



Valutazione delle performance analitiche di kit senza derivatizzazione sul sistema Waters RenataDX nell’ambito dello SNE



Ilaria Cicalini ^{1, 2†}, Silvia Valentinuzzi ^{1, 3†}, Damiana Pieragostino ^{1, 2}, Ada Consalvo^{1, 2}, Mirco Zucchelli ^{1, 2}, Simone Donzelli⁴, Davide Ambrogì⁴, Heather A. Brown⁵, Lisa J. Calton⁵, Liborio Stuppia^{1, 6}, Vincenzo De Laurenzi ^{1, 2}, Piero Del Boccio ^{1, 3}, Claudia Rossi ^{1, 6}



¹Centro Studi e Tecnologie Avanzate (CAST), Università degli Studi “G. d’Annunzio” di Chieti-Pescara, 66100 Chieti, Italy

²Dipartimento di Tecnologie Innovative in Medicina & Odontoiatria DTIMO, Università degli Studi “G. d’Annunzio” di Chieti-Pescara, 66100 Chieti, Italy

³Dipartimento di Farmacia, Università degli Studi “G. d’Annunzio” di Chieti-Pescara, 66100 Chieti, Italy

⁴Waters SPA, 20099 Milano, Italy

⁵Waters Corporation, Scientific Operations, Wilmslow SK9 4AX, UK

⁶ Dipartimento di Scienze Psicologiche, della Salute e del Territorio DiSPuTer, Università degli Studi “G. d’Annunzio” di Chieti-Pescara, 66100 Chieti, Italy

† Questi autori hanno contribuito ugualmente al lavoro.



Introduzione

L'introduzione della spettrometria di massa tandem (MS/MS) nei laboratori clinici e l'avvento dello screening neonatale esteso (SNE) sono stati cambiamenti cruciali per i programmi di salute pubblica in tutto il mondo. La MS/MS ha consentito l'espansione dello Screening Neonatale e la possibilità di monitorare oltre 40 disordini metabolici utilizzando da un singolo campione su spot di sangue secco (DBS) [1-4], nonostante non esista un pannello di screening uniforme a livello mondiale. Velocità, robustezza, accuratezza, selettività e specificità dell'analisi sono tutti requisiti dello SNE, indispensabili per ridurre al minimo il rischio di risultati falsi positivi, per eliminare possibilmente i falsi negativi e per migliorare il valore predittivo positivo dello SNE. In questo studio, abbiamo valutato nella routine clinica di un laboratorio SNE il sistema di screening RenataDX, un sistema IVD completamente integrato di MS/MS a iniezione di flusso (FIA-MS/MS) per l'analisi ad alto rendimento di campioni DBS. Data la disponibilità di diversi kit commerciali per lo SNE in MS/MS, abbiamo cercato di confrontare i kit senza derivatizzazione NeoBase™ 2 (PerkinElmer®) e MassChrom® (Chromsystems) sulla piattaforma RenataDX, valutandone le prestazioni analitiche. Inoltre, abbiamo anche confrontato le misure cliniche ottenute dai due diversi approcci di preparazione del campione analizzando più di 500 campioni DBS di neonati estratti con i due kit.

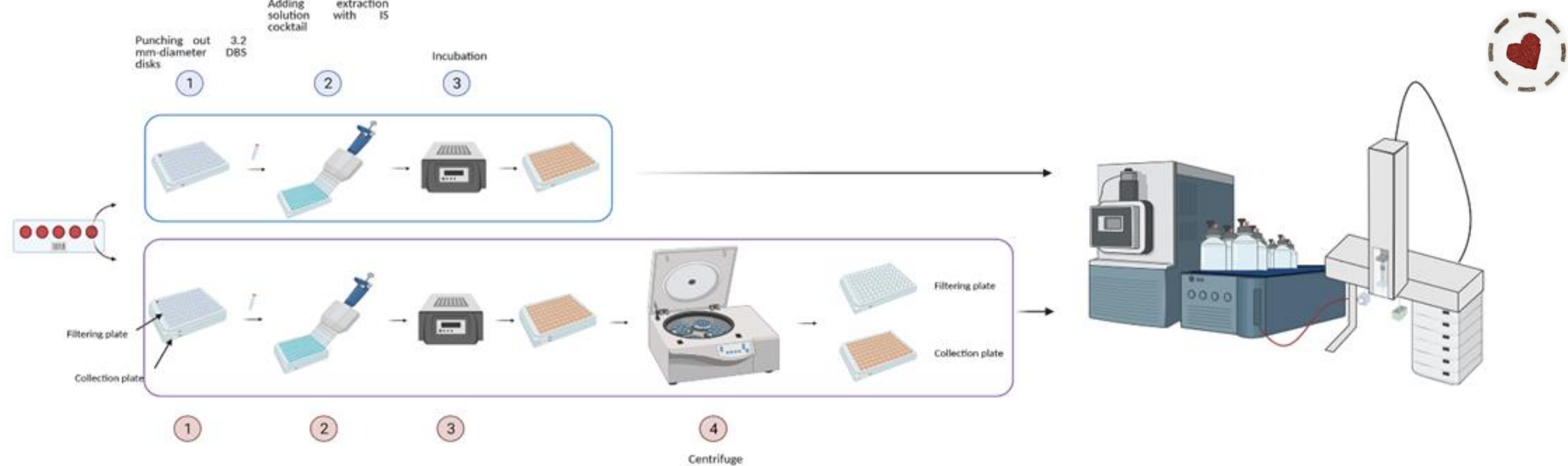


Figura 1: Flusso di lavoro operativo dello studio

Workflow della preparazione del campione utilizzando i kit senza derivatizzazione NeoBase™ 2 (in azzurro) e MassChrom® (in viola) per analisi in parallelo sul sistema di screening RenataDX. Immagine creata con [BioRender.com](#).

Metodi

Valutazione delle prestazioni analitiche dei kit senza derivatizzazione NeoBase™ 2 e MassChrom®

La Figura 1 mostra il flusso di lavoro operativo dello studio. La precisione *intra-day* per entrambi i kit in FIA-MS/MS con il sistema RenataDX è stata stabilita attraverso analisi in triplicato di due livelli di QC (alto e basso) forniti da ciascun produttore. La precisione *inter-day* è stata stimata analizzando ogni livello di QC in un periodo di 9 giorni. Infine, le precisioni stabilite rispettivamente per il kit NeoBase™ 2 e per il kit MassChrom® sono state confrontate direttamente evidenziando la %CV inferiore per analita. Al fine di definire il possibile grado di contaminazione in misurazioni consecutive, è stato valutato il carryover per entrambi i metodi. Il carryover è stato misurato analizzando nove piastre da 96 pozzetti ed i valori di carryover ottenuti per entrambi i kit sono stati confrontati per stabilire quale fosse la migliore soluzione per ridurre al minimo la contaminazione durante le analisi in FIA-MS/MS (Figura 2).

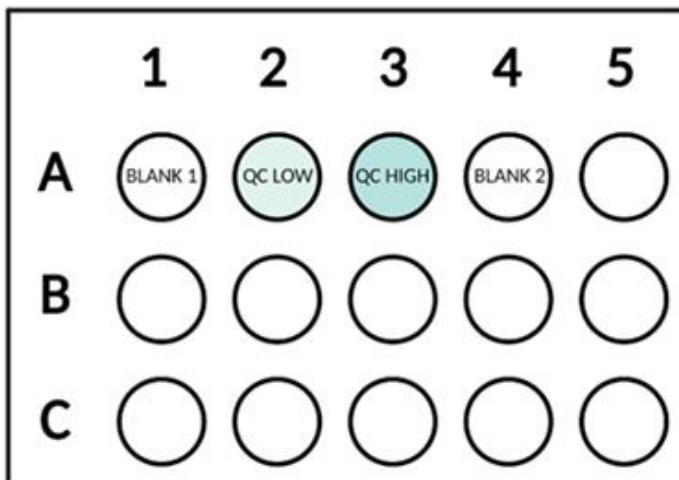


Figura 2: Calcolo del carryover

Zoom di una piastra canonica da 96 pozzetti per mostrare come è preparata per lo SNE, a partire da un primo bianco che è immediatamente seguito da QC basso, QC alto e un secondo bianco. Il carryover è valutato considerando i bianchi appena citati e il QC alto. Immagine creata con [BioRender.com](#).

Confronto delle metodiche

I dati ottenuti dalle analisi in FIA-MS/MS di 543 campioni DBS di neonati estratti utilizzando entrambi i kit sono stati processati con Analyse-it. Per verificare il grado di correlazione tra i dati ottenuti rispettivamente dai kit NeoBase™ 2 e MassChrom®, è stata effettuata un'analisi di correlazione mediante regressione di Passing-Bablok (Analyse-it) come test non parametrico. Nell'equazione di Passing-Bablok, l'intercetta fornisce una misura del bias sistematico tra i due metodi, mentre la pendenza permette una misura del bias proporzionale tra di loro. I livelli di confidenza sono stati fissati al 95%.

Risultati

Performance Analitiche

I valori di %CV *intra-day* sono risultati essere entro il 10% per tutti i livelli di QC con entrambe le metodiche, ad eccezione di C5DC\C6OH (11,1%) per i QC alti dal NeoBase™ 2, e di C4 (10,4%), C5DC \C6OH (15,1%), C8 (10,6%), C14 (11%), C16 (12,7%) e C18 (14,1%) per i QC alti analizzati con MassChrom®. I valori di %CV *inter-day* sono risultati entro il 10% per tutti i livelli di QC con entrambi i metodi analitici, ad eccezione di C5DC\C6OH (12,2%) per i QC bassi analizzati utilizzando il kit NeoBase™ 2. Il confronto tra i valori di %CV ottenuti con i due diversi kit evidenzia che è stata ottenuta una paragonabile ripetibilità *intra-day* nei livelli bassi dei QC; diversamente, un numero maggiore di valori di %CV inferiori (17/20 analiti) è stato ottenuto analizzando i livelli alti di QC con il kit NeoBase™ 2. Allo stesso modo, il confronto tra i valori di ripetibilità *inter-day* rivela che il kit MassChrom® è stato associato a valori di %CV inferiori sia nei livelli di QC bassi (15/20 analiti) che alti (11/20 analiti).

I valori di carryover sono risultati essere inferiori di 0,4% per tutti gli analiti. Nel complesso, il kit MassChrom® è stato associato a un inferiore effetto di carryover rispetto al NeoBase™ 2, come riassunto nella Tabella 1 e mostrato nei box-plot di Figura 3 per gli aminoacidi che per le acilcarnitine.

	NeoBase™ 2	MassChrom®
ARG	0.3958	-0.035
CIT	0.214	-0.022
LEU\ILE\PRO-OH	0.125	0.011
MET	0.137	0.052
PHE	0.124	-0.002
TYR	0.162	0.131
VAL	0.217	0
C0	0.096	-0.003
C2	0.095	0.001
C3	0.080	-0.001
C4	0.092	0.005257
C5	0.089	0.029
C5DC\C6OH	0.086	0.024
C6	0.083	0.018
C8	0.091	0
C10	0.044	-0.013
C12	0.047	0.041
C14	0.055	0.038
C16	0.083	0.015
C18	0.080	0.007

Tabella 1: Confronto degli effetti di carryover per i kit senza derivatizzazione NeoBase™ 2 e MassChrom® sul sistema RenataDX. Per ogni analita, il valore di carryover risultato inferiore fra le due metodiche è stato mostrato in grassetto.

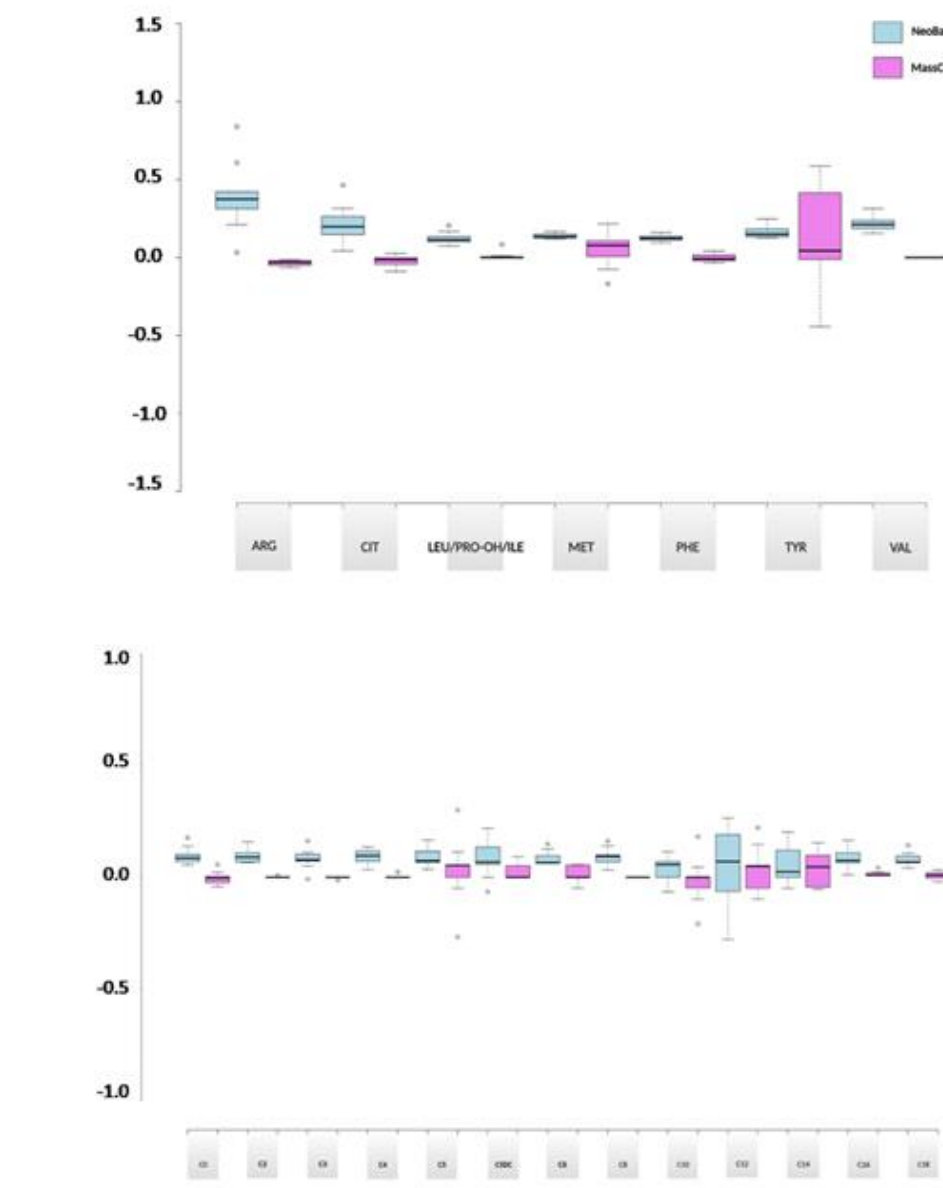


Figura 3: Carryover Valori di carryover e SD visualizzati tramite box-plot per aminoacidi (pannello superiore) e acilcarnitine (pannello inferiore). (SD= deviazione standard).

Confronto delle metodiche

La Tabella 2 mostra i risultati ottenuti da indagini di correlazione mediante regressione non parametrica di Passing-Bablok (Analyse-it) espressi come valori di pendenza e intercetta con intervallo di confidenza al 95%, in seguito all'analisi di 543 campioni DBS neonatali. La Figura 4 mostra i grafici di dispersione ottenuti per alcuni analiti di interesse. I grafici hanno evidenziato le differenze fra le due metodiche per ciascun analita: le deviazioni standard residue (RSD) degli aminoacidi sono risultate inferiori o uguali a 20, mentre quelle delle acilcarnitine erano estremamente basse (<8).

Passing-Bablok fit	Slope	Intercept
ARG	0.95	-0.92
CIT	1.08	-0.92
LEU\ILE\PRO-OH	1	-6.05
MET	0.94	0.17
PHE	1.26	-2.04
TYR	1.10	0.62
VAL	0.86	-3.37
C0	0.98	0.16
C2	1.03	-0.48
C3	1.08	-0.04
C4	1.13	-0.01
C5	0.89	0
C5DC\C6OH	1.84	-0.01
C6	1.03	-0.01
C8	1.09	-0.02
C10	1.52	-0.01
C12	1.11	0
C14	1.02	0
C16	1.12	0
C18	1.31	-0.01

Tabella 2: Valori di pendenza (*slope*) e intercetta (*intercept*) delle curve di regressione per ciascun analita dal confronto delle metodiche dei kit senza derivatizzazione NeoBase™ 2 e MassChrom®.

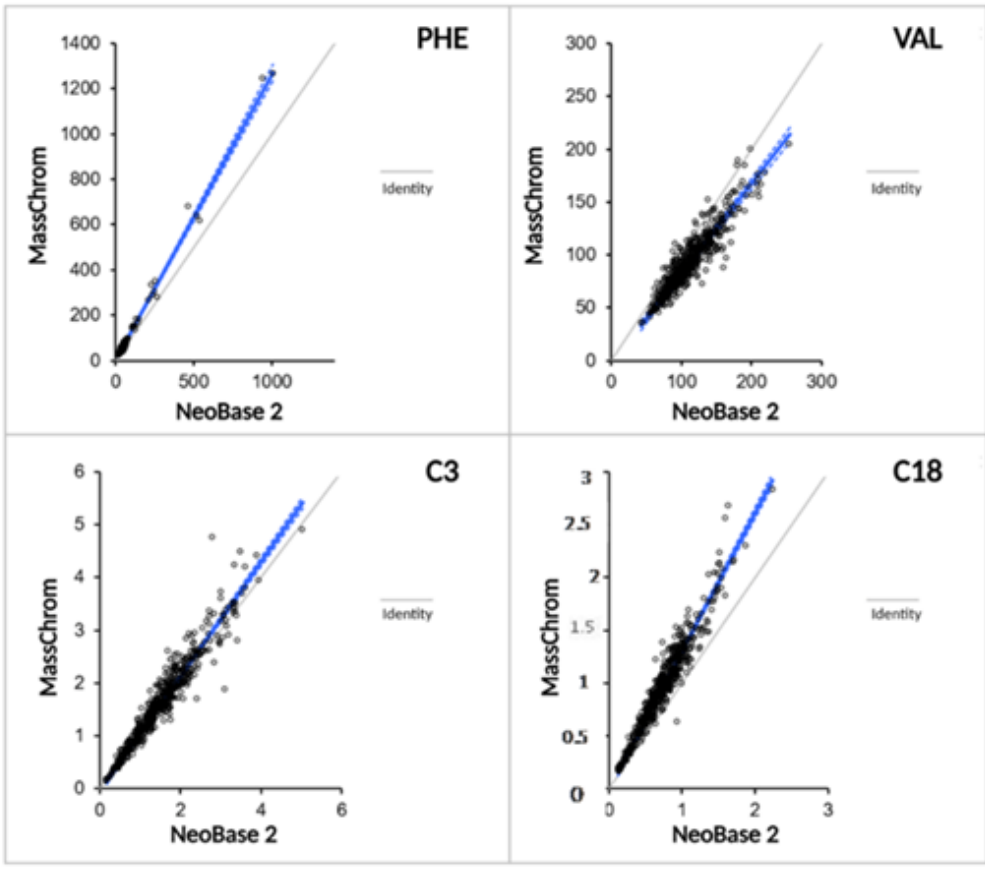


Figura 4: Scatter Plot di Correlazione Scatter plot ottenuti tramite Passing-Bablok per Phe, Val, C3, e C18 confrontando i kit senza derivatizzazione di NeoBase™ 2 e MassChrom®.

Discussione

Lo studio si è focalizzato sulla valutazione di diversi kit commerciali senza derivatizzazione dedicati allo SNE per analisi in FIA-MS/MS di campioni DBS sul sistema di screening RenataDX. Nel mondo i programmi di SNE sono differenti [5], quindi la possibilità di scegliere consapevolmente tra i diversi kit disponibili rappresenta un importante compromesso in termini di costi, preparazione del campione e copertura dei metaboliti in base al pannello specifico di disordini congeniti del metabolismo monitorati. Pertanto, abbiamo confrontato i kit senza derivatizzazione NeoBase™ 2 e MassChrom® valutando in particolare la loro ripetibilità e gli effetti di carryover. NeoBase™ 2 permette la quantificazione di oltre 50 analiti, inclusi i marcatori di ADA-SCID e X-ALD, attraverso una procedura di estrazione semplice e rapida che consente anche la determinazione del succinilacetone. MassChrom®, invece, assicura bassissime interferenze grazie all'utilizzo di piastre filtranti, permettendo di estrarre anche il succinilacetone con un semplice passaggio aggiuntivo. L'utilizzo dei due kit nelle analisi di SNE con il sistema RenataDX suggerisce che i due metodi sono in accordo tra loro, con differenze clinicamente non significative, e non in grado quindi di influenzare il risultato dello SNE [6].

Referenze

[1] Ozben, T. Clin. Chem. Lab. Med. 2013, 51, 157–176.
[2] Loeber, J.G.*et al.* Int. J.Neonatal Screen. 2021, 7, 15.
[3] Blumenfeld, C.M.; Wallace, M.J.; Anderson, R. Calif. Med. 1966, 105, 429–434.
[4] Chace, D.H.; Kalas, T.A.; Naylor, E.W. Annu. Rev. Genom. Hum. Genet. 2002, 3, 17–45.
[5] Koracin, V.; *et al.* Front. Pediatrics 2021, 9, 648939
[6] Cicalini, I; Valentinuzzi, S; *et.al.* Metabolites 2021, 11,473, 1-16.

Conflitti di interesse: Gli autori dichiarano assenza di conflitto di interesse.