

## Lo screening neonatale allargato mediante spettrometria di massa: passato, presente e futuro

Giancarlo la Marca

Laboratorio di Screening neonatale, Biochimica e Farmacologia, AOU A.Meyer, Firenze

**RIASSUNTO** *Riportiamo i nostri 10 anni di esperienza di screening neonatale allargato mediante spettrometria di massa in Toscana, la prima regione italiana che ha stabilito di effettuare per legge lo screening per più di 40 errori congeniti del metabolismo, su tutti i neonati. Sono descritte le malattie incluse nel pannello e le procedure utilizzate per ridurre sia falsi negativi che positivi. Vengono, inoltre, riportati i nuovi biomarcatori inseriti nel pannello capaci di individuare altri disordini metabolici. I campioni di sangue essiccato, prelevati con tecnica spot fra le 48-72 ore di vita vengono inviati ogni giorno tramite corriere al laboratorio. Fino ad ora, sono stati eseguiti oltre 315.000 test identificando 197 neonati affetti. Sono stati riportate le modalità di scelta dei cut-off di popolazione e l'introduzione di test di conferma secondari sempre sullo stesso campione di sangue essiccato in particolar modo per l'identificazione della acidemia propionica e metilmalonica; l'inclusione di succinilacetone, di adenosina e 2-deossadenosina nel pannello di metaboliti. Queste novità hanno portato ad una riduzione dei richiami da 1,47% a 0,3% e quindi del tempo di lavoro e lo stress alle famiglie. Perché possa essere effettuato un programma di screening esteso efficiente deve essere incentivato lo sviluppo di nuovi test e la ricerca di più specifici biomarcatori.*

**Parole chiave:** Screening neonatale esteso; Spettrometria di massa tandem; Test secondari; Campioni di sangue essiccato

**ABSTRACT** *Expanded newborn screening by tandem mass spectrometry: future tests, new perspectives. We report on our 10-year experience of expanded newborn screening by tandem mass spectrometry in Tuscany (Italy), the first Italian Region to screen all newborns for more than 40 inborn errors of metabolism: organization, diseases observed and updates on methods to reduce false-positive and false negative tests are described. Additionally new biomarkers able to identify new metabolic disorders have been reported. Blood collection is recommended between 48 and 72 h of life. Blood spots are sent daily by courier to laboratory. Up to now, spots from about 315000 infants have been analysed and 197 affected patients have been identified (disorders of amino acids, organic acids, fatty acids, and purines metabolism). We describe adjustments to cut-off values, the introduction of a second-tier test for propionic acidemia and for methylmalonic aciduria, the inclusion of succinylacetone, adenosine and 2-deoxyadenosine in the panel of metabolites. These changes resulted in a reduction in recalls from 1.47% to less than 0.3% and consequently of working time and parental stress. Avoiding false-negatives by using more specific markers and minimizing the false positive rate with second-tier testing is important for a successful newborn screening programme.*

**Key words:** Newborn screening; Tandem mass spectrometry; Dried blood spot; Second tier tests

### INTRODUZIONE

Lo screening neonatale allargato fornisce come beneficio la possibilità di segnalare la necessità di un trattamento precoce in circa 1 ogni 2000 neonati che hanno un difetto congenito del metabolismo identificabile con lo screening mediante spettrometria di massa tandem (MS/MS). Questo screening allargato testerà alla nascita più di 40 patologie permettendo l'inizio del trattamento prima che il neonato abbia i sintomi clinici della malattia. L'analisi di laboratorio di una goccia di sangue del neonato posta su carta assorbente per l'effettuazione dello screening neonatale giuoca un ruolo importante nella medicina preventiva. Un numero molto limitato di patologie è stato sottoposto a screening durante i primi trenta anni di esistenza. La situazione è completamente cambiata all'inizio degli anni 90 quando è stata introdotta la MS/MS nei laboratori clinici di tutto il mondo. La MS/MS può identificare più di 40 disordini contemporaneamente mediante il dosaggio di aminoacidi e acilcarnitine su una singola

goccia di sangue (Tab. 1). Questi disordini sono causati da difetti geneticamente determinati (errori congeniti) del metabolismo delle proteine e degli acidi grassi. Il neonato affetto non appare chiaramente malato alla nascita. I sintomi, che possono manifestarsi già nei primi giorni, appaiono generalmente in forma acuta durante il primo anno di vita. Tuttavia, sono stati descritti casi con insorgenza della patologia solo in età adulta. Lo scompenso metabolico acuto può portare a complicanze severe a lungo termine e spesso a morte. La capacità di identificare precocemente i neonati affetti prima dell'insorgenza dei sintomi può drammaticamente migliorare la prognosi della maggior parte dei pazienti. Prima che lo screening neonatale divenisse disponibile, la fenilchetonuria (PKU), dovuta ad un difetto genetico dell'enzima fenilalanina idrossilasi non veniva diagnosticata prima dei sei mesi di vita quando ritardo mentale e altri sintomi neurologici non specifici cominciarono a manifestarsi. Il trattamento basato su una dieta povera di fenilalanina è divenuto disponibile negli anni '50. I danni neurologici già presenti non erano più

**Tabella 1**

Malattie identificate allo screening in spettrometria di massa tandem (MS/MS) da campioni di sangue essiccato

1. PA	Acidemia propionica
2. IVA	Acidemia isovalerica
3. GA I	Acidemia glutarica tipo I
4. MCC	Difetti della 3-metilcrotonil CoA carbossilasi
5. BKT	Difetti della $\beta$ -chetotilasi
6. HMG	Difetti della 3-idrossi-3-metilglutaril CoA liasi
7. MCD	Difetti multipli della carbossilasi
8.	Difetti della malonil CoA decarbossilasi
9.	Difetti della isobutiril CoA deidrogenasi
10.	Aciduria 3-metilglutaconica tipo I, tipo II, tipo III, tipo IV
11.	Difetti della 2-metil-3-idrossibutiril-CoA- deidrogenasi
12. MSUD	Malattia delle urine a sciroppo d'acero
13. MMA	Aciduria metilmalonica difetto di mutasi
14. MMA	Aciduria metilmalonica difetti del Vit B12
15. SCAD	Difetti della deidrogenasi degli acil-CoA a catena corta
16. SCHAD	Difetti della deidrogenasi degli acil-CoA a catena corta idrossilata
17. MCAD	Difetti della deidrogenasi degli acil-CoA a catena media
18. VLCAD	Difetti della deidrogenasi degli acil-CoA a catena molto lunga
19. LCHAD	Difetti della deidrogenasi degli idrissiacil-CoA
20.	Deficit di Uptake di carnitina
21.	Deficit di Dienoil reductasi
22. GA II	Acidemia glutarica tipo II
23. CPI	Difetti della carnitina palmitoil transferase I
24. CPII	Difetti della carnitina palmitoil transferase II
25.	Difetti della carnitina-acilcarnitina translocase
26. HPAs	Iperfenilalaninemie
27.	Tirosinemia tipo I
28.	Tirosinemia tipo II
29.	Tirosinemia tipo III
30.	Citrullinemia tipo I
31.	Citrullinemia tipo II, deficit di citrina
32.	Argininemia
33.	Sindrome HHH
34.	Omocistinuria da difetto di cistationina beta sintetasi
35.	Ipermetioninemia
36.	Difetto del argininosuccinato liasi
37.	Iperglicinemia non chetotica
38.	Lo screening per il deficit di Biotinidasi viene eseguito in parallelo con test colorimetrico da spot di sangue
39.	Immunodeficienza severa combinata dovuta a deficit di Adenisina Deaminasi (ADA SCID)
<b>OBIETTIVI SECONDARI</b>	
40.	Formimino glutammico aciduria
41.	Idrossiprolinemia
42.	Deficit di Ornitina trans carbamilasi

reversibili ma soltanto mitigabili. Alla fine degli anni '50, Robert Guthrie ha messo a punto un metodo semplice di quantificazione della fenilalanina su goccia di sangue deposta su carta assorbente permettendo l'identificazione in fase presintomatica della PKU ed un rapido inizio del trattamento dietetico. Si trattava di un test basato su un saggio di inibizione batterica. Da quando questo test è stato disponibile, lo screening neonatale per la PKU è iniziato largamente in tutto il mondo con il nome di *Test di*

*Guthrie*. Il primo stato a iniziare è stato il New England (USA) nel 1961. Pochi altri difetti come l'ipotiroidismo congenito e la galattosemia sono stati subito dopo aggiunti in molti programmi di screening neonatale. Ma solo all'inizio degli anni 90, l'uso della MS/MS ha permesso di estendere i programmi di screening a più di 40 patologie. Tuttavia, dal momento che il numero di difetti da sottoporre a screening neonatale sono a discrezione di ciascuno stato esiste ad oggi una certa discrepanza nel numero di patologie sot-

toposte a screening neonatale.

In Italia la legge 502 del 1992 rende obbligatorio per tutti i neonati solo lo screening della PKU, dell'ipotiroidismo congenito e più recentemente della fibrosi cistica. Ad oggi la Toscana è l'unica regione che con deliberazione del 2004 si è adeguata ai protocolli internazionali sottoponendo a screening allargato per più di 40 patologie tutti i suoi neonati. Il primo progetto pilota di screening allargato risale, però, al 2001. Durante il periodo di attività (ottobre 2001-marzo 2012), sono stati sottoposti a screening allargato oltre 315.000 neonati. Complessivamente, sono stati identificati 63 neonati con iperfenilalaninemia (14 PKU, fenilchetonurie classiche), 63 acidurie organiche, 25 difetti della  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi, 10 difetti del ciclo dell'urea, altri 12 difetti, 1 caso di Immunodeficienza Severa Combinata dovuta a deficit di Adenosina Deaminasi (ADA SCID) e infine 25 deficit di biotinidasi. Il bacino di utenza annuo è di 34.000 neonati in Toscana e dal 1 gennaio del 2010 anche di circa 8-10.000 neonati umbri. E' da considerare che, sebbene singolarmente rari, i disordini congeniti del metabolismo nel loro insieme hanno un'incidenza di un nuovo caso ogni duemila nuovi nati. Uno dei più grossi problemi legati allo screening neonatale riguarda il contenimento dei test falsi positivi. Questi comportano costi elevati per i bilanci sanitari regionali e nazionali e soprattutto, generano stress nei genitori. Per ovviare a questo problema sono stati sviluppati test secondari (*2<sup>nd</sup> tier tests*) effettuati sempre sul cartoncino di sangue, che sono volti alla conferma dei test di screening. Nel caso specifico della regione Toscana, è stato messo a punto un test secondario per il riconoscimento delle acidemie metilmalonica e propionica che ha permesso di azzerare i richiami dovuti al metabolita aspecifico propionil carnitina e di portare il valore predittivo del test dal 5 al 100%<sup>1</sup>.

Un altro grosso impegno per gli operatori di screening è quello di evitare i test falsi negativi<sup>2</sup>. Fino al 2007, ad esempio, gli screening neonatali effettuati in tutto il mondo basati sul dosaggio mediante MS/MS della tirosina, riuscivano ad identificare solo 1-2 casi su dieci di tirosinemia tipo I. La malattia, causata dal deficit dell'enzima fumarilacetoacetato idrolasi, ha un'incidenza di circa 1 bambino affetto su 100-120 mila nati vivi ed è particolarmente frequente in Canada, dove l'incidenza è compresa tra 1:1.200 e 1:12.000 neonati. L'incidenza, la gravità della forma clinica e soprattutto la presenza di una terapia efficace fa sì che nella maggior parte dei paesi industrializzati la tirosinemia tipo I sia inserita nei pannelli di screening neonatale allargato. La tirosinemia ereditaria di tipo I è un difetto metabolico congenito, associato a malattia epatica severa nell'infanzia. I bambini affetti sono candidati al trapianto di fegato. In questo difetto metabolico però, il blocco enzimatico è 4 tappe a valle della tirosina, che quindi può risultare del tutto normale nei primi giorni di vita. Un altro aspetto rendeva il vecchio test diagnostico ancora meno attendibile: la concentrazione di tirosina aumenta, per immaturità enzimatica nei neonati prematuri. Ciò significa quindi che, questa può aumentare in una percentuale consistente di bambini sani e essere normale nella maggior parte di quelli realmente affetti. La diagnosi pertanto era quasi esclusivamente clinica, dopo manifestazione dei sintomi e spesso in fase avanzata di malattia. Il blocco

della via metabolica dovuto a deficit dell'enzima fumarilacetoacetato idrolasi, porta all'accumulo primario di succinilacetone. Tuttavia, la procedura analitica riconosciuta a livello internazionale per lo screening neonatale, non era in grado di estrarre dal sangue del neonato tale metabolita. E' proprio per questa ragione che è stata studiata una reazione chimica che rendeva il succinilacetone facilmente identificabile durante lo screening neonatale. La nuova reazione è stata validata per diversi mesi e il nuovo metabolita è stato inserito nel pannello di screening neonatale regionale. Dopo il percorso di validazione scientifica<sup>3,4</sup> il nuovo metodo è stato brevettato ed è ora utilizzato a livello internazionale. Nel prossimo futuro il pannello di screening neonatale verrà allargato a nuove patologie e fra queste le più importanti candidate sono alcune SCID (la regione Toscana ha iniziato un progetto pilota per lo screening neonatale dell'ADA SCID da gennaio del 2011)<sup>5</sup> e alcune malattie di accumulo lisosomiale. Per queste ultime la procedura analitica per il loro riconoscimento precoce basato sull'impiego della spettrometria di massa da campione di sangue essiccato è adesso disponibile<sup>6</sup>.

## MATERIALI E METODI

### Raccolta dei campioni

La raccolta dei campioni in Toscana è raccomandata fra le 48 e le 72 ore di vita. Ad ogni neonato, fra la terza e la quinta giornata di vita, viene punto il tallone, e alcune gocce di sangue vengono raccolte su speciale carta da filtro (carta bibula) Whatmann 903 essiccate e spedite al laboratorio di screening tramite corriere. La puntura del tallone avviene abitualmente sulla porzione mediale o su quella laterale del tallone stesso, utilizzando una lancetta "pungidito". La disinfezione della cute avviene mediante alcool isopropilico al 70%. Occorre lasciare asciugare completamente la cute prima di pungere il tallone, ed eliminare con garza sterile la prima goccia di sangue, al fine di evitare commistioni di sangue e disinfettante, che possono interferire con le determinazioni analitiche.

Il cartoncino arrivato al laboratorio viene controllato attraverso un codice a barre che associa il test ai dati anagrafici inseriti in cartella clinica. Questo codice sarà usato per tutto il percorso analitico nei vari screening eseguiti.

### Standard chimici e marchi

Gli standard marchiati con isotopi stabili sono disponibili commercialmente (GC-TMS, Roma) e sono utilizzati per l'analisi quantitativa. La soluzione madre viene fatta in metanolo per le acilcarnitine e in una miscela 50:50 v/v acqua/metanolo per gli aminoacidi. Le concentrazioni degli standard sono comprese nell'intervallo 500-2500  $\mu\text{mol/L}$  per gli aminoacidi e fra 7,6-152  $\mu\text{mol/L}$  per le acilcarnitine. Le concentrazioni di succinilacetone, adenosina e 2-deossadenosina sono 100  $\mu\text{mol/L}$ . Le soluzioni giornaliere vengono preparate per diluizione 1:200 v/v dalle soluzioni madri usando una miscela acqua/metanolo 10:90 v/v.

## Preparazione del campione e analisi in MS/MS

Tutti i solventi sono di grado HPLC e acquistati dalla Panreac (Barcellona, Spagna), e vengono impiegati per le diluizioni senza l'ausilio di ulteriori sistemi di purificazione.

La preparazione del campione consiste di diversi passaggi successivi di seguito elencati.

1. Prelevamento di un campione del diametro di 3,2 mm ed inserimento in una piastra a 96 pozzetti.
2. Aggiunta al/ai campioni di 200 µl di una soluzione di metanolo contenente standard marcati.
3. Aggiunta di una soluzione acquosa di idrazina 3 mmol/L
4. Incubazione a 37°C per 20-25 minuti sotto agitazione per ottenere una completa estrazione.
5. Prelievo del surnatante e trasferimento in una nuova piastra.
6. Essiccamento dei campioni sotto corrente di azoto a circa 50°C.
7. Risospensione dei campioni con 300 µl di una soluzione di acetonitrile (0,05% acido formico)-H<sub>2</sub>O (0,05% acido formico) 70:30 v/v.

Una volta preparato, il campione è pronto per essere introdotto e analizzato con uno strumento HPLC-MS/MS.

I test di screening vengono effettuati in accordo a procedure validate e pubblicate<sup>7,8</sup>. Recentemente delle modifiche sono state effettuate per inserire nel pannello il succinilacetone per la tirosinemia tipo I<sup>3,4,9</sup> e adenosina e deossadenosina per l'ADA SCID<sup>5</sup>.

Le analisi di routine vengono eseguite su due tripli quadrupoli (API 4000, AB Sciex, Ontario, Canada) utilizzando come modalità di scansione in ionizzazione positiva la *neutral loss scan* per gli aminoacidi, la *precursor ion scan* per le acilcarnitine e il *multiple reaction monitoring* (MRM) per altri metaboliti di interesse. I potenziali di *declustering* (DP), le energie di collisione (CE), e i potenziali in uscita alla cella di collisione (CXP) vengono ottimizzati automaticamente per analiti endogeni e standard marcati dal software Analyst 1.5.2 (AB Sciex, Ontario, Canada).

La figura 1 mostra un profilo tipico ottenuto da un campione di sangue essiccato estratto di un neonato in cui si possono vedere le tre modalità di scansione di massa utilizzate nel test di screening.

## RISULTATI

Dal 01/12/2001 al 30/10/2004 dopo delibera dall'AOU Meyer, è iniziato un progetto pilota di screening allargato in spettrometria di massa per i nati nelle province di

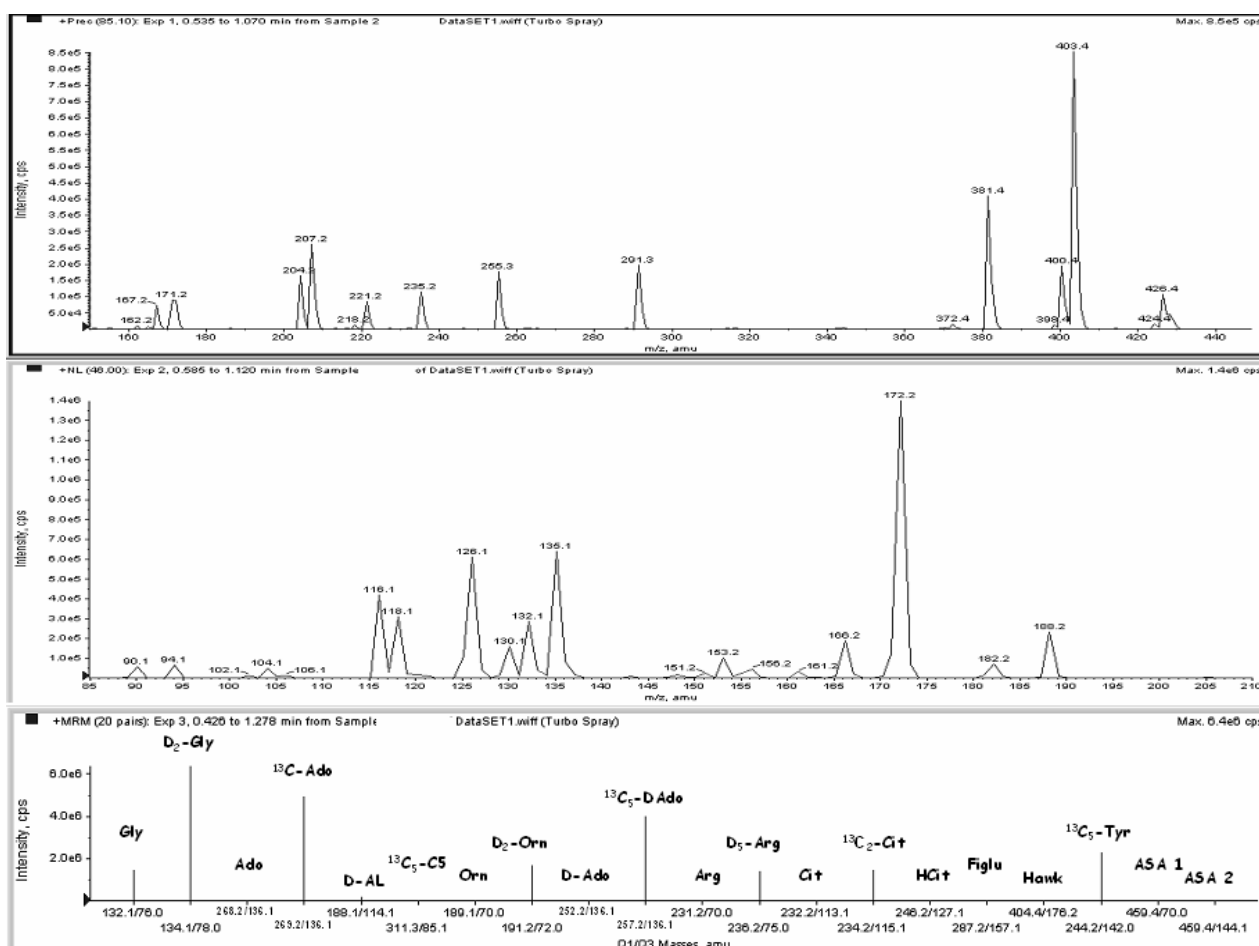


Figura 1 Profilo tipico ottenuto da un campione di sangue essiccato estratto di un neonato in cui si possono vedere le tre modalità di scansione di massa utilizzate nel test di screening.

Firenze, Prato e Pistoia per un bacino di utenza di circa 14.000 nati/anno.

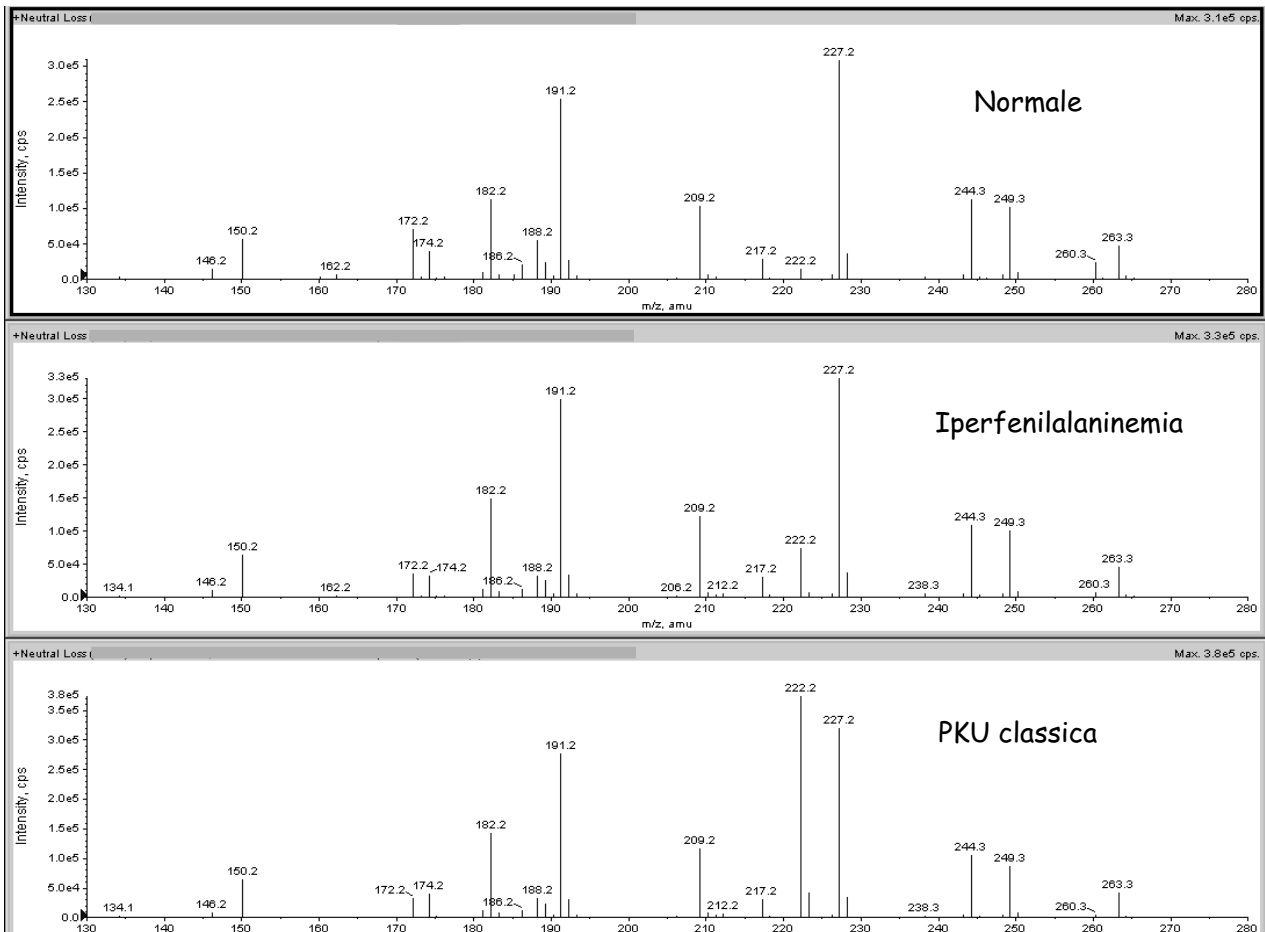
A partire dal 1 Novembre 2004, in seguito alla delibera regionale n. 800 del 2/8/2004, lo screening allargato per malattie metaboliche mediante MS/MS è stato reso obbligatorio in tutta la regione Toscana. Pertanto, lo screening neonatale di tutti i circa 34.000 neonati delle province toscane afferisce al Centro di Riferimento Regionale dell'AOU Meyer di Firenze.

Durante tutto il periodo fine 2001- marzo 2012 sono stati identificati 197 errori congeniti del metabolismo su circa 315.000 neonati sottoposti a screening con 1 nuovo caso ogni 1.600 nati circa. Per ognuno degli analiti sono stati stabiliti degli intervalli di riferimento basati su mediana +/- fino a 5 ds per ridurre la frequenza di risultati falsi positivi. La percentuale di falsi positivi complessiva è inferiore allo 0,25% nel 2012. Di seguito l'elenco dei difetti identificati allo screening esteso:

- **fra i difetti del metabolismo proteico/aminoacidico:** 63 iperfenilalaninemie di cui 14 PKU classiche; 4 idrosiprolinemie; 2 deficit di citrina (citrullinemia tipo II); 2 ipermetioninemie; 2 tirosinemie tipo I. In figura 2 si riporta la comparazione dei profili aminoacidici in *neutral loss* di un neonato sano, uno affetto da iperfenilalaninemia e uno affetto da PKU.
- **fra le acidurie organiche:**

1 glutarico aciduria tipo I; 3 propionico acidurie; 8 deficit di 3-metil-crotonil-CoA-Carbossilasi; 2 isovalerico acidurie; 1 metilglutaconico aciduria; 12 isobutirrico acidurie; 9 formiminoglutammico acidurie; 27 metilmalonico acidurie.

- **fra i difetti della beta ossidazione degli acidi grassi:** 10 difetti della  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi a catena media (*Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase deficiency, MCAD*); 8 difetti della  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi a catena corta (*Short Chain Acyl-CoA Dehydrogenase deficiency, SCAD*); 3 difetti della  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi a catena molto lunga (*Very Long Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase deficiency, VLCAD*); 4 difetti sistemici di carnitina. In figura 3 si riporta il profilo delle acilcarnitine del primo neonato italiano diagnosticato alla nascita per difetto di MCAD a tre giorni di vita, in cui le acilcarnitine a 6, 8 e 10 atomi di carbonio sono estremamente elevate se paragonate a quelle di un neonato sano.
- **fra i difetti del ciclo dell'urea:** 2 difetti di ornitina transcarbamilasi (OCT); 6 citrullinemie tipo I; 2 argininosuccinico acidurie. In Tabella 1 sono riportate le malattie incluse nel pannello di screening neonatale allargato effettuate nella regione Toscana.



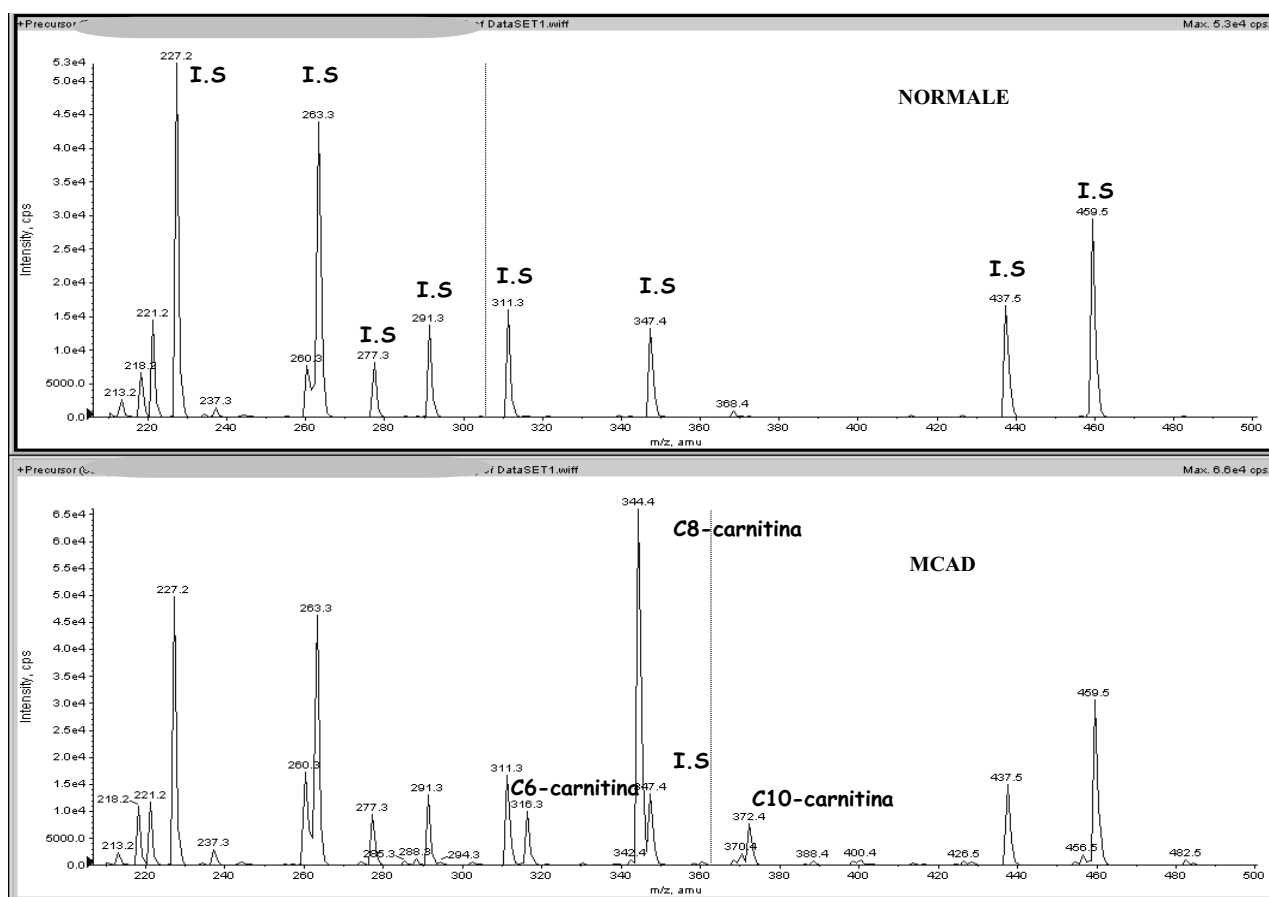
**Figura 2**  
Comparazione dei profili aminoacidici in neutral loss di un neonato sano, uno affetto da iperfenilalaninemia e uno affetto da PKU



## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In questo lavoro sono stati riportati i risultati di 10 anni di screening neonatale esteso mediante SM nella regione Toscana, la prima regione italiana che ha implementato in maniera sistematica e regolamentata gli screening neonatali obbligatori. Sono state effettuate circa 200 diagnosi su circa 315.000 test effettuati. La prevalenza complessiva dei difetti sottoposti a screening esteso è stata valutata in un nuovo caso ogni 1.600 nati, mentre quella dei singoli difetti è nel complesso molto simile a quella pubblicata in altre nazioni. La percentuale di richiamo al test di screening allargato è attualmente inferiore allo 0,3% complessiva sebbene nella fase di progetto pilota sia stato anche del 1,47%. Il miglioramento notevole dell'efficienza del test è senz'altro attribuibile alla introduzione sistematica di test secondari effettuati sugli stessi campioni di sangue e alla rivalutazione continua degli intervalli di riferimento di popolazione. Anche il valore predittivo positivo (VPP) del test è migliorato molto attestandosi ad un complessivo 15-20% e diventando circa il 100% per alcune patologie selezionate. E' il caso della acidemia propionica e della metilmalonica in cui addirittura sia passati con il test secondario dal 5 al 100% di VPP<sup>1</sup>. I test secondari sono una delle innovazioni recenti dello screening neonatale e sono oggi, diffuse in quasi tutti i paesi che effettuano lo screening allargato. Ulteriore miglioramento sia in termini di specificità che di sensibilità del test è stata l'introduzione di routine del

dosaggio del succinilacetone come biomarcatore primario per l'identificazione della tirosinemia tipo I<sup>3,9</sup>. Il numero dei test inclusi nei pannelli di screening varia da paese a paese in tutto il mondo. Molte nazioni ad esempio includono nel loro pannello effettuato mediante SM anche il deficit di biotinidasi<sup>2</sup>. La nostra esperienza ha dimostrato in dieci anni che nessuno dei 25 difetti di biotinidasi sia totale che parziale è identificabile mediante SM con il classico test di screening. Per la loro identificazione è stato sufficiente utilizzare il collaudato e sempre efficace test colorimetrico pubblicato da Heard e collaboratori nel 1984<sup>10</sup>. E' altresì vero però che in caso di scompenso metabolico acuto, i pazienti possono presentare un anomalo accumulo di propionil carnitina (C3) e 3-OH-isovalericarnitina (C5OH). I difetti di MCAD identificati nella popolazione sottoposta a screening sono stati 10, quindi 1:31.500 neonati con una incidenza abbastanza simile a quella riportata nel Europa del sud<sup>11</sup>. Molto recentemente (27/01/2010) il *Secretary's Advisory Committee for Heritable Disorders in Newborns and Children* (ACHDNC) ha deciso all'unanimità di includere nel pannello di screening neonatale le SCID in quanto patologie rispondenti in pieno ai criteri di inclusione riconosciuti a livello internazionale. La procedura diagnostica proposta si basa sull'analisi dei TREC mediante PCR *real-time*. Gli studi recenti stanno dimostrando una buona efficienza del test sebbene con variabile percentuale di falsi positivi, a costi consistenti e non sempre sostenibili. La regione Toscana ha da gennaio 2011 iniziato un



**Figura 3**  
 Profilo delle acilcarnitine del primo neonato italiano diagnosticato alla nascita per difetto di MCAD a tre giorni di vita.

progetto pilota per l'inclusione nel pannello di tutti gli altri metaboliti anche della adenosina e della deossadenosina come biomarcatori primari del deficit di Adenosina deaminasi che causa la ADA SCID, la più frequente dei difetti di SCID rappresentandone fino al 50%. Il nuovo test brevettato e validato<sup>5</sup> si è dimostrato estremamente efficiente identificando un caso di ADA SCID *late onset*. Il risultato del test basato sui TREC su questo neonato aveva dato risultato falso negativo. Altra differenza sostanziale è che il test effettuato in MS/MS costa meno di 5 centesimi di euro a neonato contro gli almeno 5 euro di quello che usa tecniche di biologia molecolare.

E' sicuramente indispensabile oltre che un obiettivo primario di chi si occupa di screening per malattie metaboliche, continuare a supportare l'introduzione di nuovi test secondari e a scoprire nuovi biomarcatori specifici che migliorino il valore predittivo dei test riducendo fra l'altro lo stress ai genitori richiamati per i valori positivi allo screening.

### BIBLIOGRAFIA

1. **la Marca G, Malvagia S, Pasquini E, et al.** Rapid 2nd-Tier Test for Measurement of 3-OH-Propionic and Methylmalonic Acids on Dried Blood Spots: Reducing the False-Positive Rate for Propionylcarnitine during Expanded Newborn Screening by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Clin Chem* 2007; 53:1364-9
2. **Wilcken B, Wiley V, Hammond J, Carpenter K.** Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. *N Engl J Med* 2003;348:2304-12
3. **la Marca G, Malvagia S, Pasquini E, et al.** The inclusion of succinylacetone as marker for tyrosinemia type I in expanded newborn screening programs *Rapid Commun Mass Spectrom* 2008;22:812-8
4. **la Marca G, Malvagia S, Funghini S, et al.** The successful inclusion of succinylacetone as a marker of Tyrosinemia Type I in Tuscany newborn screening program. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2009;23:3891-3
5. **Azzari C, la Marca G, Resti M.** Neonatal screening for severe-combined-immunodeficiency due to adenosine-deaminase defect: a reliable and inexpensive method by tandem-mass-spectrometry, *J All Clin Immunol* 2011;127:1394-9
6. **la Marca G, Casetta B, Malvagia S, et al.** New Strategy for the Screening of Lysosomal Storage Disorders: The Use of the Online Trapping-and-Cleanup Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Anal Chem* 2009; 81:6113-21
7. **Millington DS, Kodo N, Norwood DL, et al.** Tandem mass spectrometry: a new method for acylcarnitine profiling with potential for neonatal screening for inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis* 1990;13:321-4
8. **Chace DH, Millington DS, Terada N, et al.** 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
9. **Turgeon C, Magera MJ, Allard P, et al.** Combined newborn screening for succinylacetone, amino acids, and acylcarnitines in dried blood spots. *Clin Chem* 2008;54:657-64
10. **Heard GS, Secor McVoy JR, Wolf B.** A screening method for biotinidase deficiency in newborns. *Clin Chem* 1984;30:125-7
11. **Rhead WJ.** Newborn screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: a global perspective. *J Inherit Metab Dis* 2006;29:370-7

*Per corrispondenza:*

Prof. Giancarlo la Marca  
Laboratorio di Screening neonatale, Biochimica e Farmacologia, AOU A.Meyer, Firenze  
Viale Pieraccini, 24 - 50139 Firenze  
Tel.: 0555662988 - Fax: 055-5662849  
e-mail: giancarlo.lamarca@unifi.it; g.lamarca@meyer.it