

**Screening neonatale per le aminoacidopatie
con l'uso di un *Aminoacid Analyzer*.
Determinazione dei valori di riferimento
e valutazioni statistiche**

ITALO ANTONOZZI (a), PIER GIORGIO DEL CASTELLO(a),
GINO MORISI (b) e PRIMO CECCARELLI (b)

(a) *Istituto di Neuropsichiatria Infantile, Università di Roma.*
(b) *Laboratorio di Tecnologie Biomediche, Istituto Superiore di Sanità.*

Riassunto. — Sono state studiate le concentrazioni plasmatiche degli aminoacidi valina, metionina, isoleucina, leucina, tirosina e fenilalanina su 4100 neonati di età variabile tra uno e diciotto giorni. I campioni venivano scelti casualmente tra la popolazione neonatale del Lazio, Abruzzi e Molise sottoposta a *screening* neonatale di massa presso il Centro delle Oligofrenie Dismetaboliche dell'Istituto di Neuropsichiatria Infantile.

Di tutti gli aminoacidi sono state calcolate le concentrazioni medie in $\mu\text{moli}/100\text{ ml}$ ed è stato studiato l'andamento di questa variabile nei confronti del peso e dell'età.

Vengono quindi confrontati i dati della presente ricerca con quelli riportati in letteratura e viene spiegato l'uso dei dati nel calcolo dei punti di *cut off* nel corso dello *screening* neonatale di massa per le aminoacidopatie.

Summary (*Screening for aminoacidopathies in newborns by means of an aminoacid analyzer. Reference values and statistical determinations*). — Plasmatic concentrations of amino acids valine, methionine, isoleucine, leucine, tyrosine and phenylalanine, in 4100 newborns of age varying between 1 and 18 days have been analyzed.

The samples were randomly taken among the newborns of Lazio, Abruzzi and Molise subjected to neonatal screening for aminoacidopathies at the Centro delle Oligofrenie Dismetaboliche, Istituto di Neuropsichiatria Infantile. Average concentrations in $\mu\text{moles}/100\text{ ml}$ of the aminoacids and their correlations with weight and age have been studied.

A comparison of the results of this research with the already published data is made, and the *cut off* points in mass screening for aminoacidopathies are calculated.

INTRODUZIONE

La sempre più ampia applicazione degli *screening* neonatali di massa per le aminoacidopatie ha determinato un progressivo miglioramento del livello di sensibilità e di specificità delle metodiche usate. Infatti, anche se la metodica di inibizione batterica descritta da Guthrie [1] rimane la più largamente diffusa per le sue caratteristiche di basso costo, negli ultimi anni sono entrate nell'uso tecniche cromatografiche su strato sottile [2] o su colonna [3] notevolmente interessanti dal punto di vista dell'affidabilità.

Un tale miglioramento tecnico, specie nel caso della cromatografia su colonna, ha portato ad un sensibile innalzamento del livello dell'informazione prodotta e quindi, quasi paradossalmente, ad una maggiore difficoltà nella interpretazione dei risultati. Infatti le tecniche tradizionali di inibizione batterica permettono di evidenziare casi in cui il livello del segnale oggetto di *screening* è 2,5-3 volte superiore al controllo: la resa è quindi buona in tutte le forme di aminoacidopatie «classiche» quali la fenilchetonuria, la leucinosi, l'omocistinuria, l'ipertirosinemia, l'istidinemia. È chiaro però che la determinazione dei livelli plasmatici «di controllo» e la valutazione dei punti di *cut off* del programma di *screening* è fatta, con l'uso di queste metodiche, in maniera approssimativa e non del tutto corretta dal punto di vista metodologico.

L'uso di una metodica quantitativa implica ovviamente una ridefinizione dei livelli plasmatici di controllo e dei punti di *cut off*: ed è questo il primo scopo di questa ricerca.

Un altro problema inerente ai programmi di *screening* neonatali di massa è quello dello studio di forme «non classiche» di aminoacidopatie; quei disturbi cioè in cui la lesione biochimica primaria e secondaria non consiste rispettivamente in una mancanza assoluta dell'enzima e in un accumulo massivo del substrato a monte della reazione bloccata, ma in cui, invece, la lesione biochimica secondaria appare molto più sfumata. Queste aminoacidopatie definite dai diversi AA. «lievi», «borderline», «transitorie» [4, 5] sono di notevole interesse, specie alla luce dell'ipotesi patogenetica unificante delle aminoacidopatie, quella dello squilibrio aminoacidico [4].

Le tradizionali metodiche di inibizione batterica non sono in grado di evidenziare questi disturbi che costituiscono invece un problema numericamente abbastanza rilevante nel corso dei programmi di *screening* neonatali di massa che utilizzano tecniche cromatografiche su colonna [6].

L'atteggiamento che si può tenere in questi casi di sospetta anormalità della concentrazione plasmatica di alcuni aminoacidi è o quello di innalzare il punto di *cut off* o quello di sobbarcarsi ulteriori e lunghi controlli chimico-clinici sui soggetti in esame.

È ovvio però che una scelta corretta tra queste due alternative non può essere fatta senza conoscere con precisione i limiti reali della popolazione cosiddetta normale, utilizzando un campione di controllo sufficientemente ampio ed omogeneo con la popolazione in esame. È questo il secondo scopo della presente ricerca.

MATERIALI E METODI

Sono stati inclusi nello studio 4100 neonati, 2100 di sesso maschile e 2000 di sesso femminile, di età variabile fra uno e diciotto giorni (età media 5,94 giorni) (Fig. 1). I soggetti inclusi nello studio sono stati randomizzati per gruppi di 30 tra circa 16.000 campioni inviati nel corso di sei mesi al Centro delle Oligofrenie Dismetaboliche dell'Istituto di Neuropsichiatria Infantile per l'esecuzione dello *screening* neonatale di massa.

Dai campioni di sangue raccolti su carta bibula viene ritagliato, dopo autoclavatura, un dischetto di 9 mm di diametro, che viene eluito e sotto-

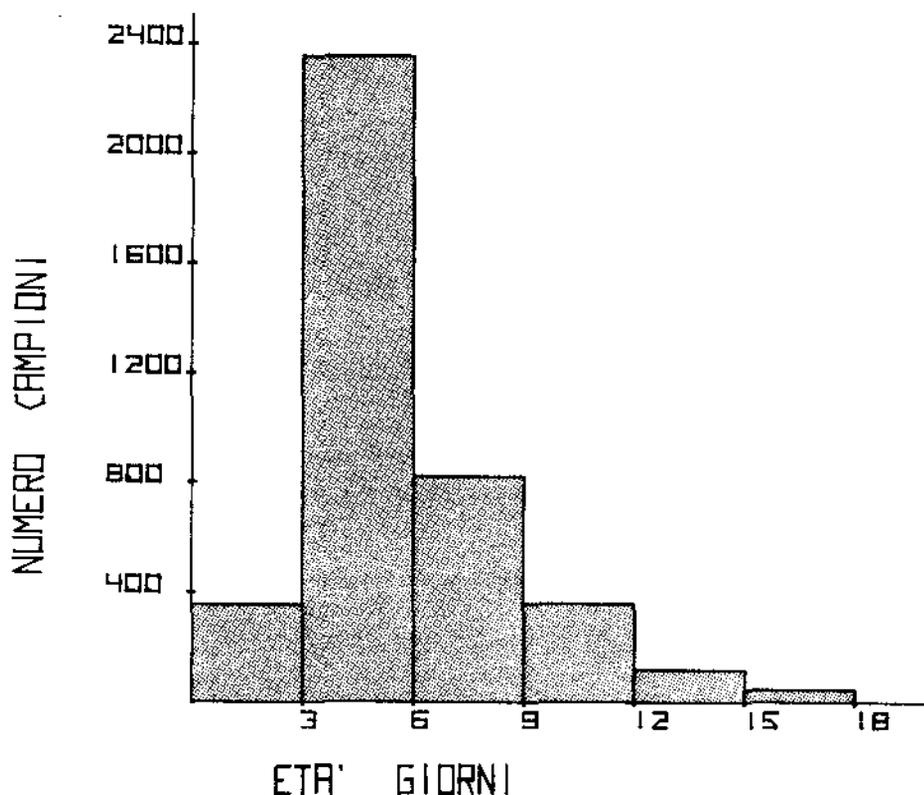


Fig. 1. — Istogramma rappresentante la distribuzione dei soggetti inclusi nella ricerca per gruppi di età di tre giorni da 1 a 18 giorni.

posto ad analisi per valina, metionina, isoleucina, leucina, tirosina e fenilalanina per mezzo di un Aminoacid Analyzer Technicon TSM1 versione *screening* secondo una modificazione del metodo descritto da Bonnafé [3] con un programma rapido di 30 min (cromatografia rapida su colonna). Ogni dieci campioni viene inserito un *pool* di sangue a concentrazione nota cui far riferimento come standard esterno. Il calcolo delle concentrazioni viene eseguito per mezzo del rapporto delle aree, calcolato con un Digitizer Hewlett-Packard 9864 A interfacciato con calcolatore Hewlett-Packard 9820.

Il controllo della validità del metodo di analisi e di calcolo veniva eseguito periodicamente sottoponendo all'analisi completa di tutti gli aminoacidi (acido cisteico - arginina) un *pool* di plasma su un Aminoacid Analyzer TSM1. Il sangue *in toto* dello stesso *pool*, adsorbito su carta bibula, veniva quindi analizzato settimanalmente in gruppi di 10 campioni per 9 successive settimane col metodo di Bonnafé [3] modificato.

Se l'analisi della varianza non dimostrava differenze significative tra i 9 gruppi di 10 campioni, tutti i gruppi venivano cumulati. Nella Tab. 1 sono riportate le medie delle letture di uno di questi controlli raffrontate con le medie di quattro determinazioni effettuate con Aminoacid Analyzer Technicon TSM1 utilizzando il programma completo acido cisteico-arginina.

L'analisi statistica dei dati veniva fatta calcolando, per mezzo di un calcolatore PDP 11/10 Digital, la media, la deviazione standard ed i coefficienti di correlazione e regressione per le seguenti variabili: età, peso, concentrazioni di valina, metionina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina e rapporto tra fenilalanina e tirosina per i dati cumulati (4100 casi) e per maschi e femmine separatamente.

TABELLA 1

Precisione e accuratezza del metodo. Confronto tra i valori ottenuti sullo stesso campione con il metodo rapido di Bonnafé (a) e con il metodo di analisi completa: acido cisteico - arginina (b)

AMINOACIDI	Concentrazione, $\mu\text{moli}/100 \text{ ml}$		
	(a)		(b)
	Media di 90 determinazioni	S.E.M.	Media di 4 determinazioni
Valina	30,49	0,49	29,15
Metionina	4,87	0,14	5,01
Isoleucina	9,83	0,19	9,95
Leucina	16,22	0,19	16,10
Tirosina	6,51	0,11	6,40
Fenilalanina	4,76	0,11	4,92

RISULTATI

Il test tra le medie degli aminoacidi ed il confronto tra le rette di regressione non ha dimostrato differenze significative nelle concentrazioni degli aminoacidi tra maschi e femmine (Tab. 2).

È quindi corretto cumulare i dati che vengono sottoposti ad analisi della correlazione e della regressione tra le tre variabili: età, peso e concentrazione plasmatica degli aminoacidi. La correlazione lineare tra peso e concentrazione plasmatica degli aminoacidi non è significativa, eccezion fatta per la tirosina, la cui concentrazione appare significativamente correlata con il peso; il coefficiente di correlazione r è di 0,133, che per una numerosità di 4100 campioni corrisponde ad un $p < 0,001$.

Lo studio della correlazione tra età e concentrazione plasmatica permette diverse osservazioni di un certo interesse (Tab. 3). Il coefficiente di correlazione lineare appare significativo, a diversi livelli di significatività, per gli aminoacidi metionina, isoleucina, leucina e tirosina in tutti i gruppi di dati esaminati (maschi, femmine, maschi + femmine).

Si osserva un andamento comune, di lieve incremento delle concentrazioni plasmatiche degli aminoacidi, nel corso del periodo di osservazione (Tab. 3, Fig. 2); tale fenomeno appare particolarmente evidente per tirosina, leucina, isoleucina i cui livelli plasmatici, nel corso del periodo di osservazione, appaiono aumentare di circa $1 \mu\text{mole}/100 \text{ ml}$.

Tale rilievo si accorda bene con i dati riferiti da Ghadimi [7], che ha potuto osservare nel suo campione di soggetti da 0 a 9 giorni un aumento maggiore fino al quinto giorno di vita ed un aumento molto più lento fra il quinto ed il decimo giorno.

La particolare distribuzione in termini di età della nostra popolazione con numerosità massima tra 3 e 6 giorni (Fig. 1) tende ovviamente a rendere più difficile lo studio dell'andamento temporale del fenomeno. I dati riferiti da Ghisolfi [6] indicano come questo fenomeno non si esaurisca nei primi giorni di vita, ma continui a persistere, sebbene meno evidente, anche nel corso dei primi mesi di vita.

La comparazione delle medie ottenute con quelle riportate da altri AA. [9-11] offre occasione a diverse osservazioni.

I valori plasmatici ottenuti col nostro metodo appaiono lievemente più alti di quelli riportati in letteratura. La grande differenza nel numero dei campioni non permette una comparazione precisa delle due popolazioni; si può solo rilevare, con una certa approssimazione, che le differenze maggiori si osservano a carico degli aminoacidi valina e metionina (Tab. 4).

Il tipo di programma utilizzato per l'analisi degli aminoacidi, che permette l'eluizione separata della valina a ridosso di un picco che rappresenta l'eluizione comune di glicina, alanina e acido alfa-amino-butirrico, in effetti

TABELLA 2

Valori medi della concentrazione plasmatica degli aminoacidi relativi a 4.100 neonati (età media: 5,94 giorni), di cui 2.100 maschi e 2.000 femmine

AMINOACIDI	$\mu\text{moli}/100 \text{ ml} \pm \text{S.D.}$		
	Maschi	Femmine	Maschi + Femmine
Valina	28,33 \pm 7,79	30,23 \pm 7,85	28,40 \pm 7,75
Metionina	5,90 \pm 2,22	5,97 \pm 2,22	5,89 \pm 2,21
Isoleucina	9,26 \pm 3,13	9,47 \pm 3,31	9,22 \pm 3,13
Leucina	16,95 \pm 4,93	17,43 \pm 6,32	17,02 \pm 5,57
Tirosina	9,55 \pm 4,00	9,82 \pm 4,03	9,55 \pm 3,95
Fenilalanina	6,12 \pm 2,13	6,13 \pm 1,72	6,11 \pm 1,93

TABELLA 3

Matrici di correlazione età verso concentrazione plasmatica degli aminoacidi

	Aminoacidi	r	p <	a	b
Maschi (n. vettori 2100)	Valina	0,033	non significativo		
	Metionina	0,045	0,05	5,80	0,015
	Isoleucina	0,133	0,001	8,86	0,061
	Leucina	0,068	0,01	16,61	0,050
	Tirosina	0,073	0,01	9,27	0,043
	Fenilalanina	0,026	non significativo		
Femmine (n. vettori 2000)	Valina	0,012	non significativo		
	Metionina	0,067	0,01	5,79	0,035
	Isoleucina	0,189	0,001	8,66	0,120
	Leucina	0,094	0,01	16,66	0,120
	Tirosina	0,092	0,01	9,35	0,073
	Fenilalanina	0,018	non significativo		
Maschi + Femmine (n. vettori 4100)	Valina	0,035	non significativo		
	Metionina	0,045	0,01	5,77	0,020
	Isoleucina	0,136	0,001	8,72	0,084
	Leucina	0,062	0,01	16,62	0,068
	Tirosina	0,079	0,01	9,18	0,061
	Fenilalanina	0,016	non significativo		

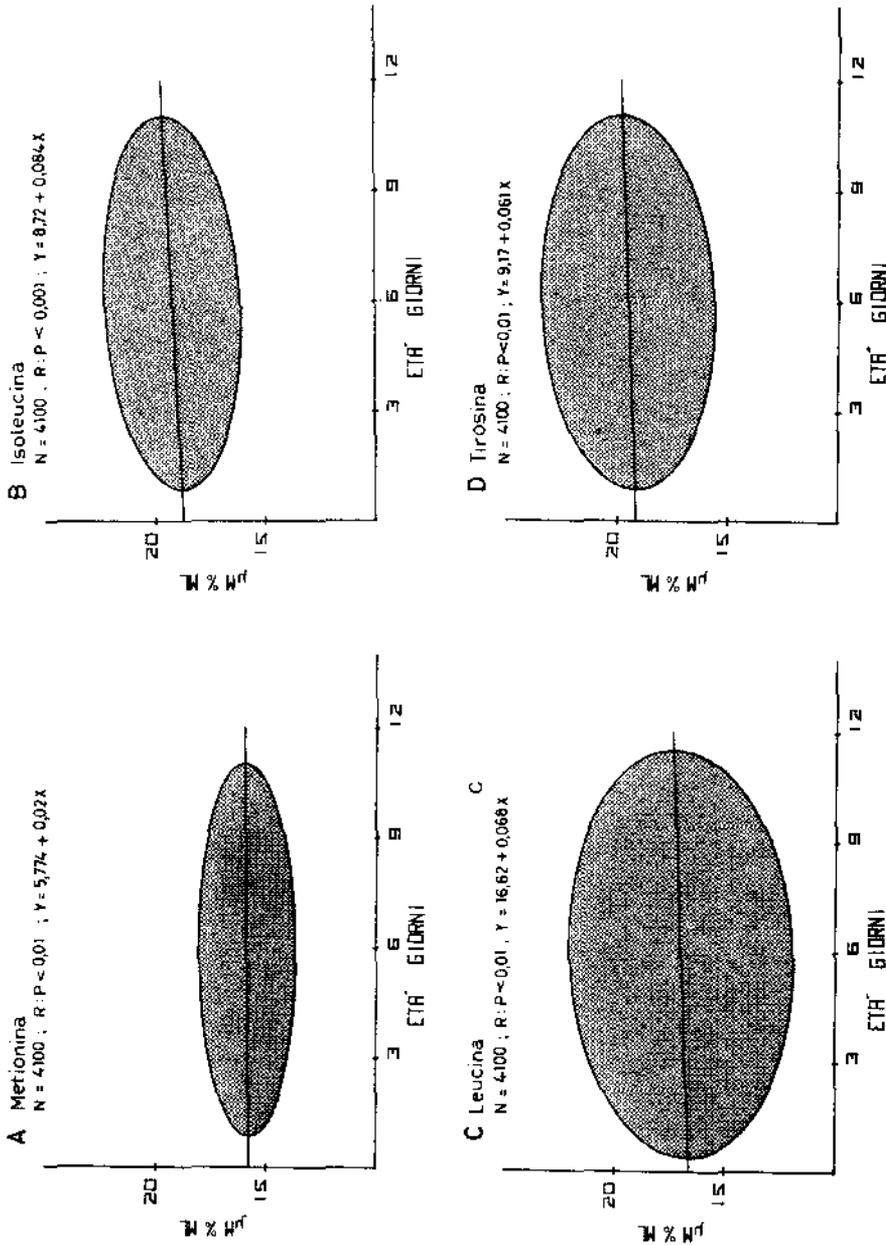


Fig. 2. — Correlazione e retta di regressione tra la concentrazione plasmatica, espressa in $\mu\text{moli}/100\text{ ml}$, della metionina (A), della isoleucina (B), della leucina (C), della tiroosina (D) e l'età in giorni su una popolazione di 4100 soggetti. Le aree grigie rappresentano le ellissi di tolleranza calcolate per un $p = 0,05$.

Confronto fra i valori delle concentrazioni plasmatiche degli aminoacidi ottenuti con questa ricerca e quelli riportati da altri Autori

AMINOACIDI	$\mu\text{moli}/100 \text{ ml} \pm \text{S.D.}$				
	Presente ricerca 4100 casi 1-18 giorni	Armstrong [9] 12 casi 6-18 anni	Gladini [7] 6 casi 5 giorni	Ghisolfi [8] 39 casi 10 giorni -3 mesi	Dickinson [10] 25 casi
Valina	28,40 \pm 7,75	22,31	22,45	19,97	13,66
Metionina	5,89 \pm 2,21	2,73	2,41	2,14	2,95
Isoleucina	9,22 \pm 3,13	6,72	6,94	5,95	3,96
Leucina	17,02 \pm 5,57	12,73	13,64	10,06	7,24
Tirosina	9,55 \pm 3,95	6,75	15,29	6,62	6,95
Fenilalanina	6,11 \pm 1,93	5,80	5,26	5,87	7,87

potrebbe portare ad una sovrastima della valina, e, in misura minore, della metionina. Una tale evenienza è però contraddetta dalla esperienza preliminare e dai successivi controlli sulla validità del metodo di analisi e di calcolo (Tab. 1).

Le differenze a carico degli altri aminoacidi sono meno evidenti e possono rientrare nelle normali oscillazioni di questi valori nelle diverse popolazioni.

UTILIZZAZIONE DEI DATI

Come accennato nell'introduzione, una impostazione metodologicamente corretta dei programmi di *screening* neonatale di massa implica una conoscenza precisa dei limiti cosiddetti «normali» della popolazione oggetto dello intervento di *screening*.

La sensibilità del programma di *screening* andrà attentamente calibrata al fine di ridurre al minimo il rumore di fondo, rappresentato dai casi in cui si impongono controlli successivi (falsi positivi). Si tratta cioè di scegliere un punto di *cut off* che minimizzi il numero dei casi da controllare in seconda istanza [5-6] senza ridurre la sensibilità del programma.

La variazione relativamente scarsa della concentrazione plasmatica degli aminoacidi nel corso del periodo di osservazione permette di usare un punto di *cut off* unico per tutti i campioni; generalmente [5] questo punto viene scelto aggiungendo due deviazioni standard (S.D.) alla media dell'aminoacido interessato.

Nel caso delle iperfenilalaninemie il punto di *cut off* potrà essere doppio, utilizzando anche la concentrazione plasmatica della tirosina (Tab. 5

e Fig. 6); l'uso di questo doppio criterio è particolarmente utile nel minimizzare i falsi negativi. È infatti noto che la concentrazione plasmatica di fenilalanina nei soggetti affetti da fenilchetonuria, nella prima settimana di vita, soprattutto nelle femmine, può non essere ancora sufficientemente elevata da dare un risultato positivo al test di Guthrie. Come esempio valga quello della Fig. 3.

TABELLA 5

Calcolo del punto di *cut off* per lo *screening* delle iperfenilalaninemie mediante cromatografia rapida su colonna

AMINOACIDI	$\mu\text{moli}/100 \text{ ml}$		Punto di <i>cut off</i>
	Medie 4100 neonati	S.D.	
Tirosina	9,55	3,95	$\bar{x} - 1 \text{ S.D.} = 5,59$ arrotondato a 5,60
Fenilalanina	6,11	1,93	$\bar{x} + 2 \text{ S.D.} = 9,97$ arrotondato a 10

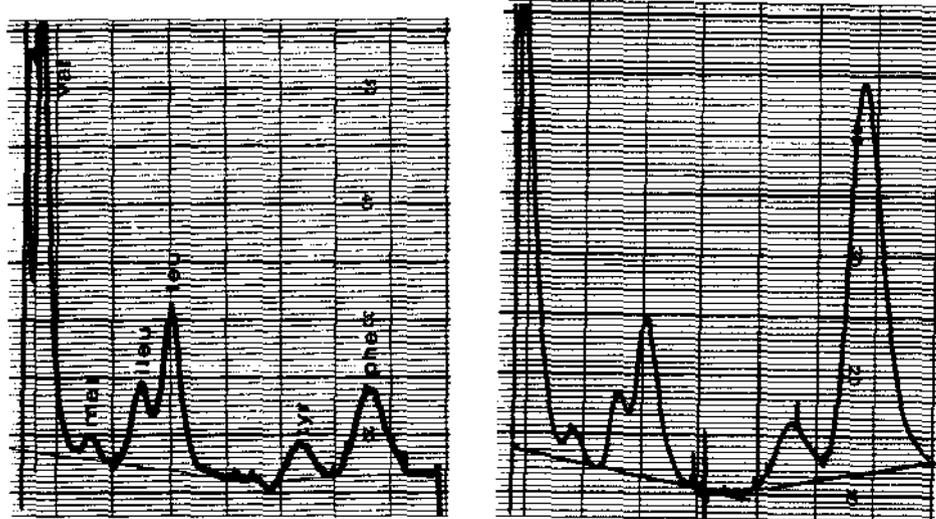


Fig. 3. — Importanza della correzione del punto di *cut off* della fenilalaninemia colla tirosinemia.

Neonato di sesso femminile; prelievo eseguito in terza giornata, negativo al test di Guthrie.

A sinistra cromatografia rapida su colonna: fenilalaninemia $11,03 \mu\text{moli}/100 \text{ ml}$, tirosinemia $3,84 \mu\text{moli}/100 \text{ ml}$. Dato che l'anamnesi familiare era positiva per la fenilchetonuria, e data l'ipotirosinemia, si procedeva a un controllo in sesta giornata; risultati (a destra): fenilalaninemia $64,46 \mu\text{moli}/100 \text{ ml}$, tirosinemia $6,34 \mu\text{moli}/100 \text{ ml}$. I successivi controlli confermavano la presenza di fenilchetonuria.

TABELLA 6

Calcolo dei punti di *cut off* per lo screening dei disturbi del metabolismo degli aminoacidi a catena ramificata mediante cromatografia rapida su colonna

AMINOACIDI	µmoli/100 ml		
	Medie 4100 neonati	S.D.	Punto di <i>cut off</i>
Valina	28,40	7,75	$\bar{x} + 2 \text{ S.D.} = 43,90$ arrotondato a 45
Isoleucina	9,22	3,12	$\bar{x} + 2 \text{ S.D.} = 15,46$ arrotondate a 15
Leucina	17,02	5,57	$\bar{x} + 2 \text{ S.D.} = 28,16$ arrotondato a 30

Nel caso dei disturbi del metabolismo degli aminoacidi a catena ramificata è verosimile che in pratica possano essere usati punti di *cut off* più alti di quelli ricavati dalla formula $\bar{x} + 2 \text{ S.D.}$, dati i notevoli aumenti che si osservano nei casi di leucinosi e data la frequenza di aumenti occasionali nelle concentrazioni plasmatiche di leucina, isoleucina, valina in rapporto alla somministrazione di formule iperproteiche.

Ricevuto il 19 dicembre 1978.

Accettato il 28 dicembre 1978.

BIBLIOGRAFIA

1. GUTHRIE P. & SUSI A. 1963. A simple phenylalanine method for detecting PKU in large populations of newborn infants. *Pediatrics*. **32**: 338-343
2. ADRIAENSSENS, K., VANNEULE, R. & VAN BELLE, M. 1967. A new simple screening method for detecting pathological aminoacidemias with collection of blood on paper. *Clin. Chem. Acta*. **15**: 362-364.
3. BONNAFÉ, M., LEMONNIER & CHARPENTIER. 1973. Nouvelle micromethode chromatographique pour le dépistage des aminoacidopathies. *Les aminoacidopathies*-Grenoble pp. 196-215.
4. BESSMAN, S. P. 1972. Genetic failure of aminoacid «justification». A common basis for many forms of metabolic, nutritional and «non specific» mental retardation. *J. Pediat.* **81**: 314.
5. SCRIVER, C. R. & ROSENBERG, L. E. 1973. *Aminoacid Metabolism and its Disorders*. W. B. Saunders Company, Philadelphia.
6. ANTONOZZI, I., DEL CASTELLO, P. G. & SANTAGATA, G. 1978. Lo screening neonatale di massa per le aminoacidopatie, *Neurops. Inf.* **203/204**: 655-696.
7. GHADIMI, H. & PECORA, P. 1964. Plasma aminoacids after birth. *Pediatrics*. **34**: 182-191.

8. GHISOLFI, J., AUGIER, D., REGNIER, C. & DALOUS, A. 1973. Etude des variations physiologiques en fonction de l'âge du taux des acides aminés libres plasmatiques chez l'enfant normal. *Arch. Franc. Ped.* **30**: 951-957.
9. ARMSTRONG, M. D. & STAVE, U. 1973. A study of plasma aminoacid levels. II. Normal values for children and adults. *Metabolism*. **22**: 561-570.
10. DICKINSON, J. C., ROSENBLUM, H. & HAMILTON, P. B. 1965. Ion exchange chromatography of the free aminoacids in the plasma of the newborn infant. *Pediatrics*. **36**: 2-13.
11. FELGIN, R. D. & HAYMOND, M. W. 1970. Circadian periodicity of blood aminoacids in the neonate. *Pediatrics*. **45**: 782-790.