

2nd tier test multiplex e rapido per le malattie metaboliche ereditarie applicabile allo Screening Neonatale Esteso

Perrone Donnorso M¹, Cassanello M², Alberti L³, Lucchi S³, Schiaffino M C², Mascagni A¹, Vannini P¹, Benedetti E³, Pratiffi E³, Meta A³, Antonelli L³, Cereda C³, Maghnie M¹

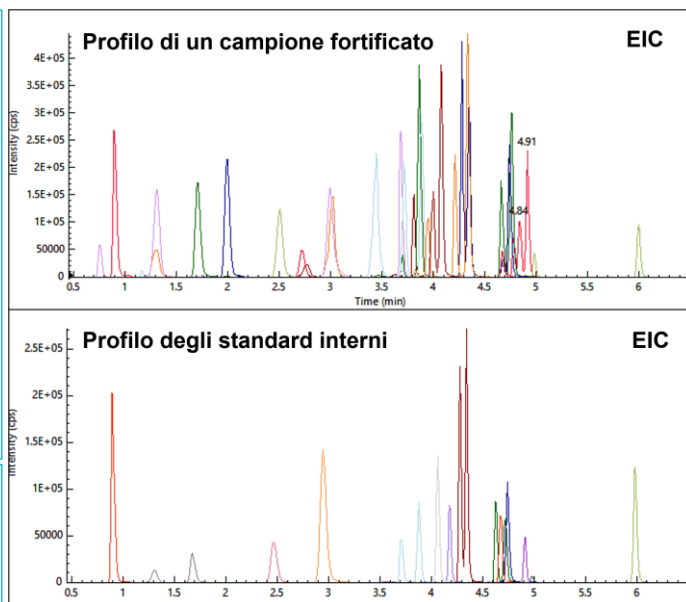
¹UNIGE DINO GMI - LABSIEM, IRCCS G. Gaslini Genova, Italy, ²LABSIEM, UOC Clin. Ped. IRCCS G. Gaslini, Genova, ³LRRSN, Osp dei Bambini V. Buzzi, Milano, Italy

Introduzione

Lo SNE è d'obbligo in Italia per 49 Malattie Metaboliche Ereditarie (MME). Prevede la misura di biomarcatori di I livello e in alcuni casi l'esecuzione di test più specifici (2nd tier test o 2TT), per migliorare il valore predittivo positivo (PPV). Presentiamo un metodo analitico UHPLC-ESI-MS/MS per l'analisi 2TT multiplex di 41 marcatori (Ac.Organici, Acilglicine, Acilcarnitine, Aminoacidi) per la diagnosi rapida e simultanea di 35 MME del pannello di legge. (L. 167/2016 DM 13.10.2016)

Metodo

La metodica prevede una singola estrazione senza derivatizzazione adatta a tutti gli analiti, da un solo DBS di 3.2mm, una cromatografia di 10' con eluizione a gradiente e acquisizione in modalità MRM con ionizzazione positiva o negativa. La quantificazione è eseguita con il metodo di diluizione pseudo isotopica.



Le informazioni sul metodo sono riportate solo parzialmente perchè sotto valutazione brevettuale



Validazione

Per ogni analita sono stati calcolati CV% intra-day/inter-day, LOD, LOQ, Recupero % e gli intervalli di linearità. La verifica di qualità è stata effettuata analizzando controlli di qualità esterni (ERNDIM, CDC, SIMMESN) e home-made.

Test intra-laboratorio effettuati con diversi strumenti tra cui TripleQuad 6500 AbSciex e Qsight 225 MD confermano la robustezza del test.

Risultati

I valori di riferimento sono stati calcolati su ~ 5000 DBS neonatali. Nel 2021 il test è stato applicato su 1.881 campioni risultati alterati al test di I livello. L'analisi retrospettiva su 50 DBS di neonati con diagnosi di MME (Mat-I, CBS, GA-I, GA-II, 3MCC, Mut, MTHFR, PPA, SCAD, OTC, CBLC, HIBCH, IBDH, IVA, MCAD, SCHAD) ha evidenziato una specificità e sensibilità del 100%.

Totale Screenati	2TT Effettuati	2TT Positivi	Diagnosi Neonatali	Stati Materni	Carrier	Specificità diagnostica %	Sensibilità diagnostica %	PPV% Pre-2TT	PPV% Post-2TT
69,403	1,881	93	52	2	11	99.9	100	2.76	55.9

Conclusioni

L'approccio 2TT multiplex riduce il TAT analitico e l'indice di richiamo, semplifica i flussi di lavoro e permette un immediato confronto tra profili di neonati positivi e negativi. Il metodo sviluppato è estremamente selettivo in quanto distingue numerosi isomeri strutturali, stereoisomeri e composti isobarici, definisce efficacemente il rischio biochimico di numerose MME (più marcatori per singola malattia, diagnosi differenziale) ed è adattabile alle esigenze dei singoli centri screening modificando il numero degli analiti dosati.