

Trieste 15 settembre 2017

Screening meonatale esteso nel Veneto, Trentino e FVG : Risultati e breve descrizione delle malattie e delle criticità riscontrate

Alberto Burlina

Centro Interregionale Screening Neonatale Esteso

U.O.C. Malattie Metaboliche Ereditarie

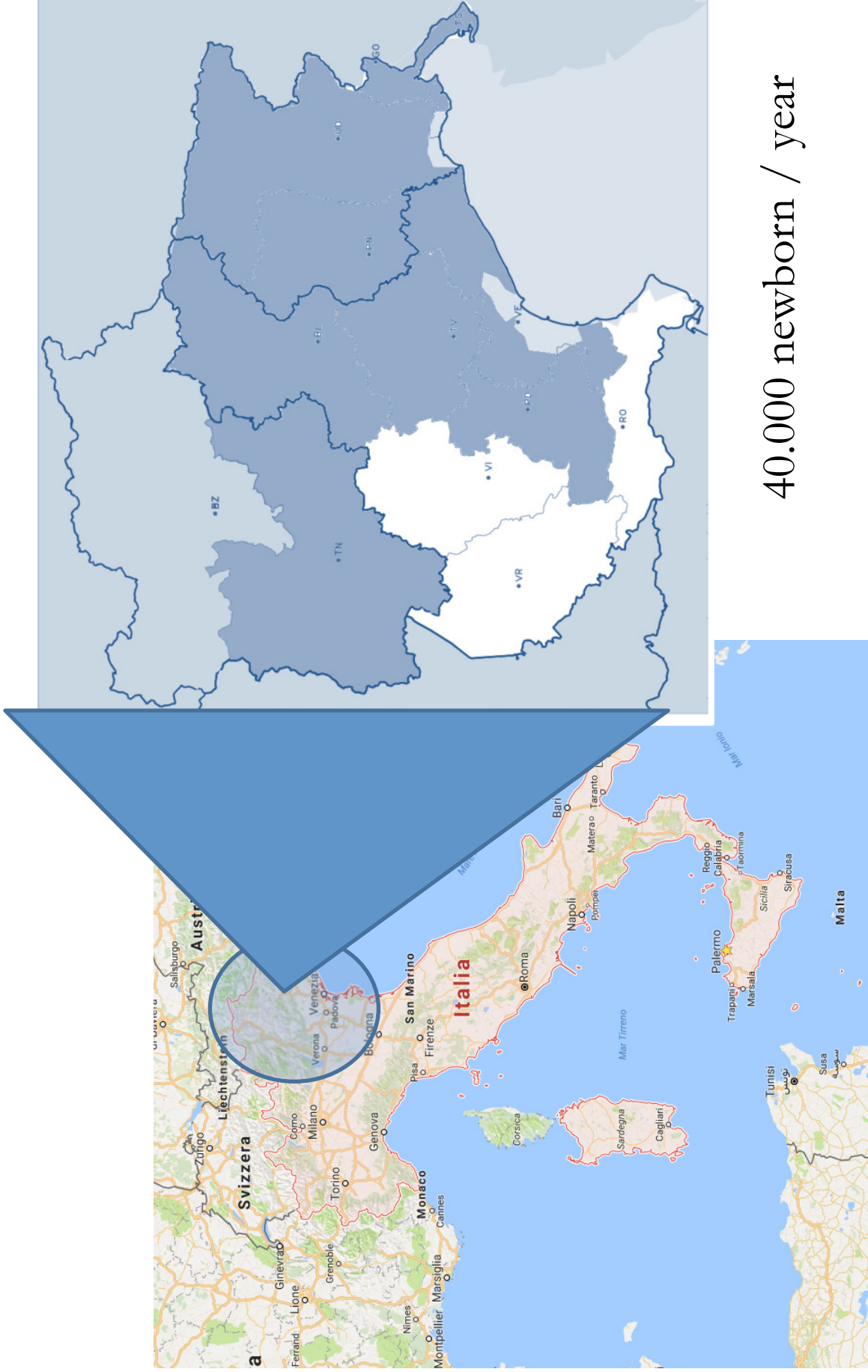
Azienda Ospedaliera di Padova

Screening neonatale esteso in Veneto

Legge Regionale 1308 del 23 Luglio 2013

- Fase I avvio il 1/01/2014 con pannello di 30 nuove patologie per il Veneto e la provincia di Trento
- Fase II (01/09/ 2015) avvio per le patologie lisosomiali
- Dal 01/04/2016 inizio screening FVG

Bacino di utenza (50.000 neonati per legge)

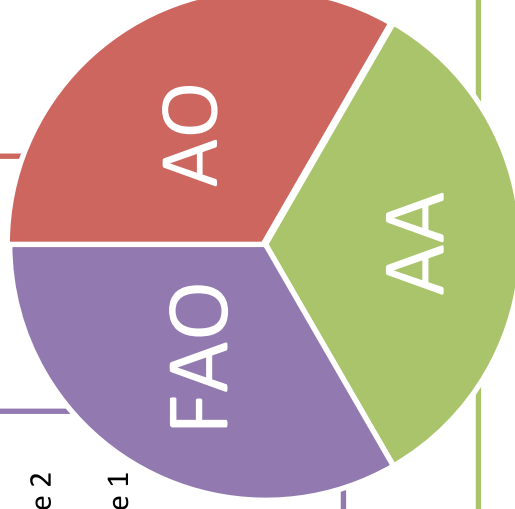


40.000 newborn / year

Le “nuove” malattie

- Medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MCAD)
- Long chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency (LCHAD)
- Very long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (VLCAD)
- Trifunctional protein deficiency (TFPD)
- Carnitine palmitoyl transferase deficiency type 2 (CPT2)
- Carnitine palmitoyl transferase deficiency type 1 (CPT1)
- Carnitine/acylcarnitine translocase deficiency (CACT)
- Carnitine uptake defect (CUD)
- Glutaric aciduria, type 2 (GA2)

- 2-methylbutyryl-CoA dehydrogenase deficiency (2MBD)
- 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency (3MCC)
- 3-hydroxy-3-methylglutaric-CoA lyase deficiency (3HMG)
- 3-methylglutaconic aciduria (3MGA)
- Glutaric aciduria, type 1 (GA1)
- Propionic acidemia (PA)
- Isovaleric acidemia (IVA)
- Methylmalonic acidemia (MMA)
- Cobalamin defects (Cbl A,B,C,D)
- Beta-ketothiolase deficiency (BKT)
- Multiple carboxylase deficiency (MCD)



- Phenylketonuria (PKU) / Hyperphenylalaninemia
- Maple syrup urine disease (MSUD)
- Tyrosinemia, type 1 and type 2 or type 3
- Homocystinuria / Hypermethioninemia
- Citrullinemia
- Argininemia
- Argininosuccinic aciduria

Programma di screening neonatale

PUNTI NASCITA

*informazione ai genitori e raccolta consenso informato (screening dipendente)
raccolta e spedizione del campione*

LABORATORIO DI SCREENING

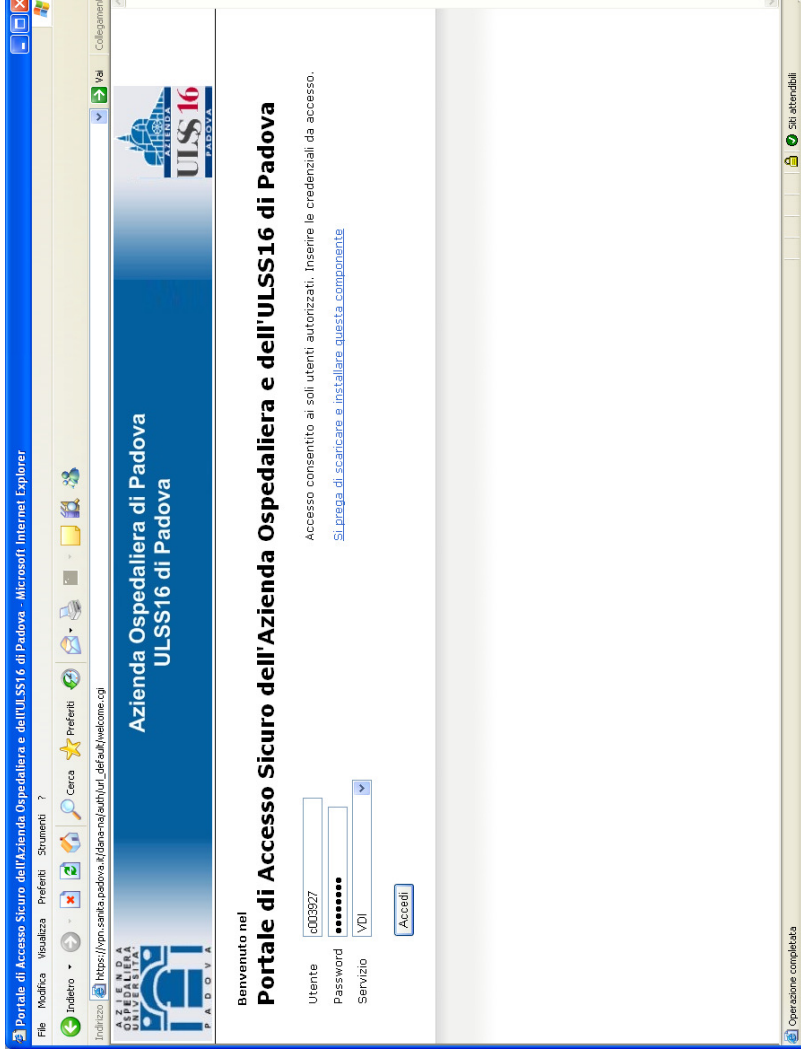
*procedure di laboratorio
conservazione del campione
comunicazione dello screening positivo
assicurazione di qualità dei risultati
conferma della diagnosi*

PRESA A CARICO DEL PAZIENTE

VALUTAZIONE DEL PROGRAMMA DI SCREENING

valutazione epidemiologica e revisione delle malattie soggette a screening

Punti nascita : percorso operativo



`https://vpn.sanita.padova.it`

Informatizzazione



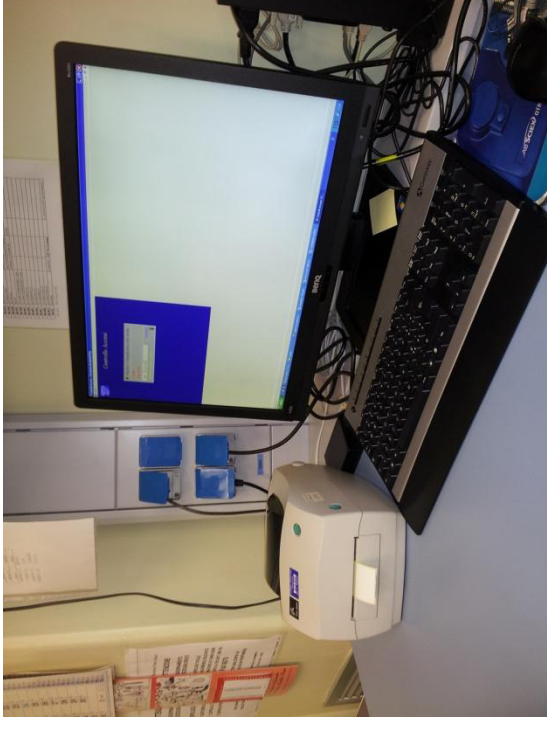
- **Riduzione degli errori di trascrizione**




- **Tracciabilità del campione in tutte le fasi: dal campionamento al referto**

Punto nascita: Richiesta esame

- Inserimento a computer di
- Informazioni anagrafiche
 - Dati complementari del neonato (SG, peso, terapie etc)



Creazione di un codice univoco
del neonato e del campione

Ref: 000001	MAME
ROSSI MARIO	
DN01/01/2014	DP03/01/2014
	
PdI:324	Cart.Guthrie CAMPIONE 1
9462900000	
Malattie Metabol	

Esecuzione del prelievo: cartoncino

- Cartoncini certificati
- Applicazione del codice a barre identificativo
- **Prelievo eseguito 48 – 72 ora di vita**

LOT 7034016/W152 SCMCHI 2019-02
REF 10530037 Rev.AD

Ref: 6492977 SCMCHI
PROVA PROGETTO
DN21/07/1978 DP08/04/2016
9462989888
PdI:324
Cart. Guthrie CAMPIONE 1
Malattie Metabol

SN **00573914**
Non toccare l'area del campione.
Non usare se danneggiato.
Firma del Responsabile del prelievo

SN **00573914**

**COMPILARE QUALORA IL SISTEMA INFORMATICO
NON SIA ATTIVO**

OSPEDALE DI PROVENIENZA _____

COGNOME _____

NOME _____

SESSO **M** **F**

DATA NASCITA (GG/MM/ANNO) _____ / _____ / _____

DATA DI PRELIEVO (GG/MM/ANNO) _____ / _____ / _____

SETT. GEST. _____ PESO _____ PREMATURO **SI** **NO** ALIMENTAZIONE ANTIBIOTICI _____

NAT **ART** | TPN | ALTRO **SI** **NO**

TRASFUSIONI IN DATA (GG/MM) _____ CONTROLLO _____ NAZIONALITÀ _____

SI **NO** _____ **1°** **2°** _____

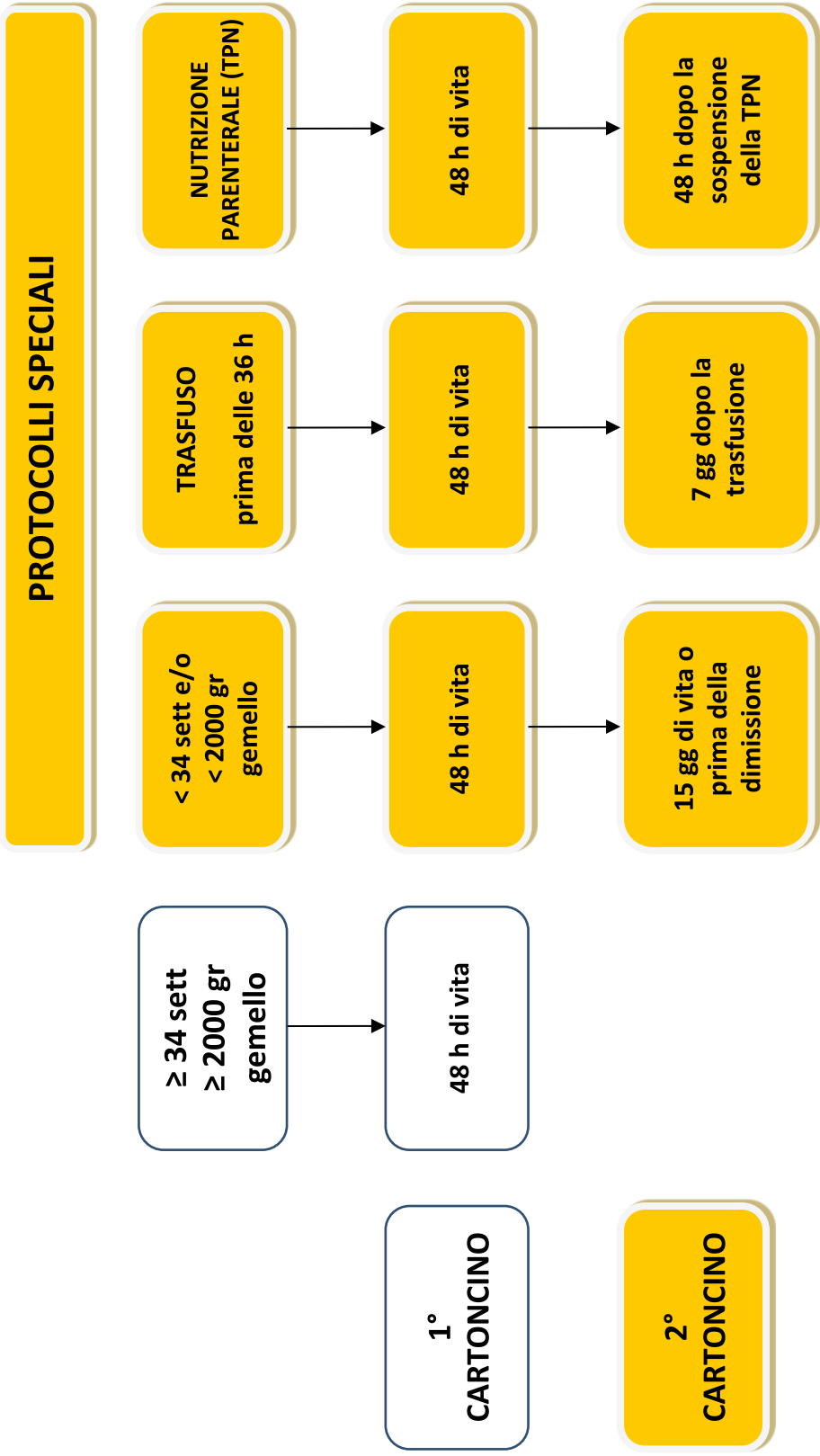
COMUNE _____ CAP _____

INDIRIZZO _____

AZ. I.R.C.C. OSPEDALIERA UNIVERSITÀ DI PADOVA

**CENTRO REGIONALE SCREENING NEONATALE
U.O.C. MALATTIE METABOLICHE EREDITARIE
AZIENDA OSPEDALIERA UNIVERSITÀ DI PADOVA**

VIA CRUS 2/C - 35129 PADOVA ☎ 049/8212536 📠 049/8217474
email: screening.metabolico@santita.padova.it



Condizioni che influenzano il risultato

- **Terapie in atto**

Trattamento	Effetto sul risultato dello SNMA	Durata dell'effetto
Nutrizione parenterale totale (TPN)	Aumento di numerosi aminoacidi	4-24h dalla sospensione
Supplementazione con carnitina	Aumento delle acilcarnitine (possono mascherare disordini del trasporto di carnitina)	Durata della supplementazione, fino a settimane dopo
Terapia con antibiotici contenenti acido pivalico	Aumento di isovalerilarnitina (C5)	Sconosciuta
Circolazione extracorporea	Alterazione di tutti i risultati dell'NBS	Durata di tempo metabolita-specifico

- **Patologie del neonato**

Condizione	Effetto sullo SNMA	Durata dell'effetto
Immaturità degli enzimi epatici	Aumento transitorio di Tyr, Metionina, occasionalmente altri aminoacidi	Poche settimane
Immaturità renale	Aumento di alcuni aminoacidi	Fino alla raggiunta maturazione
Epatopatia	Aumento di Tyr, Metionina	Fino alla guarigione

Trasporto del campione



dreamstime.com

- **Corriere privato**
- **Raccolta punti nascita dal LUNEDI al SABATO.**
- **Consegna al laboratorio entro 24h, dal LUNEDI al SABATO.**

Programma di screening neonatale

PUNTI NASCITA

*informazione ai genitori e raccolta consenso informato (screening dipendente)
raccolta e spedizione del campione*

LABORATORIO DI SCREENING

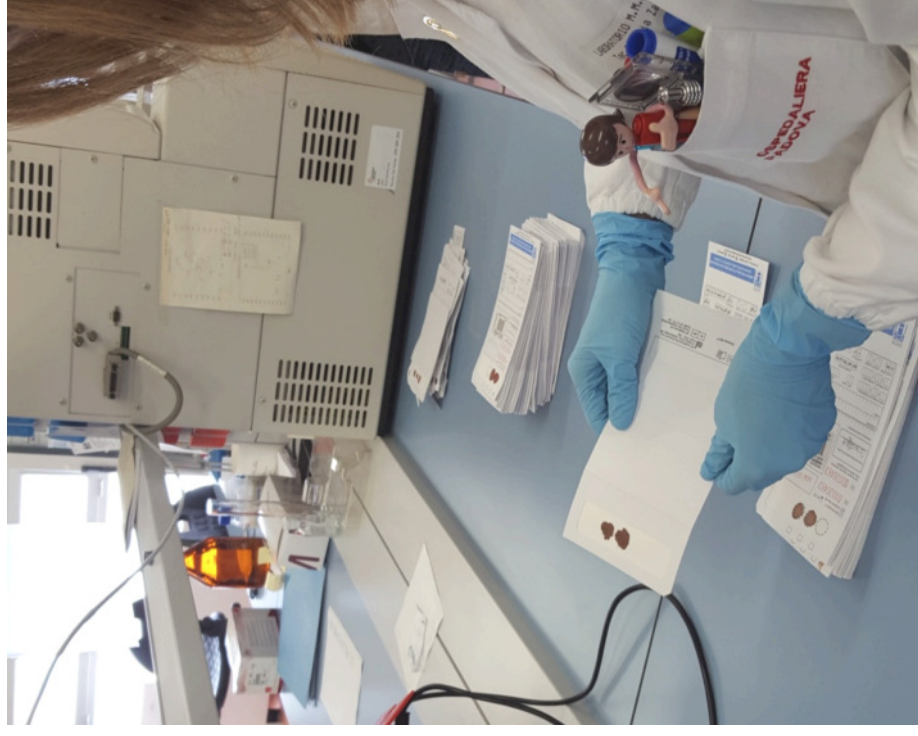
*procedure di laboratorio
conservazione del campione
comunicazione dello screening positivo
assicurazione di qualità dei risultati
conferma della diagnosi*

PRESA A CARICO DEL PAZIENTE

VALUTAZIONE DEL PROGRAMMA DI SCREENING

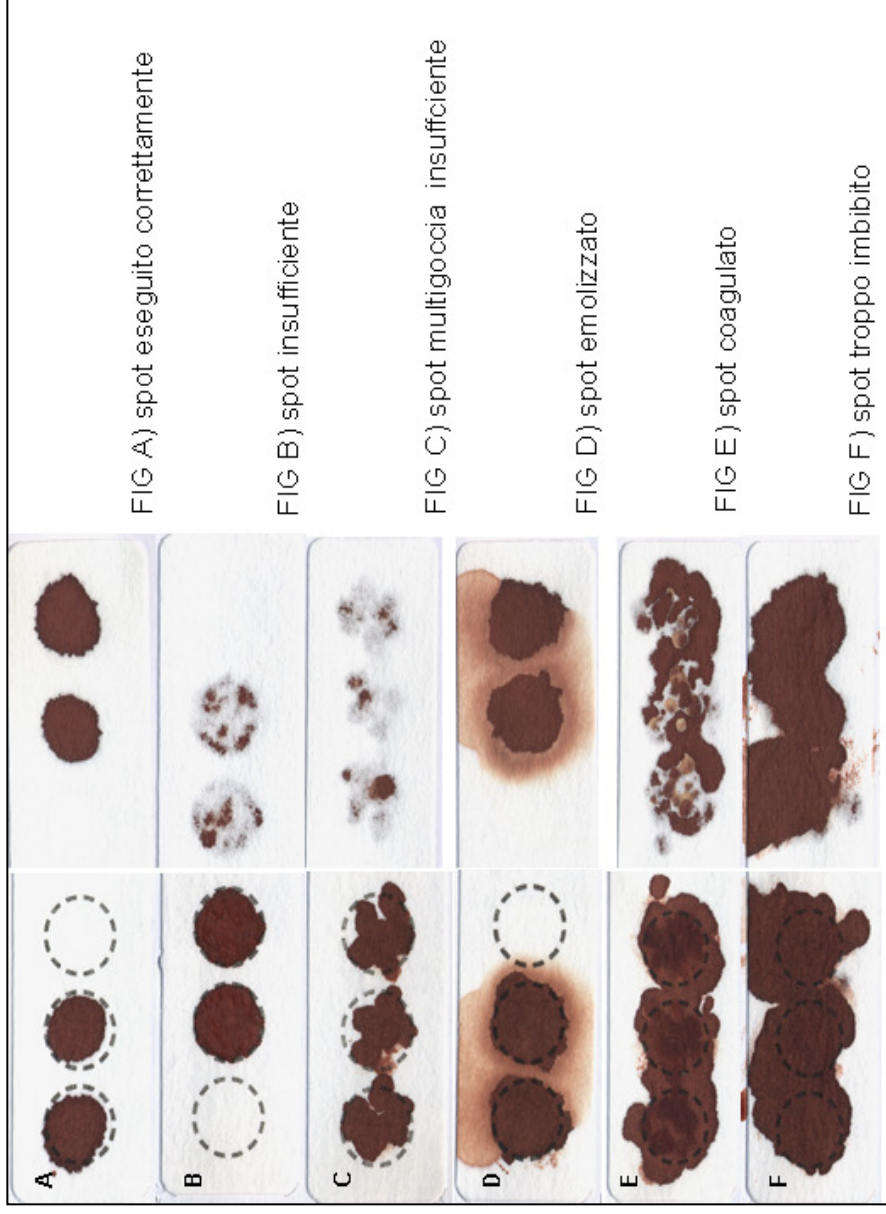
valutazione epidemiologica e revisione delle malattie soggette a screening

Pre-analitica: Controllo dei cartoncini



Verifica della qualità degli spot

Pre-analitica: Cartoncini non idonei



Campioni non idonei:

- campioni insufficienti → falsi negativi (campione diluito)
- campioni troppo abbondanti → falsi positivi (campione troppo concentrato)
- campioni non asciutti → falsi negativi (campione diluito)

Criticità: I campioni non idonei

- **1,25%** (n=152) campioni non idonei
- 74% per campione insufficiente
- Ripetizione in 4-5° giornata di vita

=

Elevato rischio di ritardo diagnostico e/o
misdiagnosi

Test



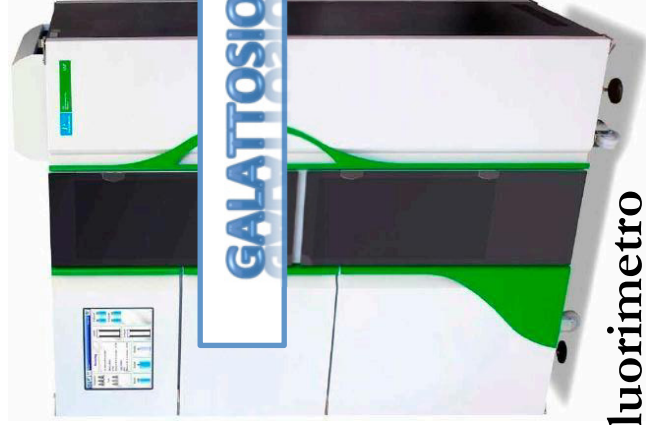
BIOTINIDASI

**4 ENZIMI
LISOSOMIALI**

GALATTOSIO

TSH

**11 AMINOACIDI
E
31 ACILCARNITINE**



Fluorimetro



**Spettrometro di
massa tandem**

Analisi dei risultati

Line	Well	CodeStr	Role	Result Status	All Flags	Age at collection	Collection	Weight	gestation	ædin Type	Blood anfsusk	dLeu Conc	Phe Conc µmol/L	Phe/Tyr	Tyr Conc µmol/L	d5a Conc	Ala Conc µmol/L	Arg Conc µmol/L	Cik Conc µmol/L	
28	C04	9462987561	Patient	OK		2	3/16/2	3295	40	No	0	144.82	67.7	0.65	103.5	0.46	205.65		5	14
29	C05	9462987562	Patient	OK		2	3/16/2	2495	37	No	0	108.44	50.6	0.63	80.4	0.42	246.37		3	11
30	C06	9462987563	Patient	OK		2	3/16/2	3635	39	No	0	96.56	41.2	0.49	84.5	0.48	167.88		5	7
31	C07	9462987616	Patient	OK		2	3/17/2	4000	41	No	0	174.45	70.0	0.69	101.2	0.38	337.67		22	21
32	C08	9462987631	Patient	OK		2	3/17/2	2720	35	No	0	95.37	61.8	0.39	156.6	0.38	209.43		11	14
33	C09	9462987603	Patient	OK		2	3/17/2	2955	38	No	0	153.84	60.0	0.58	103.0	0.44	166.29		15	12
34	C10	9462987582	Patient	OK		0	3/15/2	2990	39	No	0	179.20	73.3	0.69	106.2	0.43	424.16		32	23
35	C11	9462987555	Patient	OK	Elevated:	1	3/16/2	3675	40	No	0	208.82	76.2	0.54	140.9	0.40	409.94		25	19
36	C12	9462987717	Patient	OK		1	3/16/2	3590	39	No	0	193.34	64.2	1.08	59.7	0.44	231.17		9	11
37	D01	9462987716	Patient	OK		1	3/16/2	3460	39	No	0	104.78	51.8	0.35	146.1	0.43	211.03		9	13
38	D02	9462987663	Patient	OK	Elevated:	1	3/16/2	3865	38	No	0	119.94	53.2	0.67	78.8	0.40	188.47		13	16
39	D03		Patient	OK		2	3/17/2	3430	40	No	0	143.18	71.4	0.59	121.9	0.46	220.55		13	17
40	D04		Patient	OK							0	153.76	60.4				279.34		29	13
41	D05		Patient	OK							0	193.12	82.3				246.62		21	16
42	D06	9462987558	Patient	OK							0	127.13	63.8				275.88		33	19
43	D07	9462987591	Patient	OK							0	153.47	69.1	0.49	142.4	0.45	248.25		9	14
44	D08	9462987622	Patient	OK							0	147.19	61.0	0.67	91.4	0.44	229.48		14	15
45	D09	9462987659	Patient	OK							0	127.84	51.3	0.74	69.3	0.43	215.41		11	9

Risultati

Parametri

neonato

ID

Campioni con risultati alterati:

- Ripetizione in doppio del test
- Per gli analiti che hanno bassa specificità vengono eseguiti ulteriori dosaggi sullo stesso cartoncino di screening (second tier test)

Second tier test

- Test di conferma
 - Viene eseguito in caso di positività allo screening MS/MS per analiti il cui risultato non è univoco (bassa specificità, overlap valori normali / valori patologici)
 - Analisi di marker specifici
- Utilizza lo stesso cartoncino dello screening (nessun richiamo)

Second tier test

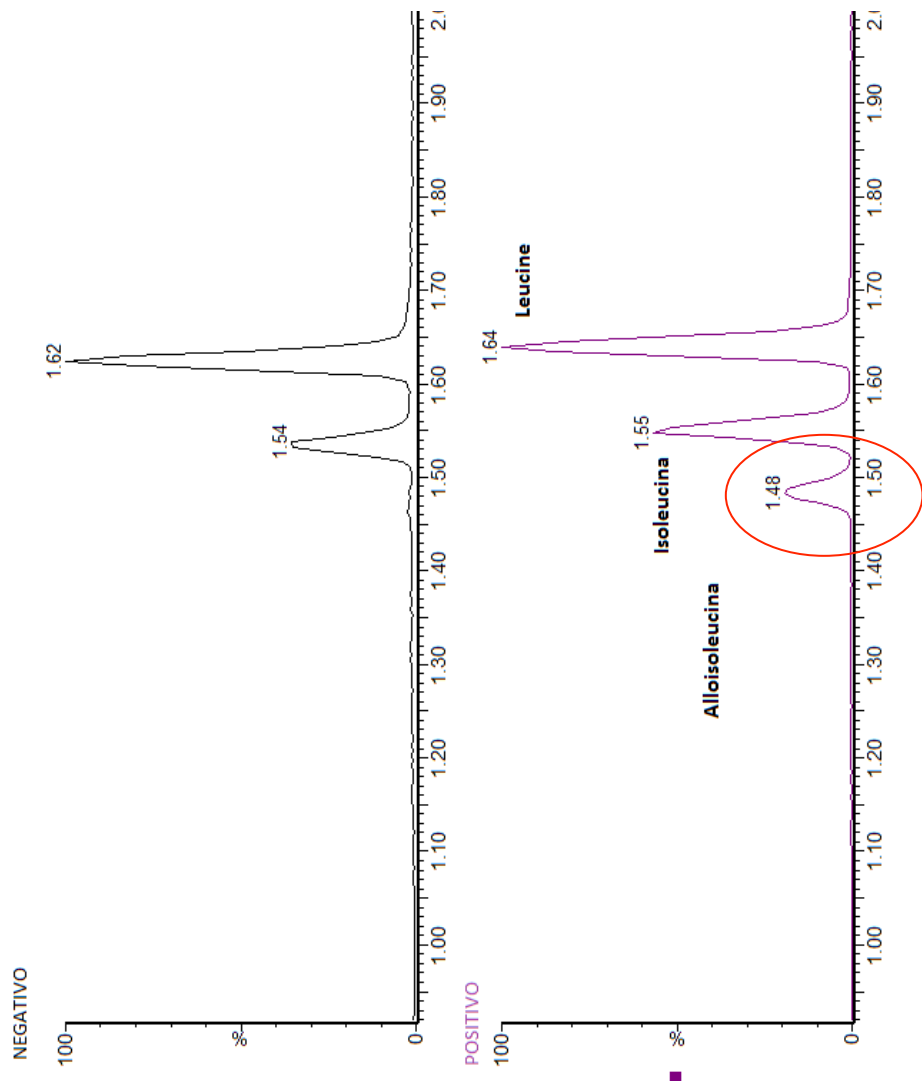
- **Aumenta:**
 - Specificità
 - Valore predittivo positivo (VPP)
- **Riduce:**
 - Richiami
 - Ansia dei genitori
 - Costi del follow-up

Second tier test

- Marker non specifici con elevata % di falsi positivi:
 - Leu/Ile/OH-Pro non specifico per MSUD
 - C5 marker non specifico per IVA
 - C3 marker non specifico per MMA, PA

MSUD

- Screening MS/MS:
 - Leu > 230 $\mu\text{mol/L}$
- Second tier test:
dosaggio ALLOISOLEUCINA



Isovalericarnitina C5

- C5 marker per Acidemia isovalerica IVA
- Acido pivalico (antibiotici) interferisce con l'analisi del C5
 - Falsi positivi per somministrazione materna di Ab contenenti acido pivalico

Propionilcarnitina C₃

- **Disordini legati al metabolismo dell'acido propionico**
 - Propionico acidemia PA
 - Metilmalonico acidemia MMA
 - Metilmalonico acidemia da deficit di cobalamina A, B, C e D
- **C₃ ridotta specificità: molti falsi positivi= molti richiami**
- **Soluzioni:**
 - Escludere patologie legate al C3
 - Aumentare i cut-off (rischio di falsi negativi)
 - Introdurre un second tier test:
 - Acido metilmalonico MMA
 - Acido metilcitrico MCA
 - Omocisteina tHCY

Propionilcarnitina C₃

Patologie	Screening	Second tier		
		MMA	MCA	HCY
PA	↑↑	N	↑↑	N
MUT	↑- ↑↑	↑↑	N	N
Cbl A,B	↑	↑	N	N
Cbl C,D	↑	↑	N	↑

Screening positivi

- Contatto telefonico + fax + referto online
- Fornite istruzioni su come procedere in base al rischio di scompenso, determinato dal valore del marker e dalla malattia sospettata
 - **Basso rischio:** richiesto un 2° cartoncino per controllo e/o campione di plasma, urine, prelievi da eseguire presso l'ospedale del punto nascita ed inviare al centro screening
 - **Alto rischio:** trasferimento del neonato in centro ad alta specializzazione

REGIONE DEL VENETO
AGENZIA REGIONALE DELLA SANITÀ
CORPORATO SUD ESTERNA LADISPOLI
LABORATORIO REGIONALE DI DIAGNOSTICA
LABORATORIO REGIONALE DI DIAGNOSTICA
Sede: Via dell'Industria, 15 - 31043 LADISPOLI (TV) - Tel. 0422/865311

LABORATORIO REGIONALE DI DIAGNOSTICA
Via dell'Industria, 15 - 31043 LADISPOLI (TV) - Tel. 0422/865311

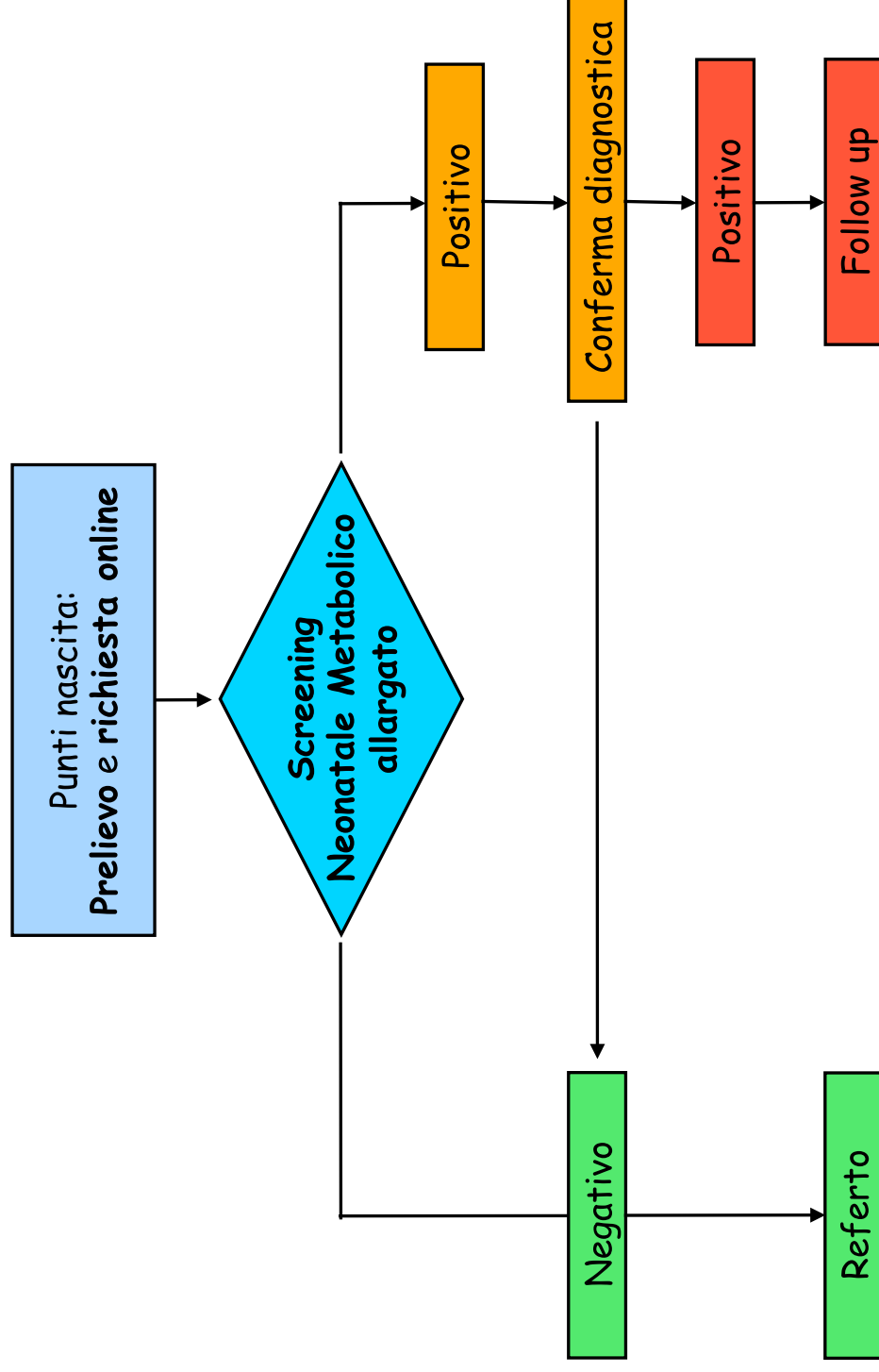
MALATTIE METABOLICHE EREDITARIE
In ereditarietà - Fax: 0422/865311

SCREENING NEONATALE METABOLICO ALLUNGATO
Pannello di 10 marker metabolici

Nome: ... Cognome: ...
Data di nascita: ...
Sesso: ...
Codice di nascita: ...
Codice di laboratorio: ...

Marker	Valore	Intervallo di Riferimento
TG	...	0.0 - 0.5
CA	...	0.0 - 0.5
...

Percorso operativo



Screening positivi: conferma
diagnostica

Screening positivi sono sottoposti ad indagini
di conferma :

- **Biochimiche (6/7 gg lavorativi)**

Aminoacidi plasmatici

Acidi organici su urine

Acilcarnitine

Carnitina

- ◆ **Molecolari**

Programma di screening neonatale

PUNTI NASCITA

*informazione ai genitori e raccolta consenso informato (screening dipendente)
raccolta e spedizione del campione*

LABORATORIO DI SCREENING

*procedure di laboratorio
conservazione del campione
comunicazione dello screening positivo
assicurazione di qualità dei risultati
conferma della diagnosi*

PRESA A CARICO DEL PAZIENTE

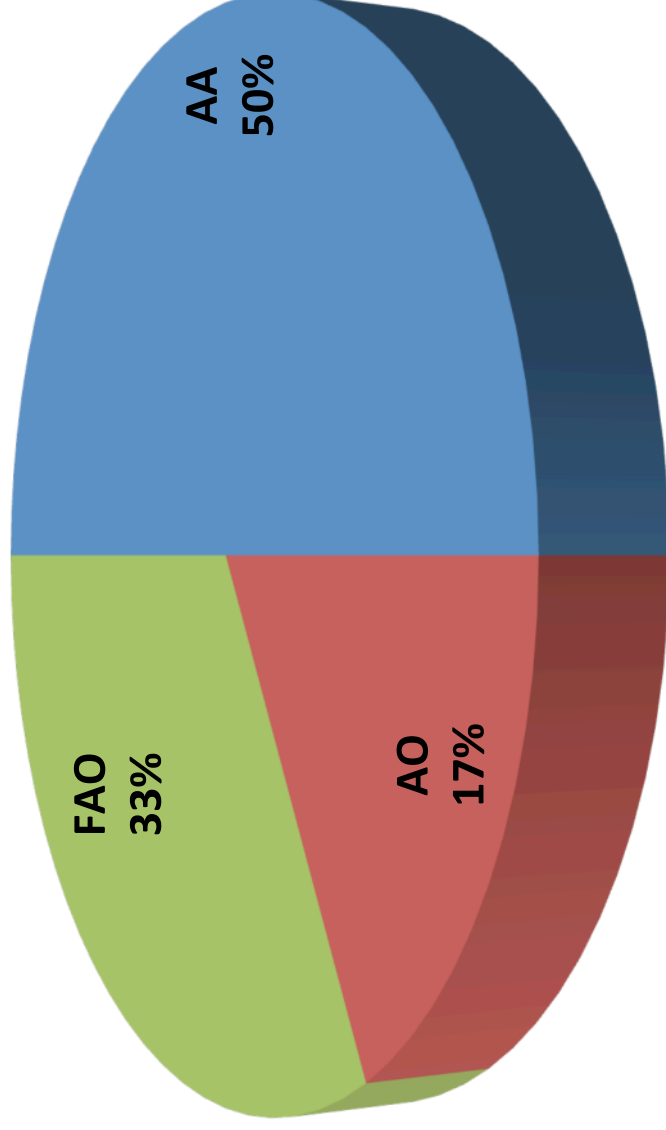
VALUTAZIONE DEL PROGRAMMA DI SCREENING

valutazione epidemiologica e revisione delle malattie soggette a screening

Attività 2014-2017 (I semestre)

104.673 Neonati (Veneto - Trentino - FVG)

36 neonati con patologia metabolica



Incidenza 1 : 2.908

Screening positivi: Aminoacidemie

Malattia		Totale	Incidenza
Fenilchetonuria	PKU	5	1 : 20935
Iperfenilalaninemia	HPHE	8	1 : 13084
Citrullinemia	CIT	2	1 : 52337
Tirosinemia tipo I	TYR I	0	
Tirosinemia tipo III	TYR III	1	1 : 104673
Leucinosi	MSUD	0	
Argininsuccinico aciduria*	ASA	2	1 : 52337

*a pannello da gennaio 2017

Incidenza 1 : 5.815

Screening positivi: Acidurie Organiche

		Totale	Incidenza
Malattico aciduria	PA	1	1 : 104673
Metilmalonico aciduria	MMA	1	1 : 104673
Difetti Cobalamina (A, B, C e D)	Cbl A,B,C,D	1	1 : 104673
Isovalerico aciduria	IVA	0	
Glutarico aciduria I	GAI	1	1 : 104673
Def. 3-Metilcrotonil-CoA carbossilasi	3MCC	2	1 : 52337
Def. 3OH-3metilglutaril CoA sintetasi	HMG	0	

Incidenza 1 : 17446

Screening positivi: Difetti beta ossidazione

Malattia	Tot	Incidenza
Deficit del trasportatore di carnitina	CUD	4 1 : 26168
Deficit di carnitina-palmitoil transferasi I	CPT I	2 1 : 52337
Deficit di carnitina-palmitoil transferasi II / Deficit di carnitina-acilcarnitina translocasi	CPT II/ CACT	0
Deficit dell'acil-CoA deidrogenasi a catena media	MCAD	4 1 : 26168
Deficit dell'idrossiacil-CoA deidrogenasi a catena lunga	LCHAD	0
Deficit dell'acil-CoA deidrogenasi a catena molto lunga	VLCAD	1 1 : 104673
Deficit multiplo di acil-CoA deidrogenasi	GA II o MADD	1 1 : 104673

Incidenza 1 : 8.723

Patologie materne

Patologia materna	Metabolita alterato	Effetto	Durata dell'alterazione
PKU o iperfenilalaninemi e non controllate dalla dieta o dai farmaci	Aumento della Phe, normale il rapporto Phe/Tyr	Iperfenilalaninemia transitoria (falso-positivo)	12-24 ore, a meno che anche il neonato non sia affetto da PKU
Deficit di 3-MCC	Aumento di C5OH Bassi livelli di carnitina (C0)	Falso positivo	Sconosciuta
Steatosi epatica gravidica o sindrome HELLP (hemolysis, elevated liver enzymes, low platelets)	Possibile aumento di acilcarnitine a lunga catena	Falso positivo	Sconosciuta
Deficit di carnitina	Bassi livelli di carnitina	Falso positivo	Sconosciuta
Deficit di vitamina B12	Aumento della propionilcarnitina (C3)	Falso positivo	Legata all'alimentazione (dieta vegetariana)
Uso di antibiotici contenenti acido pivalico	Aumento di isovalerilcarnitina (C5)	Falso positivo	Anche a terapia sospesa

Incidenza 1 : 6.674 (5 CUD, 2 GA tipo I, 2 MCC, 3 deficit B₁₂)

Lo screening neonatale esteso in FVG: Pannello malattie



Screening neonatale esteso in FVG

Aprile 2016 – Luglio 2017 :

12.116 neonati



Richiami:

1.11% per IC

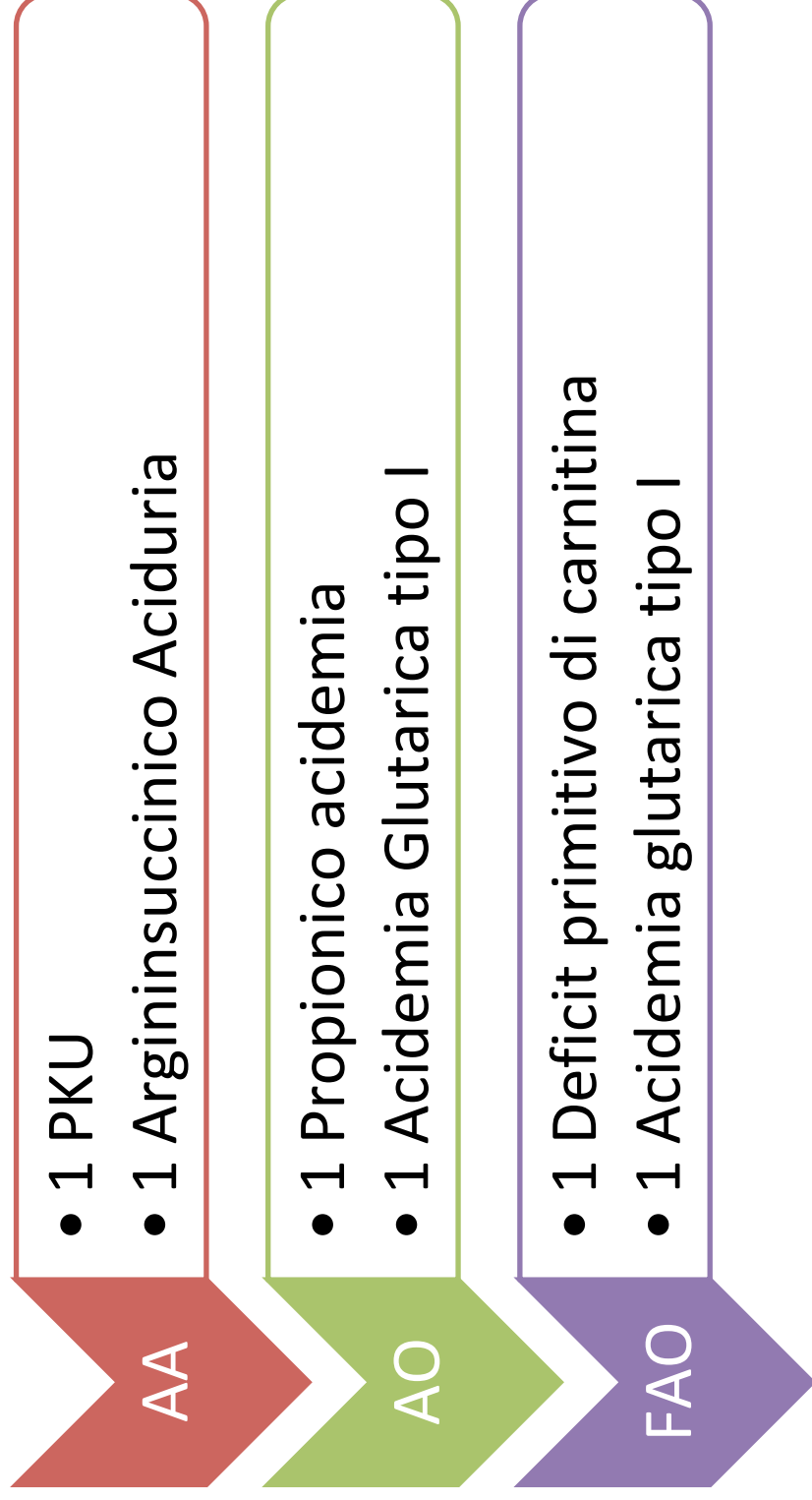
0.09% Galattosemia

0.12% Biotinidasi

0.66 % Esteso *

* Padova : 0,88 % (2015) , Verona : 2,48 % (2015) .Dati SIMMESN

Lo screening neonatale allargato: neonati positivi



Incidenza 1:2.019

Screening Def. Biotinidasi e Galattosemia

- Def. Biotinidasi
-> 1 difetto parziale
- Galattosemia
-> 0

A che età il neonato è stato richiamato?



Prelievo eseguito in 4 giornata

Età media richiamo : **6 giorni di vita**

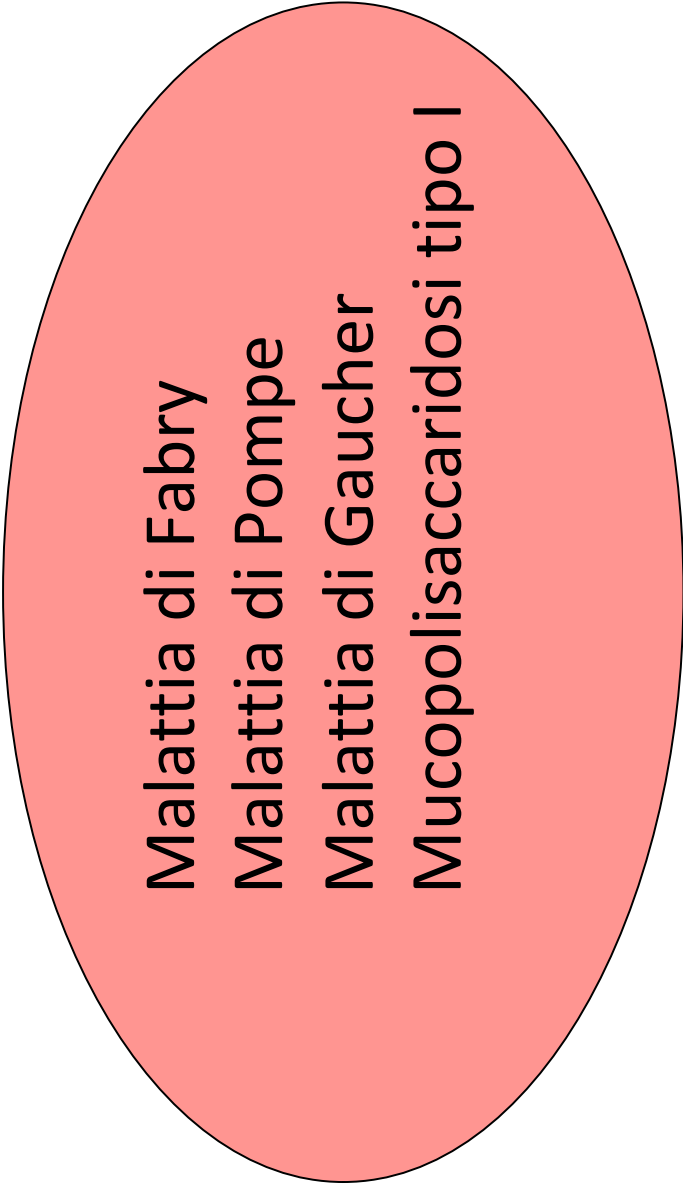
Range 3 – 8 giorni

TEMPI DELLA DIAGNOSI : LA SVOLTA

Malattie Metaboliche Ereditarie	Diagnosi	Soggetti	Tempo nascita/DIAGNOSI
Aminoacidopatie	Fenilchetonuria	13	5 giorni
	Citrullinemia	2	3 giorni
	Iperomocistinemia	1	5 giorni
	Tirosinemia Tipo III	1	7 giorni
	Arginosuccinico Aciduria	1	3 giorni
Acidurie Organiche	Acidemia Glutarica di Tipo I	1	5 giorni
	Acidemia Metilmalonica	1	4 giorni
	3-Metilcrotonilglicinuria	2	7 giorni
	Deficit Primitivo di Carnitina	4	7 giorni
	Deficit di Carnitina Palmitoil Transferasi I	1	3 giorni
Beta-Ossidazione	Deficit dell' acil-CoA deidrogenasi a catena media	4	4 giorni
	Deficit dell' acil-CoA deidrogenasi a catena molto lunga	2	5 giorni
	Acidemia Glutarica di tipo II	1	5 giorni

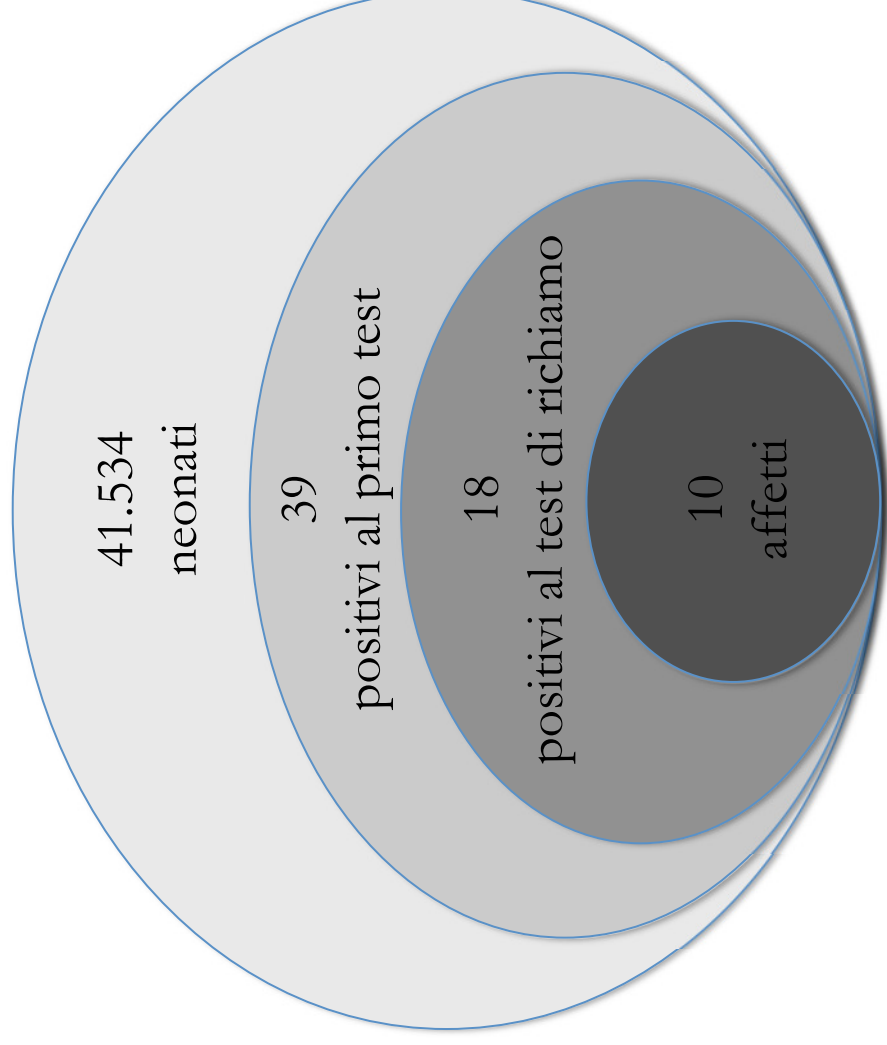
MALATTIA	COSA DEVE FARE IL PEDIATRIA
MSUD	Trasferimento immediato Centro Metabolico
TIROSIMEMIA TIPO I	Asintomatica – Ricovero Immediato
FENILCHETONURIA	Asintomatica – Contattare Centro
MCAD-LCAD-LCHAD	Asintomatica – Contattare centro Letargico – Ricovero Immediato
VLCAD	Asintomatica – Contattare cento Letargico – Ricovero Immediato
ACIDEMIA ISOVALERICA	Trasferimento immediato- Centro metabolico
GLUTARICO ACIDURIA TIPO I	Trasferimento immediato- Centro metabolico
METILMALONICO/PROPIONICO ACIDEMIA	Trasferimento immediato- Centro metabolico
DEFICIT DI COBALAMINA	Trasferimento immediato- Centro metabolico
CPT I /CPT II/DEFICIT CARNITINA	Asintomatica – Contattare Centro
DEFICIT DI 3 METIL GLUTARIL CoA LIASI	Trasferimento immediato-Centro Metabolico

- Da settembre 2015 avvio Fase II per le seguenti patologie lisosomiali:



Malattia di Fabry
Malattia di Pompe
Malattia di Gaucher
Mucopolisaccaridosi tipo I

Risultati dello screening



2 Gaucher, 2 Pompe, 5 Fabry, 1 MPS

Indagini di conferma

Malattia	Indagini
Gaucher	<ul style="list-style-type: none">• Dosaggio su leucociti^c• Analisi mutazionale• Dosaggio GlcSph^b
Pompe	<ul style="list-style-type: none">• Dosaggio su leucociti^c• Analisi mutazionale• CPK, AST,ALT, LDH• ECG
Fabry^a	<ul style="list-style-type: none">• Dosaggio su leucociti^c• Analisi mutazionale• Dosaggio LysoGB3^b
MPS I	<ul style="list-style-type: none">• Analisi mutazionale

^a anche nella madre

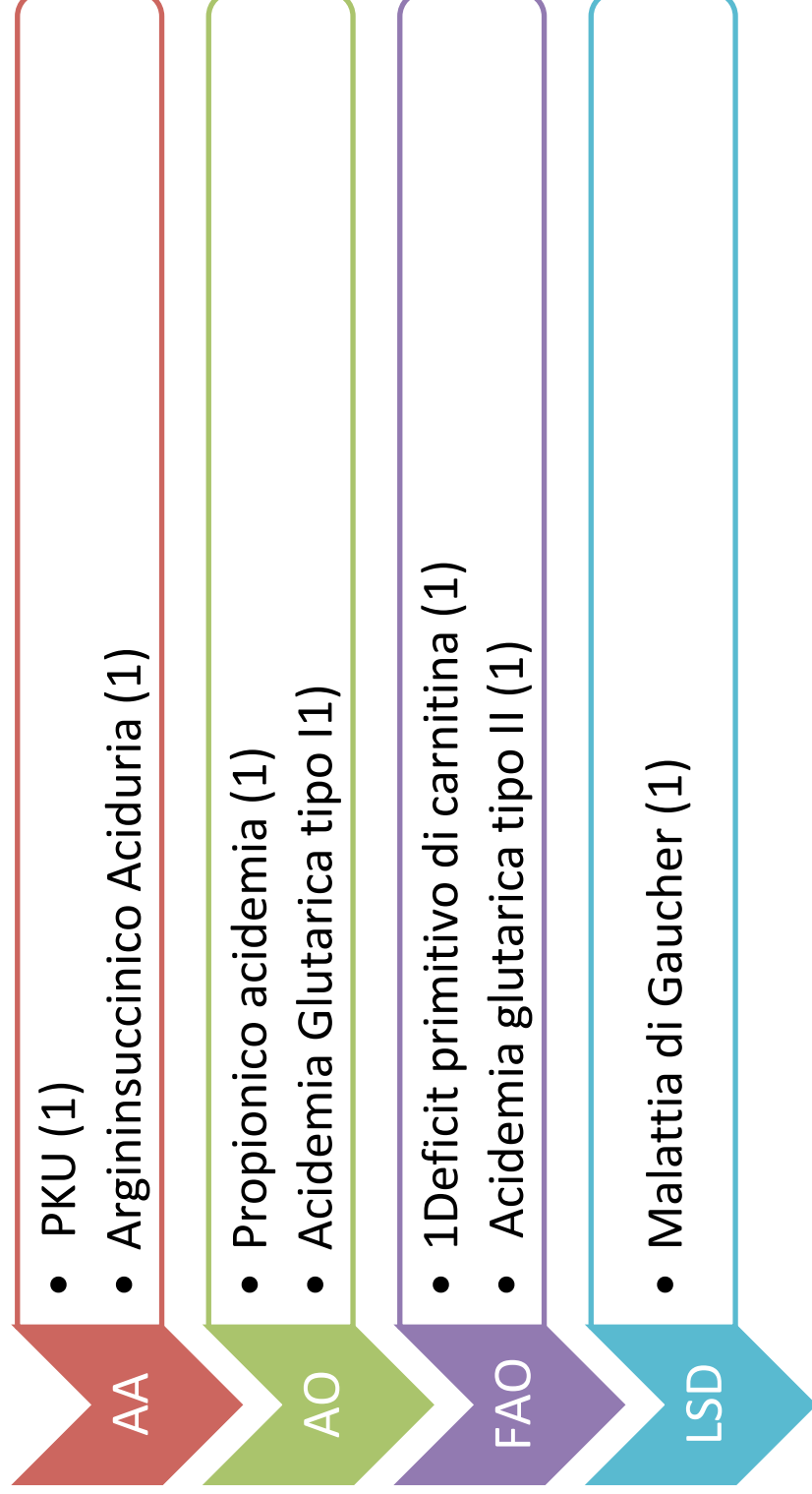
^b su spot di sangue mediante MS/MS

^c dosaggio attività enzimatica su leucociti mediante metodo fluorimetrico

Enzyme / LSD	ABG (Gaucher)	GAA (Pompe)	GLA (Fabry)	IDUA MPS I	Recall ^a	Total
Patients with positive initial newborn screening	9	8	6	13	4	40
Patients to undergo confirmatory testing	2	5	5	8	0	20
Patients with confirmed disorder	2	2	5	1	0	10
Pseudodeficiency	0	0	0	5	0	5
Variant of unknown significance	0	1	0	0	0	1
Carrier (carrier/wild type; carrier/pseudodeficiency)	0	2	0	2	0	4
Prevalence	22,205	22,205	8,881	41,534	-	4,153
lower limit	80,971	80,971	20,793	235,287	-	7,646
upper limit	6,089	6,089	3,793	7,332	-	2,256
PPV % (true positive/recalls %)	22,2	25	83,3	7,7		25

FVG incidenza 1 : 12.116

Lo screening neonatale allargato: neonati positivi



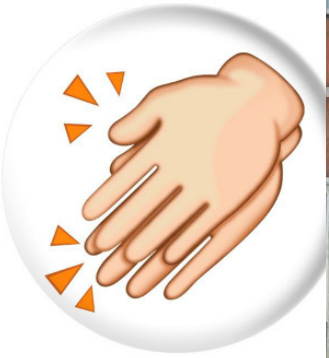
Incidenza 1:1.730

CONCLUSIONI

I have learned that **equally important** to new technologic methods are issues related to quality control, standardization, specimen choice and collection, result interpretation, patient follow-up, and genetic counseling/education.

D H Chace, Clinical Chemistry 49, No. 7, 2003





14-09-17 09:35