

INTRODUZIONE	2
_ Immunodeficienze primitive	2
_ Classificazione delle immunodeficienze primitive	2
_ Immunodeficienze severe combinate	3
_ SCID da difetti del metabolismo delle purine	4
_ SCID da difetto di adenosina deaminasi	5
- Basi genetiche	5
- Fisiopatologia del difetto di ADA	5
- Caratteristiche cliniche	6
- Diagnosi	8
- Terapia	9
_ Screening neonatale delle immunodeficienze congenite	11
_ Screening neonatale di ADA SCID con tandem massa	12
SCOPO DELLA TESI	14
METODI	15
_ Pazienti	15
_ Spettrometria di massa tandem su DBS	17
_ Attività enzimatica ADA e livelli di dAXP	17
_ Amplificazione PCR del gene ADA	18
_ Sequenziamento del gene ADA	20
RISULTATI	20
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	27
BIBLIOGRAFIA	31

INTRODUZIONE

IMMUNODEFICIENZE PRIMITIVE

Il termine immunodeficienza primitiva comprende una larga varietà di condizioni che risultano da una o più anomalie del sistema immunitario e aumentano la suscettibilità alle infezioni con ampio spettro di gravità.

Sono condizioni croniche che richiedono generalmente un monitoraggio ed una cura per tutta la vita.

Si tratta di malattie rare, infatti colpiscono lo 0.6% di tutti i nati vivi (1); sono congenite ed ereditarie, così che la maggior parte delle nuove diagnosi sono in pazienti in età pediatrica.

Sono note ad oggi circa 130 differenti malattie, determinate da alterazioni nello sviluppo e/o funzione del sistema immunitario (2). Nella maggior parte dei casi sono malattie monogeniche; in 2/3 dei casi la trasmissione è X-linked e infatti i pazienti affetti sono principalmente maschi.

Ad eccezione del deficit assoluto di IgA, tutte le altre forme hanno un'incidenza di circa 1:10.000 nati.

CLASSIFICAZIONE DELLE IMMUNODEFICIENZE PRIMITIVE

Le immunodeficienze primitive si differenziano a seconda del difetto immunologico: difetto anticorpale, difetto linfocitario o deficit combinato; difetto della funzione fagocitaria o del complemento. I deficit anticorpali costituiscono circa il 65% dei casi di immunodeficienza primitive: includono malattie in cui vi sono anomalie del comparto T regolatore ma in cui il maggior difetto è una scarsa funzione anticorpale. Le immunodeficienze combinate

comprendono il secondo gruppo più numeroso, rappresentando il 15% del totale. Molte di queste mostrano segni clinici che costituiscono una sindrome distinta o sono associati a ipoplasia o displasia timica. Difetti cellulari puri, senza un difetto anticorpale associato, sono meno comuni e rappresentano fino a 5% del totale. I difetti dei fagociti coinvolgono il sistema dei fagociti polimorfonucleati e dei fagociti mononucleati e costituiscono il 10% del totale delle immunodeficienze. I disordini primitivi del complemento costituiscono invece circa il 5% del totale (3). Tutte le malattie sono caratterizzate da un'aumentata suscettibilità alle infezioni, che sono frequenti, gravi, a decorso clinico prolungato, spesso dovute a germi opportunisti e possono coinvolgere più organi. Diarrea cronica, manifestazioni cutanee, mugugno persistente, ritardo della crescita, ritardata guarigione delle ferite sono molto comuni. Inoltre i pazienti sono a rischio di sviluppare tumori o malattie autoimmuni nel corso della vita.

IMMUNODEFICIENZE SEVERE COMBinate

Le immunodeficienze severe combinate (SCID dall'inglese *Severe Combined Immunodeficiency Disease*) sono la forma più grave di immunodeficienza congenita. I bambini affetti sono sani alla nascita ma, essendo nati privi dell'immunità umorale e cellulare, sono ad alto rischio di infezioni batteriche, virali, fungine e opportuniste. Muoiono di infezioni gravi nell'infanzia se non viene loro fornita una terapia adeguata. Purtroppo quasi nessuno degli affetti è riconosciuto nel periodo pre-infezione e quando viene formulata la diagnosi, spesso si è già verificata un'infezione grave (meningite, encefalite, polmonite complicate). A questo punto, anche se viene instaurata una terapia corretta, il danno può essere già presente e le sequele permanenti diventano un carico notevole oltre che per i pazienti, anche per le famiglie e la società. In alcuni casi inoltre i pazienti muoiono ancora prima che venga posta la diagnosi di SCID.

Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche è molto efficace nelle SCID e rappresenta un'opzione curativa consentendo alla maggior parte dei pazienti di vivere una vita normale. Tuttavia la probabilità di successo del trapianto diminuisce se il bambino ha già avuto infezioni ricorrenti o opportuniste (4)

e varia con l'età alla diagnosi e la presentazione clinica (5). In generale il trapianto effettuato prima dei 6 mesi di vita è più efficace rispetto ad un trapianto in bambini più grandi (5). Non è nota l'esatta frequenza delle SCID; è stimata essere circa tra 1:50.000 e 1:100.000 nati vivi ma potrebbe essere fortemente sottostimata in quanto tanti pazienti muoiono prima che la malattia venga sospettata. Il numero di casi varia inoltre in base alla popolazione studiata e da un paese all'altro.

SCID DA DIFETTI DEL METABOLISMO DELLE PURINE

Queste comprendono il difetto di adenosine deaminasi (ADA) e quello di and purine nucleoside fosforilasi (PNP), entrambe autosomiche recessive.

Insieme alla disgenesia reticolare e ai difetti nella formazione del TCR e BCR, costituiscono le forme con assenza di linfociti T e B, in quanto dovute ad alterazioni nei meccanismi di sviluppo dei linfociti T, con conseguente alterata sopravvivenza dei precursori linfocitari. Gli enzimi ADA e PNP agiscono in sequenza sui nucleosidi delle purine, che derivano dalla degradazione degli acidi nucleici. ADA catalizza la sostituzione del gruppo 6-aminico dell'adenosina (Ado) e della 2'-deossiadenosina (dAdo) con ossigeno, producendo inosina (Ino) e 2'-deossiinosina (dIno). Questi prodotti di ADA, così come guanina (Guo) e 2'-deossiguanosina (dGuo), subiscono il clivaggio di fosforilasi catalizzato da PNP alle componenti di base, ipoxantina o guanina e ribosio o 2'-deossiribosio-1-PO₄. Nei pazienti con difetto di ADA, aumentano i livelli plasmatici e urinari di adenosina e 2-deossiadenosina. Nel difetto di PNP, aumentano i livelli plasmatici e urinari di inosina, 2-deossiinosina, guanina e deossiguanosina. Tali enzimi sono espressi in tutte le cellule, ma soprattutto nei linfociti, dove, in caso di difetto enzimatico, i metaboliti a monte si accumulano con il maggior effetto tossico; infatti adenosina, deossiadenosina e deossiguanosina sono particolarmente elevati nelle linee cellulari in cui è alto il tasso di degradazione del DNA e sono generati in abbondante quantità durante i processi di selezione negativa nel timo, durante l'apoptosi post-attivazione dei linfociti e la distruzione dei nuclei dei progenitori eritroidi nel midollo. In caso di difetto enzimatico, i metaboliti del DNA degradato si accumulano sotto forma di dATP o dGTP a livelli tossici

nel midollo osseo e nel timo, esercitando un danno sulle cellule linfoidi. Essi possono causare infatti linfopenia, inibire la proliferazione e indurre apoptosi, interferire con la generazione della diversità del recettore antigenico o con la differenziazione linfocitaria.

SCID DA DEFICIT DI ADENOSINA DEAMINASI

Basi genetiche

Si tratta di una malattia a trasmissione autosomica recessiva, la cui incidenza varia tra 1:375.000 e 1.660.000 nati vivi e rappresenta dal 15 al 20% di tutti i casi di SCID (3). Come tutte le forme recessive, è più diffusa nelle aree geografiche ad alto tasso di unioni tra consanguinei. Il gene *ADA* mappa sul cromosoma 20q13.12, ha una lunghezza di circa 32 Kb; è formato da 12 esoni e codifica una proteina di 363 AA. Nelle banche dati sono descritte 75 mutazioni, la maggior parte delle quali sono missenso/nonsense, seguono poi mutazioni nei siti di consenso dello splicing, piccole delezioni e grosse delezioni.

Fisiopatologia del difetto di ADA

In base al peso molecolare sono stati descritti tre isoenzimi: ADA1, pm 35000 Dalton, codificato da un locus specifico sul cromosoma 20; ADA1+cp, 280000 Dalton, composto probabilmente da due molecole di ADA1 con una proteina di combinazione; ADA2, pm 100000 D, codificata da un differente locus del cromosoma 20. Per la particolare distribuzione, ADA1 è definito come enzima tissutale e ADA2 come enzima sierico (6). Nell'uomo l'attività enzimatica differisce nel siero e nei tessuti per pH ottimale e per la relativa specificità per il substrato; peraltro l'attività enzimatica mostra proprietà simili nei diversi tessuti. L'isoenzima sierico e il tissutale sono distinguibili in base alla diversa affinità per l'analogo adenosinico 2-deossiadenosina. L'adenosina deaminasi reagisce in maniera specifica con l'adenosina e meno specifica con alcuni analoghi nucleosidici. La sua attività deriva dai due principali isoenzimi: ADA1, presente in tutti i tessuti, in particolare nei linfociti, monociti e globuli rossi, essenziale per una efficace risposta immune, con elevata affinità enzimatica per la 2-deossiadenosina e l'adenosina (in rapporto di 0.75); ADA2,

presente solo nei monociti e nei macrofagi, con scarsa affinità per la 2-deossiadenosina ed elevata per l'adenosina (in rapporto di 0.25) (7). L'immunodeficienza severa combinata è dovuta al deficit congenito dell'isoenzima ADA1: a causa della presenza di vie metaboliche alternative, il deficit dell'isoenzima ADA1 non comporta carenza di inosina e deossinosina e del catabolita finale, l'acido urico. Si accumulano invece i metaboliti intermedi Ado e dAdo, che vengono trasformati rispettivamente in adenosina monofosfato (AMP) e deossiadenosina monofosfato (dAMP) ad opera di una chinasi; questi a loro volta vengono fosforilati a ATP e dATP. Nei pazienti il dATP accumulato per la mancanza dell'enzima è un metabolita tossico e la sua concentrazione negli eritrociti correla con la severità della malattia. Si ritiene che l'aumento della produzione di dATP, inibisca la ribonucleotide difosfato reductasi bloccando la sintesi del DNA e di conseguenza la maturazione e la proliferazione dei linfociti. In modelli colturali di timociti fetali murini il deficit di adenosina deaminasi (ADA1) e il conseguente accumulo di dATP indurrebbe arresto della maturazione e apoptosi dei timociti mediata dal Bcl-2 (8). L'enzima ADA è rappresentato in tutti i sistemi ed apparati, quindi l'accumulo avviene in tutti i tessuti, ma ne risultano più danneggiati quelli con alto turn-over cellulare e alto tasso di sintesi del DNA, proprio come i timociti. Normalmente i livelli plasmatici di Ado sono 1-6 micromoli/L, mentre quelli di dAdo 0.6-1 micromoli/L; dAdo, ma non Ado, è rilevabile anche nelle urine.

Caratteristiche cliniche

Sulla base dell'età alla diagnosi e sulla gravità del quadro clinico, è possibile distinguere quattro fenotipi clinici (9):

Early onset ADA SCID: rappresenta l'85-90% dei casi ed è caratterizzata da linfopenia grave con deplezione dei linfociti T, B ed NK, che determina infezioni opportunistiche ricorrenti e scarsa crescita nella prima infanzia. Generalmente i pazienti presentano un quadro di polmonite interstiziale entro il primo mese di vita; il quadro radiologico suggestivo di polmonite interstiziale non è sempre dovuto ad infezioni virali verificatesi nei primi giorni di vita, ma può essere dovuto all'effetto tossico dei metaboliti, per cui si può avere un quadro di interstiziopatia anche severa pur con la negatività di qualunque ricerca eziologica batterica o virale. Altro elemento tipico è l'assenza di tessuto

linfoide che si traduce in timo ipoplastico senza demarcazione corticomidollare, assenza di linfociti nel timo, linfonodi e milza, logge tonsillari vuote. Il graft di linfociti materni è invece meno frequente che in altre forme di SCID. L'età media alla diagnosi di difetto di ADA è di solito dai 3 ai 4 mesi, generalmente entro il primo anno di vita. Se non trattata tempestivamente, questo fenotipo porta a morte tra il primo e secondo anno di vita.

Delayed onset ADA SCID: rappresenta il 15-20% dei casi e comprende forme diagnosticate tra il 1° e il 10° anno di vita.

Late onset ADA SCID: la diagnosi avviene tra la seconda e la quarta decade di vita.

I pazienti con le forme delayed e late hanno infezioni meno invasive, tipicamente otiti ricorrenti, sinusiti e infezioni delle vie aeree superiori. Se in una prima fase le manifestazioni sono meno gravi rispetto ai pazienti con la forma early onset, alla diagnosi i pazienti possono presentare insufficienza respiratoria cronica e malattie autoimmuni come citopenie o presenza di anticorpi anti-tiroidei (10), allergie ed elevate livelli di IgE. Il tasso di sottovalutazione per l'incidenza tardiva è probabilmente superiore a quello ad insorgenza precoce early-onset ADA-SCID; infatti nelle forme ad insorgenza tardiva la conta linfocitaria e i livelli di immunoglobuline sono molto meno ridotti e l'enzima mantiene una certa attività residua. Le forme late-onset si associano a mutazioni particolari nel gene ADA- generalmente eterozigosi composte-, che riducono ma non annullano l'attività enzimatica.

Partial ADA deficiency: i pazienti hanno un deficit parziale dell'enzima con un'attività enzimatica residua tra il 5 e l'80%, sufficiente a garantire una normale funzione immunologica.

Oltre ai sintomi comuni da grave deficit immunitario, nei pazienti con deficit di ADA sono descritte alcune manifestazioni cliniche peculiari.

In più della metà dei pazienti affetti da difetto del metabolismo delle purine sono riportate anomalie neurologiche, come diplegia o tetraparesi spastica, ritardo dello sviluppo motorio, atassia, tremori, alterazioni del tono muscolare, disturbi del comportamento e ritardo mentale, cecità e sordità centrale. Raramente sono presenti anomalie della funzionalità epatica (11,12,13,14,15).

Queste ultime, così come le manifestazioni neurologiche, oltre che dalle infezioni e dal loro trattamento, potrebbero dipendere anche dall'effetto tossico dei metaboliti accumulati; infatti in alcuni pazienti regrediscono o si risolvono con l'inizio della terapia enzimatica sostitutiva.

Nella metà dei casi sono presenti lesioni ossee a livello della gabbia toracica, simil-rosario rachitico e dispalsia condro-ossea, in particolare a livello delle articolazioni costocondrali, delle apofisi delle ossa iliache e dei corpi vertebrali.

Tra le manifestazioni autoimmuni, sono riportate l'anemia emolitica, la porpora trombocitopenica idiopatica e la neutropenia autoimmune; tali eventi possono riflettere un'iperattività dei linfociti B dovuta a perdita della regolazione da parte dei linfociti T. Infine talvolta si riscontrano elevati livelli di LDH, piastrinosi, bassi livelli neutrofili (16).

Tra i segni obiettivi, può essere rilevabile una lieve epatomegalia e splenomegalia; La conta linfocitaria è inferiore a 500/ μ l, e in alcuni pazienti può diminuire nel tempo o subire oscillazioni; la risposta ai mitogeni è ridotta o può fluttuare. Il numero dei linfociti B può essere normale, ma la funzione alterata: ciò è indicato dall'associazione, talora con un'ipergammaglobulinemia, in altri pazienti con una gammopatia monoclonale o con la presenza di autoanticorpi specifici.

Diagnosi

Attualmente l'indagine di primo livello è rappresentata dalla misurazione dell'attività enzimatica di ADA mediante diversi metodi di misurazione dell'attività catalitica dei due enzimi (spettrofotometria, assays radiochimici, cromatografia): è diagnostica un'attività enzimatica inferiore a 1% negli emolisati a partire da eritrociti freschi o congelati. È stimato infatti che è sufficiente un'attività residua dell'enzima superiore al 5% per prevenire l'insorgere dell'immunodeficienza.

La diagnosi può essere effettuata anche mediante dosaggio dei substrati dell'enzima ADA nel sangue intero, nel plasma e nelle urine mediante spettrometria di massa.

Il livello di attività di ADA nei globuli rossi non correla col fenotipo clinico, al contrario dell'attività dell'enzima espresso nei linfociti periferici: in tali cellule nei pazienti con difetto di ADA l'attività enzimatica è da 1 a 2% del normale.

Al contrario, c'è una buona correlazione tra gravità clinica e livello di dATP negli eritrociti. Tale parametro ha un valore prognostico alto nei casi di nuova diagnosi se non precedentemente trasfusi.

I metaboliti accumulati possono essere dosati non solo in fase diagnostica, ma anche come markers biochimici per monitorare l'efficacia del trattamento.

Questi in generale comprendono:

- livelli di dATP o valore totale dei nucleotidi dAdo (dAXP) eritrocitari
- attività eritrocitaria dell'enzima S-adenosilomocisteina (AdoHcyse, SAHase)
- livelli urinari di dAdo
- livelli di Ado e dAdo nel DBS (Dry Blood spot)

La diagnosi genetica potrà poi confermare la diagnosi biochimica. Una volta identificata la mutazione, è possibile la diagnosi prenatale o con la ricerca della mutazione o rilevando un'attività enzimatica ridotta o assente sugli amniociti in coltura o sui fibroblasti dei villi coriali.

Il gruppo di Arredondo-Vega lo stesso che ha definito i fenotipi clinici di malattia ha analizzato una vasta casistica di pazienti affetti e ha valutato l'attività enzimatica di ADA in ceppi E.coli che esprimevano tutti i geni mutati. Sulla base dell'attività enzimatica e dei livelli di dAXP accumulati, le diverse mutazioni sono state classificate in 4 classi (I,II,III,IV), con attività enzimatica crescente. E' stata valutata poi la correlazione tra le mutazioni delle diverse classi e le varie forme cliniche di malattia, confermando che generalmente le mutazioni più gravi (di classe I) erano osservate nei pazienti con forme precoci di malattia e mutazioni di classe II-IV erano proprie dei pazienti con esordio tardivo (9).

Terapia

Oltre al supporto con terapia sostitutiva con immunoglobuline, profilassi con cotrimossazolo per le infezioni da *Pneumocystis jirovecii*, trattamento aggressivo degli episodi infettivi ed eventuali trasfusioni con prodotti irradiati, esistono delle possibilità di cura (17,18).

Il trattamento di scelta per questi difetti è il trapianto di midollo osseo o di cellule staminali da fratelli HLA identici. In questi casi la percentuale di guarigione è del 70% o più (19).

In alternativa si potrà utilizzare il trapianto da donatore alternative (volontario HLA-matched non familiar, familiar HLA-aploidentico, da sangue cordonale). Tale procedura ha comunque tante complicanze, come l'insorgenza di GVHD, le complicanze infettive nel period pre-attecchimento, la possibilità d perdita del trapianto. In caso di perdit parziale, con lo sviluppo di un attecchimento misto, si potrà avere una incompleta riocstituzione dell'immunità umorale con necessità di terapia sostitutiva con immunoglobuline.

Le varie casistiche, se pur limitate, riportano in generale un frequente fallimento del graft nei pazienti con ADA-SCID. Sono state fornite varie spiegazioni, come la presenza in tali pazienti di cellule T in grado di rigettare il graft, oppure una suscettibilità delle cellule staminali del donatore ai metaboliti tossici presenti nel microambiente del ricevente. Secondo alcuni è necessario un trattamento condizionante citoriduttivo pre-trapianto, secondo altri è lesivo, dato che i farmaci usati sono epatotossici e quindi incrementerebbero la tossicità epatica degli stessi metaboliti accumulati per la malattia.

I attesa di trapianto o quando questo non è praticabile, è disponibile la terapia sostitutiva con ezima PEG-ADA: si tratta dell'enzima di origine bovina legata al polietilenglicole; tale legame covalente impedisce la proteolisi e l'uptake da altre cellule, prolungando il tempo di permanenza in circolo e riducendo l'immunogenicità. Dalle casistiche dei pazienti a cui è stata somministrata, emerge una riduzione dei metaboliti tossici nei globuli rossi, il miglioramento delle condizioni generali, la ripresa della crescita staturo-ponderale, e un buon controllo delle infezioni entro i primi 3 mesi di trattamento. Entro 6 mesi, cessano le infezioni opportunistiche, mentre la frequenza e la durata delle infezioni respiratorie e della diarrea diminuiscono. Anche dopo terapie a lungo termine con PEG-ADA, la maggior parte dei pazienti rimane linfopenica e la risposta ai mitogeni dei linfociti è fluttuante dal 30 al 90% di quella dei controlli. Il compartimento B cellulare va incontro ad un recupero migliore rispetto ai pazienti trapiantati. In circa il 10% dei pazienti, entro alcuni mesi dall'inizio della terapia, si possono rilevare anticorpi anti PEG-ADA e in alcuni di questi è evidente anche una clearance dell'enzima stesso. Altre possibili conseguenze osservate sono fenomeni di immuno- disregolazione, come anemia emolitica o malattie linfoproliferative. Infine una buona alternativa è rappresentata dalla terapia genica, che al momento è solo sperimentale. Si tratta

di prelevare delle cellule staminali dal midollo osseo, inserire il gene normale per l'enzima in un vettore retrovirale e reinfonderle nel paziente (20).

SCREENING NEONATALE DELLE IMMUNODEFICIENZE CONGENITE

Come per tutte le altre malattie per cui è possibile, lo screening neonatale ha lo scopo di evidenziare l'immunodeficienza in fase pre-sintomatica, con notevoli vantaggi per il paziente in termini di salute che per la società in termini di risparmio di risorse. Dato che rispondo ai criteri di Wilson, stabiliti dall'OMS nel 1995, le SCID sono state incluse nello screening neonatale. In particolare, tra i criteri è fondamentale il fatto che il trattamento precoce delle SCID con TMO effettuato entro i 3,5 mesi di vita, prima che il paziente sviluppi infezioni gravi e si instrui un danno d'organo, a una percentuale di sopravvivenza del 95%, mentre nei pazienti trapiantati dopo i 3,5 mesi la sopravvivenza scende al 66% (21,22,23). Date queste premesse, a Washington, il 21 gennaio 2010 il "Secretary's Advisory Committee for Heritable Disorders in Newborns and Children" (ACHDNC) ha raccomandato all'unanimità l'inclusione delle immunodeficienze combinate gravi (SCID) nel pannello di screening neonatale.

Nel tempo sono state proposte diverse metodiche di screening: la prima proposta è stata l'emocromo completa alla nascita, considerando che la maggior parte dei bambini con SCID ha conte linfocitarie assolute molto basse. Questo è stato poi scartato per l'alto numero di falsi positivi e falsi negativi, oltre che per la necessità di effettuare ulteriore prelievo oltre a quello su DBS. Successivamente è stato preso in considerazione il dosaggio dell'interleuchina 7 (IL-7) con metodica ELISA su spot neonatale, basandosi sul rationale che questa citochina risulta elevata nel siero e nel plasma dei pazienti con SCID. È stato poi scartato per la necessità di testare nuovamente i pazienti identificati con metodiche più specifiche.

Infine è stata proposta la quantificazione dei Tcell receptor gene excision circles (TRECs) attraverso un'analisi real time PCR su DBS. I TREC sono

piccoli segmenti di DNA del gene codificante per il T-cell receptor (TCR) che vengono escissi durante la fase di maturazione dei linfociti T nel timo attraverso il fenomeno della ricombinazione V(D)J. Le estremità dei segmenti successivamente si chiudono portando alla formazione di un prodotto circolare stabile (24). I TREC sono quindi dei buoni marcatori del corretto e avvenuto processo di maturazione linfocitaria nel timo e nel midollo iniziata già nella vita intra-uterina. Inoltre I TREC non vanno incontro a replicazione all'interno della cellula, non duplicano durante la mitosi e quindi vengono diluiti con le successive divisioni cellulari (25). Nonostantele SCID siano causate da mutazioni che interessano geni diversi, la maggior parte dei soggetti affetti ha un basso numero di TREC alla nascita (26). Nel 2008 è stato avviato il primo progetto pilota di Screening neonatale mediante TRECs in Wisconsin (USA). Tuttavia, come descritto da molti autori, questo metodo genera un alto numero di falsi positivi e i costi appaiono insostenibili per molti paesi. Costo per test: circa 5\$).

SCREENING NEONATALE DI ADA SCID CON TANDEM MASSA

Recentemente è stato introdotto un nuovo metodo di screening applicabile alla SCID da difetto di ADA: si tratta dello studio in spettrometria di massa tandem su DBS con la ricerca e quantificazione dei metaboliti di accumulo Ado e dAdo.

E' una metodica estremamente sensibile, essendo in grado di individuare gli analiti considerati senza che vi sia overlap tra i valori nei pazienti affetti e quelli nei controlli: in particolare la media dei valori di Ado nei pazienti affetti è circa 30 volte quella dei controlli, mentre la media dei valori di dAdo negli affetti è perfino 1700 volte quella dei controlli (27). Il laboratorio di Immunologia e quello di Diagnostica delle Malattie del Sistema Nervoso e del Metabolismo dell'Ospedale Meyer di Firenze hanno messo a punto negli ultimi anni tale metodica e attraverso lo studio di campioni DBS con spettrometria di massa tandem di controlli, portatori e pazienti affetti sono stati stabiliti i cut-off diagnostici per i livelli di Ado, superiori a 2 micromoli/L e dAdo, superiori a 0.07 micromoli/L. Il metodo è stato brevettato (PCT EP2010/070517) e validato utilizzando 12.000 DBS da neonati sani (27,28). Tali markers possono essere dosati insieme agli altri metaboliti che vengono testati normalmente nei

programmi di screening neonatale, ad un costo irrisorio (0,05 € per test). Il basso costo dipende dal fatto che vengono utilizzate le stesse risorse che si adoperano già per lo screening neonatale delle malattie metaboliche. Attualmente infatti la spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS) permette lo screening neonatale di circa 40 difetti metabolici noti per cui esiste una terapia. Questa consente l'analisi contemporanea di più metaboliti su un'unica goccia di sangue raccolta tra le 48 e le 72 ore di vita. Numerose esperienze di screening neonatale tramite questa metodica condotte dalla fine degli anni Novanta in vari paesi hanno confermato la validità di questa tecnica e il follow-up dei pazienti diagnosticati con screening neonatale mostra una favorevole modifica nella storia naturale della malattia. In Italia è stata proprio la regione Toscana ad avviare per prima l'attività di screening neonatale allargato in LC-MS/MS: dal 1° novembre 2004 è stato reso obbligatorio a tutti i nati in Toscana. Dal 1° gennaio 2006 lo screening neonatale in LC-MS/MS presso il centro screening neonatale regione Toscana è stato esteso anche ai nati nell'area USL 1 Umbria e dal 1° gennaio 2010 a tutta la regione Umbria. Successivamente alla Regione Toscana lo screening neonatale in LC-MS/MS è stato avviato, come progetto pilota o programma di screening, nella Regione Liguria e in parte nella regione Lazio e Campania, ed è in fase organizzativa in altre regioni. Dal 1° gennaio 2011, nella regione Toscana, il pannello di patologie sottoposte a screening neonatale in LC-MS/MS è stato allargato alle immunodeficienze causate da deficit dell'enzima Adenosina Deaminasi (ADA). I primi 18 mesi di esperienza toscana hanno permesso di individuare un paziente ADA (1:50.000), suggerendo così che l'incidenza della malattia è largamente sottostimata. Oltre al basso costo e all'assenza di falsi positivi, la spettrometria di massa tandem ha un altro vantaggio rispetto al dosaggio dei TREC: permette di identificare già alla nascita anche i pazienti che non hanno ancora un difetto immunitario conclamato, che rientrano quindi nelle forme delayed e late onset. In tali pazienti infatti i TREC alla nascita possono essere ancora normali, mentre sono già rilevabili i metaboliti accumulati Ado e dAdo (28).

SCOPO DELLA TESI

L'immunodeficienza da deficit di ADA è una delle principali forme di immunodeficienza severa combinata (SCID). La mancanza dell'enzima, che ha un ruolo chiave nel catabolismo delle purine, comporta un grave disordine metabolico ereditario. Nella forma comune, la totale assenza dell'enzima determina l'accumulo di metaboliti tossici che da una parte causano difetti del sistema immunitario e dall'altra danni permanenti ad organi e tessuti, come cervello e fegato. In questi casi l'ADA-SCID è fatale nel primo mese di vita se non trattata, e con gravi conseguenze se trattata troppo tardi. Inoltre sono stati descritti casi di insorgenza tardiva ADA-SCID, nei quali i pazienti presentano ricorrenti infezioni croniche e patologie polmonari non fin dai primi mesi di vita ma successivamente, durante l'infanzia. Se questa immunodeficienza è individuata in fase precoce, il trapianto di cellule staminali ematopoietiche può essere curativo. Per tale ragione nel 2010 le SCID sono state dichiarate eleggibili di screening neonatale. Uno dei mezzi di screening di ADA-SCID più promettenti sembra essere la spettrometria di massa tandem, che permette di individuare e quantificare i metaboliti tossici accumulati già alla nascita sullo stesso DBS che si utilizza per lo screening delle malattie metaboliche.

La spettrometria di massa, rispetto all'altro metodo di screening rappresentato dal dosaggio dei TREC, ha il vantaggio di essere in grado di individuare anche le forme di malattia ad esordio tardivo. Infatti in tali forme i TREC sono ancora presenti, perché la disfunzione immunologica ancora non si è verificata, mentre i metaboliti sono già presenti alla nascita, in quanto si sono accumulati fin dalla vita intra-uterina. E' ipotizzabile quindi prevedere il fenotipo clinico di malattia sulla base dei livelli dei metaboliti dosati alla nascita su spot. Lo scopo di questa tesi pertanto è stato quello di valutare la capacità di tale metodo di identificare già alla nascita il fenotipo clinico di ADA-SCID. In particolare, il primo obiettivo è stata l'individuazione di un marker specifico i cui valori alla nascita correlano con la gravità del fenotipo futuro di malattia. Il secondo obiettivo è stato quello di verificare se esiste una correlazione tra i valori dei metaboliti alla nascita e il genotipo e di confrontare questa correlazione con quella tra metaboliti e fenotipo e con quella tra genotipo e fenotipo.

METODI

PAZIENTI

Lo studio è stato effettuato su 16 DBS effettuati alla nascita, appartenenti a pazienti affetti da ADA-SCID con diversi fenotipi clinici. Di questi 16 pazienti, 11 avevano una forma early-onset, 4 avevano una forma delayed-onset, 1 aveva una forma late-onset. Sono stati poi esaminati i DBS eseguiti alla nascita di 7 controlli sani. 7 pazienti erano italiani, 1 paziente era tedesco e 15 pazienti erano americani.

L'analisi degli spot in tandem massa è stata effettuata presso il Laboratorio di Malattie metaboliche dell'Ospedale Meyer.

I DBS erano stati raccolti tra le 48 e le 72 ore di vita mediante puntura da tallone, procedura standard di raccolta di goccia di sangue su apposita carta filtro ai fine di screening neonatale. La diagnosi di ADA-SCID nei pazienti affetti era stata formulata ad un'età compresa tra 0 e 7 anni (Tabella 1).

Ad eccezione dei pazienti diagnosticati allo screening neonatale, tutti avevano esordito con infezioni respiratorie ricorrenti e a decorso prolungato.

Per 10 dei pazienti considerati era nota la mutazione genetica (Tabella 6).

Tra i 7 controlli sani, un paziente era carrier di una mutazione del gene ADA e clinicamente sano.

Paziente	Età alla diagnosi
1	4 anni
2	4 anni
3	7 anni
4	screening
5	3 anni
6	4 mesi
7	2 mesi
8	screening
9	screening
10	screening
11	screening
12	screening
13	screening
14	screening
15	screening
16	screening
17	negativo
18	carrier
19	negativo
20	negativo
21	negativo
22	negativo
23	negativo

Tabella 1.

SPETTROMETRIA DI MASSA TANDEM SU DBS

Per questo studio è stato utilizzato uno spettrometro Triple-Quad (ABI SCIEX API 4000, Toronto, Canada) dotato di una sorgente turbo ion spray e accoppiato ad un sistema di analisi HPLC. Ad ogni spot di sangue neonatale sono stati aggiunti 300 microlitri di una soluzione di estrazione fatta da una miscela contenente metanolo e acqua in un volume pari a 60/40 v/v. Nella soluzione di estrazione sono presenti anche standard interni marcati con isotopi stabili di aminoacidi, carnitina libera, acilcarnitine, adenosina e deossiadenosina.

Il campione estratto è stato poi portato a secco mediante evaporazione del solvente e ripreso in una miscela contenente acetonitrile e acqua (70:30 v/v) e poi iniettato nello spettrometro di massa. Gli spettri di massa degli aminoacidi vengono acquisiti in neutral loss scan della molecola neutra a 46 Da. Gli spettri di massa delle acilcarnitine vengono acquisiti in precursor ion scan dello ione 85m/z. Gli spettri di massa per adenosina e deossiadenosina vengono acquisiti mediante transizioni MRM specifiche (29), normali livelli di adenosina sono <2 micromoli/L, mentre la 2-deossiadenosina è quasi assente nei DBS di soggetti sani. (<0.07 micromoli/L).

Il metodo non ha dato nessun falso positivo in 50.000 neonati esaminati all'interno del programma pilota di screening condotto in Toscana con nessuna differenza tra nati a termine e prematuri.

ATTIVITA' ENZIMATICA ADA E LIVELLI DI dAXP

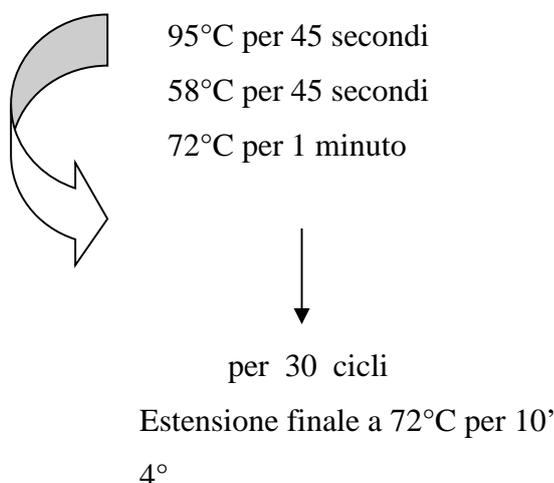
L'attività enzimatica ADA è stata valutata utilizzando tre metodi diversi. Il metodo A è stato eseguito su emolisato di sangue intero, considerando quindi l'attività enzimatica sia in globuli rossi e sia in globuli bianchi. I valori di riferimento per il metodo A sono i seguenti: <0.3 U/gHb per i pazienti early-onset ADA-SCID, 0.4-0.8 per i pazienti delayed-onset o late-onset ADA-SCID e per i portatori, 0.8-2.5 per i controlli sani. Il metodo B determina l'attività

ADA su estratti separati di globuli rossi e globuli bianchi, si tratta di un saggio basato su HPLC (30). Il metodo C è un saggio radiochimico descritto da Arredondo-Vega negli anni Novanta. I valori normali per l'attività enzimatica ADA negli eritrociti e nei globuli bianchi sono rispettivamente, 63.0 ± 41.4 e 1197 ± 516 nmol/hour per mg di proteina; pazienti non trasfusi con early-onset ADA-SCID, come pazienti delayed-onset e late-onset ADA-SCID, hanno valori $<1\%$ di una normale attività ADA sia in eritrociti e sia in globuli bianchi. I livelli totali di adenosina e deossadenosina (rispettivamente AXP e dAXP) nei globuli rossi sono stati pubblicati dal gruppo di ricerca della Duke University (9).

Il valore normale di dAXP negli eritrociti è $<0,002$ mmol/ml; per comparare i livelli di dAXP misurati in tempi diversi e in pazienti diversi, il valore di dAXP viene espresso come segue: $dAXP = \frac{[dAXP]}{[AXP + dAXP]} \cdot 100$. Il valore normale di dAXP è $<0.2\%$. I livelli di dAXP in pazienti non trasfusi varia in base al fenotipo clinico (9).

AMPLIFICAZIONE PCR DEL GENE ADA

Le reazioni di PCR sono state effettuate in un volume finale di 25 μ l, utilizzando 5 μ l di DNA genomico, 12,5 μ l di Master Mix Quiagen e 2,5 μ l di primers mix contenente primers fwd e rev per ogni esone del gene ADA. Il programma di amplificazione prevede una denaturazione iniziale a 95°C per 15 minuti seguita da.:



Le reazioni sono state effettuate in un termociclatore GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems). I prodotti di PCR sono stati purificati mediante

metodo enzimatico (EXOSAP-IT), che utilizza la combinazione di due enzimi: esonucleasi I e fosfatasi alcalina. Questo metodo permette la purificazione di frammenti di PCR anche inferiori a 100 bp e grandi fino a 20 kb, senza significativa perdita di campione. La miscela dei due enzimi (1,5 µl) viene aggiunta direttamente al prodotto di PCR e la microprovetta viene inserita nel termociclatore GeneAmp-PCR System 2700 (Applied Biosystems) secondo il seguente ciclo di purificazione: 37°C per 15 minuti e 80°C per 15 minuti. Le sequenze dei primers utilizzati per amplificare gli esoni del gene *ADA* sono riportati in Tabella 2.

ESONE 1 fwd : 5'-agg aaa tgc gcg atc cag-3'
ESONE 1 rev : 5'-cca ctt gac aga cag cga aa-3'
ESONE 2 fwd : 5'-aat ggt ggc taa tgg tta tca-3'
ESONE 2 rev : 5'-cca gaa agc tca gga gtt gg-3'
ESONE 3 fwd : 5'-atg tct cct gct gtg gtc ct-3'
ESONE 3 rev : 5'-gct ccc ata ttc tgc cat tt-3'
ESONE 4 fwd : 5'-caa agt aga gct gat agg act tgc-3'
ESONE 4 rev : 5'-atg gga acc acg tct ctt gt-3'
ESONE 5 fwd : 5'-cag tct ttc ctc tga ggc agt-3'
ESONE 5 rev : 5'-gcc tag gag gtc tcc agt tg-3'
ESONE 6 fwd : 5'-caa tag ctg gca ggg ttc tt-3'
ESONE 6 rev : 5'-cca agc ctt aag acc caa ca-3'
ESONE 7 -8 fwd : 5'-gca ggc agc atg act agg at-3'
ESONE 7-8 rev : 5'-cag gcc atg ctg att cct-3'
ESONE 9 fwd : 5'-gct acc aca ccc tgg aag ac-3'
ESONE 9 rev : 5'-cag agt aat gga gcg ttc tgc-3'
ESONE 10 fwd : 5'-atg ggc tgg att ctg gac tt-3'
ESONE 10 rev : 5'-aca cac ctt tct ggg gag ag-3'
ESONE 11 fwd : 5'-ggt ctc tac tct gga act tgc t-3'
ESONE 11 rev : 5'-cat gga ggt gtc ccc aac t-3'
ESONE 12 fwd : 5'-tct tgg caa ggc atc ttc tt-3'
ESONE 12 rev : 5'-cac agc att ggg atc tct gg-3'

Tabella 2. Sequenze primers utilizzate per amplificare i 12 esoni del gene ADA.

SEQUENZIAMENTO DEL GENE ADA

Il protocollo di lavoro utilizzato è basato sull'impiego del kit BigDye-Terminator v1.1 Cycle sequencing (Applied Biosystems). Le condizioni da seguire per ogni marcatura fluorescente, in tubini sterili da 0.2 ml mediante PCR sono le seguenti:

• DNA stampo	2-100ng
• BigDye-Terminator	2 µl
• 5x Sequencing Buffer	3,2 µl
• Primer F o R	3.2 pmol

Si porta a volume finale di 20 µl con acqua deionizzata e si mettono i tubini nel termociclatore impostando le seguenti condizioni di amplificazione:

96°C per 10'', 50°C per 5'', 60°C per 2' (25 cicli)

Il prodotto della reazione viene conservato a 4°C fino all'utilizzo nella successiva fase di rimozione dei Big-Dye Terminator non incorporati (Kit DyEx 2.0 Spin Kit, Qiagen) e comunque per un tempo non superiore ad una settimana.

I campioni una volta purificati, vengono inseriti in apposite piastre e caricati sul sequenziatore ABI Prism 3130 Genetic Analyser.

RISULTATI

I 23 pazienti totali sono stati studiati in cieco, analizzando con la spettrometria di massa tandem i loro DBS. La tabella seguente mostra i livelli dei metaboliti nei diversi pazienti (**Tabella 3**).

Paziente	Ado (<2micromoli/L)	dAdo (<0.07 micromoli/L)	Ratio Ado/dAdo
1	8.6	0.4	21.5
2	25	2.7	9.3
3	10.0	0.7	14.3
4	6.9	1.2	5.7
5	19.0	2.4	7.9
6	4.4	2.4	1.76
7	11.8	5.3	2.2
8	8.6	16.2	0.53
9	26.5	52.92	0.5
10	7.6	9.9	0.8
11	28.6	27.4	1.0
12	8.8	27.1	0.32
13	47.2	34.3	1.4
14	18.9	13.4	1.4
15	2.4	15.1	0.2
16	40.8	55.3	0.7
17	1.5	0.005	300
18	1.8	0.3	6.0
19	0.56	0.02	28.0
20	0.77	0.02	38.5
21	1.01	0.03	33.7
22	0.88	0.01	88.0
23	2.60	0.03	86.7

Tabella 3.

La tabella che segue mostra invece il rapporto Ado/dAdo in correlazione con la l'ipotesi diagnostica basata sul risultato della tandem massa e con la diagnosi effettiva (**Tabella 4**).

Paziente	Ratio Ado/dAdo	Diagnosi clinica	Ipotesi TMS
1	21.5	Delayed onset	Delayed onset
2	9.3	Delayed onset	Delayed onset
3	14.3	Delayed onset	Delayed onset
4	5.7	Late onset	Late onset
5	7.9	Delayed onset	Delayed onset
6	1.76	Early onset	Early onset
7	2.2	Early onset	Early onset
8	0.53	Early onset	Early onset
9	0.5	Early onset	Early onset
10	0.8	Early onset	Early onset
11	1.0	Early onset	Early onset
12	0.32	Early onset	Early onset
13	1.4	Early onset	Early onset
14	1.4	Early onset	Early onset
15	0.2	Early onset	Early onset
16	0.7	Late onset	Early onset
17	300.0	Negativo	Negativo
18	6.0	Carrier	Delayed onset
19	28.0	Negativo	Negativo
20	38.5	Negativo	Negativo
21	33.7	Negativo	Negativo
22	88	Negativo	Negativo
23	86.7	Negativo	Negativo

Tabella 4.

I dati sono poi stati studiati con analisi statistica Mann-Whitney/Wilcoxon Two-Sample Test (Kruskal-Wallis test for two groups) che ha dato i seguenti risultati:

	Ado	dAdo	Ado/dAdo
Kruskal-Wallis H (equivalent to Chi square)	11.8261	17.3862	17.7492
Degrees of freedom	2	2	2
p value	0.0027	0.0002	0.0001

Tabella 5.

E' stata poi stabilita una correlazione tra i parametri Ado, dAdo e Ado/dAdo con il fenotipo clinico di malattia. I seguenti grafici mostrano i valori ottenuti e le relative medie.

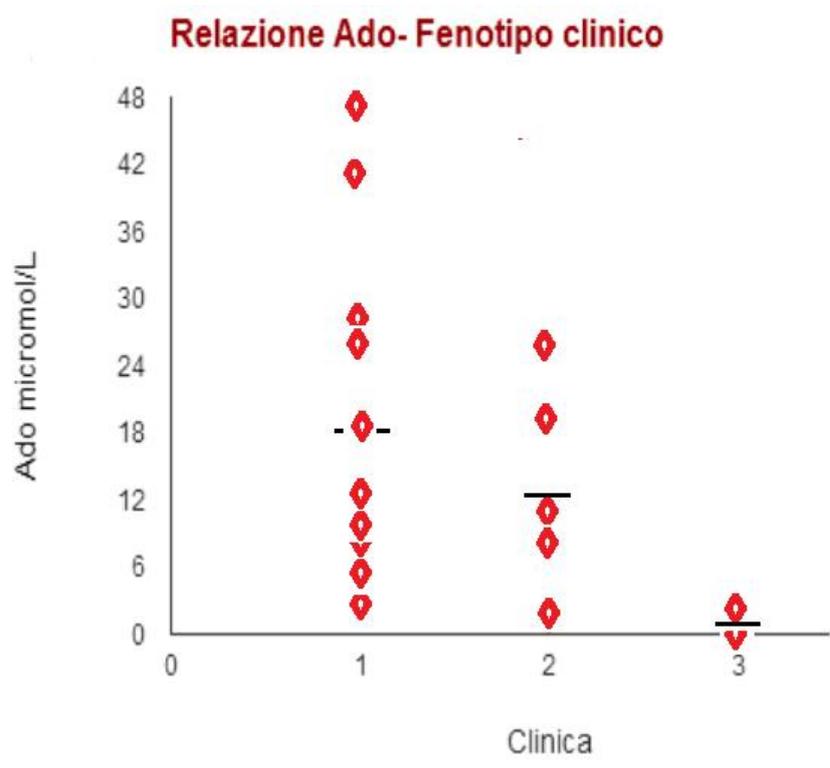


Grafico A.

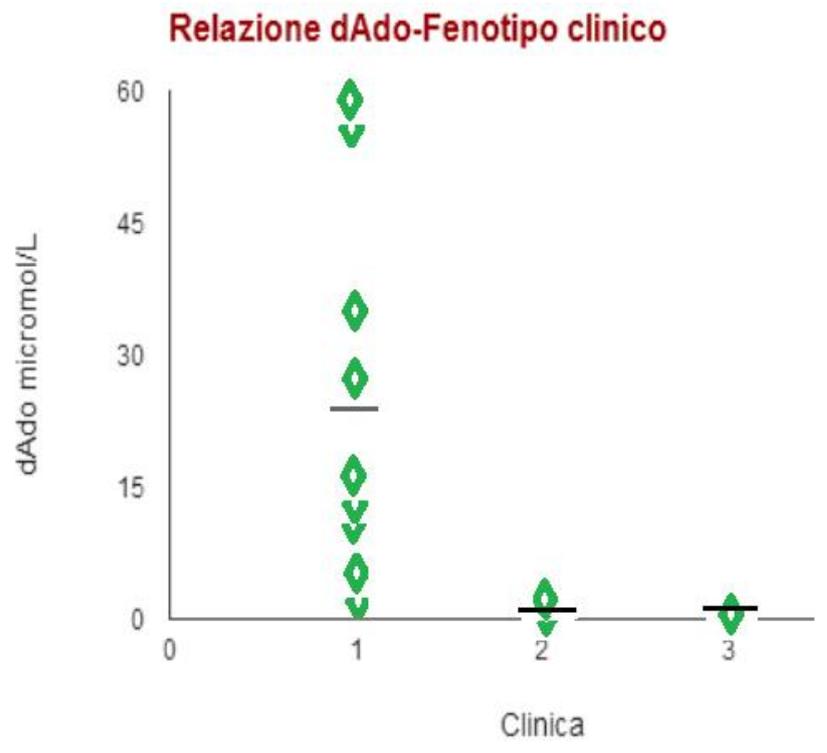


Grafico B.

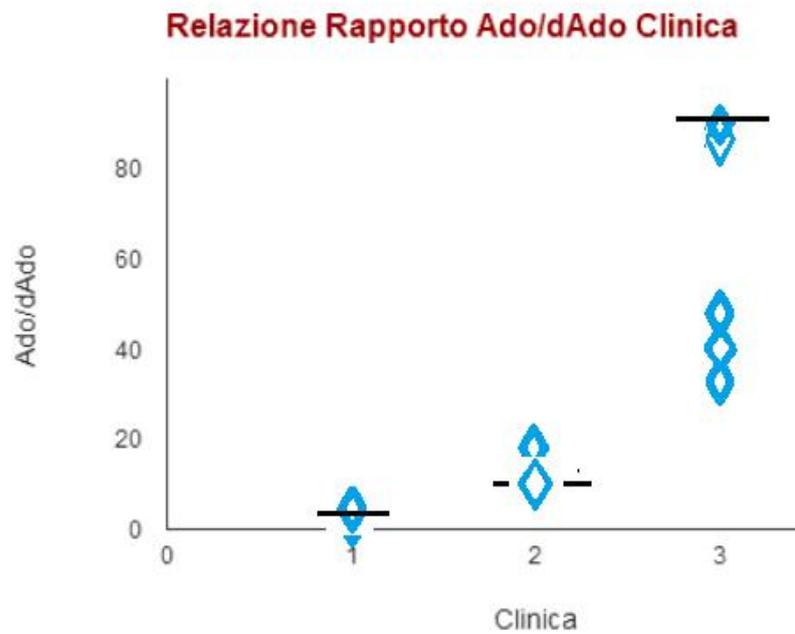
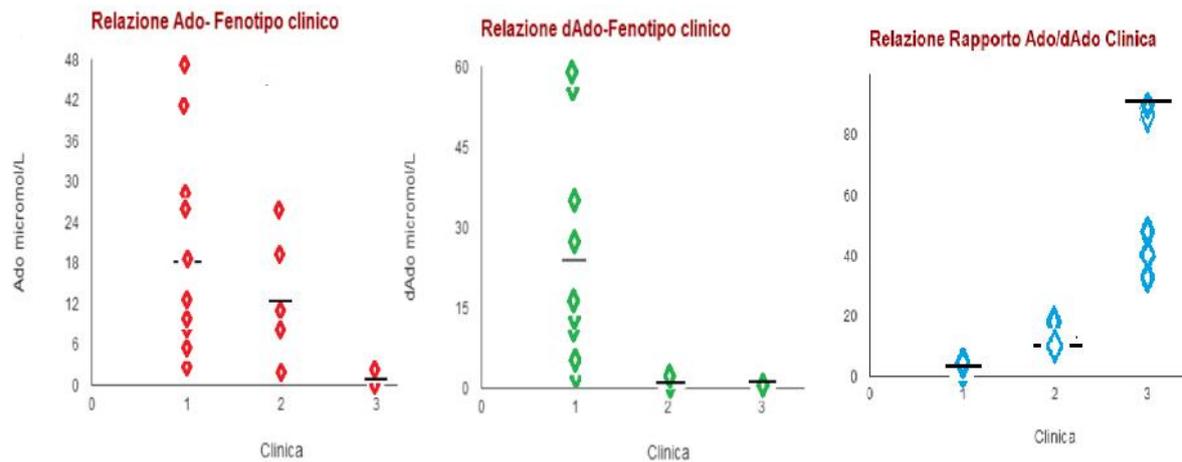


Grafico C.

1 = early onset; 2 = delayed onset; 3 = controllo

Il grafico che segue riassume le distribuzioni dei tre parametri nei fenotipi early-onset e delayed-onset.



1 = early onset; 2 = delayed onset

Grafico D.

I valori sono stati poi confrontati con i risultati ottenuti esaminando un campione di 12000 controlli sani. Da tale casistica i valori di Ado erano compresi tra un minimo di 0.01 micromoli/L ad un valore massimo di 0.4 micromoli/L; la media era di 0.064 micromoli/L, SD 0.08 micromoli/L. I valori di dAdo erano sempre sotto al limite di sensibilità della spettrometria di massa tandem (0.005 micromoli/L). Il rapporto Ado/dAdo in questa casistica aveva una media di 32.8 micromoli/L, con valori compresi tra 2 e 80 micromoli/L.

La tabella seguente mostra i valori del rapporto Ado/dAdo in relazione oltre all'ipotesi diagnostica basata sul risultato della tandem massa e alla diagnosi effettiva, anche al genotipo, per i pazienti per i quali la mutazione genetica era nota. Nell'ultima colonna vi è la classificazione di ciascuna mutazione secondo Arredondo-Vega (**Tabella 6**).

Paziente	Ado/dAdo	Diagnosi clinica	Ipotesi TMS	Mutazione	Classe
1	21.5	Delayed	Delayed	E6:V177M E10:E319fsX	II
2	9.3	Delayed	Delayed	E6:V177M E10:E319fsX	II
3	14.3	Delayed	Delayed	c.780+1G>A c.396dupA	Mutazione di splicing/Duplicazione
4	5.7	Late	Late	E2:H15D E3:I50T	I/mutazione nuova
5	7.9	Delayed	Delayed	E5:V129M E10:S291L	II/I
6	1.76	Early	Early	E3:F61fsX87 E11:E337X	I
7	2.2	Early	Early	E5:R156C E10:c.956_960delAA GAG	I
8	0.53	Early	Early	E10T294K	Mutazione nuova
16	0.7	Late	Early	E4:R101G E4:L107P	I
18	6.0	Carrier	Delayed	E2:IVSdsG>A	Mutazione di splicing

Tabella 6.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Lo scopo principale della tesi è stato quello di individuare un parametro sensibile e affidabile in grado di predire il fenotipo clinico di un paziente affetto da ADA-SCID.

Il dosaggio dei metaboliti A_{do} e dA_{do} mediante spettrometria di massa tandem è lo strumento migliore in quanto non solo correla in maniera significativa col fenotipo ma fornisce tale dato in fase precocissima. Infatti, com'è già stato dimostrato, i metaboliti sono già presenti a valori patologici fin dalla nascita in tutte le forme di malattia, anche quelle ad esordio delayed e late onset. Fin dalla nascita quindi, un paziente affetto non solo può essere diagnosticato ma si può predire anche che forma di malattia svilupperà sulla base del livello dei metaboliti.

Ogni volta che un soggetto alla nascita risulta avere un livello di metaboliti anomalo, dovranno essere caratterizzati l'attività enzimatica di ADA, i livelli di dAXP e il profilo immunologico per completare la determinazione del fenotipo.

Tutto ciò è fondamentale dal punto di vista clinico, in quanto permette di eseguire il follow-up appropriato per il paziente e con gli strumenti giusti e soprattutto di intervenire tempestivamente non appena compare un deterioramento dell'assetto immunologico. In tal modo sarà possibile evitare le conseguenze gravi e spesso permanenti dovute al manifestarsi di infezioni.

I dati raccolti dimostrano che esiste una correlazione significativa tra i valori dei metaboliti accumulati A_{do} e dA_{do} e del loro rapporto col fenotipo clinico della malattia. In particolare è stato dimostrato che il parametro rapporto A_{do}/dA_{do} è il marker migliore per predire il fenotipo clinico.

E' stata infatti valutata la forza della correlazione di tutti e tre i parametri con la clinica. Nel caso del parametro A_{do}, è emersa un'ampia sovrapposizione tra i valori di A_{do} nelle forme early e delayed onset. Anche se la media e la

mediana di Ado è maggiore nei pazienti early rispetto ai delayed, l'ampia sovrapposizione fa sì che in ogni singolo paziente il valore isolato indica la patologia ma non può predire il fenotipo. Riguardo al parametro dAdo, la sovrapposizione è meno evidente e la differenza della media e della mediana tra early e delayed è più spiccata, ma neppure il livello di dAdo, valutato da solo, può predire con certezza il fenotipo clinico. I valori del rapporto Ado/dAdo invece non si sovrappongono nei due fenotipi: il massimo valore negli early onset è 2.2, mentre il minimo valore nei delayed onset è 5.7 micromoli/L. E' il rapporto Ado/dAdo quindi, nei soggetti affetti da difetto di ADA, il marcatore più utile e specifico per la determinazione del fenotipo.

Ciò vale esclusivamente nei pazienti affetti, cioè che hanno valori di Ado e dAdo fuori dal range della norma. Infatti nei soggetti sani che presentano oltre ad un valore molto basso di dAdo, anche un valore molto basso di Ado, il rapporto risulta basso e sovrapponibile a quello dei pazienti affetti con forma early onset.

Sono stati inoltre confrontati i fenotipi previsti sulla base dei valori di tale rapporto con i fenotipi clinici attribuiti alla diagnosi ed è emersa una netta corrispondenza.

Laddove possibile, è stata poi analizzata la correlazione tra rapporto Ado/dAdo, fenotipo clinico e genotipo. I pazienti 1 e 2 avevano la stessa mutazione in quanto fratelli.

Riguardo alla paziente numero 4, in essa sono state riscontrate due mutazioni, di cui una nota appartenente alla classe I, ed un'altra nuova.

Al fine di comprendere la gravità, tale mutazione è stata inserita in siti di predizione proteica, che l'hanno definita probabilmente dannosa. Per comprenderne l'effetto funzionale, ne è stato studiato l'effetto in termini di attività enzimatica, mediante espressione dell'enzima mutato in E.coli. I risultati hanno dimostrato un'attività residua dell'enzima di circa il 30% nella forma mutata rispetto all'enzima wild-type. La paziente è stata quindi collocata nel gruppo IV di Arredondo-Vega. Questa comprende mutazioni trovate anche in bambini sani e in adulti con deficit parziale. La paziente alla nascita aveva su DBS un dosaggio di metaboliti intermedio tra quello di un paziente sano e quelli di un paziente con una forma grave; inoltre dal punto di vista clinico stava bene e il sistema immunitario era intatto; i TREC su DBS della nascita erano infatti normali. E' stata poi testata l'attività enzimatica e sono stati dosati

i livelli di dAXP, che hanno mostrato valori border-line tra un difetto di ADA parziale e un fenotipo late onset. Non è noto quindi in quale epoca di vita la paziente svilupperà la malattia. Il caso dimostra come i metaboliti correlano meglio di altri parametri con il genotipo e hanno permesso di fare la diagnosi alla nascita e di instaurare un follow-up clinico ed ematochimico adeguato.

Nel caso del paziente numero 8 la mutazione identificata era nuova, non comparso nei database ufficiali e quindi non era codificata in una delle classi. Sicuramente però, trattandosi di una mutazione in omozigosi che comporta un cambio di classe amminoacidica è verosimile che si associ ad una forma di malattia ad esordio precoce.

Le mutazioni di splicing, nella casistica di Arredondo-Vega, si associano sia a fenotipo early onset che delayed e late onset; è noto che nella maggior parte dei casi queste ultime varianti di sequenza alterano lo schema di lettura proteica e quindi il difetto è molto grave, se trovate in omozigosi. Nei DBS analizzati, come mostrato sopra, queste erano in eterozigosi; ciò spiega perché il fenotipo era più blando.

Nel complesso, i dati mostrano che il valore di metaboliti su spot neonatale correla non solo col fenotipo clinico ma anche con il genotipo. Infatti tutti i pazienti a cui, sulla base del rapporto Ado/dAdo, si attribuiva un fenotipo early onset, avevano una mutazione di classe I; tutti quelli a cui corrispondeva un fenotipo delayed onset, avevano una mutazione di classe II.

E' emerso anche che è più stretta la correlazione tra valore dei metaboliti e genotipo che quella tra fenotipo clinico e genotipo.

Il paziente 16 infatti aveva un fenotipo clinico di tipo late onset ma un valore di Ado/dAdo e un tipo di mutazione caratteristici di una forma early onset.

Ciò si spiega col fatto che talvolta, anche se in base alla mutazione è previsto un esordio precoce, vi sono altri fattori per cui i pazienti possono sviluppare il quadro clinico più tardivamente, ad esempio il mancato incontro con patogeni particolarmente virulenti.

Il paziente 18 infine, sulla base della clinica era stato definito portatore, tuttavia aveva valori del rapporto Ado/dAdo compatibili con una forma delayed onset.

Da un punto di vista molecolare è stata identificata solo una variante di splicing in eterozigosi, che non può spiegare del tutto i valori tossici dei metaboliti.

Si ipotizza quindi che il soggetto potrebbe avere un'altra variante di sequenza patologica in una zona intronica che è impossibile identificare con un

sequenziamento classico. Questo caso dimostra come l'analisi in spettrometria di massa può mettere in dubbio una diagnosi clinica, in quanto il paziente potrebbe non essere un carrier, ma sviluppare tardivamente la malattia.

Riguardo al secondo obiettivo quindi, i dati, seppur ottenuti da una casistica limitata a causa della rarità della malattia, dimostrano che è più forte la correlazione tra metaboliti e genotipo di quella tra metaboliti e fenotipo clinico. Inoltre metaboliti e genotipo tra sé correlano più strettamente che genotipo e fenotipo. Sono già in corso studi nel nostro laboratorio per avvalorare tali affermazioni.

In conclusione, il lavoro ha dimostrato che il dosaggio dei metaboliti in tandem massa su DBS è non solo uno strumento essenziale per lo screening neonatale di ADA-SCID, ma è anche il miglior metodo per predire il fenotipo clinico di malattia. Inoltre è emerso che i metaboliti sono più strettamente correlati al genotipo che al fenotipo clinico di malattia. Questo dipende dal fatto che il loro livello è condizionato dall'attività enzimatica residua, a sua volta determinata dal tipo di mutazione. Inoltre, i livelli dei metaboliti correlano col genotipo meglio di quanto non correlino tra sé fenotipo e genotipo.

Alla luce di queste considerazioni, dell'elevatissima sensibilità e specificità e del basso costo dell'analisi in tandem massa, è ipotizzabile che in un futuro prossimo, un valore patologico di metaboliti su spot neonatale, confermato con un secondo dosaggio sullo stesso campione, potrà indirizzare direttamente all'analisi genetica, riservando ad un secondo momento le analisi enzimatiche e gli approfondimenti immunologici. Ciò consentirebbe di accorciare notevolmente i tempi di diagnosi e di permettere al paziente di iniziare la terapia adeguata nell'arco di pochi giorni, con notevoli benefici clinici.

BIBLIOGRAFIA

1. Cacciari E, Cao A, Cavazzuti GB, Guaraldi GP, Guglielmi M, Panizon F, Segni G, Zacchello F, Zanesco L. Principi e pratica di pediatria. Monduzzi Editore. 1999.
2. Notarangelo LD. Primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:182-94.
3. Stiehm ER, Ochs HD, Winkelstein JA. Immunologic Disorders in Infants and Children Chapter 16. 5th Edition 2004.
4. Fischer A. Primary immunodeficiency diseases: a perspective. *Nature Immunology* 2004;5:23-30.
5. Geha RS, Notarangelo LD, Casanova JL, Chapel H, Conley ME, Fischer A, et al. Primary immunodeficiency diseases: an update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee. International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:776-94.
6. Gakis C, Piras MA. Behaviour of serum 2deoxyadenosine deaminase ratio in infectious diseases and haemopoietic malignancies. *Pathology* 1981;9:518-19.
7. Gakis C, Piras MA, Romani G. Unusual biochemical pattern of serum adenosine deaminase activity in acute lymphoblastyc leukemia. *Haematologica* 1982;67:199-200.

8. Thompson LF, Vaughn JG, Laurent AB, Blackburn MR, Van De Wiele CJ. Mechanisms of apoptosis in developing thymocytes as revealed by adenosine deaminase-deficient fetal thymic organ culture. *Biochem Pharmacol* 2003; 66:1595-99.
9. Arredondo-Vega FX, Santisteban I, Daniels S, Toutain S, Hershfield MS. Adenosine deaminase deficiency: genotype-phenotype correlations based on expressed activity of 29 mutant alleles. *Am J Hum Genet* 1998;63:1049-59.
10. Hirschhorn R. Adenosine deaminase deficiency: molecular basis and recent developments. *Clin Immunol Immunopathol* 1995;76:S219-27.
11. Bollinger ME, Arredondo-Vega FX, Santisteban I, Schwarz K, Hershfield MS, Lederman HM. Brief report: hepatic dysfunction as a complication of adenosine deaminase deficiency. *N Engl J Med* 2001;344:1367-71.
12. Tanaka C, Hara T, Suzaki I, Maegaki Y, Takeshita K. Sensorineural deafness in siblings with adenosine deaminase deficiency. *Brain Dev* 1996;18:304-6.
13. Rogers MH, Lwin R, Fairbanks L, Gerritsen B, Gaspar HB. Cognitive and behavioral abnormalities in adenosine deaminase deficient severe combined immunodeficiency. *J Pediatr* 2001;139:44-50.
14. Albuquerque W, Gaspar HB. Bilateral sensorineural deafness in adenosine deaminase-deficient severe combined immunodeficiency. *J Pediatr* 2004;144:278-80.
15. Nofech-Mozes Y, Blaser SI, Kobayashi J, Grunebaum E, Roifman CM. Neurologic abnormalities in patients with adenosine deaminase deficiency. *Pediatr Neurol* 2007;37:218-21.
16. Sokolic R, Maric I, Kesserwan C, Garabedian E, Hanson IC, Dodds M, Buckley R, Issekutz AC, Kamani N, Shaw K, Tan B, Bali P, Hershfield MS, Kohn DB, Wayne AS, Candotti F. Myeloid dysplasia and bone marrow

hypocellularity in adenosine deaminase-deficient severe combined immunodeficiency. *Blood* 2011;118:2688-94.

17. Gaspar HB. Bone marrow transplantation and alternatives for adenosine deaminase deficiency. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2010;30:221-36.

18. Gaspar HB, Aiuti A, Porta F, Candotti F, Hershfield MS, Notarangelo LD. How I treat ADA deficiency. *Blood* 2009;114:3524-32.

19. Buckley RH, Schiff SE, Schiff RI, Markert L, Williams LW, Roberts JL, Myers LA, Ward FE. Hematopoietic stem-cell transplantation for the treatment of severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 1999;340:508-16.

20. Aiuti A, Cattaneo F, Galimberti S, Benninghoff U, Cassani B, Callegaro L, Scaramuzza S, Andolfi G, Mirolo M, Brigida I, Tabucchi A, Carlucci F, Eibl M, Aker M, Slavin S, Al-Mousa H, Al Ghonaium A, Ferster A, Duppenthaler A, Notarangelo L, Wintergerst U, Buckley RH, Bregni M, Markt S, Valsecchi MG, Rossi P, Ciceri F, Miniero R, Bordignon C, Roncarolo MG. Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *N Engl J Med.* 2009;360:447-58.

21. Puck JM. Population-based newborn screening for severe combined immunodeficiency: steps toward implementation. SCID Newborn Screening Working Group. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:760-8.

22. Buckley RH. Molecular defects in human severe combined immunodeficiency and approaches to immune reconstitution. *Annu Rev Immunol* 2004;22:625-55.

23. Gaspar HB, Parsley KL, Howe S, King D, Gilmour KC, Sinclair J, Brouns G, Schmidt M, Von Kalle C, Barington T, Jakobsen MA, Christensen HO, Al Ghonaium A, White HN, Smith JL, Levinsky RJ, Ali RR, Kinnon C, Thrasher AJ. Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. *Lancet* 2004;364:2181-87.

24. van Zelm MC, Szczepanski T, van der Burg M, van Dongen JJ. Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B cell expansion. *J Exp Med* 2007;204:645-55.
25. van Zelm MC, van der Burg M, Langerak AW, van Dongen JJ. PID comes full circle: applications of V(D)J recombination excision circles in research, diagnostics and newborn screening of primary immunodeficiency disorders. *Front Immunol* 2011;2:12.
26. van der Spek J, Groenwold RH, van der Burg M, van Montfrans JM. TREC Based Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency Disease: A Systematic Review. *J Clin Immunol*.2015;35:416-30.
27. Azzari C, la Marca G, Resti M. Neonatal screening for severe combined immunodeficiency caused by an adenosine deaminase defect: a reliable and inexpensive method using tandem mass spectrometry. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:1394-9.
28. la Marca G, Canessa C, Giocaliere E, Romano F, Duse M, Malvagia S, Lippi F, Funghini S, Bianchi L, Della Bona ML, Valleriani C, Ombrone D, Moriondo M, Villanelli F, Speckmann C, Adams S, Gaspar BH, Hershfield M, Santisteban I, Fairbanks L, Ragusa G, Resti M, de Martino M, Guerrini R, Azzari C. Tandem mass spectrometry, but not T-cell receptor excision circle analysis, identifies newborns with late-onset adenosine deaminase deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131:1604-10.
29. la Marca G, Malvagia S, Pasquini E, Innocenti M, Fernandez MR, Donati MA, Zammarchi E. The inclusion of succinylacetone as marker for tyrosinemia type I in expanded newborn screening programs. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2008;22:812-8.
30. Fairbanks LD, Simmonds HA, Duley JA, Gaspar HB, Flood T, Steward CA. ADA activity and DATP levels in erythrocytes after bone marrow transplantation. *Adv Exp Med Biol* 2000;486:51-5.

