



Pannello NGS Malattie Metaboliche "MM Panel" associato allo SNE per gli Errori Congeniti del Metabolismo (ECM)

C. Aloï¹, A. Salina¹, M. Cassanello¹, O. Mazza¹, A. Mascagni²,
M. Maghnie^{2,3}, M.C. Schiaffino³

¹ LABSIEM, UOC Clinica Pediatrica e Endocrinologia, IRCCS G. Gaslini, Genova, Italia

² DINOEMI Università degli Studi di Genova, Italia

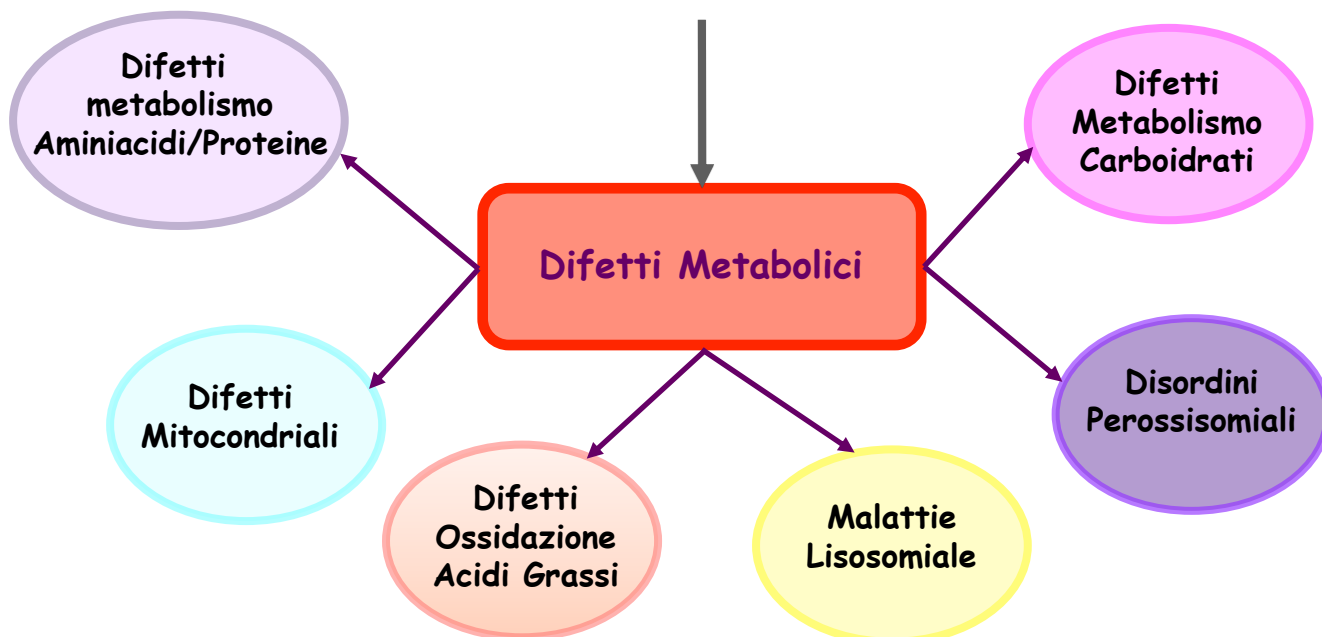
³ UOC Clinica Pediatrica e Endocrinologia, IRCCS G. Gaslini, Genova, Italia

Keyword: NGS, ECM, Screening Neonatale, Diagnosi Genetica

INTRODUZIONE/BACKGROUND

- **ECM:** malattie genetiche causate dall'alterato funzionamento di una specifica via metabolica che determina accumulo di sostanze tossiche o carenza di metaboliti essenziali
- **Modalità trasmissione:** Autosomico Recessiva generalmente, alcuni difetti sono X-linked
- **Manifestazioni cliniche:** complesse e variabili. Per i bambini sospetti positivi allo SNE è obbligatorio ulteriore accertamento
- **Next Generation Sequencing (NGS)** è un importante strumento per la diagnostica delle malattie ereditarie

CATEGORIE ECM



OBIETTIVI

Genotipizzare 22 soggetti affetti da diversi difetti ECM precedentemente diagnosticati tramite il programma di SNE

Difetti del Metabolismo degli Aminoacidi (AAD)

- Alterazione nel metabolismo degli aminoacidi
- Sintomatologia Variabile
- Trattamento: restrizioni nutrizionali che limitano il consumo di un aminoacido o in alcuni casi il consumo di proteine. Somministrazione di integratori

Difetti dell'Ossidazione degli Acidi Grassi (FAOD)

- Difetto ereditario dell'ossidazione mitocondriale degli acidi grassi a catena corta, media e lunga
- Fenotipo con quadro variabile: cardiomiopatia, ipoglicemia ipochetotica, epatopatia, intolleranza all'esercizio fisico e rabdomiolisi
- Trattamento: evitare il digiuno, una dieta ipolipidica

Acidemie Organiche (OAD)

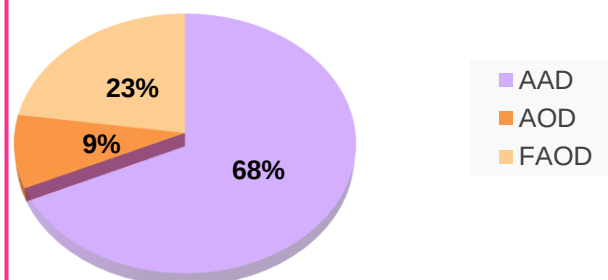
- Ciascun difetto degli Acidi Organici (AO) è associato a una specifica carenza enzimatica che provoca l'accumulo di AO nel sangue e nelle urine. I composti accumulati o i loro metaboliti sono tossici, determinando le caratteristiche cliniche di questi disturbi
- Il neonato affetto appare "normale" per i primi giorni di vita, ma poi può sviluppare vomito, scarsa alimentazione, ritardo della crescita, ipoglicemia, iperammoniemia, convulsioni, ipotonia e letargia, fino al coma
- La diagnosi e il trattamento precoci possono modificare significativamente l'esito della malattia. Nella maggioranza dei casi si nota un miglioramento dell'esito quando viene fornita una dieta a basso contenuto proteico e un'integrazione di carnitina. Si consigliano supplementi dietetici aggiuntivi

PAZIENTI

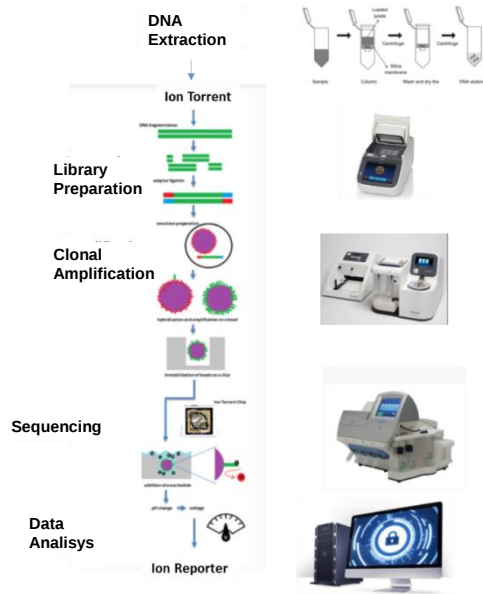
fenotipo clinico e biochimico	n°
AAD	15
OAD	2
FAOD	5

**TOTALE → n°22
PROBANDI AFFETTI DA ECM**

**Distribuzione Pazienti
affetti da ECM**



METODI



Flow chart del protocollo analitico utilizzato per library preparation and enrichment Ampliseq standard protocol
Sequenziamento NGS: Ion Torrent
Personal Genome Machine (PGM)
Data analisi e variant call: Ion Reported

78 geni presenti in "MM Panel"

ACAD8, ACADM, ACADS, ACADSB, ACADVL, ACAT1, AHCY, ALDH4A1, AMT, ARG1, ASL, ASS1, AUH, BCKDHA, BCKDHB, BTBD, CBS, CPT1A, CPT1B, CPT1C, CPT2, DBT, DLD, DNAJC19, ECHS1, ETFA, ETFB, ETFDH, ETHE1, FAH, GALE, GALK1, GALT, GCDH, GCH1, GCSH, GLDC, GNMT, HADH, HADHA, HADHB, HIBCH, HLCS, HMGCL, HPD, HSD17B10, IVD, LMBRD1, MAT1A, MCCC1, MCCC2, MLYCD, MMAA, MMAB, MMACHC, MMADHC, MTHFR, MTR, MTRR, MUT, OPA3, OTC, PAH, PC, PCBD1, PCCA, PCCB, PRODH, PTS, QDPR, SLC22A5, SLC25A13, SLC25A15, SLC25A20, SLC7A7, SPR, TAT, TAZ.

Genome : Human (hg19)

Amplicon Range : 125 -275 bp

Panel Size : 231.441 kb

In-Silico Coverage : 99 %

Pool Info : 1-20 ng

POOL_1 : 599 amplicons

POOL_2 : 606 amplicons

Caratteristiche
"MM Panel"

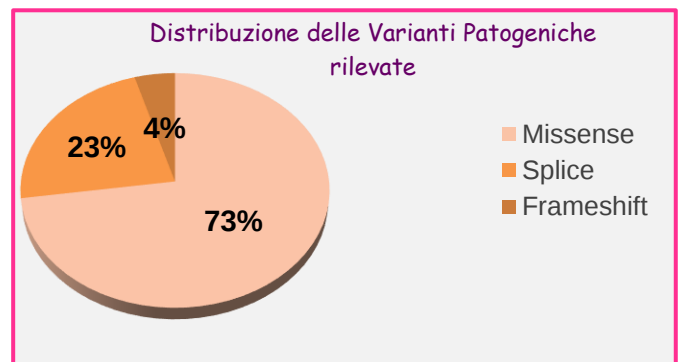
RISULTATI

Dopo realizzazione e validazione di "MM Panel",
il DNA dei 22 probandi inclusi nello studio è stato sequenziato
mediante Ion Torrent PGM

COVERAGE MEDIO

per ciascuna Runs > 200bp

Mutazioni in omozigosi o eterozigosi composta rilevate in 20 casi su 22 (91%)



Nelle restanti 2 probande con fenotipo PKU classico è stata rilevata una sola variante patogenica mono allelica e diversi SNP eterozigoti. Sulla base di questi dati possiamo escludere la presenza di una grande delezione nella regione del gene *PAH*.

Non sono state trovate altre varianti nei 77 geni analizzati.

RISULTATI

4 NUOVE VARIANTI PATOGENICHE IDENTIFICATE (Tabella 1).

- 2 in omozigosi:
 - la missenso **c.340G>C**; **p.Glu114Gln** sull'esone 4 di **IVD** (Pz89)
 - la splice variant **c.1358+1G>T** sull'introne 13 di **CBS** (Pz91).
- 1 allo stato emizigote: la **c.868-5T>A** su **OCT**, gene mappato sul ChrX (Pz95)
- 1 variante di splicing **c.315+2T>C** in **PAH** (Pz78)

Tabella 1: Descrizione delle nuove varianti trovate

Patients	Genes	Exon	Transcript	Coding	AA Change	Het/Hom	ClinVar	ACGM	Tools Pred
78	PAH	12	NM_000277.3	c.1315+2T>C		Het	Likely pathogenic	Pathogenic	6 su 6
89	IVD	4	NM_002225.5	c.340G>C	p.Glu114Gln	Hom		Uncertain Significance	17 su 18
91	CBS,CBSL	14	NM_001354007.1	c.1358+1G>T		Hom	Pathogenic	Pathogenic	6 su 6
95	OTC	-	NM_000531.6	c.868-5T>A		Hem	nd	Uncertain	nd

CONCLUSIONI

- ✓ L'NGS migliora l'utilità diagnostica e prognostica delle malattie ereditarie metaboliche: l'analisi e la comprensione dei dati genomici deve essere strettamente connessa a tutti i suggerimenti che i biomarkers classici possono offrire.
- ✓ "MM Panel" ha il potenziale per aiutare a identificare diversi difetti nei neonati che devono ricevere una diagnosi genetica necessaria per un trattamento ottimale al fine di prevenire complicanze legate alla malattia.