:30 |
| Data prelievo  |                    | 31/05/2010 10:20             |                    |                |                  |
| Data accettazione  |                    | 01/06/2010 08:20             |                    |                |                  |
| Data analisi   |                    | 01/06/2010 08:20             |                    |                |                  |
| ELENCO SCREENING   |                    | RISULTATI                    |                    | RISULTATI      |                  |
|  |                    | DOS 1                        | DOS 2              | DOS 1          | DOS 2            |
| Fenilchetonuria  |                    | Negativo                     |                    |                |                  |
| Tirosinemia tipo I   |                    | Negativo                     |                    |                |                  |
| Citrullinemia  |                    | Negativo                     |                    |                |                  |
| Argininemia  |                    | Negativo                     |                    |                |                  |
| Aciduria argininosuccinica                                 |                    | Negativo                     |                    |                |                  |
| M. urine allo sciroppo d'acero                             |                    | Negativo                     |                    |                |                  |
| Acidemia Propionica  |                    | Negativo                     |                    |                |                  |
| Acidemia Metilmalonica                                     |                    | Negativo                     |                    |                |                  |
| Deficit cobalamina C/D                                     |                    | Negativo                     |                    |                |                  |
| Isovalerico acidemia                                       |                    | Negativo                     |                    |                |                  |
| Glutarico aciduria tipo I                                  |                    | Positivo                     |                    |                |                  |
| Deficit acil CoA deidrogenasi a catena media (MCAD)        |                    | Negativo                     |                    |                |                  |
| Deficit acil CoA deidrogenasi a catena molto lunga         |                    | Negativo                     |                    |                |                  |
| Deficit acil CoA deidrogenasi a catena lunga               |                    | Negativo                     |                    |                |                  |
| Deficit acil CoA deidrogenasi a catena corta               |                    | Negativo                     |                    |                |                  |
| Deficit acil CoA deidrogenasi (aciduria glutarica tipo II) |                    | Negativo                     |                    |                |                  |
| Deficit carnitina palmitoiltrasferasi tipo I               |                    | Negativo                     |                    |                |                  |
| Deficit carnitina palmitoiltrasferasi tipo II              |                    | Negativo                     |                    |                |                  |
| Deficit Carnitina acilcarnitina traslocasi                 |                    | Negativo                     |                    |                |                  |
| Deficit trasportatore (OCTN2) della Carnitine              |                    | Negativo                     |                    |                |                  |
| Malattie di Pompe  |                    | Negativo                     |                    |                |                  |
| Malattia di Fabry  |                    | Negativo                     |                    |                |                  |
| Mucopolisaccaridiosi tipo I, II e VI                       |                    | Negativo                     |                    |                |                  |

## LA PROGETTAZIONE DEL SISTEMA DI RACCOLTA DATI

Il centro di secondo livello potrà visualizzare solo i pazienti positivi al test di primo livello:

| CENTRO II LIVELLO                          |      |              |                     |                |                  |               |    |
|--|------|--------------|---------------------|----------------|------------------|---------------|----|
| REGIONE                                    |      | AZIENDA USL  |                     |                |                  |               |    |
| VENETO                                     |      | XXXXXXXXXX   |                     |                |                  |               |    |
| Elenco pazienti positivi al test I Livello |      |              |                     |                |                  |               |    |
| Pag. 1                                     |      |              |                     |                |                  |               |    |
| Cognome                                    | Nome | Comune nasc. | Data nasc.          | Codice fiscale | Punto nasc.      | id nato       |    |
| >  | BA   | EN           | CASTELFRANCO VENETO | 10/10/2001     | BLDNRC01R10C111E | CAMPOSAMPIERO | 10 |
| >  | BA   | GI           | ODERZO              | 19/11/2007     | BTTGD107S59F999A | CAMPOSAMPIERO | 19 |
| >  | BO   | GI           | CASTELFRANCO VENETO | 20/04/2003     | BRDGC03D20C111M  | CAMPOSAMPIERO | 20 |
| >  | BR   | AN           | CODIGORO            | 14/10/1983     | BRSNLS83R54C814J | CAMPOSAMPIERO | 14 |
| >  | CA   | AU           | ADRIA               | 05/01/2000     | CVLRA00A45A059X  | CAMPOSAMPIERO | 05 |
| >  | GA   | MA           | MODENA              | 22/08/2000     | GLIMTT00M22F257D | CAMPOSAMPIERO | 22 |
| >  | GU   | RO           | MOTTA DI LIVENZA    | 16/09/1988     | GRRRSO88P56F770H | CAMPOSAMPIERO | 16 |
| >  | HU   | AM           | FIOVE DI SACCO      | 21/03/1998     | HDRMBR98C61G693E | CAMPOSAMPIERO | 21 |
| >  | OB   | AL           | PADOVA              | 27/01/1994     | BJKLC94A27G224H  | CAMPOSAMPIERO | 27 |
| >  | OB   | EM           | PADOVA              | 27/01/1994     | BJKMNL94A27G224R | CAMPOSAMPIERO | 27 |
| >  | PT   | TL           | MILANO              | 05/08/1996     | PCCLRT96M45F05S  | CAMPOSAMPIERO | 05 |
| >  | PI   | CA           | ASIAGO              | 17/05/2001     | PRBCLT01E57A465C | CAMPOSAMPIERO | 17 |
| >  | QU   | DA           | VENEZIA             | 31/10/1986     | QNCDDV86R31L/36S | CAMPOSAMPIERO | 31 |
| >  | RO   | BA           | SOAVE               | 02/11/1982     | RSSBBR82S421775N | CAMPOSAMPIERO | 02 |

Per ogni paziente il centro di secondo livello potrà visualizzare e inserire le informazioni sui metaboliti risultato del test di primo livello, le informazioni sugli esami che dovrà effettuare al secondo livello.

| CENTRO II LIVELLO                    |           |                                   |             |           |           |  |
|--------------------------------------|-----------|-----------------------------------|-------------|-----------|-----------|--|
| REGIONE                              |           | AZIENDA USL                       |             |           |           |  |
| VENETO                               |           | XXXXXXXXXX                        |             |           |           |  |
| Elenco screening                     |           |                                   |             |           |           |  |
| Cognome                              | BA        | Nome                              | EN          |           |           |  |
| TEST I LIVELLO                       |           | TEST II LIVELLO                   |             |           |           |  |
| POSITIVO PER                         |           | I ESAME                           | II ESAME    | III ESAME | IV ESAME  |  |
| Glutarico aciduria tipo I            |           |                                   |             |           |           |  |
| Data appuntamento visita             |           | 04/06/2010 08:30                  |             |           |           |  |
| Tipo prelievo                        |           | Test enzimatico Urine             |             |           |           |  |
| Data prelievo                        |           | 04/06/2010 08:30 04/06/2010 08:30 |             |           |           |  |
| Data accettazione                    |           | 04/06/2010 09:30 04/06/2010 09:30 |             |           |           |  |
| Data analisi                         |           |                                   |             |           |           |  |
| METABOLITI                           | RISULTATI | RISULTATI                         | RISULTATI   | RISULTATI | RISULTATI |  |
| C0                                   | 0.4       |                                   |             |           |           |  |
| C3                                   | 2.0       |                                   |             |           |           |  |
| C4                                   |           |                                   |             |           |           |  |
| <b>C4DC</b>                          |           |                                   |             |           |           |  |
| CSDC                                 | 0.22      |                                   |             |           |           |  |
| CSDC/C4                              | 0.60      |                                   |             |           |           |  |
| CSDC/C8                              | 0.25      |                                   |             |           |           |  |
| CSDC/C12                             | 1.20      |                                   |             |           |           |  |
| <b>RISULTATO II LIVELLO</b>          |           |                                   |             |           |           |  |
| Patologia: Glutarico aciduria tipo I |           |                                   | ESITO: n.d. |           |           |  |

## LA PROGETTAZIONE DEL SISTEMA DI RACCOLTA DATI

Una volta che avrà ottenuto i risultati degli esami di secondo livello li inserirà e in basso si potrà visualizzare il risultato definitivo sulla patologia. In caso di risultato negativo:

**CENTRO II LIVELLO**

|         |             |  |  |  |
|---------|-------------|--|--|--|
| REGIONE | AZIENDA USL |  |  |  |
| VENETO  | XXXXXXXX    |  |  |  |

Ricerca

| Elenco screening                              | Cognome          | BA               | Nome             | EN    |
|---|------------------|------------------|------------------|-------|
| TEST I LIVELLO                                |                  |                  |                  |       |
| TEST II LIVELLO                               |                  |                  |                  |       |
| POSITIVO PER <b>Glutarico aciduria tipo I</b> |                  |                  |                  |       |
| Data appuntamento visita                      | 04/06/2010 08:30 |                  |                  |       |
| Tipo prelievo                                 |                  |                  | Test enzimatico  | Urine |
| Data prelievo                                 | 04/06/2010 08:30 |                  | 04/06/2010 08:30 |       |
| Data accettazione                             |                  | 04/06/2010 09:30 | 04/06/2010 09:30 |       |
| Data analisi                                  |                  | 04/06/2010 11:30 | 04/06/2010 11:30 |       |

| METABOLITI | RISULTATI | RISULTATI | RISULTATI | RISULTATI |
|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| C0         | 0.4       |           |           |           |
| C3         | 2.0       |           |           |           |
| C4         |           |           |           |           |
| C4DC       |           |           |           |           |
| C5DC       | 0.22      | Ris -     | Ris -     |           |
| C5DC/C4    | 0.60      |           | Ris -     |           |
| C5DC/C8    | 0.25      |           | Ris -     |           |
| C5DC/C12   | 1.20      | Ris -     |           |           |

**RISULTATO II LIVELLO**  
 Patologia: **Glutarico aciduria tipo I**

ESITO: **Negativo**

I risultati saranno visibili al punto nascita:

| PUNTO NASCITA  |                    |                              |                    |                  |        |
|--|--------------------|------------------------------|--------------------|------------------|--------|
| REGIONE  | AZIENDA USL        | ISTITUTO/AZIENDA OSPEDALIERA | COMUNE DI EVENTO   |                  |        |
| VENETO   | ULSS 15 CITTADELLA | O.C. CAMPOSAMPIERO           | CAMPOSAMPIERO (PD) |                  |        |
| <b>CRUSCOTTO NATO – STATO DELLO SCREENING</b>              |                    |                              |                    | STAMP            | CHIUDI |
|  | TEST I LIVELLO     | TEST I LIVELLO               | TEST I LIVELLO     | TEST II LIVELLO  |        |
|  | I PRELIEVO         | II PRELIEVO                  | III PRELIEVO       |                  |        |
| Data appuntamento  |                    |                              |                    | 02406/2010 08:30 |        |
| Data prelievo  | 31/05/2010 10:20   |                              |                    |                  |        |
| Data accettazione  | 01/06/2010 08:20   |                              |                    |                  |        |
| Data analisi   | 01/06/2010 08:20   |                              |                    |                  |        |
| ELENCO SCREENING   | RISULTATI          | RISULTATI                    | RISULTATI          | RISULTATI        |        |
| Fenilchetonuria  | Negativo           |                              |                    |                  |        |
| Tirosinemia tipo I   | Negativo           |                              |                    |                  |        |
| Citrullinemia  | Negativo           |                              |                    |                  |        |
| Argininemia  | Negativo           |                              |                    |                  |        |
| Aciduria argininosuccinica                                 | Negativo           |                              |                    |                  |        |
| M. urine allo scioppo d'acero                              | Negativo           |                              |                    |                  |        |
| Acidemia Propionica  | Negativo           |                              |                    |                  |        |
| Acidemia Metilmalonica                                     | Negativo           |                              |                    |                  |        |
| Deficit cobalamina C/D                                     | Negativo           |                              |                    |                  |        |
| Isovalerico acidemia                                       | Negativo           |                              |                    |                  |        |
| Glutarico aciduria tipo I                                  | Positivo           |                              |                    | Negativo         |        |
| Deficit acil CoA deidrogenasi a catena media (MCAD)        | Negativo           |                              |                    |                  |        |
| Deficit acil CoA deidrogenasi a catena molto lunga         | Negativo           |                              |                    |                  |        |
| Deficit acil CoA deidrogenasi a catena lunga               | Negativo           |                              |                    |                  |        |
| Deficit acil CoA deidrogenasi a catena corta               | Negativo           |                              |                    |                  |        |
| Deficit acil CoA deidrogenasi (aciduria glutarica tipo II) | Negativo           |                              |                    |                  |        |
| Deficit carnitina palmitoiltrasferasi tipo I               | Negativo           |                              |                    |                  |        |
| Deficit carnitina palmitoiltrasferasi tipo II              | Negativo           |                              |                    |                  |        |
| Deficit Carnitina acilcarnitina traslocasi                 | Negativo           |                              |                    |                  |        |
| Deficit trasportatore (OCTN2) della Carnitine              | Negativo           |                              |                    |                  |        |
| Malattia di Pompe  | Negativo           |                              |                    |                  |        |
| Malattia di Fabry  | Negativo           |                              |                    |                  |        |
| Mucopolisaccaridosi tipo I, II e VI                        | Negativo           |                              |                    |                  |        |

## LA PROGETTAZIONE DEL SISTEMA DI RACCOLTA DATI

In caso di risultato positivo invece il centro di secondo livello visualizzerà la seguente schermata:

**CENTRO SCREENING II° LIVELLO**

|         |             |  |  |  |
|---------|-------------|--|--|--|
| REGIONE | AZIENDA USL |  |  |  |
| VENETO  | XXXXXXXX    |  |  |  |

Ricerca

| Elenco screening         | Cognome          | BA                        | Nome  | EN |
|--------------------------|------------------|---------------------------|-------|----|
| <b>TEST II LIVELLO</b>   |                  |                           |       |    |
| <b>POSITIVO PER</b>      |                  | Glutarico aciduria tipo I |       |    |
| Data appuntamento visita | 04/06/2010 08:30 |                           |       |    |
| Tipo prelievo            | Test enzimatico  |                           | Urine |    |
| Data prelievo            | 04/06/2010 08:30 | 04/06/2010 08:30          |       |    |
| Data accettazione        | 04/06/2010 09:30 | 04/06/2010 09:30          |       |    |
| Data analisi             | 04/06/2010 11:30 | 04/06/2010 11:30          |       |    |

| METABOLITI | RISULTATI | RISULTATI | RISULTATI | RISULTATI |
|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| C0         | 0.4       |           |           |           |
| C3         | 2.0       |           |           |           |
| C4         |           |           |           |           |
| C4DC       |           |           |           |           |
| C5DC       | 0.22      | Ris +     | Ris +     |           |
| C5DC/C4    | 0.60      |           | Ris +     |           |
| C5DC/C8    | 0.25      |           | Ris +     |           |
| C5DC/C12   | 1.20      | Ris +     |           |           |

Esce
Ricerca

**RISULTATO II LIVELLO**

Patologia: Glutarico aciduria tipo I ESITO: **Positivo**

Il centro di secondo livello si collega all'applicativo del Registro malattie rare per la certificazione del paziente.

**Malattia**

Malattia:  ? [Vedi scheda sul sito](#)

Malattia di riferim.:

Codice esenzione:  Codice ICD9CM:

Medico certificatore:

Usa Dietetici:

Usa farmaco orfano:  Sì  No Nome farmaco:

**Dati Esordio Malattia**

Primo centro che ha effettuato la diagnosi:

Data diagnosi:  Data esordio malattia (mm/aaaa):

Fonte dati esordio:  Riferiti da paziente  Da documentazione

**Dati Utente Certificatore**

Centro che certifica:

Presidio che certifica:

Azienda che certifica:

Data certificato:

**Piani Terapeutici Personalizzati**

Il paziente **non ha attivo** alcun piano terapeutico [Gestione piani terapeutici pers.](#)

[Stampa Certificato](#) [Inserisci segnalazione errore](#)



### 6. Conclusioni

Il tema dello screening neonatale allargato per le malattie metaboliche ereditarie è ampiamente discusso in letteratura e non c'è un consenso unanime nel mondo scientifico su quali patologie sia opportuno effettuare lo screening, sulla riproducibilità del test in momenti diversi della vita del neonato, in particolare per i neonati di bassa età gestazionale ed infine, su quali siano le procedure di conferma diagnostica e sulla tempistica entro cui è utile effettuare il test poiché in alcuni casi i risultati arrivano dopo la comparsa dei sintomi.

L'introduzione della spettrometria tandem mass ha completamente cambiato la filosofia dello screening passando dal concetto "un campione, un test, una malattia" al concetto "un campione, un test, molte malattie". In passato gli screening erano considerati un'emergenza sanitaria che aveva l'obiettivo di evitare gravi conseguenze sulla salute del paziente, mentre ora lo screening è considerato un servizio offerto dal sistema sanitario che può portare dei benefici di entità variabile in termini di prevenzione e di salute. I benefici possono riguardare, oltre la salute del neonato, anche la consapevolezza dei genitori e quindi indirizzare le loro scelte riproduttive.

Da una parte siamo di fronte a un test di screening di grande potenza che è in grado di valutare un numero molto elevato di metaboliti e quindi di sottoporre a screening un grande numero di patologie, dall'altra non sempre è possibile valutare per ogni patologia l'impatto del trattamento in termini di salute del nato. Mentre per alcune malattie metaboliche è nota l'efficacia dello screening, per altre la terapia presenta caratteristiche non note di efficacia e sicurezza e si basa spesso su *end point* di tipo biologico e non di tipo clinico, in particolare per le patologie che hanno impatto sul sistema nervoso centrale.

Si tratta sempre e comunque di un'indagine di tipo genetico che indaga sul "futuro possibile" del neonato: lo screening può infatti identificare le mutazioni genetiche in neonati sani e che potrebbero non sviluppare alcun sintomo. Inoltre, l'identificazione di una mutazione porterebbe ad aumentare l'ansia dei genitori con ripercussioni sul rapporto con il bambino oltre alle ripercussioni che lo stato di potenziale malato potrebbe avere sulla vita sociale dello stesso.

## CONCLUSIONI

Quando si parla di screening neonatale si pone anche un problema programmatico che non riguarda solo la scelta delle patologie da sottoporre allo screening, ma anche l'organizzazione dello stesso e l'impatto nella rete dei servizi sanitari e nella popolazione.

Nel corso del presente lavoro è stata affrontata la pianificazione dello screening nella Regione Veneto dove una legge regionale ne ha approvato l'attivazione. Il pannello di malattie previsto dalla legge comprende cinque difetti del metabolismo degli acidi organici, sei difetti degli aminoacidi, nove difetti del metabolismo mitocondriale, e cinque disordini lisosomiali (malattia di Pompe, malattia di Fabry e mucopolisaccaridosi I, II e VI). La legge prevede inoltre che il progetto di screening valorizzi le competenze già presenti sul territorio: Padova e Verona per il test di primo livello e il Centro di riferimento regionale per le malattie metaboliche ereditarie dell'Azienda Ospedaliera di Padova per il test di secondo livello. Questa legge si va ad inserire in un contesto nazionale dove non è presente una legge che regola lo screening neonatale allargato per le malattie metaboliche ereditarie e dove si può riportare l'esperienza consolidata della Regione Toscana.

Da diversi anni inoltre in molte nazioni come l'Australia, gli Stati Uniti, la Germania e il Portogallo lo screening neonatale è attivo. Questo ha reso possibile avvalersi della loro esperienza sull'organizzazione dello screening e avere una fonte di dati importante per capire i casi attesi e la proporzione di soggetti positivi al test di screening che necessitano del test di conferma diagnostica. Per quanto riguarda la malattia di Pompe e la malattia di Fabry non sono riportate esperienze di altre nazioni sullo screening neonatale con la tecnologia tandem mass ma solo il risultato di studi pilota condotti in Austria. Per queste due patologie sono disponibili anche risultati di test di screening eseguiti con tecniche diverse dalla tecnologia tandem mass. Non si dispone invece di dati sullo screening neonatale per le mucopolisaccaridosi.

Sulla base delle esperienze delle altre nazioni ci si aspetta che il programma di screening nella Regione Veneto individui un numero annuo di casi che va da 6 a 24 escludendo la malattia di Fabry per la quale ci si aspetta un numero di casi compreso tra 8 e 20.

Per quanto riguarda i criteri di positività al test di primo livello, non c'è un consenso unanime nel mondo scientifico sui metaboliti e sui cut-off da utilizzare. Trattandosi di

## CONCLUSIONI

popolazioni diverse essi vengono calcolati sulla base dei valori di un gruppo di neonati sani e di un gruppo di soggetti con patologia e vengono rivisti nel tempo alla luce dei risultati ottenuti sulla popolazione sottoposta a screening. Inoltre la potenza del test di screening pone anche il problema di che cosa fare dei metaboliti che non vengono utilizzati per le patologie che rientrano nel pannello ma che vengono comunque analizzati. In alcune nazioni essi non vengono riportati nei risultati che vengono forniti alla famiglia.

Le definizioni dei positivi al test di primo livello riguarda anche altre scelte tecniche e organizzative. In molti paesi in caso di risultato positivo del test e per patologie a basso rischio di decompensazione metabolica, viene ripetuto il test di primo livello su un nuovo campione prima di inviare il neonato al test di secondo livello.

Questo tipo di screening è risultato essere altamente sensibile e specifico ma presenta una proporzione di valori predittivi positivi molto bassa: la maggior parte dei neonati che vengono richiamati per il test di conferma diagnostica risulta infatti non malata. Il numero di positivi attesi in Veneto al test di screening, sulla base delle esperienze di altri paesi, risulta essere tra 285 e 393 l'anno, ma di questi ben 180 sarebbero positivi per la malattia di Fabry.

La pianificazione prevede quindi la necessità di un dimensionamento dei centri di primo e secondo livello per far sì che il tempo che intercorre tra la nascita e il risultato definitivo sia sufficiente per evitare gravi rischi di salute per il neonato e limitare l'ansia dei genitori. Questo problema programmatico è stato affrontato con un modello di simulazione dinamica che permette di valutare varie soluzioni di allocazione delle risorse e di scegliere quella che riduce al minimo i rischi per il neonato ma che al tempo stesso non porti a sovradimensionamento e a uno spreco di risorse. Il modello permette di stimare i tempi di attesa per i test di primo e secondo livello e, come avverrà nella pratica, attribuisce priorità diverse per la visita di secondo livello ai neonati in base alla gravità della patologia e alla necessità di intervento tempestivo.

Il futuro accorpamento delle regioni contigue, Trentino Alto Adige e Friuli Venezia Giulia, porterebbe a incrementare il numero di richieste di test di primo e secondo livello e richiedere un nuovo dimensionamento dei centri. Il modello di simulazione potrà essere nuovamente utilizzato per riallocare le risorse qualora le richieste di

## CONCLUSIONI

assistenza cambino, come in questo caso, oppure qualora nuove patologie vengano inserite nel programma di screening.

Nel progetto regionale di screening neonatale allargato è fondamentale il ruolo del punto nascita che, oltre a effettuare il prelievo e inviarlo al centro screening, sarà il ponte tra il centro screening e la famiglia in quanto si occuperà di comunicare i risultati negativi, ma soprattutto di contattare la famiglia in caso di risultato positivo e di inviarla al centro di secondo livello fornendole tutte le informazioni necessarie. Si occuperà anche di un eventuale secondo prelievo in caso di necessità.

Prima ancora il punto nascita dovrà raccogliere il consenso allo screening ma dall'esperienza degli altri paesi con sistemi sanitari pubblici il programma di screening ha una copertura quasi totale sulla popolazione.

È fondamentale in questa fase di pianificazione prevedere anche un sistema di monitoraggio di tutte le informazioni che si susseguono dalla nascita ai risultati definitivi del test. Gli attori che entrano in gioco sono il punto nascita, il centro screening ed il centro di secondo livello e il percorso che porta alla diagnosi definitiva richiede anche di conoscere le informazioni anamnestiche del neonato e dei suoi familiari. Il sistema di raccolta dati si va ad inserire in un contesto dove i punti nascita sono già attivi nella compilazione del Certificato di Assistenza al Parto che viene compilato via web e il centro di secondo livello è già attivo nel Registro Malattie Rare tra le quali rientrano le malattie metaboliche ereditarie. La raccolta dati sullo screening neonatale collegherà questi due flussi informativi e oltre a essere uno strumento fondamentale nel passaggio delle informazioni tra i centri durante il processo di screening, permetterà di monitorare l'efficacia dello stesso. Si potranno infatti ricavare le proporzioni di falsi positivi, i valori predittivi positivi ma anche sarà possibile monitorare i falsi negativi cioè i neonati classificati come negativi dal test di screening ma che sviluppano successivamente la malattia e che vengono quindi registrati nel Registro Malattie Rare al momento della diagnosi clinica.

Il monitoraggio dei falsi negativi è un punto chiave del programma di screening poiché essi rappresentano un punto critico dello stesso e degli obiettivi di salute che si era preposto. Anche i lavori delle altre nazioni riportano i falsi negativi ai quali si sono susseguite delle decisioni di revisione dei cut-off. Successivamente non si sono verificati altri falsi negativi.

## CONCLUSIONI

Il programma di screening allargato per le malattie metaboliche ereditarie andrà sicuramente valutato nel tempo alla luce delle nuove conoscenze cliniche e possibilità terapeutiche relative alle patologie diagnosticabili, dei dati di efficacia che si otterranno, delle risorse disponibili, ma soprattutto delle scelte e degli orientamenti delle persone e dei risultati ottenuti, intesi come effettivi miglioramenti della presa in carico dei pazienti.



## Bibliografia

Andermann A, Blancquaert I, Beauchamp S, Déry V. Revisiting Wilson and Jungner in the genomic age: a review of screening criteria over the past 40 years. *Bull World Health Organ.* 2008 Apr;86(4):317-9.

Azteni P, Ceri S, Paraboschi S, Torbolone R. Basi di dati. Concetti, linguaggi e architetture. McGraw-Hill 1996.

Baehner F, Schmiedeskamp C, Krummenauer F, Miebach E, Bajbouj M, Whybra C, Kohlschütter A, Kampmann C, Beck M. Cumulative incidence rates of the mucopolysaccharidoses in Germany. *J Inher Metab Dis.* 2005;28(6):1011-7.

Bennett S, Skelton J, Lunn K. Introduzione a UML, McGraw Hill, 2002.

Bodamer OA, Hoffmann GF, Lindner M. Expanded newborn screening in Europe 2007. *J Inher Metab Dis.* 2007 Aug;30(4):439-44. Epub 2007 Jul 23.

Burton H, Moorthie S. Expanded newborn screening. A review of the evidence. May 2010 – NHS, NIH CLAHRC, PHG foundation.

Chien YH, Chiang SC, Zhang XK, Keutzer J, Lee NC, Huang AC, Chen CA, Wu MH, Huang PH, Tsai FJ, Chen YT, Hwu WL. Early detection of Pompe disease by newborn screening is feasible: results from the Taiwan screening program. *Pediatrics.* 2008 Jul;122(1):e39-45. Epub 2008 Jun 2.

Dajnoki A, Mühl A, Fekete G, Keutzer J, Orsini J, Dejesus V, Zhang XK, Bodamer OA. Newborn screening for Pompe disease by measuring acid alpha-glucosidase activity using tandem mass spectrometry. *Clin Chem.* 2008 Oct;54(10):1624-9. Epub 2008 Aug 14.

Dajnoki A, Fekete G, Keutzer J, Orsini JJ, De Jesus VR, Chien YH, Hwu WL, Lukacs Z, Mühl A, Zhang XK, Bodamer O. Newborn screening for Fabry disease by measuring GLA activity using tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta.* 2010 Oct 9;411(19-20):1428-31. Epub 2010 Mar 22.

Demitsu T, Kakurai M, Okubo Y, Kikuchi Y, Mori Y, Susegawa K, Mizuguchi M. Skin eruption as the presenting sign of Hunter syndrome IIB. *Clinical and Experimental Dermatology.* May 1999; 24(3): 179-182.

Dionisi-Vici C, Rizzo C, Burlina AB, Caruso U, Sabetta G, Uziel G, Abeni D. Inborn errors of metabolism in the Italian pediatric population: a national retrospective survey. *J Pediatr.* 2002 Mar;140(3):321-7.

Fernandes J, Saudubray JM, van der Berghe G, Walter JH. *Inborn Metabolic Diseases. Diagnosis and Treatment.* Fourth, revised edition. Springer, 2006

## BIBLIOGRAFIA

Feuchtbaum L, Lorey F, Faulkner L, Sherwin J, Currier R, Bhandal A, Cunningham G. California's experience implementing a pilot newborn supplemental screening program using tandem mass spectrometry. *Pediatrics*. 2006 May;117(5 Pt 2):S261-9.

Frazier DM, Millington DS, McCandless SE, Koeberl DD, Weavil SD, Chaing SH, Muenzer J. The tandem mass spectrometry newborn screening experience in North Carolina: 1997-2005. *J Inher Metab Dis*. 2006 Feb;29(1):76-85.

Gaburro D, Paolucci C, Salvioni GP, Volpato S. *Pediatria generale e specialistica*. Guido Gnocchi Editore. 1997

Germain DP. Fabry disease Review *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2010, **5:30**

Hwu WL, Chien YH, Lee NC, Chiang SC, Dobrovolny R, Huang AC, Yeh HY, Chao MC, Lin SJ, Kitagawa T, Desnick RJ, Hsu LW. Newborn screening for Fabry disease in Taiwan reveals a high incidence of the later-onset GLA mutation c.936+919G>A (IVS4+919G>A). *Hum Mutat*. 2009 Oct;30(10):1397-405.

Kemper AR, Hwu WL, Lloyd-Puryear M, Kishnani PS. Newborn screening for Pompe disease: synthesis of the evidence and development of screening recommendations. *Pediatrics*. 2007 Nov;120(5):e1327-34.

La Marca G, Malvagia S, Casetta B, Pasquini E, Donati MA, Zammarchi E. Progress in expanded newborn screening for metabolic conditions by LC-MS/MS in Tuscany: Update on methods to reduce false tests. *J Inher Metab Dis*. 2008 Oct 27. [Epub ahead of print]

Lindner M, Hoffmann GF, Matern D. Newborn screening for disorders of fatty-acid oxidation: experience and recommendations from an expert meeting. *J Inher Metab Dis*. 2010 Apr 7. [Epub ahead of print]

Marsden D, Levy H. Newborn screening of lysosomal storage disorders. *Clin Chem*. 2010 Jul;56(7):1071-9. Epub 2010 May 20. Review.

Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA*. 1999 Jan 20;281(3):249-54.

Micro Analysis & Design Simulation Software Inc. 1998 MICRO SAINT User's Manual Windows.

Minichiello C. Farmaci e malattie rare. Programmazione delle reti per il trattamento dei malati di una ampia area del nord Italia. Testi di Dottorato di Ricerca in Medicina dello Sviluppo e Scienze della Programmazione – Università degli studi di Padova. Gennaio 2010.

Moore D, Connock MJ, Wraith E, Lavery C. The prevalence of and survival in Mucopolysaccharidosis I: Hurler, Hurler-Scheie and Scheie syndromes in the UK. *Orphanet J Rare Dis*. 2008 Sep 16;3:24.

## BIBLIOGRAFIA

Nelson Textbook of Pediatrics. WB Saunders Company, 16th Edition 2000

O'Mahony C, Elliott P. Anderson-Fabry disease and the heart. *Prog Cardiovasc Dis.* 2010 Jan-Feb;52(4):326-35.

Pavone L, Ruddieri M. *Neurologia pediatrica.* Elsevier 2006.

Poorthuis BJ, Wevers RA, Kleijer WJ, Groener JE, de Jong JG, van Weely S, Niezen-Koning KE, van Diggelen OP. The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Hum Genet.* 1999 Jul-Aug;105(1-2):151-6.

Poupetová H, Ledvinová J, Berná L, Dvorská L, Kozich V, Elleder M. The birth prevalence of lysosomal storage disorders in the Czech Republic: comparison with data in different populations. *J Inher Metab Dis.* 2010 Aug;33(4):387-96. Epub 2010 May 20.

Rinaldo et al: Evidence based rationale for expanded newborn screening ; National Academy of Clinical Biochemistry : Laboratory Medicine Practice Guidelines :Draft version #10 –Sept 5 , 2007

Sanjurjo P, Baldellou A, Aldámiz-Echevarría K, Montejo M, García Jiménez M. [Inborn errors of metabolism as rare diseases with a specific global situation]. *An Sist Sanit Navar.* 2008;31 Suppl 2:55-73. Spanish.

Schulze A, Lindner M, Kohlmüller D, Olgemöller K, Mayatepek E, Hoffmann GF. Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism by electrospray ionization-tandem mass spectrometry: results, outcome, and implications. *Pediatrics.* 2003 Jun;111(6 Pt 1):1399-406.

Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, Eighth Edition McGraw-Hill 2001

SISMME-SISN Società Italiana Studio Malattie Metaboliche Ereditarie – Società Italiana Screenings Neonatali. *Linea guida per lo screening neonatale esteso e la conferma diagnostica* 2008.

Spada M, Pagliardini S, Yasuda M, Tükel T, Thiagarajan G, Sakuraba H, Ponzzone A, Desnick RJ. High incidence of later-onset fabry disease revealed by newborn screening. *Am J Hum Genet.* 2006 Jul;79(1):31-40. Epub 2006 Apr 28.

Valayannopoulos V, Nicely H, Harmatz P, Turbeville S. Mucopolysaccharidosis VI. *Orphanet J Rare Dis.* 2010 Apr 12;5:5. Review.

Vilarinho L, Rocha H, Sousa C, Marcão A, Fonseca H, Bogas M, Osório RV. Four years of expanded newborn screening in Portugal with tandem mass spectrometry. *J Inher Metab Dis.* 2010 Feb 23. [Epub ahead of print]

## BIBLIOGRAFIA

Villani GR, Balzano N, Di Natale P. Two novel mutations of the arylsulfatase B gene in two Italian patients with severe form of mucopolysaccharidosis. Mutations in brief no. 127. Hum-Mutat. 1998; 11(5): 410).

Wilcken B, Wiley V, Hammond J, Carpenter K. Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. N Engl J Med. 2003 Jun 5;348(23):2304-12.

Wilcken B, Wiley V. Newborn screening. Pathology. 2008 Feb;40(2):104-15. Review.

Wiley V, Carpenter K, Wilcken B. Newborn screening with tandem mass spectrometry: 12 months' experience in NSW Australia. Acta Paediatr Suppl. 1999 Dec;88(432):48-51.

Wilson JM, Jungner G. Principles and practice of screening for disease. World Health Organization 1968

Zschocke J, Hoffman GF. Vademecum Metabolicum. Guida alla diagnosi e terapia delle malattie metaboliche. 3a Edizione italiana a cura di Alberto Burlina. Milupa CG Edizioni Medico Scientifiche. 2005

Zytkovicz TH, Fitzgerald EF, Marsden D, Larson CA, Shih VE, Johnson DM, Strauss AW, Comeau AM, Eaton RB, Grady GF. Tandem mass spectrometric analysis for amino, organic, and fatty acid disorders in newborn dried blood spots: a two-year summary from the New England Newborn Screening Program. Clin Chem. 2001 Nov;47(11):1945-55.

## **NORMATIVA**

Decreto ministeriale - Ministero della Sanità - 18 maggio 2001, n. 279 “Regolamento di istituzione della rete nazionale delle malattie rare e di esenzione dalla partecipazione al costo delle relative prestazioni sanitarie ai sensi dell'articolo 5, comma 1, lettera b) del decreto legislativo 29 aprile 1998, n. 124.” (Pubblicato in Gazzetta Ufficiale 12 luglio 2001, n. 160 Supplemento Ordinario n.180/L)

Decreto ministeriale - Ministero della Sanità - 16 luglio 2001, n.349 Regolamento recante “Modificazioni al certificato di assistenza al parto, per la rilevazione dei dati di sanità pubblica e statistici di base relativi agli eventi di nascita, alla natimortalità ed ai nati affetti da malformazioni” (Pubblicato in Gazzetta Ufficiale Serie Generale n. 218 del 19 settembre 2001)

Delibera Regionale n.800 del 2 agosto 2004, Estensione screening neonatale MME con strumentazione MS/MS (Pubblicata in Bur Toscana n. 34 del 02/04/2004).

Deliberazione della Giunta Regionale n. 2171 del 08 agosto 2008. Legge finanziaria regionale per l'esercizio 2008, n. 1 del 27/02/2008. Art. 92 "Prevenzione, cura e

## BIBLIOGRAFIA

riabilitazione delle malattie metaboliche". Definizione di un progetto congiunto di esecuzione di screening neonatali ivi compreso lo screening neonatale allargato per le malattie metaboliche ereditarie Prenotazione di spesa. (Pubblicata in Bur Veneto n. 77 del 16/09/2008)

Deliberazione della Giunta Regionale n. 3337 del 3 novembre 2009. Legge finanziaria regionale per l'esercizio 2008, n. 1 del 27/02/2008. Art. 92 "Prevenzione, cura e riabilitazione delle malattie metaboliche". Definizione di un progetto congiunto di esecuzione di screening neonatali ivi compreso lo screening neonatale allargato per le malattie metaboliche ereditarie. Integrazioni alla D.G.R. n. 2171 del 08.08.2008. (Pubblicata in Bur Veneto n. 98 del 01/12/2009)

Accordo ai sensi dell'articolo 4 del D.L. 28 agosto 1997, n.281, tra il Governo, le Regioni e le Province Autonome di Trento e Bolzano sul riconoscimento di Centri di coordinamento regionali e/o interregionali, di presidi assistenziali sovraregionali per patologie a bassa prevalenza e sull'attivazione dei registri regionali ed interregionali delle malattie rare. Rep. n. 103/CSR del 10 maggio 2007.

### SITI INTERNET

Orphanet - The portal for rare diseases and orphan drugs. <http://www.orpha.net>

Registro delle Malattie Rare - Coordinamento Regionale per le Malattie Rare - Regione Veneto. <http://malattierare.regione.veneto.it/>

MeSH MEDLINE/PubMed - Mucopolisaccaridosi Tipo I. pagina web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68008059>

MeSH MEDLINE/PubMed - Mucopolisaccaridosi tipo II. pagina web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68016532>

MeSH MEDLINE/PubMed - Mucopolisaccaridosi tipo IV. pagina web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68009087>