

SISSME
Società Italiana per lo Studio delle
Malattie Metaboliche Ereditarie



SISN
Società Italiana per gli Screening Neonatali



GENCLI
Gruppo di Studio di Genetica Clinica –
Dismorfologia e Malattie Metaboliche
della Società Italiana di Pediatria

Congresso congiunto

Pesaro 11-13 Ottobre 2006

Strategie diagnostiche ed assistenziali come garanzia di qualità

**Sessione aggiornamento e formazione
“Diagnosi di laboratorio delle malattie metaboliche ereditarie”**

13 Ottobre 2006



**Diagnosi di laboratorio delle malattie metaboliche ereditarie
L'analisi dei metaboliti**



U. Caruso, AR. Fantasia, G. Migliaccio, A. Mascagni G. Minniti

Laboratorio per lo Studio degli Errori Congeniti del Metabolismo,
Dipartimento di Scienze Pediatriche “Giovanni e Toni” dell’Università, Ist. G. Gaslini, GENOVA



INDICE

1 -	Introduzione	3
2 -	Le indagini di primo livello	3
3 -	I metaboliti	3
4 -	Le tecniche analitiche	4
4.1 -	La cromatografia su carta e su strato sottile.....	4
4.2 -	La cromatografia liquida.....	4
4.2.1 -	La cromatografia a scambio ionico: l'analizzatore di aminoacidi.....	4
4.2.2 -	La cromatografia ad alta risoluzione. HPLC.....	4
4.3 -	La gascromatografia (GC)	5
4.4 -	I rivelatori per le tecniche cromatografiche.....	5
4.4.1 -	La spettrometria di massa (MS) e la GC-MS	6
4.5 -	La spettrometria di massa Tandem	7
5 -	La diluizione isotopica con isotopi stabili	7
6 -	L'approccio diagnostico	8
7 -	Conclusioni.....	8

1 - Introduzione

L'approccio di laboratorio alla diagnosi delle Malattie Metaboliche Ereditarie (MME) si articola su quattro livelli fondamentali:

- la misura dei parametri biomorali *di routine*,
- il dosaggio dei metaboliti,
- lo studio biochimico-enzimatico,
- la caratterizzazione molecolare.

Pur se ciascuno di questi livelli contribuisce a indicare, confermare o definire la diagnosi, spesso nell'attività diagnostica quotidiana uno o più di questi possono essere omessi, in quanto ritenuti non necessari o di difficile realizzazione. Il secondo livello, quello che fa riferimento al dosaggio dei metaboliti, ha costituito storicamente l'approccio diretto specifico alla diagnosi delle MME, soprattutto prima che fossero disponibili gli studi biochimici su colture cellulari, prima, e gli studi molecolari, poi. E' universalmente noto come l'intuizione di Garrod, che nel 1902 definì la prima malattia metabolica, abbia aperto la strada al mondo allora sconosciuto ed oggi ancora affascinante del metabolismo. Il progresso tecnologico ha reso oggi disponibili strumenti e metodologie che permettono indagini rapide, accurate ed estremamente sensibili, ma occorre ricordare che l'analisi dei metaboliti è pur sempre, oggi come allora, un'analisi chimica, sia essa qualitativa o quantitativa.

Questo contributo si limita ad approfondire quanto concerne le indagini diagnostiche di secondo livello, ovvero l'analisi dei metaboliti, con un breve accenno alle indagini di routine e ad uno specifico aspetto dello studio biochimico-enzimatico.

Saranno presentate le tecniche analitiche più frequentemente utilizzate per la diagnosi di MME senza descrivere nel dettaglio le tecniche stesse, argomento che esula dallo scopo di questo contributo.

Saranno, infine, evidenziate le differenze fra l'approccio diagnostico per pazienti selezionati in base alla sintomatologia clinica e la conferma diagnostica per soggetti positivi allo screening neonatale.

2 - Le indagini di primo livello

Alterazioni di alcuni parametri biomorali *di routine* possono essere suggestive, unitamente al quadro clinico, di una patologia metabolica. I tre dati principali, soprattutto in relazione all'esordio acuto neonatale sono:

- ammoniemia
- glicemia
- pH ematico e gap anionico, ovvero la differenza fra le concentrazioni di cationi e anioni:

$$[\text{Na}^+] - ([\text{HCO}_3^-] + [\text{Cl}^-])$$

che indicano l'entità di una eventuale la misura della condizione di acidosi metabolica.

Questi parametri risultano generalmente alterati in un numero rilevante di MME tre cui le più frequenti sono:

- i difetti del ciclo dell'urea (iperammoniemia senza acidosi metabolica)
- i difetti di β -ossidazione (ipoglicemia)
- alcune acidosi organiche, quali propionico acidemia, metilmalonico acidemia (iperammoniemia con acidosi metabolica), 3-idrossi-3-metilglutarico aciduria (iperammoniemia, ipoglicemia, acidosi metabolica)

Altri parametri le cui alterazioni possono essere correlati a MME sono

- gli indici di citolisi epatica (SGOT, SGPT, LDH, CK, ...)
- gli indici di funzionalità epatica (fattori della coagulazione, albumina e altre proteine di sintesi epatica)
- gli indici di funzionalità renale
- gli indici di colestasi
- l'acido urico
- etc

E' fondamentale che il laboratorio che esegue indagini di secondo livello (metaboliti specifici che possono indicare una diagnosi di MME) disponga di questi dati, unitamente ad una descrizione completa del quadro clinico, della terapia in atto e del tipo e delle modalità di alimentazione.

3 - I metaboliti

I metaboliti ovvero le molecole interessate ai difetti del metabolismo intermedio possono essere, piuttosto grossolanamente, raggruppate di fatto in tre grandi categorie:

- gli aminoacidi
- gli acidi
- i carboidrati

comprehensive anche dei loro derivati o polimeri. Ovviamente queste tre categorie non sono esaustive, esistono altre specie chimiche di interesse quali i lipidi complessi, alcoli, purine e pirimidine, ect.

Sono le caratteristiche chimiche e chimico-fisiche di queste classi di composti che costituiscono la base delle metodologie utilizzate nella pratica quotidiana della chimica clinica con specifico riferimento alla diagnosi delle MME. L'introduzione nella pratica della chimica clinica delle tecniche cromatografiche (dapprima su carta e strato sottile, poi su colonna, in fase gassosa o in fase liquida) e lo sviluppo tecnologico hanno rappresentato un notevole salto in avanti, si può dire di portata storica, nell'approccio diagnostico alle MME.

Si è passati infatti dal dosaggio (più o meno specifico) di un singolo analita (ad esempio la Phe con metodo fluorimetrico) o di un gruppo di analiti *in toto* (ad esempio l'azoto aminico totale o i NEFA) ad un dosaggio simultaneo, sempre più specifico e accurato di gruppi di analiti (aminoacidi, acidi organici, etc) analoghi per caratteristiche chimico-fisiche.

Tutto questo ha reso disponibile agli addetti ai lavori un *profilo metabolico* di grande rilevanza diagnostica. E' raro, infatti, che una MME si presenti con l'alterazione della concentrazione di un singolo analita (può essere, ad esempio, il caso della malattia di Canavan, difetto di aspartoacilasi che si presenta con l'aumento isolato di acid acetil-aspartico); usualmente le alterazioni riguardano più metaboliti e a volte più classi di metaboliti e la diagnosi è tanto più certa quanto più completo è il profilo biochimico.

4 - Le tecniche analitiche

Con riferimento a quanto sopra affermato, saranno prese in considerazione quasi esclusivamente tecniche cromatografiche. La cromatografia (=separazione) rappresenta solo una fase, anche se fondamentale, di tutto il processo analitico, costituito dalla fase pre-analitica (preparazione e purificazione del campione, quando necessario), dalla cromatografia vera e propria, dalla rilevazione, e infine dalla riduzione e dall'interpretazione dei dati.

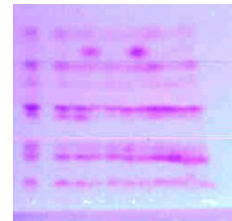
Le tecniche cromatografiche sono molteplici

- cromatografia su carta (mono- e bi-dimensionale)
- cromatografia su strato sottile TLC (mono- e bi-dimensionale, su cellulosa, silice e altri tipi di supporti)
- cromatografia liquida su colonna (a scambio ionico, a fase inversa, etc)
- gascromatografia (a colonne impaccate, wide-bore, capillari...)
- elettroforesi capillare
- ...

Una menzione speciale merita la LC-ESI-MS-MS (spettrometria di massa Tandem, accoppiata alla cromatografia liquida), tecnica sviluppata di recente in grado di analizzare simultaneamente in modo quantitativo numerosi analiti e caratterizzata da elevata versatilità, rapidità e accuratezza di risultato. Non viene trattata in questa sede in quanto oggetto di una specifica relazione.

4.1 - La cromatografia su carta e su strato sottile

La cromatografia su carta nasce addirittura nel '700 "...Verso la fine del '700 il carbone di legna era utilizzato per chiarificare le soluzioni zuccherine nella nascente industria saccarifera; ancor prima nelle grandi tintorie i tecnici si saggiava la qualità di un bagno di colorante ponendo una goccia di soluzione su un pezzo di carta o su un panno, e osservando i cerchi concentrici formati dai componenti del colorante, man mano che il solvente progrediva per capillarità " [Luigi Cerruti, Pagine di storia della chimica classica. <http://www.minerva.unito.it/Storia/ChimicaClassica/Indice.htm>]. La cromatografia su carta e su strato sottile hanno rappresentato per lungo tempo l'unica tecnica disponibile per la separazione e l'identificazione, in termini semiquantitativi, di numerosi composti, quali a aminoacidi, acidi fenolici, oligosaccaridi, etc. A titolo di esempio di esclusivo valore storico, la figura sopra riportata rappresenta la cromatografia su strato sottile di cellulosa degli aminoacidi plasmatici, dopo colorazione con ninidrina. Sono chiaramente visibili due campioni da pazienti con iperfenilalaninemia.



4.2 - La cromatografia liquida

4.2.1 - La cromatografia a scambio ionico: l'analizzatore di aminoacidi

La cromatografia a scambio ionico (cationico) rappresenta fin dalla sua implementazione, negli anni 50, il metodo elettivo per la separazione degli aminoacidi (AA) nei liquidi biologici. Su questa base è stato sviluppato l'analizzatore di aminoacidi che utilizza generalmente in rivelatore colorimetrico basato sulla reazione con la ninidrina. Nel tempo, ed in particolare negli ultimi anni questo strumento ha subito un notevole sviluppo e gli analizzatori di aminoacidi sono oggi strumenti tecnologicamente avanzati, affidabili sotto il profilo dell'accuratezza e della riproducibilità di risultato. I tempi di analisi, pur se notevolmente ridotti rispetto i primi strumenti, rimangono piuttosto alti (ca 2 ore per campione) specie se confrontati con quelli relativi a tecnologie di ultima generazione (spettrometria di massa Tandem), non ancora applicabile su larga scala a questo tipo di indagine.

4.2.2 - La cromatografia ad alta risoluzione. HPLC

La cromatografia ad alta risoluzione (HPLC, acronimo dell'inglese **H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatography, precedentemente definita **H**igh **P**ressure **L**iquid **C**hromatography) è una tecnica estremamente versatile che permette di separare e dosare una grande varietà di molecole di interesse biologico anche ad elevato peso molecolare. E' disponibile oggi un intero universo di colonne per HPLC che permettono in pratica di analizzare qualsiasi molecola (o classe di molecole) combinando adeguatamente la fase mobile (eluente) con i diversi tipi di fase stazionaria (colonna): silice a fase normale, a fase inversa, a scambio ionico, gel filtration, gel permeation, a fase chirale (per la separazione degli

isomeri), etc Le particelle che compongono la fase stazionaria (ovvero il riempimento della colonna) possono essere di diverse dimensioni (sono disponibili particelle fino a 3 µm di diametro che garantiscono una separazione estremamente efficiente). Le applicazioni nel campo del dosaggio dei farmaci sono svariate.

La parte cromatografica dello strumento HPLC può essere accoppiata a una grande varietà di rivelatori (a volte anche più di uno in sequenza), i principali dei quali sono: lo spettrofotometro UV-visibile, il diode-array, il fluorimetro o lo spettrofluorimetro, il rivelatore elettrochimico, etc.

Con riguardo ad esami mirati alla diagnostica nel campo delle MME, l'HPLC è largamente utilizzata. Alcuni limitati esempi di applicazioni sono:

- purine e pirimidine
- omocisteina
- corpi chetonici
- creatina e guanidinoacetato
- acido orotico e orotidina
- triptofano e suoi metaboliti
- pterine
- acidi nucleici
- aminoacidi
- ...

La cromatografia liquida è stata di recente, dopo l'implementazione dell'interfaccia elettrospray, accoppiata con successo alla spettrometria di massa (in particolare Tandem). L'utilizzo di colonne cromatografiche a monte dello spettrometro di massa permette di accrescere ulteriormente le potenzialità di questa strumentazione

4.3 - La gascromatografia (GC)

La gascromatografia è una tecnica separativa relativamente "antica", implementata nella prima metà del secolo scorso grazie ad una brillante intuizione di A.J.P. Martin. *"La prima colonna utilizzata aveva un diametro di un quarto di pollice ed una lunghezza di circa 15... i primi cromatogrammi furono ottenuti mediante titolazione acido/base con un indicatore e con la registrazione su carta millimetrata dei tempi e del numero di gocce impiegate..."* [Luigi Cerruti, v. sopra]. La tecnica diventò subito molto popolare e ebbe negli anni seguenti uno sviluppo "esplosivo".

Oggi la gascromatografia utilizza quasi esclusivamente colonne capillari in silice fusa di elevata lunghezza (fino a 50 m) e di diametro estremamente ridotto (fino a 0.1 mm) al cui interno è adesa la fase stazionaria con spessore che può arrivare fino a 0.1 µm.

L'universo delle fasi stazionarie per la gascromatografia è ancora più ampio di quello per la cromatografia liquida, rendendo disponibili analisi per qualsiasi classe di composti chimici. Numerosi sono anche i rivelatori utilizzati, fra i quali emerge per specificità e accuratezza lo spettrometro di massa (vedi più avanti paragrafo 4.4).

Lo sviluppo tecnologico degli ultimi anni ha interessato, ovviamente, anche il campo della gascromatografia con particolare riguardo ai sistemi di gestione del gas eluente, agli iniettori e al controllo della temperatura.

Le applicazioni nel campo delle MME sono molteplici e, ormai, utilizzano quasi esclusivamente sistemi GC-MS capillari. Tali applicazioni sono presentate in dettaglio al paragrafo 4.4.1.

Va ricordato che raramente in gascromatografia si analizzano i composti tal quali. Il processo di separazione si basa sulla differenza della loro volatilità. Occorre quindi procedere ad uno step di derivatizzazione (usualmente attraverso la formazione di esteri volatili) che, pur se può migliorare la specificità del metodo analitico, ne allunga, a volte anche in modo considerevole, i tempi.

4.4 - I rivelatori per le tecniche cromatografiche

Un particolare riguardo va rivolto ai sistemi di rilevazione per le tecniche cromatografiche: la cromatografia, di per sé, fornisce infatti solo una separazione dei composti, ovvero un flusso di analiti in sequenza, in una fase liquida o gassosa, oppure una dispersione mono- o bi-dimensionale su carta o su strato sottile degli stessi analiti.

Per poter effettuare l'identificazione dei composti analizzati, occorre rilevare i composti stessi, ovvero renderli in qualche modo visibili all'interno di un *cromatogramma*.

Per quanto riguarda la cromatografia su carta o su strato sottile si procede generalmente ad una colorazione spruzzando, imbibendo o esponendo ai vapori della soluzione colorante specifica la carta o la piastra. L'identificazione viene quindi effettuata con una semplice osservazione *a colpo d'occhio*, confrontando posizione e intensità delle macchie con campioni di riferimento conosciuti.

Per la cromatografia liquida o la gascromatografia capillare si utilizzano rivelatori più sofisticati colorimetri, fluorimetri, rilevatori elettrochimici, rilevatori a ionizzazione di fiamma o a ioni specifici e, infine, il rivelatore a selezione (spettrometro) di massa, usualmente ormai gestiti da un personal computer che ricostruisce il cromatogramma. L'identificazione avviene, quindi sulla base dei parametri specifici della tecnica utilizzata (tempo di ritenzione, spettro di massa, ...)

Nella tabella seguente sono elencati alcuni dei rivelatori (la lista non è certo completa) comunemente usati nei processi cromatografici e, per ognuno di questi, è indicata la compatibilità con i le due principali fasi mobili, gassosa e liquida.

Rivelatore	Dettagli	fase gassosa	fase liquida
FID	a ionizzazione di fiamma	compatibile	
ECD	a cattura di elettroni	compatibile	
TCD	a conduttività termica	compatibile	
FPD	fotometrico a fiamma	compatibile	
NPD	per azoto e fosforo	compatibile	
UV-vis	spettrofotometro per UV e visibile		compatibile
DA	diode-array		compatibile
F	fluorimetro		compatibile
SF	spettrofluorimetro		compatibile
EC	elettrochimico		compatibile
MS / MSD	detector a selezione (spettrometro) di massa	compatibile	compatibile

Anche in considerazione della sempre maggiore diffusione di questo tipo di rivelatore, con particolare riguardo alle applicazioni in campo biomedico, diffusione legata alla sostanziale discesa dei costi di produzione e, quindi dei prezzi, si analizzerà nel dettaglio il detector a selezione (o spettrometro) di massa, evidenziandone in particolare le doti di specificità e di selettività e le potenzialità applicative nel campo della diagnostica delle MME.

4.4.1 - La spettrometria di massa (MS) e la GC-MS

La storia della spettrometria di massa è storia antica, relativamente ai sistemi analitici chimici e chimico-fisici; i primi esperimenti in tal senso risalgono, infatti, al 1912 (Thomson - Wien) e sono legati a studi sulla separazione degli isotopi e sulla struttura della materia.

Lo spettrometro di massa nasce, e rimane nel tempo, come strumento autonomo dedicato allo studio della materia, nel senso dell'individuazione dei pesi molecolari e della struttura chimica delle molecole. Solo più recentemente, verso la metà degli anni '60, è stato realizzato un accoppiamento fra gascromatografo e spettrometro di massa, successivamente utilizzato come *rivelatore a selezione di massa (MSD)*.

Le applicazioni dei sistemi GC-MS sono svariate: nel campo del controllo della produzione industriale (industria chimica, industria alimentare, farmaci), in campo ambientale, forense e, ovviamente nella chimica clinica. In quest'ultimo settore lo sviluppo tecnologico e la conseguente caduta dei costi ha reso i sistemi GC-MS molto popolari in particolare nello studio delle MME.

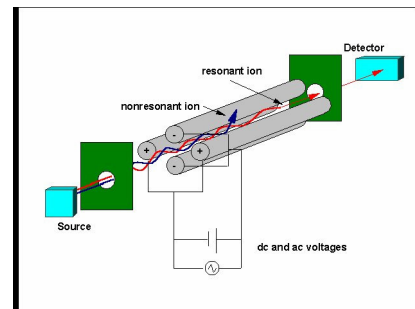
Uno spettrometro di massa è uno strumento complesso che, mediante frammentazione delle molecole, formazione di ioni carichi positivamente o negativamente e identificazione degli stessi in termini qualitativi (massa) e quantitativi (intensità) fornisce dati precisi, riproducibili, ma soprattutto *trasportabili*, sulla struttura chimica della molecola stessa. L'identificazione degli ioni viene effettuata da un filtro di massa, costituito da un quadrupolo che, per mezzo di campi elettrici e magnetici combinati, seleziona gli ioni da inviare all'analizzatore (vedi figura). Negli strumenti tradizionali si usano un campo elettrico e un campo magnetico disposti ortogonalmente.

Quando è accoppiato ad un GC, in un sistema GC-MS, questi dati costituiscono una matrice tridimensionale i cui assi sono tempo, massa dello ione e abbondanza dello stesso. Da questa matrice è possibile estrarre sostanzialmente due oggetti che interagiscono fra loro: il cromatogramma ricostruito o TIC (simile a quello ottenuto da un gascromatografo con altro rivelatore collegato ad un registratore o un computer) e lo spettro di massa in un determinato tempo ovvero del composto eluito in quel momento. Lo spettro di massa di un determinato composto è *trasportabile*, ovvero, in condizioni di ionizzazione standardizzate, è sempre lo stesso indipendentemente dallo strumento utilizzato per ottenerlo. Costituisce quindi l'impronta digitale del composto permettendone l'identificazione, anche attraverso il confronto con specifiche librerie contenenti gli spettri di sostanze note.

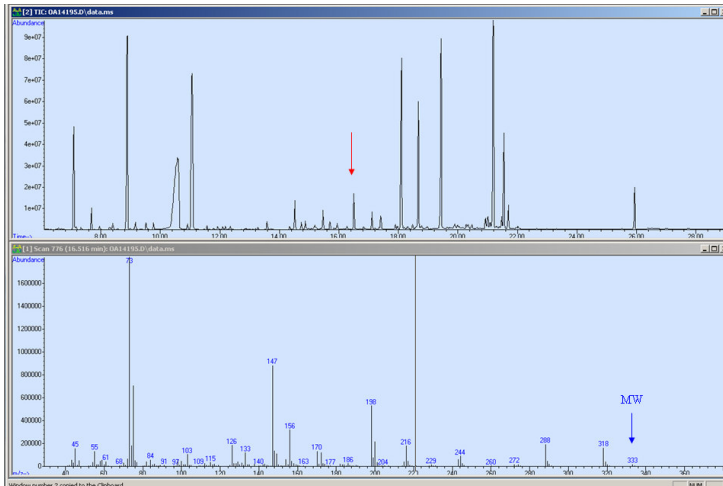
La figura nella pagina seguente mostra nella parte superiore il cromatogramma ricostruito, in cui ogni picco corrisponde ad un determinato composto (se la separazione GC è efficiente) e nella parte inferiore lo spettro di massa corrispondente al composto indicato dalla freccia rossa. In pratica il TIC è il cromatogramma ottenuto sommando le intensità di tutti gli ioni rilevati in un certo momento e lo spettro, che mostra le intensità dei singoli ioni, è una sezione trasversale della matrice tridimensionale nel momento desiderato.

L'utilizzo della GC-MS ha fornito la soluzione per l'interpretazione di cromatogrammi complessi come quelli, per esempio, relativi all'analisi degli acidi organici urinari, in cui, dato l'elevato numero di metaboliti presenti, il semplice tempo di ritenzione non è sufficiente a fornire un'identificazione certa.

Le potenzialità della spettrometria di massa si esprimono, però, nell'analisi quantitativa. Utilizzando l'opzione SIM (*Selected Ion Monitoring*) E' possibile selezionare al momento dell'acquisizione uno o più ioni specifici, cioè



caratteristici della sostanza (o delle sostanze da analizzare) con un incremento considerevole della sensibilità del sistema, ma soprattutto della sua specificità.



Questa tecnica, accoppiata alla diluizione isotopica con isotopi stabili (vedi più avanti il paragrafo 5), costituisce oggi il metodo più affidabile per l'analisi quantitativa di molecole di interesse biologico.

Va infine ricordato che, utilizzando l'opzione della ionizzazione chimica e l'acquisizione di ioni negativi con l'utilizzo di opportuni derivatizzanti fluorurati, si può incrementare la sensibilità anche di un fattore 10^3 raggiungendo il livello della femtomole.

Nel campo dello studi delle MME la GC-MS è applicabile, in pratica, a qualsiasi tipo di analisi, utilizzando la giusta combinazione di procedura di purificazione, tipo di derivatizzazione, colonna cromatografica,

modalità di acquisizione.

L'applicazione più diffusa è sicuramente quella dell'analisi degli acidi organici urinari, sia come valutazione del profilo globale che come dosaggio quantitativo (con l'utilizzo di isotopi stabili) di singoli metaboliti di alta rilevanza diagnostica (acido metilmalonico, acido glutarico, succinilacetone, acido acetil-aspartico, galattitolo, acido 2-idrossi glutarico, etc.) ma sono importanti e diffusi anche altri dosaggi si di singoli analiti che di classi di composti, quali:

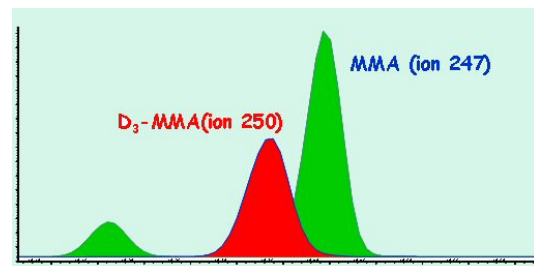
- acidi dicarbossilici
- acilglicine
- acilcarnitine
- acidi grassi liberi
- acidi grassi a catena molto lunga (VLCFA), acido pristanico e acido fitanico
- plasmalogeni eritrocitari
- acidi biliari
- carboidrati e loro derivati
- polioli
- ...

4.5 - La spettrometria di massa Tandem

L'argomento non è oggetto di questo contributo, in quanto viene trattato in una relazione specifica. E' opportuno, però, ricordare le elevate potenzialità di questa tecnica analitica che ha rivoluzionato non solo il mondo dello screening neonatale, ma anche il campo della diagnostica delle MME per le sue caratteristiche di accuratezza, sensibilità e rapidità di risultato.

5 - La diluizione isotopica con isotopi stabili

Un isotopo di un atomo è un atomo che ha lo stesso numero atomico (numero di elettroni) e un peso atomico maggiore, per la presenza nel nucleo di una o più particelle subatomiche in eccesso. Gli isotopi sono presenti in natura per tutti quasi tutti gli atomi; alcuni di questi emettono radiazioni o particelle e sono quindi nocivi, altri sono invece stabili. Tipico esempio di isotopo stabile è il *deuterio* (D) che è un atomo di idrogeno con un neutrone in più nel nucleo. Le sue caratteristiche chimiche sono analoghe a quelle dell'idrogeno naturale, ma il suo peso atomico è più grande di una unità. Nell'analisi con la diluizione isotopica si utilizza come standard interno la molecola analoga a quella da dosare marcata con un isotopo stabile. La molecola marcata ha tutte le caratteristiche chimiche di quella da dosare ma un peso molecolare più alto. Durante tutto il processo analitico le due molecole si comportano nello stesso modo, in particolare nella fase estrattiva e in quella cromatografica. Lo spettrometro di massa è però in grado di distinguere le due sostanze che hanno, nello spettro, alcuni ioni (quelli recanti gli atomi marcanti) di massa differente. Utilizzando l'acquisizione in SIM e, quando possibile, la ionizzazione chimica a ioni negativi è possibile mettere a punto con questa tecnica un metodo analitico con le caratteristiche di accuratezza, sensibilità e specificità più elevate oggi disponibili. Nella figura a lato sono presentate, come esempio, le tracce relative agli ioni caratteristici per l'acido metilmalonico (MMA) naturale, contenuto nel campione da analizzare e marcato con 3 atomi di deuterio (utilizzato come standard interno). Lo



spettrometro di massa distingue i due ioni sulla base della loro massa, anche se i tempi di ritenzione sono praticamente sovrapponibili, e permette un dosaggio quantitativo particolarmente accurato e riproducibile mediante il confronto delle aree a l'utilizzo di una curva di calibrazione.

6 - L'approccio diagnostico

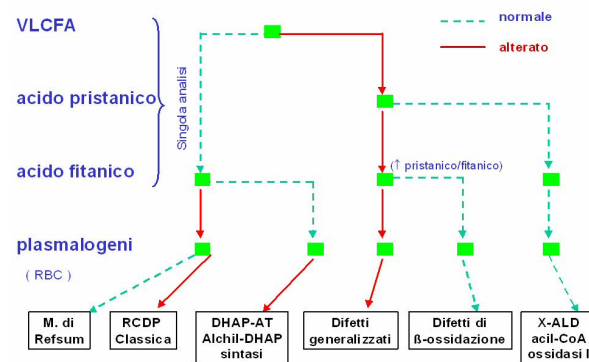
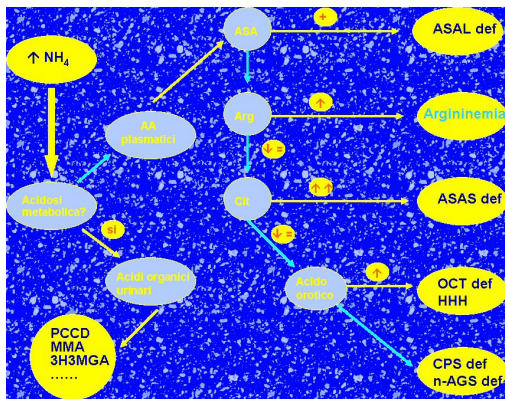
Le tecniche analitiche descritte, unitamente ad altre, costituiscono lo strumento che il laboratorio di secondo livello utilizza per proporre (o escludere) una diagnosi di MME nei pazienti con quadro clinico evocativo.

Le indagini da effettuare vengono indicate dal clinico o, in alcuni casi, individuate dallo stesso laboratorio sulla base dei dati relativi al quadro clinico e biochimico riferito. La diagnosi di una MME è un processo complesso che coinvolge ed integra più parametri biochimici con il quadro clinico che rimane il punto di partenza del sospetto diagnostico.

E' raro che la procedura diagnostica si limiti alla determinazione di un solo metabolita o una sola classe di metaboliti (quali aminoacidi, acidi organici, etc). Usualmente la diagnosi a livello dei metaboliti si completa con diversi esami i cui risultati vanno integrati a costituire un unico profilo biochimico. Alcuni esempi sono:

- la diagnosi differenziale delle iperfenilalaninemie (aminoacidi plasmatici, pterine urinarie),
- la diagnosi di tirosinemia I (aumento della tirosina all'analisi degli AA, presenza di metaboliti della tirosina e di succinilacetone all'analisi degli acidi organici e suo dosaggio quantitativo),
- la diagnosi differenziale dei difetti del ciclo dell'urea (AA plasmatici e urinari, acido orotico urinario),
- la diagnosi differenziale delle malattie perossisomiali (VLCFA, acido fitanico, acido pristanico plasmatici, plasmalogeni eritrocitari),
- la diagnosi dei difetti di β -ossidazione (acidi dicarbossilici all'analisi degli acidi organici ed eventuale loro dosaggio, acilcarnitine su plasma o su spot, acilglicine urinarie, acidi grassi liberi plasmatici).

Può essere utile per le diagnosi differenziali utilizzare *flow-chart* diagnostiche, come quelle qui sotto riportate per i difetti del ciclo dell'urea e per le malattie perossisomiali.



Va ricordato che spesso le indagini diverse vengono effettuate simultaneamente (e non nella sequenza indicata dalla *flow-chart*) soprattutto nei casi di esordi acuti con rischio vitale per il paziente. In queste circostanze il breve tempo di risposta è fondamentale per iniziare il trattamento specifico e la *flow-chart* è utile solo ai fini dell'interpretazione del risultato analitico.

Un discorso a parte va fatto per l'accertamento diagnostico nei soggetti individuati attraverso lo screening neonatale. In questi casi il sospetto diagnostico è mirato, sulla base dell'alterazione biochimica riscontrata allo screening. Compito dell'accertamento è quello di definire la diagnosi in modo completo, anche procedendo alla diagnostica differenziale come nel caso delle iperfenilalaninemie o dei difetti di β -ossidazione. In alcuni casi il dosaggio dei metaboliti può non essere sufficiente a definire la diagnosi ed è indispensabile affrontare indagini biochimiche e/o molecolari.

7 - Conclusioni

Quanto sopra riportato evidenzia come il processo diagnostico per le MME sia complesso e basato non solo sulla conoscenza e la padronanza delle tecniche analitiche e della strumentazione: è necessaria un'ampia conoscenza dei processi biochimici per poter correttamente interpretare i risultati delle indagini effettuate. Il laboratorio che esegue l'analisi dei metaboliti rappresenta un momento fondamentale per questo processo ma non può operare in modo isolato. E' fondamentale la conoscenza del quadro clinico e biochimico di base che ha sollevato il sospetto di una MME, ma soprattutto il collegamento e l'integrazione con il clinico.