

Le nuove frontiere dello screening neonatale: l'era della "tandem mass"

Carlo Corbetta

U.O.C. Laboratorio di Riferimento Regionale per lo Screening Neonatale, A.O. Istituti Clinici di Perfezionamento, Ospedale dei Bambini "Vittore Buzzi", Milano

ABSTRACT

New trends in newborn screening: the tandem-mass era. Today, the newborn screening programs are one of the most important activities in preventive medicine, with the aim to protect the pediatric population health. Since 1963 - when Robert Guthrie developed the first blood test for the newborn screening of phenylketonuria - a number of diseases and technologies were proposed and selected for newborn screening programs. The initial newborn screening organizing criteria (WHO 1968) have been modified in the last ten years, following the evolution of new technologies for blood analysis and the new notion and definition of health; consequently, the era of expanded newborn screening is started. The tandem-mass spectrometry is the most important example, allowing the evaluation and measurement in the same neonatal sample and with the same technology of markers for different rare diseases (aminoacidopathies, fatty acids oxidation defects, organic acidemias). In the last years, following the recommendations of the American College of Medical Genetics and the American Association of Pediatrics, programs were started in North America, Australia and Europe. The obtained results are positive for efficiency (clinical sensitivity and specificity) and for efficacy (positive cost/benefit ratio); moreover, the number of investigated diseases included in the screening panel has significantly increased.

INTRODUZIONE

Il termine "screening neonatale" definisce i programmi di medicina preventiva secondaria, attivati su larga scala nei primi giorni di vita, aventi per obiettivo la selezione precoce ed il tempestivo trattamento di neonati ad alto rischio per alcune patologie congenite, curabili, caratterizzate principalmente da un'importante mortalità precoce e/o da una morbilità severa dei soggetti affetti.

Più di quarant'anni fa, nel 1963, un ricercatore americano, Robert Guthrie, mise a punto il primo esame di laboratorio (che ancora oggi porta il suo nome: "test di Guthrie"), che consentiva di misurare la concentrazione dell'amminoacido fenilalanina in una goccia di sangue, prelevata mediante puntura del tallone del neonato, fatta assorbire e quindi essicare su una speciale carta da filtro ("Guthrie card") (1). Questo esame, a basso costo ed eseguibile facilmente su larga scala, ha consentito di realizzare le prime campagne di screening neonatale per individuare i neonati affetti da fenilchetonuria (PKU), il più comune errore congenito del metabolismo, caratterizzato da un grave ritardo mentale.

In una successione temporale ormai storica, alla fenilchetonuria si aggiunsero, fra le patologie con indicazione assoluta per lo screening neonatale, l'ipotiroidismo congenito e, nei successivi quarant'anni di sviluppo, altre numerose malattie, principalmente genetiche, quali endocrinopatie, errori congeniti del metabolismo ed emoglobinopatie.

Tradizionalmente, i programmi di screening neonatale utilizzano come indicatori biologici di patologia analiti, principalmente ematici, la cui misura quantitativa o valutazione qualitativa permette, con sufficiente efficienza, la

selezione dei soggetti a maggior rischio presenti nella popolazione neonatale. In alcuni programmi, l'analisi di laboratorio è rivolta alla misura di substrati accumulati nei liquidi biologici, con differenti meccanismi: a) alterata utilizzazione o trasformazione, da deficit enzimatico, di un substrato in un processo biochimico (PKU: fenilalanina; galattosemia: galattosio; iperplasia surrenalica congenita: $17\text{-}\alpha$ OH progesterone); b) ostruzione meccanica (fibrosi cistica: tripsina immunoreattiva); c) attivazione fisiologica di un fenomeno di "feedback" [(ipotiroidismo: ormone tiroideo-stimolante (TSH)]. In altri, è la carenza/riduzione di un substrato l'indicatore di una situazione di rischio (ipotiroidismo: tiroxina) o, ancora, è la presenza di metaboliti anomali, assenti in condizioni fisiologiche (emoglobinopatie). Infine, lo screening può essere condotto mediante la misura o valutazione qualitativa di una specifica attività enzimatica (galattosemia: attività dell'enzima galattosio-1-P-uridiltransferasi). Nei primi giorni di vita esiste una "cronologia" delle concentrazioni dei singoli marcatori, che risentono fortemente delle modificazioni biologiche che avvengono, con il passare delle ore, nel delicato periodo perinatale d'adattamento biochimico alla vita autonoma: il momento della raccolta del campione per screening neonatale deve essere quindi opportunamente scelto in finestre temporali che garantiscano, in presenza della patologia, concentrazioni ottimali per la misura/valutazione dell'analita al fine d'ottenere l'efficienza (sensibilità + specificità) massima del sistema.

Vi è oggi un largo consenso internazionale nel considerare gli screening neonatali di massa come un modello per tutti gli screening di popolazione; per valutazione comune, essi rappresentano un intervento essenziale,

insieme ai programmi di prevenzione della malnutrizione e delle infezioni, per assicurare il migliore "outcome", in termini di salute, alla popolazione neonatale. Vi è sicuramente un parallelismo fra importanza dello screening neonatale ed evoluzione economica e sociale: lo screening neonatale è tanto più importante quanto più avanzato è il livello economico e sociale della popolazione e come la struttura familiare evolve da un modello di famiglia di grandi dimensioni, con alta morbilità e mortalità infantile (tipico dei paesi meno avanzati), a modelli di più ridotte dimensioni (basso indice riproduttivo) ed a migliorata sopravvivenza infantile (2).

L'EVOLUZIONE DELLO SCREENING NEONATALE

Alla fine degli anni '60, l'OMS, in un'ottica di valutazione centrata, però, principalmente sulle malattie croniche dell'adulto, definì i principi ed i criteri per le patologie selezionabili come obiettivi dei programmi di screening di massa in età neonatale (3). Questo modello è oggi pressoché universalmente considerato superato: le sue principali criticità sono quelle di non considerare il significato familiare dello screening neonatale, in particolare il valore dell'informazione genetica, e la valenza positiva che la comunicazione precoce postnatale di una malattia, anche incurabile, può avere nel percorso di gestione familiare di una malattia congenita (problema della cosiddetta "odissea diagnostica").

Dagli anni '60, l'evoluzione tecnologica ha offerto sempre maggiori possibilità di ampliare le tecniche di laboratorio applicate allo screening neonatale, fornendo la possibilità d'utilizzare – su larga scala – un numero sempre maggiore di biomarcatori per la selezione di malattie. Dagli anni '90 si afferma progressivamente la possibilità di superare il concetto "un marker, una malattia" per raggiungere il modello tecnico-organizzativo "più marcatori simultanei per molte malattie": una nuova visione multiparametrica o di piattaforma analitica nell'esecuzione laboratoristica dello screening, che tende a modificare la struttura dei programmi di screening neonatale. La tecnologia che oggi meglio risponde a questa visione è quella di spettrometria di massa ("tandem mass spectrometry"), che fu sviluppata per merito dei ricercatori della Duke University e del "Newborn Screening Laboratory" (North Carolina, USA) sul finire degli anni '80 (4).

Una nuova tecnologia per lo screening neonatale: la "tandem mass spectrometry"

La spettrometria di massa è una tecnica che identifica e quantifica le molecole in base alla loro massa o PM, caratteristica determinata dalla composizione elementare della molecola, mentre alla struttura atomica della molecola sono legate altre caratteristiche fisiche e chimiche della stessa (polarità, pKa, volatilità). Uno spettrometro di massa (MS) è costituito essenzialmente da una camera di ionizzazione o sorgente, un analizzatore di massa ed un rivelatore: l'insieme consente di analizzare

le molecole in base al loro rapporto massa/carica (m/z). L'introduzione delle molecole d'interesse nello MS avviene attraverso tecniche (diverse) di ionizzazione: per misurarne la massa, una molecola deve essere presente in fase gassosa (vaporizzazione) e deve possedere, per essere separata e rilevata, una carica. Poiché migliaia di molecole possono essere presenti in miscele complesse (come quelle derivate dai liquidi biologici) e più molecole ionizzate intatte possono presentare lo stesso PM, il sistema analitico deve prevedere un apparato aggiuntivo di separazione, generalmente costituito da un sistema cromatografico, in fase gassosa (GC) o liquida (LC), che consente di ottimizzare l'identificazione degli ioni molecolari e gli ioni "frammento", ossia il risultato della divisione di uno ione molecolare, che si dissocia se sottoposto ad un sufficiente flusso di energia e/o ad un processo di collisione con altre molecole. L'uso associato di due spettrometri di massa (MS/MS o "tandem mass") è un'ulteriore evoluzione delle tecniche di spettrometria di massa e rende possibile il controllo del processo di formazione degli ioni molecolari e degli ioni frammento. Lo strumento misura la massa delle molecole intatte nel primo spettrometro (MS 1), li sottopone a frammentazione nella successiva cella di collisione e quindi misura la massa di questi frammenti nel secondo spettrometro (MS 2), mediante differenti tecniche di valutazione della frammentazione. Tra le più utilizzate, troviamo quelle di "neutral loss scan" (scansione ioni neutri), "multiple reaction monitoring" (MRM) (monitoraggio reazioni multiple ioni frammento) e "parent ion scan" (scansioni ioni precursori) (5). Lo sviluppo di metodi moderni di ionizzazione delle molecole ha consentito la realizzazione di analizzatori evoluti, fra i quali nei laboratori clinici sono comunemente utilizzati quelli che abbinano la spettrometria di massa in tandem (MSMS) alla ionizzazione cosiddetta "electro-spray ionization" (ESI) (ionizzazione a elettrospray) ed alla separazione in LC: l'acronimo identificativo di tale strumentazione è ESI-LC-MSMS.

Storicamente, le tecniche in LC, GC e gas cromatografia-spettrometria di massa (GC-MS) sono risultate essenziali per la diagnosi biochimica di un errore congenito del metabolismo, in particolare per quelli a carico del metabolismo intermedio (amminoacidopatie, acidemie organiche e difetti del ciclo dell'urea); la possibilità, inoltre, di misurare le carnitine (totali ed esterificate) con tecniche principalmente radiochimiche ha poi consentito ai laboratori specializzati di migliorare le possibilità di identificazione delle acidemie organiche e di introdurre una più facile metodologia per evidenziare i difetti dell'ossidazione degli acidi grassi, altro capitolo di patologie di grande interesse e rilievo nell'età infantile e pediatrica.

L'introduzione nei laboratori clinici, avvenuta sul finire degli anni '80, della tecnologia della "tandem mass spectrometry" ha di fatto consentito una relativa semplificazione del processo diagnostico, attraverso la valutazione e/o la misura (simultanea o sequenziale) di amminoacidi ed acilcarnitine nello stesso campione biologico. Il passo successivo, ossia l'applicazione delle tecniche in ESI-LC-MSMS al campione speciale, già usualmente utilizzato per lo screening neonatale [campione DBS

("dried blood spot") o "Guthrie card"], ha permesso una potenziale drammatica espansione del numero di patologie tecnicamente affrontabili con politiche di screening neonatale, aprendo la possibilità di valutare simultaneamente, con la stessa azione tecnica, gruppi di malattie rare, singolarmente non rispondenti ai criteri di selezione delle patologie per i programmi di screening neonatale. Si è resa tecnicamente possibile la selezione, in un'unica seduta analitica e su un unico campione biologico ("Guthrie card"), di numerosi errori congeniti del metabolismo (amminoacidopatie, difetti del metabolismo degli acidi grassi, acidemie organiche) (6,7).

In effetti, molte caratteristiche della tecnologia "tandem mass spectrometry" la rendono particolarmente idonea per la realizzazione di programmi di screening neonatale:

1. elevatissima sensibilità: consente di utilizzare i campioni DBS con volume ematico estremamente ridotto;
2. alta velocità analitica: ciclo analitico di circa 2–4 min/campione;
3. elevata automazione del processo analitico;
4. elevata produttività;
5. ridotto costo per campione analizzato.

La visione attuale dei programmi di screening neonatale

Questa evoluzione tecnologica, unita alle criticità prima già emerse, ha reso necessario l'aggiornamento dei criteri utilizzati per l'inclusione delle singole patologie in un pannello generale di screening. Numerosi gruppi di lavoro internazionali ("National Academy of Sciences", USA; "Human Genetics Society of Australasia"; "Health Technology Assessments Programme", UK) hanno proposto successive revisioni ed integrazioni del contesto iniziale, definito sul finire degli anni '60, al fine di renderlo più adeguato al progresso tecnologico e scientifico, alla nuova definizione di salute (stato di completo benessere fisico, psichico e sociale e non solo mera assenza di malattia), alla migliore conoscenza di molte malattie metaboliche geneticamente determinate, alle migliorate opzioni di trattamento terapeutico efficace e alle nuove possibilità di diagnosi prenatale nelle famiglie a rischio.

I punti principali di questa nuova visione possono essere così riassunti (8):

- lo screening neonatale è una responsabilità essenziale del sistema sanitario pubblico ed è un fattore critico per migliorare lo stato di salute del bambino ammalato;
- le politiche di screening neonatale dovrebbero essere prioritariamente guidate dalla valutazione di quale sia il miglior interesse per il bambino ammalato, con considerazione secondaria per gli interessi degli altri soggetti coinvolti (neonati "sani", famiglie, aree professionali, autorità politico-sanitaria);
- le raccomandazioni circa l'appropriatezza di una patologia per una sua inclusione in un programma di screening neonatale dovrebbero essere basate su criteri d'evidenza scientifica e di largo consenso professionale.

Nel 2002, negli USA, gli uffici governativi di "Maternal and Child Health Bureau" (MCHB), "Health Resources and Services Administration" (HRSA), "United States Department of Health and Human Services" (DHHS) hanno affidato all'"American College of Medical Genetics" (ACMG), in collaborazione con l'"American Academy of Pediatrics" (AAP), il compito di condurre un'analisi globale sull'efficacia dei programmi di screening neonatale (9). Il gruppo di lavoro interdisciplinare (che si è avvalso di una cooperazione internazionale) ha concentrato la propria azione sui seguenti punti: a) raccogliere le migliori evidenze della letteratura sull'idoneità, rispetto allo screening, di specifiche patologie; b) elaborare raccomandazioni per la costituzione di un pannello uniforme di patologie idonee per lo screening neonatale; c) analizzare tutte le altre componenti di un "sistema" di screening neonatale, che risultino critiche per il raggiungimento di esiti positivi nei soggetti interessati dai programmi stessi.

Per ogni condizione o patologia conosciuta e rilevata in età neonatale e pediatrica sono quindi stati definiti alcuni criteri fondamentali, sostitutivi di quelli dell'OMS, raggruppabili in tre principali categorie di classificazione:

1. la disponibilità e le caratteristiche dell'esame di screening;
 2. la disponibilità e la complessità dei servizi diagnostici necessari;
 3. la disponibilità e l'efficacia dei trattamenti terapeutici relativi alle singole condizioni.
- Ogni condizione è stata considerata in funzione di:
1. caratteristiche cliniche:
 - a. incidenza della condizione,
 - b. segni e sintomi clinicamente identificabili nelle prime 48 ore di vita,
 - c. sviluppo della patologia (storia naturale in assenza di trattamento);
 2. disponibilità e caratteristiche analitiche dell'esame di screening:
 - a. disponibilità di un algoritmo analitico sensibile e specifico,
 - b. applicabilità dell'esame sui campioni neonatali ("Guthrie card") o in tipologie alternative di campione o attraverso procedure semplici, di facile applicazione nelle "nursery",
 - c. applicazione dell'esame in una piattaforma analitica che offre alte capacità di volume analitico,
 - d. costo economico contenuto,
 - e. analisi multiple per singola condizione, effettuabili nello stesso ciclo analitico,
 - f. possibilità d'identificare condizioni secondarie multiple o altre condizioni;
 3. diagnosi, "follow-up", trattamento e gestione medica complessiva:
 - a. disponibilità di trattamento,
 - b. costo del trattamento,
 - c. efficacia potenziale dei trattamenti disponibili,
 - d. beneficio individuale dell'intervento precoce,
 - e. benefici familiari e sociali dell'identificazione precoce,
 - f. prevenzione della mortalità per diagnosi e tratta-

mento precoce,

- g. gestione in fase acuta,
- h. semplicità dell'intervento terapeutico.

In base ai risultati di questa prima fase d'analisi, ognuna delle condizioni valutate è stata assegnata ad una delle seguenti categorie:

1. pannello principale di condizioni ("core panel");
2. condizioni secondarie ("secondary targets"): condizioni che nel processo di screening sono parte della diagnosi differenziale di una condizione del pannello principale;
3. condizioni non appropriate (allo stato attuale delle conoscenze) per un programma di screening neonatale: inesistenza di un esame di screening idoneo ed affidabile, punteggio di valutazione insufficiente per altri criteri di valutazione.

Per essere inclusa nel pannello principale ogni condizione deve rispondere ai seguenti criteri minimi:

- deve essere possibile l'identificazione in un periodo di tempo (24–48 ore di vita) nel quale non è comunemente individuabile clinicamente;
- è disponibile un esame sensibile e specifico;
- vi sono dimostrati benefici, derivanti da una precoce identificazione della condizione, da un tempestivo intervento medico, da un efficace trattamento.

Sono state considerate 84 condizioni congenite (endocrinopatie, emoglobinopatie, malattie infettive, amminoacidopatie, alterazioni del metabolismo dei carboidrati, difetti dell'ossidazione degli acidi grassi, malattie lisosomiali, acidemie organiche, altre condizioni genetiche), candidate potenziali per un programma di screening neonatale e, ad ognuna di esse, è stato attribuito un punteggio di valutazione, derivante dalla somma dei punteggi attribuiti dal gruppo di lavoro, in base al grado di corrispondenza della singola condizione ai criteri prima rappresentati.

Ogni condizione che raggiunga un punteggio finale (validato, in termini d'evidenza scientifica) pari o superiore a 1200 punti può essere selezionata come appropriata per un programma di screening neonatale. In base a ciò, sono state selezionate 29 condizioni costitutive il pannello principale, ognuna delle quali, a giudizio degli esperti ed in base alle evidenze scientifiche disponibili, è caratterizzata da:

1. esame di screening specifico e sensibile;
2. ben conosciuta storia naturale della malattia;
3. disponibilità di un efficace trattamento terapeutico.

Il pannello principale (punteggio >1200) comprende 9 acidemie organiche, 5 difetti dell'ossidazione degli acidi grassi, 6 amminoacidopatie, tutte identificabili attraverso le nuove tecnologie basate sull'utilizzazione della "tandem mass", a cui si associano 3 emoglobinopatie e 6 altre differenti condizioni (ipotiroidismo congenito, deficit di biotinidasi, iperplasia surrenalica congenita, galattosemia classica, sordità, fibrosi cistica), identificabili con tecnologie analitiche differenti (Tabella 1).

Il pannello secondario comprende 25 patologie (punteggio 1000-1200) derivate come "secondary targets" dalla diagnosi differenziale delle patologie precedentemente elencate ed è costituito da 6 acidemie organiche,

8 difetti dell'ossidazione degli acidi grassi, 8 amminoacidopatie, un'emoglobinopatia e due altre galattosemie (Tabella 1).

Le raccomandazioni conclusive, relative alla costituzione di un pannello di condizioni per lo screening neonatale, da applicarsi in ogni singolo stato americano, sono sintetizzabili nei seguenti quattro punti finali:

1. screening obbligatorio per tutte le condizioni elencate nel pannello principale;
2. obbligo di selezione per tutte le condizioni del pannello secondario e vincolo di segnalazione per ogni altro risultato anomalo (non negativo) di potenziale rilevanza clinica (inclusa la condizione di "carrier" genetico);
3. massimizzazione dell'uso di piattaforme analitiche multiparametriche (quali le tecnologie MSMS per lo screening degli errori congeniti del metabolismo);
4. considerazione che l'insieme dei benefici realizzabili attraverso politiche di screening neonatale si estende anche ad azioni o trattamenti che vanno oltre la valutazione della mortalità o morbilità infantile.

La diffusione dei programmi di screening metabolico allargato

La "tandem mass spectrometry" ha introdotto un progresso rivoluzionario nello screening e nella diagnosi degli errori congeniti del metabolismo consentendo a molti laboratori di screening nel mondo di estendere i pannelli in uso, sia includendo *ex novo* i difetti dell'ossidazione degli acidi grassi e le acidemie organiche, sia aumentando enormemente il numero di amminoacidopatie selezionabili con il programma. E' quindi iniziata l'era dei cosiddetti programmi di screening neonatale "esteso" o "allargato".

I dati della letteratura internazionale evidenziano un'ampia diffusione di questi nuovi programmi in molte aree geografiche. In Australia, lo screening neonatale mediante MSMS è stato progressivamente introdotto dal 1998, con estensione successiva anche alla Nuova Zelanda (10). Negli USA (l'area geografica a maggiore e più rapida affermazione), per effetto delle politiche federali che hanno reso obbligatoria l'introduzione progressiva di un pannello uniforme di screening neonatale esteso in tutti gli stati, l'indice di copertura della popolazione neonatale con programmi estesi ("core panel" >30 patologie) è passato dallo 0% dell'anno 2000 al 63% dell'anno 2006 (11) e, più recentemente (maggio 2008), solo in due stati non risultano ancora applicate politiche di screening neonatale esteso. In Europa, già nel 2003, i primi risultati dell'esperienza tedesca, condotta per 42 mesi in oltre 250.000 neonati, evidenziavano l'affidabilità della strategia basata sull'uso della "tandem mass", con dimostrazione sia di un'elevata prevalenza complessiva delle patologie (1:2.400) nella popolazione studiata, sia (dato d'estrema importanza) di un'elevata efficienza diagnostica: 94,2% per le amminoacidopatie (incluse le varianti) e 100% per i difetti dell'ossidazione degli acidi grassi e le acidemie organiche (12). La positività di questi risultati era confermata anche dal livello di specificità,

Tabella 1

Pannello principale e secondario di patologie per screening neonatale allargato (fonte rif. 9)

Identificabili mediante "tandem mass"		Identificabili mediante altre tecnologie		
Acilcarnitine		Amminoacidi		
Acidemie (Ac.) organiche	Difetti dell'ossidazione acidi grassi	Amminoacidopatie	Emoglobinopatie	Altre patologie
Pannello principale ("core panel")				
Ac. isovalerica	Deficit di acil-CoA deidrogenasi a media catena	Fenilchetonuria (PKU)	Anemia a cellule falciformi	Ipotiroidismo congenito
Ac. glutarica tipo I	Deficit di acil-CoA deidrogenasi a lunghissima catena	Malattia delle urine a sciroppo d'acero	Emoglobinopatia da HbS/β-Talassemia	Deficit di biotinidasi
Ac. 3-idrossi 3-metil glutarica	Deficit di acil-CoA deidrogenasi a lunga catena	Omocistinuria	Emoglobinopatia da HbS/HbC	Iperplasia surrenalica congenita
Deficit multiplo di carbossilasi	Deficit di proteina trifunzionale	Citrullinemia		Galattosemia da deficit di galattosio-uridil-transferasi
Ac. metilmalonica (mutasi)	Deficit di captazione di carnitina	Arginin-succinico aciduria		Sordità congenita
Deficit di 3-metilcrotonil-CoA carbossilasi		Tirosinemia tipo I		Fibrosi cistica
Ac. metilmalonica (Cbl A,B)				
Ac. propionica				
Deficit di β-chetotiolasi				
Pannello secondario ("secondary targets")				
Ac. metilmalonica (Cbl C,D)	Deficit di acil-CoA deidrogenasi a corta catena	Iperfenilalaninemia non PKU	Altre varianti emoglobine (HbE)	Galattosemia da deficit di galattochinasi
Ac. malonica	Ac. glutarica tipo II	Tirosinemia tipo II		Galattosemia da deficit di galattoepimerasi
Deficit di isobutiril-CoA deidrogenasi	Deficit di 3-idrossi acil-CoA a media/corta catena	Iperfenilalaninemia da deficit dei cofattori di biosintesi		
Ac. 2-metil 3-idrossibutirrica	Deficit chetoacil-CoA tiolasi a media catena	Argininemia		
Deficit di 2-metilbutiril-CoA deidrogenasi	Deficit di carnitina palmitoiltransferasi II	Tirosinemia III		
Ac. 3-metil glutaconica	Deficit di carnitina/acil-carnitina translocasi	Iperfenilalaninemia da deficit dei cofattori di rigenerazione delle bipterine		
	Deficit di carnitina palmitoiltransferasi IA	Ipermetioninemia		
	Deficit di dienoil-CoA riduttasi	Citrullinemia tipo II		

evidenziato da un indice di falsa positività dello 0,33%. Più recentemente, la situazione dei programmi di screening neonatale europei è stata analizzata in due lavori scientifici (13,14). Pur con importanti differenze e disomogeneità per quanto attiene al numero di patologie incluse nei singoli pannelli di screening, emerge una pro-

gressiva diffusione della pratica dello screening neonatale esteso in Europa, che è ormai presente in più aree geografiche con programmi a copertura nazionale o regionale. Nel 2007, non meno del 33% dei neonati europei, nati in oltre 10 nazioni, è stato sottoposto ad un programma di screening neonatale degli errori congeniti

del metabolismo con uso della tecnologia MSMS.

In Italia, la legislazione nazionale in vigore (legge 104/1992, DPCM 09.07.1999) rende obbligatorio lo screening neonatale solo per PKU, ipotiroidismo congenito e fibrosi cistica, ma con possibilità per le singole regioni di attivare programmi integrativi per endocrinopatie congenite ed errori congeniti del metabolismo. In base a questa apertura normativa, negli ultimi anni sono state attivate iniziative regionali di screening neonatale esteso, a carattere istituzionale (Toscana) o come programmi pilota ad estensione geografica variabile (Liguria, alcune province venete, Lazio) (15). I dati raccolti dalla Società Italiana per gli Screening Neonatali evidenziano che dal 2005 al 2007 sono stati selezionati complessivamente mediante programmi estesi oltre 32 casi di errore congenito del metabolismo in oltre 148.000 neonati, con un'incidenza complessiva di acidemie organiche, difetti dell'ossidazione degli acidi grassi ed amminoacidopatie (iperfenilalaninemie PKU escluse) nei nati vivi pari a 1:4.632 (16). Per una prima valutazione d'efficacia dei programmi di screening esteso in Italia, questo dato è confortante se confrontato con i risultati dello studio retrospettivo nazionale condotto negli anni 1985-1997, in cui la selezione clinica per sintomi evidenziava un'incidenza delle stesse patologie pari a 1:6.200 (17).

Anche in termini d'economia sanitaria, l'analisi dei primi risultati ottenuti con i programmi di screening neonatale esteso sembra avere un indirizzo complessivamente favorevole. Alcuni autori evidenziano, in termini di analisi costo/benefici, che i programmi basati sulla tecnologia MSMS per errori congeniti del metabolismo possono determinare un risparmio economico complessivo, se comparati agli alti costi assistenziali per i soggetti, a lunga sopravvivenza, diagnosticati in assenza di screening (18) e che l'uso della tecnologia MSMS (in confronto a quello di altre tecnologie) ha la capacità di determinare un maggiore livello di risparmio economico, proprio in funzione della caratteristica intrinseca di essere in grado di rilevare un pannello di patologie in un unico esame (19). Va segnalato, tuttavia, che altre valutazioni hanno invece evidenziato benefici economici minori e riservati a programmi limitati nel numero di patologie sottoposte a screening (20).

Nonostante il prevalente favore nei confronti dei programmi di screening neonatale esteso, non deve però essere sottovalutata l'esistenza di problemi ancora aperti, connessi con l'attivazione di tali programmi. I principali punti di riflessione sono di seguito sinteticamente elencati in un ordine prioritario:

- la possibile selezione di patologie in cui l'intervento terapeutico, anche se precoce ed iniziato in un periodo pre-sintomatico, non modifica la storia naturale – infausta per morbilità e mortalità – della malattia;
- l'individuazione di varianti biologiche, a basso impatto clinico, o di patologie ad esordio tardivo, in cui non vi sono evidenze della necessità o dell'utilità di un intervento terapeutico;
- l'inevitabile, anche se contenuto, incremento di falsi positivi (soprattutto in particolari categorie, come ad es. i soggetti prematuri), con potenziali ripercussioni

negative (psicologiche, sociali, economiche) nell'ambito familiare;

- il rischio che, in situazioni di falsa negatività (che, seppur rare, sono comunque presenti anche in programmi ad alta efficienza), il falso senso di sicurezza determinato dall'esistenza di un programma di screening mirato rallenti ulteriormente la diagnosi clinica della malattia.

Gli scenari futuri

I percorsi di diagnosi e cura delle malattie "rare" (le patologie con prevalenza di soggetti affetti, presenti nella popolazione, inferiore a 5 casi su 10.000) riscuotono oggi, nei sistemi sanitari più avanzati, grande attenzione sociale e politica. Le potenzialità tecniche ed applicative offerte dalla "tandem mass" ed il sostanziale successo internazionale dei programmi di screening neonatale esteso (rivolto in gran parte a patologie "rare") determinano una costante pressione, anche nell'opinione pubblica, per un'ulteriore espansione del numero di patologie considerate nei pannelli di screening. Oggi la categoria di maggior interesse è rappresentata dalle malattie da accumulo lisosomiale (LSD), un gruppo di oltre 40 patologie ereditarie, con una prevalenza stimata in ~1 caso su 40.000, per alcune delle quali nell'ultimo decennio si sono resi disponibili interventi curativi innovativi, quali il trapianto midollare e la terapia enzimatica sostitutiva. In effetti, i vantaggi potenziali di una diagnosi precoce ed in condizioni asintomatiche rendono queste patologie delle candidate preferenziali per lo screening neonatale (21). Anche se esistono alternative biochimiche per la misura delle attività enzimatiche specifiche nelle "Guthrie cards" per singola malattia (22-24), l'uso della tecnologia MSMS presenta il vantaggio di poter rilevare, mediante l'analisi di differenti substrati (con differenti e specifici rapporti m/z) più difetti enzimatici simultaneamente (25). Recenti segnalazioni rendono possibile una nuova applicazione della tecnologia ESI-LC-MSMS anche per lo screening (sempre con uso di "Guthrie card") della malattia di Wilson, disordine genetico del metabolismo del rame che si manifesta principalmente con un complesso quadro di epatopatia in età pediatrica o adulta (26,27).

CONCLUSIONI

Per molti errori congeniti del metabolismo, la diagnosi precoce postnatale è lo strumento più efficace di prevenzione o riduzione sia del rischio di mortalità che dei danni da morbilità grave. Questo elemento tecnico deve inoltre essere associato alla considerazione che, per molte patologie congenite rare, negli ultimi anni sono molto migliorati l'approccio e la possibilità d'intervento terapeutico. L'introduzione della tecnologia MSMS, ancor più che l'applicazione delle tecniche di biologia molecolare, ha rivoluzionato la visione dello screening neonatale, consentendo di realizzare nuovi scenari di medicina preventiva rivolti a queste malattie, singolarmente rare ma valutabili, in termini di screening, con l'uso di biomarcatori correlati ad un gruppo di (e non a singole) patologie.

In un contesto così vasto di potenzialità applicative, nella società civile e nel mondo sanitario può affiorare la tentazione (intesa anche come risposta a legittime istanze sociali di gruppi laici di sostegno alle differenti patologie) verso un approccio globale di screening neonatale per un numero sempre più vasto di patologie congenite, anche al di fuori di criteri di scelta ben ponderati e condivisi, costantemente basati su forti evidenze scientifiche, epidemiologiche e di economia sanitaria. Deve inoltre essere considerata la possibilità che gli interessi legati all'introduzione di terapie, sì innovative ma ad elevato costo economico, possa determinare un'indebita pressione verso scelte operative efficaci da un punto di vista di selezione e diagnosi, ma non sostenute da successivi interventi terapeutici, che siano vantaggiosi per l'individuo ed economicamente ed eticamente sostenibili per la società. La scienza dello screening neonatale non è esente dalla generale considerazione (o preoccupazione) che conoscenza e tecnologia avanzino oggi ad una velocità tale da superare ampiamente la capacità dei sistemi sanitari di usufruirne con sicurezza, efficienza ed efficacia (28). In particolare, occorre, senza eccezione, considerare che nella nuova visione dei programmi di screening neonatale, l'attività di "testing" laboratoristico rappresenta solamente la parte iniziale di un processo complesso, che deve assicurare sempre per ogni risultato non negativo l'adeguato e tempestivo percorso di definizione diagnostica e, se richiesto, di assistenza sanitaria e terapeutica.

Va certamente a merito delle società scientifiche italiane [Società Italiana per gli Screening Neonatali (SISN) e Società Italiana per lo Studio delle Malattie Metaboliche Ereditarie (SISMME)], più coinvolte con lo screening e la diagnosi degli errori congeniti del metabolismo, aver elaborato - in una fase ancora iniziale d'affermazione in Italia dei programmi di screening neonatale esteso - un utile ed aggiornato documento di consenso per lo screening e la conferma diagnostica degli errori congeniti del metabolismo, con uso della tecnologia MSMS (29). L'applicazione di tale strumento potrà positivamente contribuire alla realizzazione di efficaci programmi di screening neonatale esteso, in cui i benefici complessivi (per l'individuo, la famiglia e la società) risultino prevalenti rispetto ai rischi, anche parziali, sempre presenti in qualsiasi azione o intervento medico.

BIBLIOGRAFIA

- Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large population of newborn infants. *Pediatrics* 1963;32:338-43.
- Pollitt RJ. Introducing new screens: Why are we all doing different things. *J Inher Metab Dis* 2007;30:423-9.
- Wilson JM, Junger G. Principles and practice of screening for diseases. *Bol Oficina Sanit Panam* 1968;65:281-393.
- Millington DS, Kodo N, Norwood DL, et al. Tandem mass spectrometry: a new method for acylcarnitine profiling with potential for neonatal screening for inborn errors of metabolism. *J Inher Metab Dis* 1990;13:321-4.
- Chace DH, Kalas TA. A biochemical perspective on the use of tandem mass spectrometry for newborn screening and clinical testing. *Clin Biochem* 2005;38:296-309.
- Chace DH, Kalas TA, Naylor EW. Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns. *Clin Chem* 2003;49:1797-817.
- Rinaldo P, Tortorelli S, Matern D. Recent developments and new applications of tandem mass spectrometry in newborn screening. *Cur Opin Pediatrics* 2004;16:427-33.
- American Academy of Pediatrics Newborn Screening Task Force. Serving the family from birth to medical home. Newborn screening a blue print for the future. A call for a national agenda on state newborn screening programs. *Pediatrics* 2000;106(Suppl 2):389-422.
- American College of Medical Genetics Newborn Screening Expert Group. Newborn screening: toward a uniform screening panel and system. Executive Summary. *Pediatrics* 2006;117:S296-307.
- Wilcken B, Wiley V, Hammond J, et al. Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. *N Engl J Med* 2003;348:2304-12.
- Rinaldo P, Zafari S, Tortorelli S, et al. Making the case for objective performance metrics in newborn screening by tandem mass spectrometry. *MRDD Researchs Reviews* 2006;12:255-61.
- Schulze A, Lindner M, Kohlmuller D, et al. Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism by electrospray ionization-tandem mass spectrometry: results, outcome and implications. *Pediatrics* 2003;111:1399-406.
- Loeber JG. Neonatal screening in Europe: the situation in 2004. *J Inher Metab Dis* 2007;30:430-8.
- Bodamer OA, Hoffmann GF, Lindner M. Expanded newborn screening in Europe 2007. *J Inher Metab Dis* 2007;30:439-44.
- Cerone R, Cassanello M, Caruso U, et al. Screening neonatale esteso per gli errori congeniti del metabolismo mediante tandem mass: l'esperienza italiana. *Minerva Pediat* 2007;59:488-9.
- Cerone R, Caruso U. SISN - Rapporto tecnico sui programmi di screening neonatale in Italia anno 2007. <http://www.sismme.it/sisn/documents/rapporto2008.pdf>
- Dionisi-Vici C, Rizzo C, Burlina AB, et al. Inborn errors of metabolism in the Italian paediatric population: a national retrospective survey. *J Pediatr* 2002;140:321-7.
- Feuchtbaum L, Cunningham G. Economic evaluation of tandem mass spectrometry screening in California. *Pediatrics* 2006;117:S280-6.
- Carroll AE, Downs SM. Comprehensive cost-utility analysis of newborn screening strategies. *Pediatrics* 2006;117:S287-95.
- Pandor A, Eastham J, Beverley C, et al. Clinical effectiveness and cost-effectiveness of neonatal screening for inborn errors of metabolism using tandem mass spectrometry: a systematic review. *Health Technol Assess* 2004;8:1-121.
- Millington DS. Newborn screening for lysosomal storage disorders. *Clin Chem* 2005;51:808-9.
- Chamoles NA, Blanco M, Gaggioli D. Fabry disease: enzymatic diagnosis on dried blood spots on filter paper. *Clin Chim Acta* 2001;308:195-6.
- Chamoles NA, Blanco M, Gaggioli D, et al. Gaucher and Niemann-Pick diseases-enzymatic diagnosis in dried blood on filter paper: retrospective diagnoses in newborn screening cards. *Clin Chim Acta* 2002;317:191-7.
- Chamoles NA, Blanco M, Gaggioli D, et al. Tay-Sachs and Sandhoff diseases: enzymatic diagnosis in dried blood on filter paper: retrospective diagnoses in newborn screening cards. *Clin Chim Acta* 2002;318:133-7.
- Millington DS. Rapid and effective screening for lysosomal

- storage disease: How close are we? *Clin Chem* 2008;54:1592-3.
26. Gahl WA. Newborn screening for Wilson disease: Does liquid chromatography-tandem mass spectrometry provide the solution? *Clin Chem* 2008;54:1941-2.
 27. deWilde A, Sadilkova K, Sadilek M, et al. Tryptic peptide analysis of ceruloplasmin in dried blood spots using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to newborn screening. *Clin Chem* 2008;54:1961-8.
 28. Price CP, Christenson R. Evaluating new diagnostic technologies: Perspectives in the UK and US. *Clin Chem* 2008;54:1421-3.
 29. Antonozzi I, Burlina A, Caruso U, et al. SISMME SISN – Linee guida per lo screening neonatale esteso e la conferma diagnostica 2008. <http://www.sismme.it/it/documents/GLEXPNBS2008.pdf>