BARI 9.10.11 NOVEMBRE 2022
SIMMESN
XII CONGRESSO NAZIONALE

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

Ospedale dei Bambini Vittore Buzzi
Sistema Socio Sanitario
Regione Lombardia
ASST Fatebenefratelli Sacco

Centro Ospedaliero per Assistenza e cura delle Leucodristrofie e delle condizioni Associate

Sistema Socio Sanitario
Ospedale di Bergamo
Regione Lombardia
ASST Papa Giovanni XXIII

Screening Neonatale dell'Adrenoleucodistrofia X-linked: prima esperienza italiana

L. Alberti[1], S. Lucchi[1], L. Cappelletti[1], E. Pratiffi[1], S. Fazzone[1], A. Meta[1], E. Benedetti[1], M. Perrone Donnorso[1], L. Spaccini[2], M. Ferrario[3], E. Verduci[3], M. Iascone[4], L. Cannella[1], E. Bonaventura[5], C. Cereda[1], D. Tonduti[6]

1: Laboratorio di Riferimento regionale per lo Screening Neonatale, Ospedale dei Bambini Vittore Buzzi – ASST Fatebenefratelli-Sacco Milano

2: Unità di Genetica Medica, UOC Ostetricia e Ginecologia, Ospedale Vittore Buzzi ASST-FBF-Sacco

3: Unità di Pediatria, Ospedale dei Bambini Vittore Buzzi – ASST Fatebenefratelli-Sacco Milano, Università degli Studi di Milano

4: Laboratorio di Genetica Medica, ASST-Papa Giovanni XXIII Bergamo

5: Unit of Pediatric Neurology, V. Buzzi Children's Hospital – ASST Fatebenefratelli-Sacco Milan; C.O.A.L.A (Center for Diagnosis and Treatment of Leukodystrophies)

6: Unit of Pediatric Neurology, V. Buzzi Children's Hospital – ASST Fatebenefratelli-Sacco Milan; C.O.A.L.A (Center for Diagnosis and Treatment of Leukodystrophies); Department of Biomedical and Clinical Sciences, University of Milano

Contatto: luisella.alberti@asst-fbf-sacco.it

INTRODUZIONE

L'adrenoleucodistrofia X-linked (X-ALD) è causata da varianti nel gene *ABCD1* codificante un trasportatore degli acidi grassi a catena molto lunga (VLCFA), appartenente alla superfamiglia ATP-binding cassette. La proteina interviene nel trasporto dei VLCFA dal citosol ai perossisomi dove vengono degradati. Esistono tre forme principali

- Adrenoleucodistrofia cerebrale legata all'X (X-CALD) Maschi con X-ALD sono a rischio di sviluppare lesioni demielinizzanti nella sostanza bianca cerebrale che presenta con problemi neurologici severi e progressivamente ingravescenti, manifestandosi attorno ai 3-12 anni. Esordio: ridotta attività surrenalica; evoluzione gravi difficoltà di apprendimento, disfagia, sordità, perdita della vista, convulsioni e atassia, portando fino allo stato neurovegetativo nella fase terminale della malattia;

- Adrenomieloneuropatia (AMN): esordisce intorno ai 20-30 anni, con sintomi a lenta progressione che possono includere rigidità degli arti, debolezza e dolore a mani e piedi, spasmi e problemi urinari, fino a giungere, in alcuni casi, allo stato vegetativo. Si possono rilevare anche disturbi del comportamento e cognitivi.

- Adrenoleucodistrofia con insufficienza corticosurrenalica (AI) isolata: 70% dei maschi con X-ALD , spesso segno d'esordio, anni o decenni prima della comparsa dei sintomi neurologici. Nel 10% dei maschi è l'unico sintomo per anni. La AI nell'adrenoleucodistrofia ricorda la malattia di Addison (a causa dell'accumulo degli acidi grassi a catena lunga e molto lunga nel surrene) e si manifesta con stanchezza, nausea, perdita di peso, ipotensione e ipoglicemia. Il 50% di questi pazienti può sviluppare, con il tempo, anche una sintomatologia neurologica.

Opzioni Terapeutiche

Terapia di supporto dietetico, che si basa sulla prescrizione di una dieta a basso contenuto di VLCFA e sulla somministrazione di alimenti a fini medici speciali che sono costituiti da miscele di oli capaci di abbassare i livelli di VLCFA.

L'unica cura per la forma cerebrale è rappresentata dal trapianto di cellule staminali ematopoietiche, raccomandato per i ragazzi con un donatore compatibile e, soprattutto, prima che presentino gravi sintomi neurologici o un'importante diffusione della demielinizzazione a livello cerebrale; è documentato che il trapianto non è in grado di dare esito favorevole quando effettuato tardivamente, ragione per cui è determinante porre una diagnosi precoce di adrenoleucodistrofia per permettere al piccolo paziente di giovare di questa opzione terapeutica.

Per la X-CALD è attualmente in via di sperimentazione l'impiego della terapia genica come opzione alternativa al trapianto midollare.

Steroidi, in caso di insufficienza corticosurrenalica.

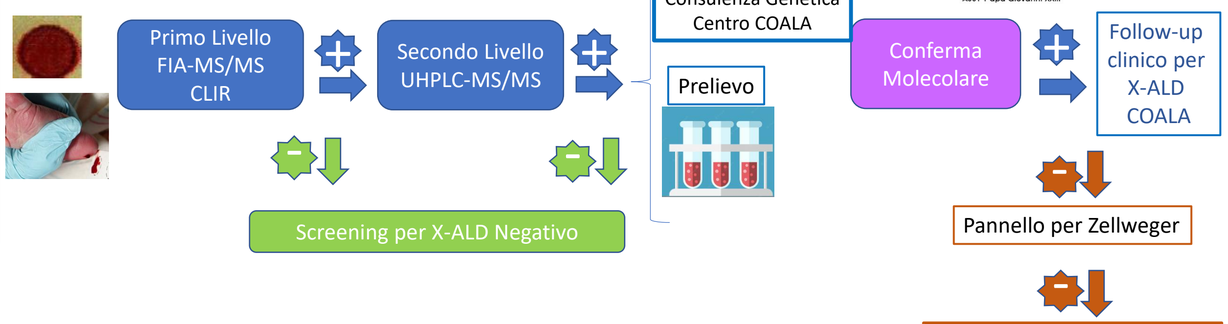
Terapia fisica, per trattare la spasticità, utile anche per la AMN

METODI

Grazie a un progetto pilota triennale dal settembre 2021 i bambini nati in Lombardia con E.G.>37 settimane hanno la possibilità di essere sottoposti allo screening neonatale anche per questa rara patologia genetica.

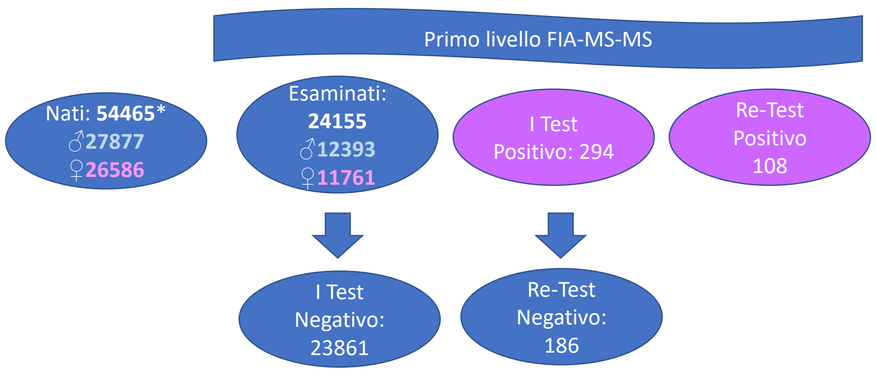
Abbiamo utilizzato una strategia a due livelli: il test di primo livello viene eseguito con spettrometria di massa/massa, che quantifica le lisofosfatadilcoline a catena molto lunga (LPC) su goccia di sangue essiccato. Per aumentare la specificità e ridurre i falsi positivi, è stato sviluppato un test di secondo livello in cromatografia liquida: viene valutata la quantità di LPC C26:0 e LPC C24:0 sullo stesso campione usato per il test di primo livello.

I campioni positivi al secondo livello vengono inviati al CCR per la presa in carico, la consulenza genetica e l'avvio della conferma molecolare.

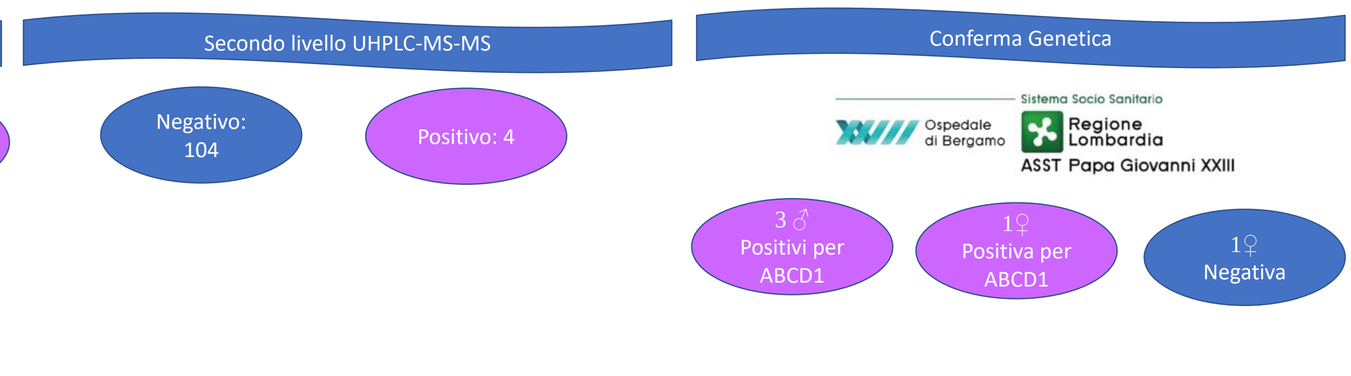


RISULTATI

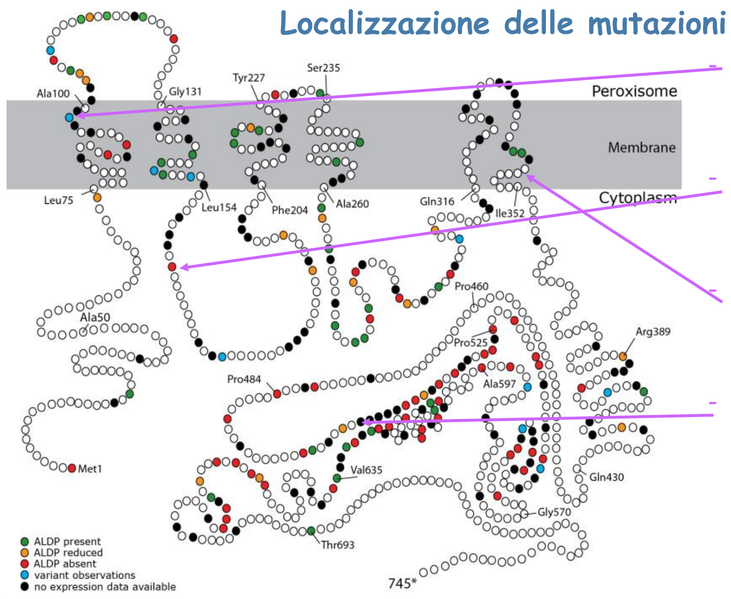
Test di primo livello I



Test di Secondo livello



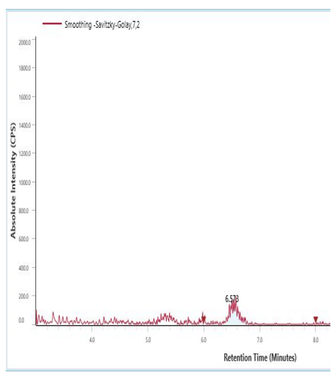
Localizzazione delle mutazioni su ALDP



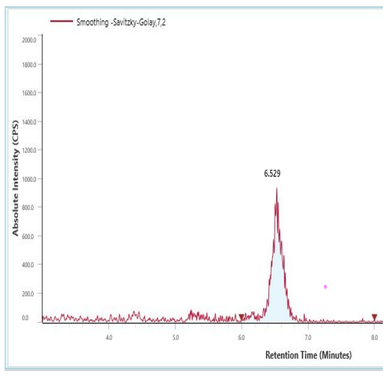
- **c.293C>T (p.Ser98Leu)**: Pathogenic, identified in 13 ALD cases. Normal ALDP level in patient cells (7), but non-functional
- **c.488G>A (p.Arg163His)**: Pathogenic, identified in 8 ALD cases. No detectable ALDP in patient cells (32).
- **c.1036A>G (p.Met346Val)** (novel): Variant of unknown significance (VUS), identified in ALD newborn screening.
- **c.1628del (p.Pro543fs)**: Pathogenic, identified in 3 ALD cases. Deleterious mutation

Test di secondo livello UHPLC-MS/MS

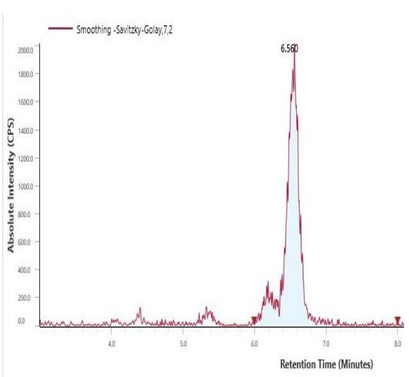
Controllo



1 femmina eterozigote
mutazione c.1036A>G p. Met346V (NOVEL)
MS/MS C26: 0.04 µM C26-LPC: 0.61 µM
2-TT C26: 0.02 µM C26-LPC: 0.51 µM



1 maschio affetto c.293C>T p.(Ser98Leu)
MS/MS C26: 0.08 µM C26-LPC: 0.77 µM
2-TT C26: 0.07 µM C26-LPC : 2 µM



DISCUSSIONE

L'incidenza della patologia nella nostra regione è sovrapponibile a quella riscontrata in letteratura da altri studi. X-ALD è una patologia che possiede tutti i requisiti per essere inserita anche in Italia nel pannello dello screening neonatale esteso con modalità che potranno essere chiarite al termine del nostro studio pilota.

State	Tier 1: Method/Target/Cutoff		Tier 2: Method/Target/Cutoff		*ABCD1* Sequencing
California [43]	FIA-MS/MS	C26 ≥ 0.42 µmol/L	LC-MS/MS	C26 ≥ 0.22 µmol/L [a]	Integrated with NBS
Georgia [42]	FIA-MS/MS	CLIR analysis of C20, C22, C24, and C26 LPC	LC-MS/MS	C26:0-LPC > 0.30 nmol/mL	Following referral
Illinois [44]	LC-MS/MS	Borderline: C26:0-LPC ≥ 0.18 µmol/L Positive: C26:0-LPC ≥ 0.28 µmol/L	LC-MS/MS	Borderline: C26:0-LPC ≥ 0.18 µmol/L Positive: C26:0-LPC ≥ 0.28 µmol/L	Following referral
New York [2]	MS/MS	C26:0-LPC	HPLC-MS/MS	C26:0-LPC	Integrated with NBS
North Carolina [41]	HPLC-MS/MS	C24:0-LPC ≥ 0.175 µmol/L and C26:0-LPC ≥ 0.08 µmol/L	Duplicate HPLC-MS/MS	Median C26:0-LPC ≥ 0.15 µmol/L OR Median C26:0-LPC 0.08–0.15 µmol/L and C24:0-LPC ≥ 0.175 µmol/L	Integrated with NBS
Minnesota [40]	LC-MS/MS	Borderline: C26:0-LPC ≥ 0.16 µmol/L Positive: C26:0-LPC ≥ 0.30 µmol/L	Repeat LC-MS/MS	C26:0-LPC ≥ 0.16 µmol/L	Following referral
Pennsylvania	FIA-MS/MS	C26:0-LPC > 0.36 µmol/L	LC-MS/MS	C26:0-LPC > 0.15 µmol/L	Integrated with NBS
Italy/Lombardia	FIA-MS/MS	C26-LPC> 0.5uM CLIR Analysis	UHPLC-MS/MS	C26-LPC>0.1uM	Following Referral

State	Publication	Study Length	Total # Screened	Positive Screens	Male X-ALD	Female Heterozygote	Peroxisome Biogenesis Disorder	Other Genetic Syndrome	Incidence
California	Matteson et al., 2021 [43]	4 years	1,854,631	355	95	110	23	12	1: 9 047
Georgia	Hall et al., 2020 [42]	7 months	51,081	11	1	0	2	0	1: 51 081
Illinois	Burton et al., 2022 [44]	1 year 11 months	276,000	34 [a]	7	10 [b]	3	0	1: 16 235
New York	Moser et al., 2016 [2]	2 years 8 months	630,000	53	20 [c]	22	- [d]	- [d]	1: 15 000
North Carolina	Lee et al., 2020 [41]	6 months	52,301	12	3	3	1	1	1: 8 717
Minnesota	Wiens et al., 2019 [40]	1 year	67,836	14	9	5	0	0	1: 4 845
Pennsylvania	Present Study	4 years 2 months	542,554	51	21	23	4	0	1: 12 330
Italy/Lombardia		7 months	24155	5	3	1	0	0	1: 6 039