

# SCREENING NEONATALE PER MALATTIE METABOLICHE EREDITARIE MEDIANTE SPETTROMETRIA DI MASSA

Giancarlo la Marca, Pharm Sc.

Ricercatore confermato, Dipartimento di farmacologia clinica e preclinica, Università degli Studi di Firenze  
Laboratorio di Spettrometria di Massa, Chimica Clinica e Farmacologia  
Azienda Ospedaliero-Universitaria Meyer

Le malattie metaboliche ereditarie sono patologie causate da alterazioni geniche che portano a deficit totale o parziale di una proteina con funzione enzimatica o assimilabile. Tali difetti sono responsabili di gravi patologie che possono coinvolgere vari organi ed apparati con interessamento frequente del sistema nervoso centrale con conseguente handicap neurologico e/o intellettuale. La prognosi spesso è grave *quoad vitam* o *quoad valetudinem*. Tali patologie sono singolarmente rare ma se considerate globalmente la loro incidenza è attualmente valutata in un caso ogni circa 200 nati. Attualmente si conoscono oltre 600 diverse malattie metaboliche ereditarie e il loro numero è in progressivo aumento grazie all'individuazione di nuovi difetti enzimatici e nuovi geni responsabili. Una diagnosi omessa o tardiva ha pesanti conseguenze quali *exitus* o gravi handicap del paziente o nascita di altri soggetti affetti dalla medesima patologia nella stessa famiglia.

Come è noto gli screening sono procedure diagnostiche che tendono ad evidenziare patologie in fase preclinica con notevoli vantaggi sia per il paziente (in termini di salute), che per la società (in termini di risparmi di risorse) nel concetto, fondamentale in campo medico, che è meglio prevenire che curare.

Il concetto di screening neonatale, per una malattia metabolica, è stata introdotto per la prima volta nel 1963 da Robert Guthrie per la fenilchetonuria (Guthrie, 1963). Il Test di Guthrie, rapido, poco costoso su goccia di sangue adsorbita su carta bibula, ha rappresentato un'importante tappa nella prevenzione del ritardo mentale. Altri test su goccia di sangue sono stati successivamente resi disponibili per altre malattie metaboliche (malattia urine a sciroppo d'acero, galattosemia, deficit di biotinidasi) ed endocrinologiche (ipotiroidismo congenito ed iperplasia surrenale congenita). Oggi nella maggior parte dei Paesi del mondo tutti i neonati sono sottoposti allo screening per almeno due patologie: fenilchetonuria e ipotiroidismo congenito.

Dalla fine degli anni 90 i progressi tecnologici e in particolare l'utilizzo della Spettrometria di Massa (MS/MS) che consente un'analisi multimetabolita su un'unica goccia di sangue, hanno portato a modificare il concetto di screening da un sistema con "un test per malattia" (Test di Guthrie) (Fig. 1) ad un sistema con "un test per molte malattie" (screening in MS/MS) (la Marca, 2008) (Fig. 2).

In MS/MS dalla medesima goccia di sangue vengono

analizzati contemporaneamente e quantificati (il Test di Guthrie è invece un'analisi semiquantitativa) vari metaboliti (oggi acilcarnitine, aminoacidi, acidi organici e nel prossimo futuro anche alcune purine per lo screening di alcune immunodeficienze severe combinate).

Questa tecnica consente di identificare alla nascita, a partire da una sola goccia di sangue essiccato su carta bibula, più di 40 malattie metaboliche ereditarie.

Del resto la tendenza scientifica fa prevedere che con tecniche simili, ma ancora più sofisticate, nei prossimi 10 anni il numero di patologie che saranno sottoposte a screening sarà in forte aumento (50-100-150 diverse malattie).

Queste patologie rare singolarmente mostrano elevata frequenza come gruppo e sono suscettibili di una cura se diagnosticate in fase precoce. Se non diagnosticate, come detto, possono portare rapidamente ad *exitus* o a gravi sequele neurologiche.

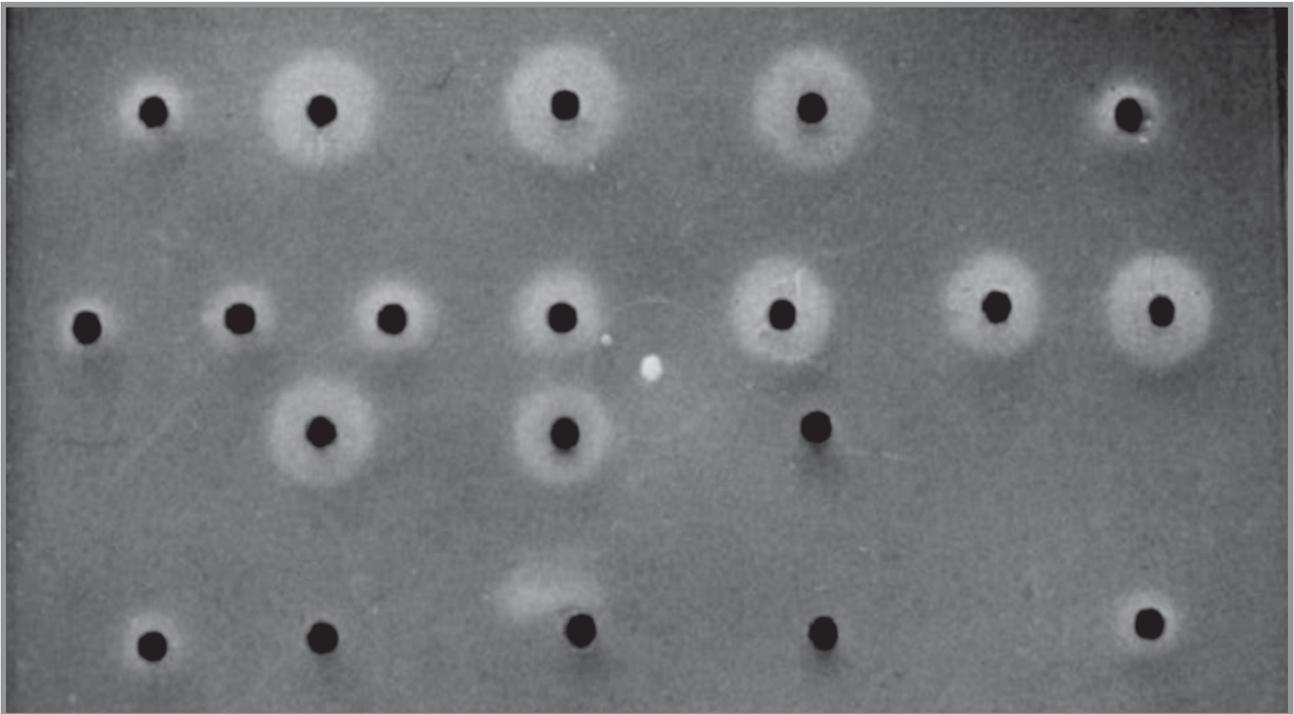
La diagnosi consente inoltre, la prevenzione nell'ambito familiare mediante consiglio genetico e diagnosi prenatale.

La capacità analitica della metodica (MS/MS) con analisi di un campione ogni due-tre minuti (Fig. 3) permette di analizzare un elevato numero di campioni ed è quindi applicabile allo screening di massa neonatale.

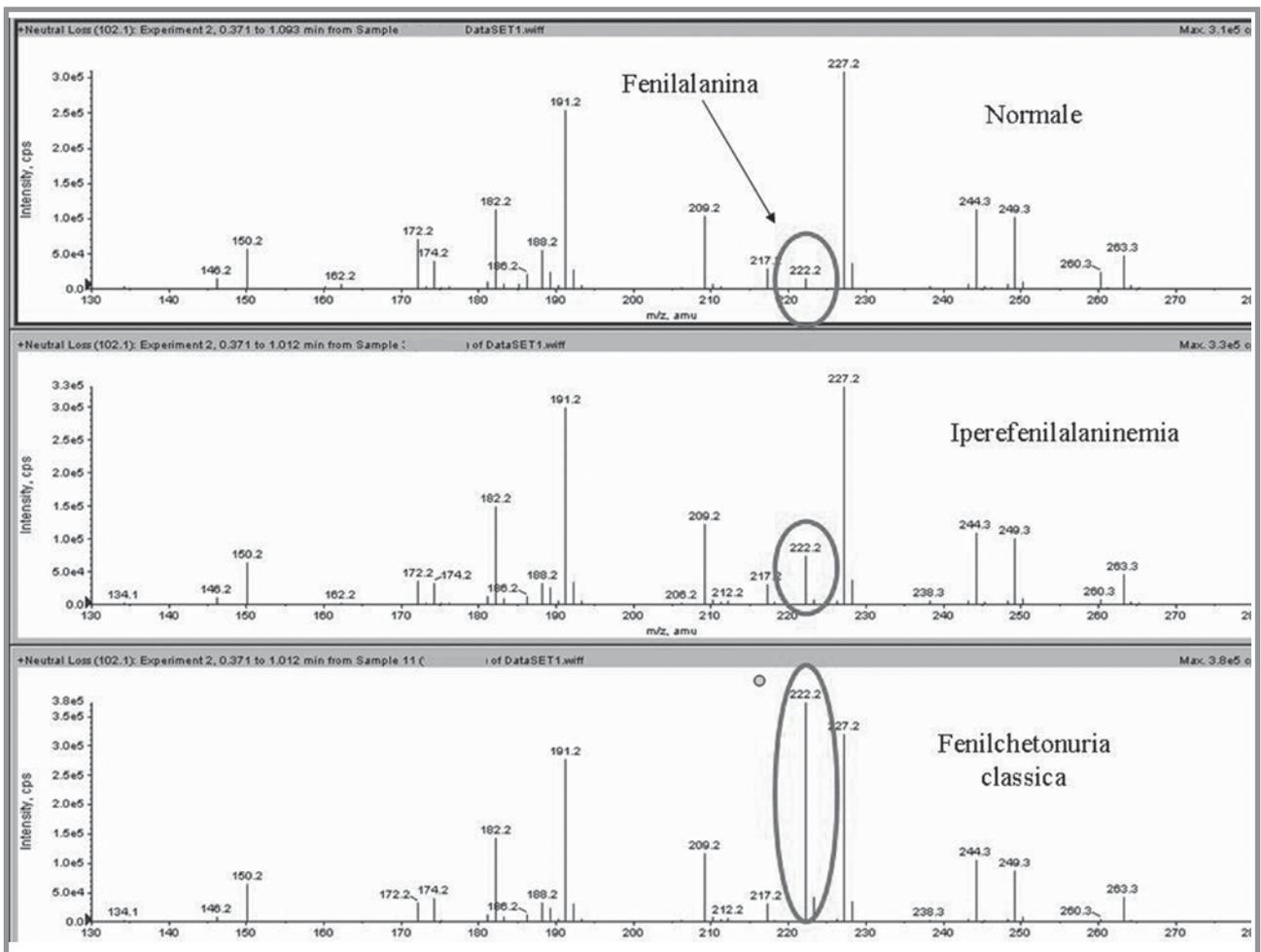
Numerose le esperienze dalla fine degli anni 90 in altri Paesi, Stati Uniti, Australia, Regno Unito, Germania che confermano la validità di questa nuova tecnica (Millington et al., 1990; Chace et al., 1993; Jones and Bennett, 2002; Wilcken et al., 2003).

Si può calcolare attualmente che alcune decine di milioni di bambini siano stati ormai sottoposti a questo screening allargato con grandi vantaggi per il bambino, per la famiglia e per la società.

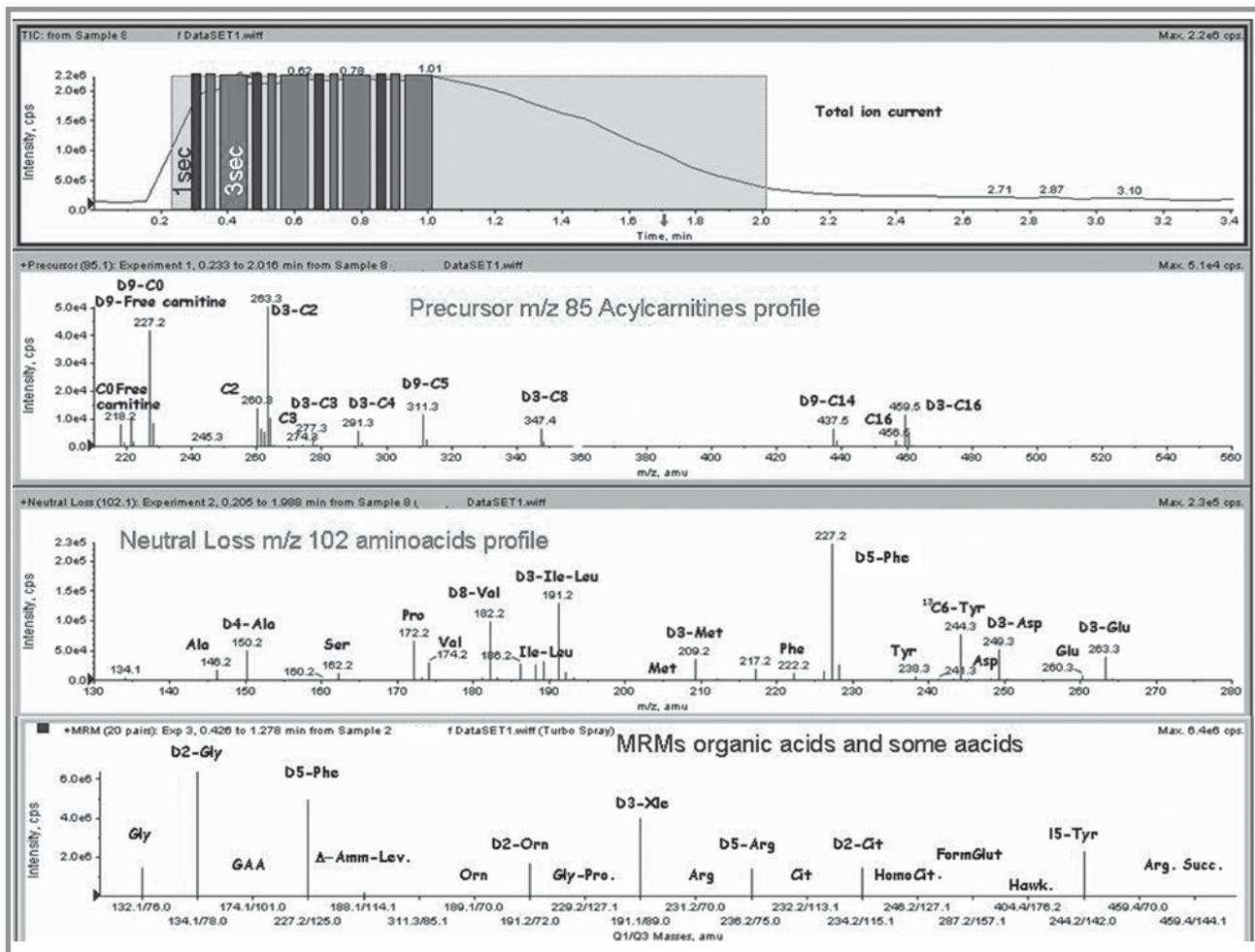
La Toscana è stata la prima regione italiana ad avere investito in questo settore, divenendo la regione trainante. In Italia oggi, Toscana a parte, sono stati recentemente iniziati studi pilota nelle regioni Veneto, Lazio, Liguria e Campania (Linee Guida per lo screening neonatale esteso e la conferma diagnostica, 2008). Regioni come la Lombardia, la Sicilia, la Puglia, l'Emilia Romagna, la Sardegna, le Marche e il Piemonte si stanno organizzando per iniziare progetti pilota. È probabile che in pochissimi anni queste modalità di screening vengano estese a tutte le regioni. Esiste un dibattito su quante e quali malattie debbano essere sottoposte a screening.



**Figura 1:** Piastra in cui avveniva il test di inibizione batterica per determinare la fenilchetonuria (Test di Guthrie). La concentrazione di fenilalanina e quindi la gravità del difetto enzimatico veniva effettuata valutando l'alone di crescita batterica intorno alla goccia di sangue depositata (dried blood spot) contro spot di sangue standard contenenti concentrazioni crescenti di fenilalanina.



**Figura 2:** Identificazione quantitativa dell'aminoacido fenilalanina mediante spettrometria di massa. Il segnale indicato con il numero 222 identifica la fenilalanina presente nel sangue depositato su carta bibula. Il segnale è basso nel neonato con funzionalità enzimatica normale (a); è più alto che nel normale nel caso di un difetto parziale (iperfenilalaninemia) (b); è molto alto nel caso di un difetto più importante facilmente indicabile come una fenilchetonuria classica (c). Si noti come la fenilalanina è solo uno dei molti segnali attribuibili ad altri aminoacidi determinati con la stessa analisi.



**Figura 3:** Profilo complesso di aminoacidi, acilcarnitine e acidi organici ottenibili in un'analisi di tre minuti circa su uno spot di sangue normale di un neonato.

La scelta di uno screening neonatale applicabile alle sole malattie suscettibili di terapia è, a differenza di quanto ritenuto negli anni 60-70, attualmente superata. Già da numerosi anni in molti Paesi del mondo, e anche nella regione Toscana dal 1983, viene effettuato lo screening per la Fibrosi Cistica, patologia per la quale a tutt'oggi non è disponibile una terapia risolutiva.

Il paziente ha un ruolo diverso nella società d'oggi, vi è una diversa attenzione verso "lo stato di salute", non inteso come completo benessere ma anche come qualità di vita; è inoltre da sottolineare quanto oggi sia importante il ruolo della medicina preventiva e della ricerca sia nella prevenzione che nello studio di nuovi approcci terapeutici.

Nella scelta della metodologia e delle patologie per uno screening neonatale le linee di pensiero maggiormente condivise sottolineano l'importanza dei seguenti punti (Linee Guida per lo screening neonatale esteso e la conferma diagnostica, 2008).

1. Lo screening non deve essere dannoso per il bambino.
2. La malattia deve rappresentare un problema di salute per il paziente.
3. La malattia può essere suscettibile di terapia risolutiva: ad esempio il difetto di biotinidasi, di olocarbossilasi sintetasi, la malattia delle urine a sciroppo d'acero, deficit sistemico di carnitina.

4. La malattia può essere solo parzialmente curabile, ma la diagnosi precoce consente comunque un miglioramento della qualità e della durata della vita: ad esempio glutaricoaciduria tipo I.
5. La malattia non dispone di una terapia ma la diagnosi precoce consente un adeguato consiglio genetico (Khoury et al., 2003).
6. La diagnosi precoce può consentire una diagnosi prenatale nelle successive gravidanze.
7. La diagnosi precoce consente di evitare iter diagnostici lunghi, talora con accertamenti inutili e costosi, e terapie inadeguate.
8. Lo screening neonatale può inoltre consentire, in patologie a decorso molto rapido e mortale, di ottenere una diagnosi precisa in casi che altrimenti sarebbero classificati come morti per sepsi neonatali o per cause sconosciute. Queste diagnosi, assolutamente non dannose per il bambino, portano un vantaggio notevole per la famiglia in termini di consiglio genetico ed eventuale diagnosi prenatale.
9. Lo screening neonatale mediante MS/MS, parimenti ai test di screening neonatale eseguiti su tutto il territorio nazionale per fenilchetonuria, ipotiroidismo e fibrosi cistica, è un test biochimico e non un test genetico in senso stretto: tale analisi consente di evidenziare l'alterazione biochimica di aminoacidi o acilcarnitine, in fase precoce, possibilmente in fase presintomatica.

Per quello che riguarda la regione Toscana, a partire da Novembre 2001 si è dotata del primo spettrometro di massa presso la Sezione di Malattie Metaboliche e Muscolari Ereditarie dell'Azienda Ospedaliera Meyer, adibito allo screening neonatale. Nel 2003 e nel 2004 sono stati acquisiti altri due strumenti. Dal 1° Gennaio 2002 fino al 31 Ottobre 2004 in via sperimentale, sono stati analizzati circa 42.000 nati nelle provincie di Firenze, Prato e Pistoia. Dal 1° Novembre 2004 con la Delibera Regionale n. 800 del 02/08/2004, lo screening neonatale allargato è stato reso obbligatorio ed esteso a tutti i nati in Toscana (la Marca, 2008). Con il 1° Gennaio 2006 anche i nati nell'area ASL 1 Umbria e dal 1° Gennaio 2010 tutta la regione Umbria effettua il test presso il Meyer. Al 1° Marzo 2011 sono stati eseguiti circa 260.000 test che hanno consentito di diagnosticare 54 iperfenilalaninemie (13 forme classiche), 44 acidurie organiche, 23 difetti della beta ossidazione, 7 difetti del ciclo dell'urea e 10 aminoacidopatie.

In questi anni è stata maturata un'esperienza importante confrontata anche a livello internazionale, che ha permesso una precisazione analitica in termini di sensibilità e specificità consentendo una riduzione del numero dei richiami e di introdurre nuovi screening.

Quello che è certo è che nell'immediato futuro questa tecnologia permetterà l'allargamento dei pannelli di screening neonatale anche a molte altre patologie (ad esempio alcune malattie di accumulo lisosomiale, alcuni difetti della biogenesi dei perossisomi e alcune immunodeficienze severe combinate) permettendo ancora una volta l'associazione fra una diagnosi precoce e tempestiva e l'inizio, a volte vitale, della migliore terapia disponibile.

## ■ BIBLIOGRAFIA ■

- Chace DH, Millington DS, Terada N, Kahler SG, Roe CR, Hofman LF. Rapid diagnosis of phenylketonuria by quantitative analysis for phenylalanine and tyrosine in neonatal blood spots by tandem mass spectrometry. *Clin. Chem.*, 1993; 39: 66-71.
- Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics*, 1963; 32: 338-343.
- Jones PM, Bennett MJ. The changing face of newborn screening: diagnosis of inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. *Clin. Chim. Acta*, 2002; 324: 121-128.
- Khoury MJ, McCabe LL, McCabe ER. Population screening in the age of genomic medicine. *N. Engl. J. Med.*, 2003; 348: 50-58.
- la Marca G, Malvagìa S, Casetta B, Pasquini E, Donati MA, Zammarchi E. Progress in expanded newborn screening for metabolic conditions by LC-MS/MS in Tuscany: Update on methods to reduce false tests. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 2008.
- Linee Guida per lo screening neonatale esteso e la conferma diagnostica, 2008. <http://www.sismme.it/documenti>
- Millington DS, Kodo N, Norwood DL, Roe CR. Tandem mass spectrometry: a new method for acylcarnitine profiling with potential for neonatal screening for inborn errors of metabolism. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 1990; 13: 321-324.
- Wilcken B, Wiley V, Hammond J, Carpenter K. Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. *N. Engl. J. Med.*, 2003; 348: 2304-2312.

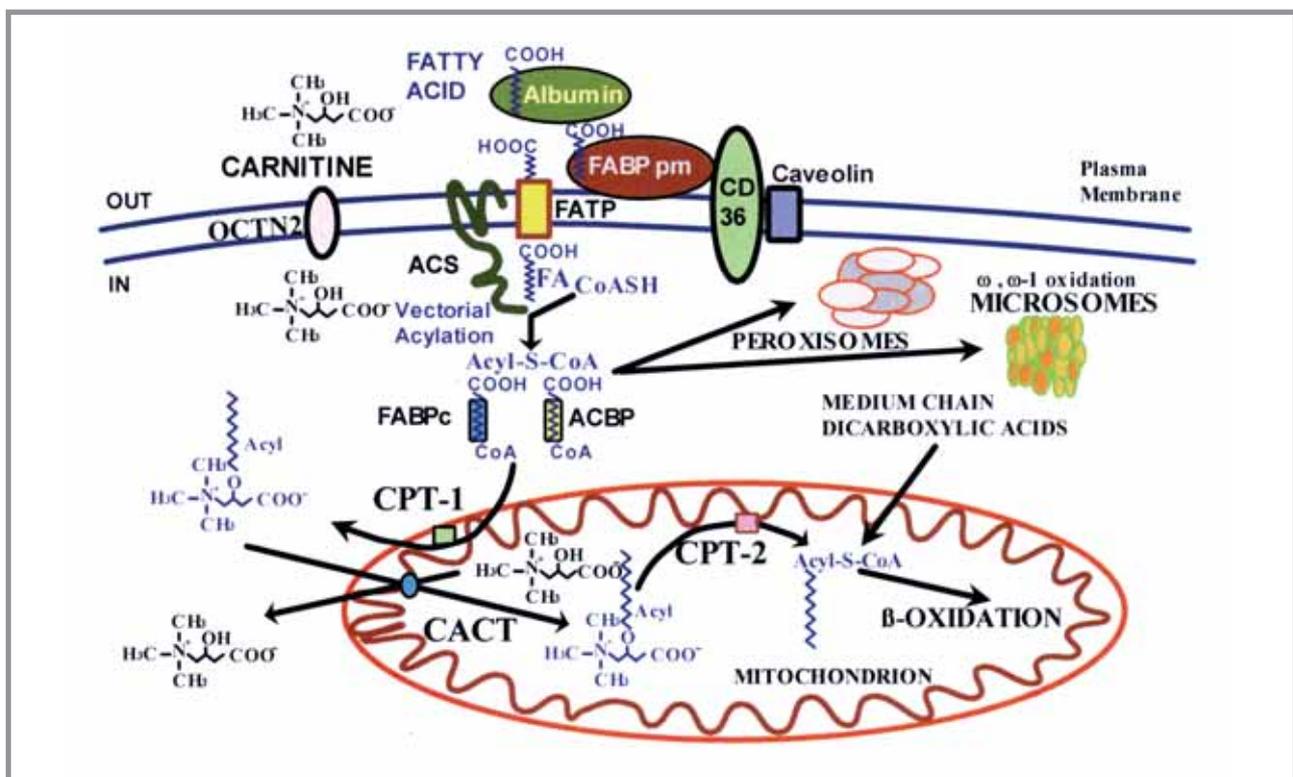
# I DIFETTI DEL TRASPORTO DI CARNITINA

Nicola Longo

Division of Medical Genetics, Department of Pediatrics, University of Utah, 2C412 SOM,  
50 North Mario Capecchi Drive, Salt Lake City UT 84132, USA  
nicola.longo@hsc.utah.edu

La carnitina è essenziale per facilitare l'ingresso degli acidi grassi a lunga catena all'interno dei mitocondri. La carnitina può essere sintetizzata dal corpo umano o assunta con la dieta. E' presente nella carne (da cui deriva il nome), nel latte e derivati ed in quantità minime in vegetali e frutta. Con una dieta normale, circa il 75% della carnitina è assunta con la dieta. La carnitina viene escreta nelle urine ed, in minima parte, nella bile. In condizioni normali, anche un'assunzione minima di carnitina con la dieta non ne causa una diminuzione dei livelli plasmatici e tissutali perchè il corpo umano ha un sistema efficiente per riassorbire la carnitina dovuto ad un trasportatore specifico con alta affinità chiamato OCTN2 (Organic Cation Transporter Novel, number 2) (Fig. 1). La mancanza di questo trasportatore, codificato dal gene *SLC22A5*, porta alla perdita di carnitina nelle urine con riduzione dei livelli plasmatici e tissutali. Quando i livelli di carnitina sono al di sotto di un certo livello all'interno delle cellule oppure c'è una domanda

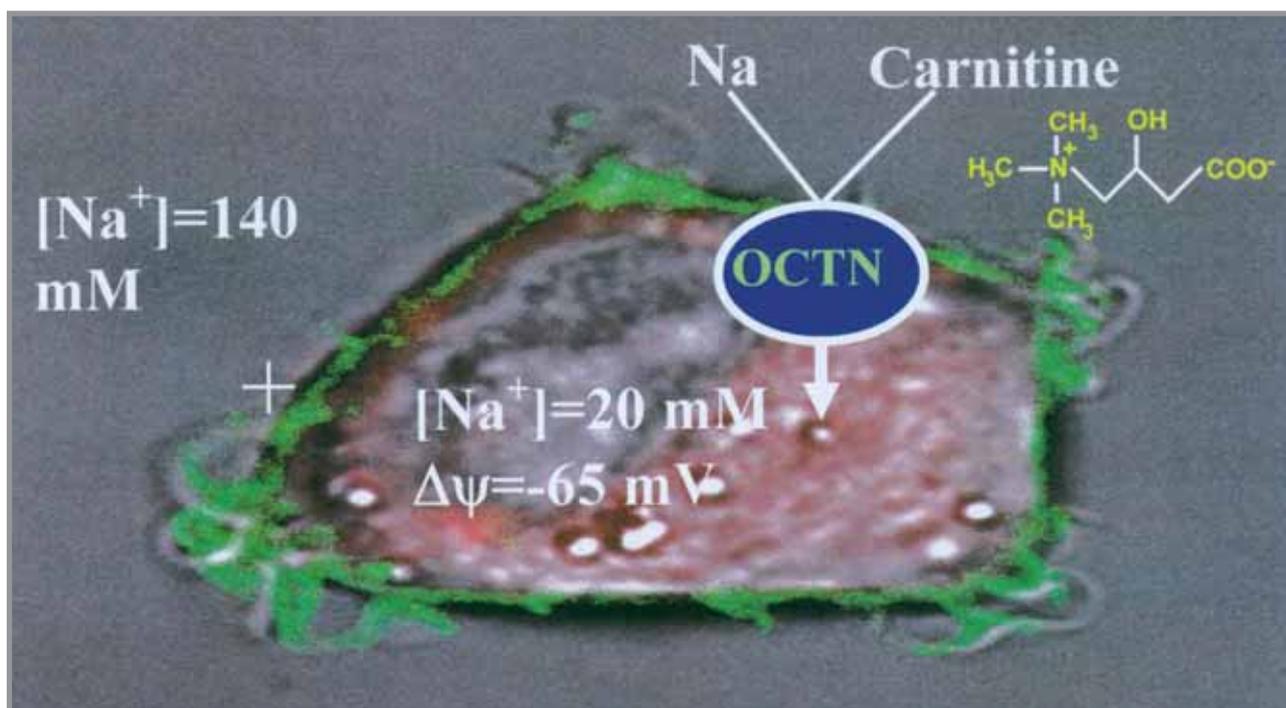
eccessiva per la produzione di energia da acidi grassi a lunga catena, come durante il catabolismo prolungato (infezioni, febbre, digiuno), il sistema si scompensa. Il deficit del trasporto di carnitina (Carnitine Uptake Defect, OMIM 212140) è una malattia autosomica recessiva con una frequenza di circa 1:40,000 nascite negli USA ed in altre parti del mondo. I bambini affetti sono in genere normali alla nascita (solo un caso ha avuto manifestazione clinica nel periodo neonatale) e si presentano dopo i 4 mesi di età con ipoglicemia, encefalopatia epatica (Sindrome di Reye), cardiomiopatia, o disturbi del ritmo cardiaco che possono causare morte improvvisa. I sintomi di ipoglicemia o di insufficienza epatica sono il più delle volte scatenati da digiuno in concomitanza di infezioni, febbre o gastroenterite. Questo porta ad un aumentato utilizzo di glucosio (ipoglicemia) con ridotta produzione di chetoni dagli acidi grassi (ipochetosi) ed all'accumulo di grassi in vari tessuti (steatosi) con danno di vari organi (epatopatia, cardiomiopatia, miopatia).



**Figura 1:** Ciclo della carnitina nell'ossidazione degli acidi grassi. La carnitina è accumulata dalle cellule tramite il trasportatore OCTN2. L'enzima carnitine palmitoyl transferase 1 (CPT-1) coniuga acidi grassi a lunga catena al gruppo idrossilico della carnitina formando acilcarnitine. Queste entrano nei mitocondri tramite il carnitine acylcarnitine translocator (CACT). Nella matrice mitocondriale, gli acidi grassi sono coniugati con il Coenzima A dalla carnitine palmitoyl transferase 2 (CPT-2). Gli acil-CoA formati diventano substrati della beta-ossidazione.

Se il paziente non è trattato con glucosio, la situazione può peggiorare ulteriormente fino al coma ed alla morte. La malattia viene diagnosticata misurando i livelli di carnitina plasmatica che sono in genere estremamente ridotti in questi pazienti (carnitina libera < 6 micromolare, normale 25-60 micromolare). La conferma diagnostica si ottiene misurando il trasporto di carnitina nei fibroblasti dei pazienti (che è in genere ridotto a meno del 10% del normale) o trovando 2 mutazioni nel gene *SLC22A5*, anche se quest'ultima metodica non individua circa il 15% delle mutazioni. Il trattamento consiste nell'assunzione orale di carnitina ad alte dosi che deve essere continuata per tutta la vita. Questa malattia può essere identificata con lo screening neonatale allargato (Spettrometria di Massa-Massa) trovando valori bassi di carnitina libera (C0) e coniugata (C3, C16, C18). Con lo screening neonatale, si è notato che in alcuni bambini i livelli bassi di carnitina plasmatica erano dovuti al fatto che la madre aveva il difetto di trasporto di carnitina, mentre i bambini erano solo portatori del difetto stesso. La carnitina viene trasferita dalla madre al feto durante la gravidanza. Se la madre ha livelli di carnitina bassi, il feto non riceve quantità sufficienti di carnitina tramite la placenta. Il livello di carnitina plasma-

tico di questi neonati si normalizza rapidamente con dosi basse di carnitina orale. La maggior parte delle madri identificate in questo modo non ha sintomi definiti. In alcuni casi, le madri avevano intolleranza al digiuno prolungato e stanchezza muscolare. I sintomi sono migliorati con supplementi di carnitina. In altri casi, le madri sono state diagnosticate dopo manifestazione di cardiomiopatia o aritmie severe ed in un caso con prolungamento dell'intervallo QT. Anche in questi casi, la terapia con carnitina ha portato a risoluzione dei sintomi e dei segni clinici. In regioni del mondo in cui questa malattia è molto frequente, giovani adulti (età 20-30 anni) sono morti improvvisamente senza avere prima alcun sintomo di malattia, suggerendo che anche in assenza di sintomi questi pazienti sono ad alto rischio per morte improvvisa. Cellule ottenute da madri asintomatiche hanno un aumento del trasporto residuo di carnitina dovuto ad un'aumentata frequenza di sostituzioni aminoacidiche (missense mutations) ed una diminuita frequenza di inserzione prematura di Stop codons (nonsense mutations). Questi dati indicano che c'è una correlazione tra genotipo e fenotipo e che un genotipo meno severo riduce la probabilità di presentazione pediatrica del difetto di trasporto di carnitina (Fig. 2).



**Figura 2:** Funzione del trasportatore della carnitina OCTN2. Il trasportatore OCTN2 coniugato con la Green Fluorescent Protein si localizza sulla membrana plasmatica (colore verde) quando espresso in cellule di mammifero. L'accumulo di carnitina è energizzato dal gradiente elettrochimico del sodio e concentra in modo significativo la carnitina all'interno delle cellule.

## BIBLIOGRAFIA

- Longo N, Amat di San Filippo C, Pasquali M. Disorders of carnitine transport and the carnitine cycle. *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.*, 2006; 142 (2): 77-85.
- Schimmenti LA, Crombez EA, Schwahn BC, Heese BA, Wood TC, Schroer RJ, Bentler K, Cederbaum S, Sarafooglou K, McCann M, Rinaldo P, Matern D, Amat di San Filippo C, Pasquali M, Berry SA, Longo N. Expanded newborn screening identifies maternal primary carnitine deficiency. *Molec. Genet. Metab.*, 2007; 90 (4): 441-5.

# DEFICIT MATERNI E NEONATALI DI CARNITINA: COME INTERPRETARE LO SCREENING NEONATALE

Piero Rinaldo

Mayo Clinic College of Medicine, Rochester, MN (USA)

Lo screening neonatale allargato è stato ufficialmente adottato negli Stati Uniti nel 2010, a conclusione di un processo su base nazionale iniziato nel 2004. Il pannello uniforme proposto dall'American College of Medical Genetics (ACMG) include 30 condizioni primarie e 25 condizioni secondarie, queste ultime per la maggior parte, correlate alla diagnosi differenziale del primo gruppo. L'implementazione a livello nazionale è virtualmente completa. Dall'inizio del 2011 il 99% dei neonati americani viene testato per tutte le condizioni primarie.

Le malattie metaboliche rappresentano la grande maggioranza del pannello: 20 delle 30 condizioni primarie e 22 delle 25 condizioni secondarie sono identificate mediante l'analisi in spettrometria di massa tandem (MS/MS) mediante il test per aminoacidi e acilcarnitine. Un risultato inaspettato dello screening allargato è venuto dal riconoscimento che risultati anormali possono originare da malattie metaboliche della madre, ovviamente non diagnosticate precedentemente, e non del neonato. Tra queste condizioni materne, vanno menzionate alcune che possono presentarsi con un deficit di carnitina molto pronunciato: acidosi glutarica tipo I (GA-I), difetto di 3-metil-crotonil carbossilasi (3MCC), difetto di acil-CoA deidrogenasi a media catena (MCAD), e naturalmente, il difetto di trasporto di carnitina (CUD).

Si pone quindi il problema di come riconoscere questi casi sulla base dei risultati dello screening neonatale. Anche se non è possibile in tutti i casi, ci sono dei rapporti tra metaboliti molto caratteristici e relativamente facili da riconoscere.

Trattandosi di condizioni rare, è molto difficile anche per i Centri di maggiore esperienza poter stabilire il valore clinico di risultati ottenuti in pochi casi. Per questa ragione, a partire dal 2004 un progetto collaborativo su base mondiale per il miglioramento della qualità analitica dello screening neonatale mediante MS/MS ha consentito la raccolta dei risultati di quasi 12.000 casi positivi, tra cui sono inclusi 256 casi di origine materna. Questi dati hanno permesso la definizione di disease ranges, e soprattutto lo sviluppo di strumenti post-analitici che permettono una rapida e semplice valutazione di singoli casi sia a livello del laboratorio ma anche in fasi successive di valutazione clinica. Queste applicazioni hanno il potenziale di cambiare in modo significativo la sensibilità e la specificità di programmi di screening neonatale.

A prescindere dal riconoscimento iniziale di un difetto materno, è fondamentale che la valutazione post-

screening di un risultato anormale sia diretto al neonato e alla madre. Nel caso specifico entrambi dovranno essere valutati sia con un'analisi dei livelli di carnitina totale e libera ma anche con un profilo completo delle acilcarnitine plasmatiche.

## BIBLIOGRAFIA

- ?????

# SCREENING NEONATALE PER MALATTIE METABOLICHE EREDITARIE E MEDICINA PERINATALE

Generoso Andria

Dipartimento di Pediatria, Università Federico II, Napoli

Gli screening neonatali di massa per malattie metaboliche ereditarie rappresentano un esempio di medicina preventiva di grande successo, in quanto consentono di identificare neonati con malattie a prognosi potenzialmente grave o addirittura letale in una fase presintomatica, quando è ancora possibile iniziare un trattamento efficace.

Gli Stati Uniti sono il Paese in cui da molti anni è iniziata un'analisi approfondita delle malattie, quasi tutte genetiche, per le quali è consigliabile attuare uno screening neonatale di massa, grazie all'utilizzo di nuove tecnologie analitiche come la tandem mass spectrometry.

Anche in Italia varie regioni stanno avviando tali programmi di screening, sull'esempio pionieristico fornito dalla regione Toscana. Le esperienze che si sono andate accumulando in questi anni hanno rivelato che in alcuni rari casi alterazioni riscontrate nel neonato sono in realtà espressione di un difetto materno su base genetica. Alcune di queste condizioni sono identificate attraverso un deficit di carnitina molto marcato nel sangue del neonato. In questo modo è stato possibile attuare l'opportuno trattamento nella madre piuttosto che nel

neonato. Tuttavia l'impatto per la medicina perinatale della diagnosi delle malattie genetiche andrà in futuro ben oltre l'utilizzo degli screening neonatali di massa. I progressi molto rapidi delle indagini di tipo molecolare fanno prevedere un'evoluzione nell'identificazione sempre più precoce delle patologie ereditarie, non solo di origine metabolica. In particolare è prevedibile in tempi ravvicinati la possibilità di un'analisi del DNA fetale isolato dal sangue della donna in gravidanza, tramite nuove tecnologie in grado di sequenziare l'esoma o l'intero genoma del feto a costi sostenibili. Questo approccio sposterà all'epoca prenatale l'individuazione di un numero sempre maggiore di malattie monogeniche, ma anche di fattori di rischio genetici per patologie multifattoriali.

Come possiamo dunque immaginare il ruolo del pediatra in un futuro non lontano, in cui buona parte dei bambini con malattie genetiche diagnosticate in utero non saranno fatti nascere, mentre i progressi dell'Ostetricia e della Neonatologia consentiranno a molti neonati gravemente prematuri o di peso molto basso di sopravvivere, pur con rischio elevato di handicap neurologico permanente?