

Un effettivo vantaggio dello screening neonatale allargato

Cristina Mazzaccara^{1,2}, Adriana Redi¹, Lucia Albano², Simona Fecarotta³, Carmen Flagiello², Daniela Crisci², Fabio Acquaviva³, Giovanna Gallo², Antonio Nolano¹, Bruno Mirra¹, Rita Pecce¹, Giancarlo Parenti³, Guglielmo Rosario Domenico Villani^{1,2}, Margherita Ruoppolo^{1,2}, Giulia Frisso^{1,2}

¹Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli;

²CEINGE Biotecnologie Avanzate, s.c.a.r.l., Napoli;

³Dipartimento di Medicina Translazionale-Sezione di Pediatria, Università degli Studi di Napoli Federico II.

ABSTRACT

A real benefit of an extended neonatal screening. Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) deficiency, is a very rare congenital defect of folate metabolism, inherited in an autosomal recessive pattern included in newborn screening (NBS) programs in Italy. It is caused by mutations in the *MTHFR* gene and is characterized by elevated plasma homocysteine and borderline-low or normal methionine levels, causing severe neurological signs, recurrent apnoea, microcephaly and convulsions, generally during the neonatal period. An early treatment may prevent the clinical manifestations with a positive impact on patient's health.

We report a new case of *MTHFR* deficiency, identified during NBS that showed hypomethioninemia 4.6 $\mu\text{mol/L}$ (r.i. 6-20). The second level-test revealed hyperhomocysteinemia (106.7 μM , r.i. 5-15). The whole sequencing of the *MTHFR* gene showed two missense mutation: c.176G>C (p.Trp59Ser), reported as disease causing and the novel c.1769T>G (p.Leu590Arg), classified as likely pathogenetic. The baby was immediately treated with vitamin B12, folate and betaine; after 12 months of follow-up he has no signs or symptoms of the disease.

In conclusion, this case report highlights the importance of NBS for inborn errors of metabolism and genetic analysis, that can prevent the establishment of a serious disorder of folate metabolism.

CASO CLINICO

Il caso indice è un bambino nato nel Febbraio 2018, da genitori non consanguinei, dopo una gravidanza ottenuta con tecniche di fecondazione assistita e decorsa fisiologicamente. Il suo peso alla nascita è di 2,820 Kg [25-50°percentile,(ct)], la lunghezza è di 48 cm (25-50°ct) e la circonferenza cranica (o fronto-occipitale) di 32,5 cm (10-25°ct). Nel complesso l'esame obiettivo evidenzia un buono stato di salute, con tono muscolare, riflessi e reattività nei limiti della norma. Alla nascita è sottoposto al programma di screening neonatale esteso (SNE) obbligatorio delle 38 malattie metaboliche ereditarie individuate dal Ministero della Salute (Decreto 13 ottobre 2016-GU Serie Generale n.267 del 15.11.2016) effettuato presso il CEINGE Biotecnologie Avanzate/DAI Medicina di Laboratorio dell'Università Federico II di Napoli. I risultati dello SNE, eseguito con metodica di spettrometria di massa tandem (MS/MS) su gocce di sangue assorbite su idoneo cartoncino (Whatman 903@

grade), mostrano ipometioninemia (4,0 $\mu\text{mol/L}$; i.r. 6-20) e un profilo normale di acilcarnitine (1).

I risultati impongono la richiesta un secondo spot di sangue (retesting) che evidenzia un valore di metionina border-line (6,0 $\mu\text{mol/L}$; i.r. per età 10-60).

In seguito a segnalazione da parte del laboratorio di SNE, il neonato accede al Day Hospital pediatrico del Dipartimento di Medicina Translazionale dell'Università degli Studi di Napoli Federico II, dove vengono richiesti, oltre alla valutazione dell'equilibrio acido base, l'esecuzione di un profilo biochimico-emocromocitometrico, la vitamina B12 e i folati, come pure esami biochimici di secondo livello: omocisteina (eseguita in cromatografia ad alte prestazioni HPLC), amminoacidi (HPLC), acilcarnitine (MS/MS) e acidi organici urinari (gascromatografia/spettrometria di massa; GC/MS). I risultati mostrano elevati livelli di omocisteina plasmatica (106,7 μM ; i.r. 5-15) e metionina pari al valore inferiore dell'intervallo di riferimento (10 $\mu\text{mol/L}$). Tutti i restanti parametri risultano all'interno dei rispettivi

Corrispondenza a: Cristina Mazzaccara, Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, CEINGE Biotecnologie Avanzate s.c.a.r.l., Università degli Studi di Napoli Federico II, Via S. Pansini, 5 80131 Napoli. Tel. 0817462422, email cristina.mazzaccara@unina.it

Ricevuto: 13.02.2019

Revisionato: 27.02.2019

Accettato: 07.03.2019

Pubblicato on-line: 16.04.2019

DOI: 10.19186/BC_2019.028

intervalli di riferimento. Alla luce di tali risultati è posto il sospetto di deficit di metilentetraidrofolato reduttasi (*MTHFR*) (Figura 1).

A soli venti giorni dalla nascita, viene, quindi, intrapresa la terapia con metilfolinato di calcio (compresse, cp) (N5-metiltetraidrofolato di calcio pentaidrato; 15mg/3 volte al giorno per via orale), betaina (250mg/kg/die) e idrossicobalamina per via intramuscolare (1mg/die).

Sulla base del sospetto diagnostico, per la diagnosi definitiva di deficit di *MTHFR* è richiesta al CEINGE Biotecnologie Avanzate/DAI Medicina di Laboratorio

dell'Università Federico II di Napoli l'indagine molecolare per la ricerca di mutazioni nel gene *MTHFR*.

I risultati dell'analisi molecolare, attraverso il sequenziamento, dei 12 esoni e delle regioni 5'- e 3'-UTR del gene *MTHFR*, effettuato mediante metodica Sanger, evidenziano la presenza delle mutazioni c.176G>C e c.1769T>G in eterozigosi composita. In particolare, la mutazione c.176G>C (p.Trp59Ser) nell'esone 2, è riportata nel database di malattie genetiche, Human Genomic Mutation Database-HGMD, come causativa di malattia (CM 155512), mentre la variante c.1769T>G (p.Leu590Arg) identificata

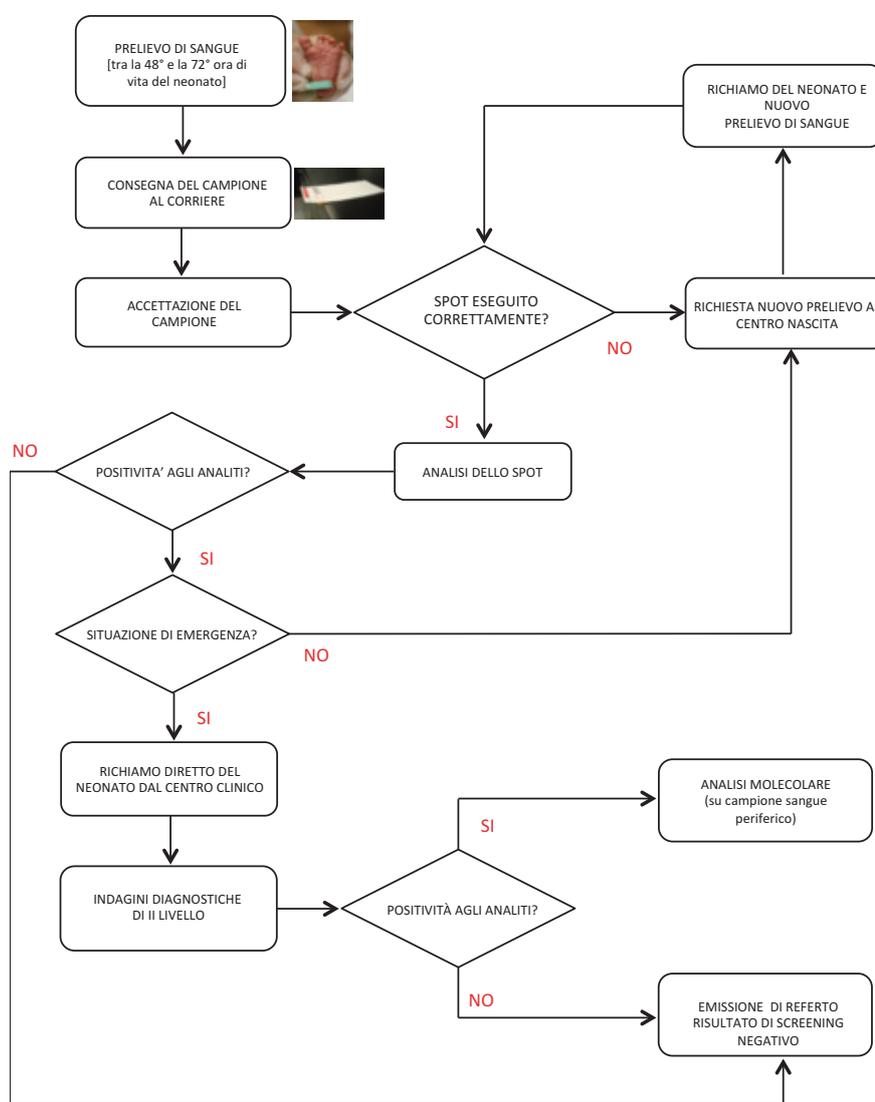


Figura 1
Diagramma di flusso dello screening neonatale esteso (SNE) effettuato presso il CEINGE Biotecnologie Avanzate, Università Federico II di Napoli

Presso tutti i punti nascita della regione Campania, fra il secondo e il terzo giorno di nascita, vengono prelevate dal tallone del neonato poche gocce di sangue e assorbite su idoneo cartoncino. Il campione viene inviato al laboratorio, dove viene eseguita l'indagine di screening delle 38 patologie individuate dal Ministero della Salute. In caso di positività allo screening, il neonato è richiamato dal centro clinico per eseguire ulteriori indagini di accertamento diagnostico. La diagnosi definitiva è, quindi, effettuata mediante analisi molecolare.

nell'esone 12 non era stata precedentemente descritta, pertanto risultava assente nei database pubblici di mutazioni e varianti genetiche (HGMD, dbSNPs, 1000 Genome Project, Exome Variant Server and Exome Aggregation Consortium (ExAC), Genome Aggregation Database (gnomAD).

L'analisi molecolare, eseguita anche sui genitori, che hanno espresso consenso informato per sé e per il bambino, ha mostrato la segregazione materna della mutazione nota c.176G>C (p.Trp59Ser) e la segregazione paterna della nuova variante c.1769T>G (p.Leu590Arg) (Figura 2A).

DISCUSSIONE

Le malattie metaboliche ereditarie sono malattie congenite che comprendono un esteso gruppo eterogeneo di condizioni causate da un deficit specifico in una via metabolica.

Il peso sociale è considerevole in quanto si tratta di malattie multi-sistemiche che causano danni irreversibili a carico di più organi e apparati, responsabili di mortalità precoce neonatale e handicap psichici e neuro-motori permanenti sia in età infantile, che in età successive. La precocità della diagnosi può avere un ruolo determinante, nell'efficacia del trattamento, al fine di evitare i danni clinici conseguenti alla malattia o al suo aggravamento.

Lo screening neonatale esteso (SNE) di malattie metaboliche ereditarie è un programma di medicina

preventiva basato sulla misurazione di specifici metaboliti, con l'obiettivo di individuare precocemente i soggetti affetti da alcune malattie metaboliche, consentendo quindi di effettuare una diagnosi tempestiva di malattia, anche in una fase precedente l'insorgenza di sintomi clinicamente rilevabili (2). L'esame per lo SNE è rapido, sicuro e non invasivo: tra la 48° e la 72° ora di vita del neonato viene effettuata, dal centro nascita, una piccola puntura sul tallone e il sangue è adsorbito su un idoneo cartoncino, preventivamente identificato. Dal 2016, in Italia è possibile lo screening neonatale, oltre che per la fenilchetonuria, l'ipotiroidismo congenito e la fibrosi cistica già obbligatorie, anche per numerose altre malattie metaboliche, per complessivamente 38 patologie (in spettrometria di massa tandem). L'indagine è gratuita e obbligatoria e non è richiesto il consenso informato da parte di genitori ad eccezione di patologie, inserite nello screening, non previste dal Decreto 13.10.2016-GU Serie Generale n.267. Il paziente in questione, risultato positivo allo screening neonatale esteso per la presenza di alterazioni suggestive di un disturbo della rimetilazione dell'omocisteina, è stato rapidamente indirizzato ad eseguire gli esami diagnostici di conferma/esclusione. In particolare, i valori diminuiti di metionina, ottenuti sia dallo SNE che dalle indagini biochimiche di secondo livello, e l'iperomocisteinemia sierica hanno permesso di escludere un deficit della via di transulfurazione dell'omocisteina (come il deficit di

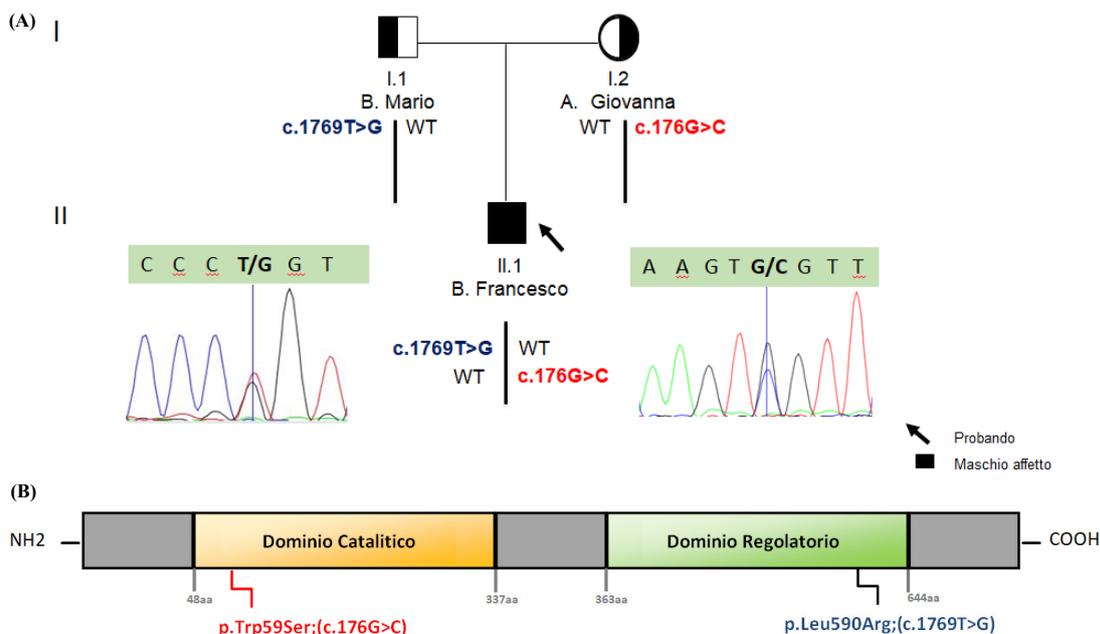


Figura 2

Risultati dello screening genetico e localizzazione delle varianti identificate nel probando e nei genitori

(A) Pedigree del probando ed ereditarietà allelica delle varianti del gene MTHFR, identificate mediante sequenziamento diretto. La nuova variante c.1769T>G (p.Leu590Arg) è indicata in blu, la mutazione nota c.176G>C (p.Trp59Ser) è mostrata in rosso. (B) Rappresentazione schematica dei domini della proteina MTHFR e localizzazione delle varianti (non in scala).

cistationina beta sintasi), che se presente avrebbe determinato elevati valori di metionina.

I valori normali di vitamina B12, folati, volume corpuscolare medio, il normale profilo delle acilcarnitine (in particolare della propionilcarnitina) e l'assenza di acido metilmalonico hanno inoltre consentito di escludere il deficit materno di vitamina B12 o di folati, i difetti di sintesi intracellulari di vitamina B12, nonché la diagnosi di acidemia metilmalonica. Le indagini di laboratorio hanno orientato verso un difetto di rimetilazione dell'omocisteina dovuto a deficit di *MTHFR*.

L'enzima *MTHFR* catalizza la conversione del 5,10-metilentetraidrofolato (5,10-MTHF) a 5-metiltetraidrofolato (5-MTHF), quale donatore del gruppo metilico; i soggetti con deficit di *MTHFR* mostrano iperomocisteinemia e livelli di metionina diminuiti o normali. Le manifestazioni cliniche insorgono, tipicamente nel periodo neonatale, con ritardi nello sviluppo, gravi disturbi neurologici, apnea ricorrente, microcefalia, encefalopatia e ipotonia, sebbene siano anche riportate forme ad insorgenza più tardiva, che presentano disturbi psichiatrici, cognitivi, convulsioni, eventi trombotici (3, 4). La malattia si trasmette con modalità autosomica recessiva ed è causata da mutazioni del gene *MTHFR* (gene ID:4524; 1p36.3), codificante per l'omonimo enzima, che è costituito da un dominio catalitico N-terminale (aa 48-337), che lega il MTHF, il NADPH e il FAD e un dominio regolatore C-terminale (aa 363-644) che lega l'adenosil-metionina (AdoMet), l'inibitore allosterico dell'enzima, collegati tra loro da una regione linker (aa 338-362) (5) (Figura 2B). Mutazioni in entrambi i domini sono state associate a deficit di *MTHFR* (6). In particolare, la mutazione nota riscontrata nel nostro caso indice, c.176G>C (p.Trp59Ser) ricade nel dominio N-terminale catalitico dell'enzima ed è associata ad una severa diminuzione dell'attività enzimatica, con conseguente insorgenza precoce di sintomi e morte entro il primo anno di vita. La variante identificata c.1769T>G (p.Leu590Arg) e pertanto assente nei database pubblici di mutazioni e varianti genetiche, ricade, invece, nel dominio regolatorio dell'enzima; mutazioni in tale dominio possono aumentare o diminuire il legame con AdoMet, alterando il meccanismo di inibizione allosterica dell'enzima *MTHFR*. Per valutare la patogenicità della variante c.1769T>G (p.Leu590Arg), sono state eseguite predizioni bioinformatiche in silico, usando Alamut Visual software (<http://www.interactive-biosoftware.com/>), che integra informazioni genetiche e diversi algoritmi predittivi, segnalando la possibile patogenicità e l'impatto funzionale delle varianti analizzate. In particolare, l'algoritmo *Sorting Intolerant From Tolerant* (SIFT) (<http://sift.jcvi.org/>) valuta la possibile patogenicità di una variante sulla base del livello di conservazione evolutiva del residuo aminoacidico interessato. Per cui i cambiamenti nelle posizioni amminoacidiche conservate tendono ad essere stimati come deleteri. Il sistema *Polyphen-2* (Polymorphism Phenotyping v2) (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>), predice il possibile impatto di una sostituzione aminoacidica sulla struttura e la funzione della proteina, utilizzando allineamenti multipli,

la variazione nella struttura 3D della proteina ed eventuali contatti con altre molecole o con siti funzionali, nonché la conservazione nella specie. L'algoritmo *Pathogenic Mutation Prediction* (PMut) (<http://mmb.pcb.ub.es/PMut/>), è basato sull'utilizzo di reti che acquisiscono le informazioni da database di mutazioni e analizzano le varianti in una specifica proteina. Il programma ricava informazioni da database interni, programmi che danno informazioni sulla struttura secondaria della proteina, e da allineamenti multipli. Infine SNPs & GO è un web server (<http://snps-andgo.biocomp.unibo.it/>) che combina le informazioni di sequenza proteica con annotazioni funzionali.

L'analisi in silico e l'applicazione dei criteri dell'*American College of Medical Genetics* (ACMG) per l'interpretazione delle varianti di sequenza (7) hanno permesso di classificare la variante c.1769T>G (p.Leu590Arg) come probabilmente patogenetica (8, 9). Inoltre, l'analisi genetica nei genitori ha permesso di verificare che le varianti c.176G>C (p.Trp59Ser) e c.1769T>G (p.Leu590Arg) sono rispettivamente di origine materna e paterna. Considerata la trasmissione autosomica recessiva della patologia, la determinazione del genotipo dei genitori è stata di fondamentale importanza per la diagnosi definitiva di deficit di *MTHFR* e per supportare il probabile ruolo patogenetico della nuova variante identificata.

I controlli clinici, eseguiti durante il monitoraggio nei 12 mesi successivi, hanno evidenziato una normale crescita staturale-ponderale del bambino e l'assenza di segni e/o sintomi di rilievo, associati alla malattia. La valutazione dei parametri biochimici mostra la significativa riduzione dei livelli di omocisteina (47,1 µM) e la normalizzazione della metionina (30 µmol/L) (i.r. per età 9-42).

In conclusione, il caso clinico presentato mette in luce:

- la rilevanza dello SNE nell'identificazione precoce di un difetto metabolico, anche in una fase precedente le manifestazioni cliniche, consentendo di iniziare tempestivamente la terapia necessaria in grado di migliorare il decorso della malattia e di prevenire gravi complicanze;
- l'importanza di valutare accuratamente valori bassi di metionina, e, pertanto, la necessità di avere a disposizione un esame di conferma, sullo stesso cartoncino, (second tier-test) che consenta velocemente di confermare un primitivo sospetto;
- la necessità dell'indagine genetica per la diagnosi definitiva di malattia, che, nel caso particolare, ha richiesto l'analisi genetica anche nei genitori, al fine di verificare che le due varianti fossero in trans, condizione indispensabile per attribuire un verosimile ruolo patogenetico anche alla nuova variante c.1769T>G (p.Leu590Arg). La definizione della loro condizione di portatori offre, inoltre, la possibilità di eseguire diagnosi prenatale in caso di successiva gravidanza (10).

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Scolamiero E, Villani GR, Ingenito L, et al. Maternal vitamin B12 deficiency detected in expanded newborn screening. *Clin Biochem* 2014;47:312-7.
2. Huemer M, Kožich V, Rinaldo P, et al. Newborn screening for homocystinurias and methylation disorders: systematic review and proposed guidelines. *J Inherit Metab Dis* 2015;38:1007-19.
3. D'Aco KE, Bearden D, Watkins D, et al. Severe 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency and two *MTHFR* variants in an adolescent with progressive myoclonic epilepsy. *Pediatr Neurol* 2014;51:266-70.
4. Lossos A, Teitsh O, Milman T et al. Severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency clinical clues to a potentially treatable cause of adult-onset hereditary spastic paraplegia. *JAMA Neurol*;71:901-4.
5. Froese DS, Kopec J, Rembeza E, et al. Structural basis for the regulation of human 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase by phosphorylation and S-adenosylmethionine inhibition. *Nat Commun* 2018;9:2261.
6. Froese DS, Huemer M, Suormala T, et al. Mutation update and review of severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Hum Mutat* 2016;37:427-38.
7. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17:405-24.
8. Girolami F, Frisso G, Benelli M, et al. Contemporary genetic testing in inherited cardiac disease: tools, ethical issues, and clinical applications. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* 2017; doi: 10.2459/JCM.0000000000000589.
9. Frisso G, Detta N, Coppola P, et al. Functional studies and in silico analyses to evaluate non-coding variants in inherited cardiomyopathies. *Int J Mol Sci* 2016;17:1883.
10. Maruotti GM, Frisso G, Calcagno G, et al. Prenatal diagnosis of inherited diseases: 20 years'experience of an Italian Regional Reference Centre. *Clin Chem Lab Med*. 2013;51:2211-7.