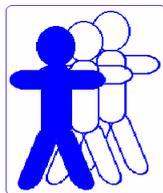


SISMME



SISN

**Società Italiana Studio Malattie
Metaboliche Ereditarie**

Società Italiana Screenings Neonatali

**LINEE GUIDA PER LO SCREENING
NEONATALE ESTESO E LA CONFERMA
DIAGNOSTICA
2008**

DOCUMENTO REDATTO A CURA DELLA COMMISSIONE AD HOC DELLA SISMME E SISN

APPROVATO DAI DIRETTIVI SISMME E SISN
APPROVATO DAI PRESIDENTI DELLA SISMME E SISN , Proff. A. Burlina e R. Cerone

Commissione ad hoc.

Prof. Italo Antonozzi , Università di Roma “Sapienza”

Prof. Alberto Burlina, Università di Padova

Ubaldo Caruso, Università di Genova

Prof. Roberto Cerone, Università di Genova

Dr. Carlo Corbetta, A.O. Ist.Clinici Perfezionamento – Osp. Bambini "V. Buzzi", Milano

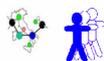
Dr. Giuseppe Giordano, Università di Padova

Dr. Giancarlo La Marca, Università di Firenze

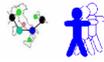
Dr. Elisabetta Pasquini, Università di Firenze

Maggio

2008



ACRONIMI USATI NEL TESTO	3
1.POSIZIONE DEL PROBLEMA	4
1.1 LE LINEE GENERALI DI SVILUPPO	4
1.2 LA SITUAZIONE ITALIANA.....	5
2. METODOLOGIA DELLO STUDIO	11
3.LINEE ORGANIZZATIVE GENERALI.....	13
3.1 IL PANNELLO DI MALATTIE	13
3.2 DIMENSIONI DEL BACINO DI UTENZA	20
4.SCREENING :LINEE GUIDA FASE PREANALITICA	22
4.1 RACCOLTA E TRASPORTO DEI CAMPIONI.....	22
4.2 CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI.....	22
4.3 CAMPIONI DA SOTTOPORRE A TRATTAMENTI SPECIALI.....	24
5. SCREENING :LINEE GUIDA FASE ANALITICA	25
5.1 CARATTERISTICHE DELLA STRUTTURA ANALITICA DELLO SCREENING.....	25
5.2 PANNELLO DELLE MALATTIE	26
5.3 METODI ANALITICI CONSIGLIATI.....	26
5.4 VALORI DI RIFERIMENTO , PUNTI DI CUT OFF , SOGLIE DECISIONALI.....	27
5.5 CRITERI GENERALI DI INTERPRETAZIONE E DI RICHIAMO	29
5.6 CONTROLLO DI QUALITA' (CQ) E PROFICIENCY TESTING (PT).....	32
6.CONFERMA :LINEE GUIDA PER LA CONFERMA ANALITICA	34
6.1 SCREENING E CONFERMA :DUE COMPITI DELLA STESSA STRUTTURA.....	34
6.2 CARATTERISTICHE DELLA STRUTTURA ANALITICA DI CONFERMA.....	36
6.3 TRASPORTO E IMMAGAZZINAMENTO DEI CAMPIONI	36
6.4 DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DEGLI AMINOACIDI.....	36
6.5 DOSAGGIO DELLE ACILCARNITINE	39
6.6 DOSAGGIO DEGLI ACIDI ORGANICI	42
7. LA CONFERMA A LIVELLO PROTEOMICO E GENOMICO	45
8. IL POST-SCREENING E IL RITORNO CLINICO.....	48
8.1 ALGORITMO E CARATTERISTICHE GENERALI DEL PROCESSO	48
8.2 RACCOMANDAZIONI GENERALI	49
9. ANALISI DEI COSTI	57



ACRONIMI USATI NEL TESTO

2M3HBA	Aciduria 2-Metil 3-idrossi butirrico	ERNDIM	European Research Network Evaluation Improvement Screening	MMA	Acidemie Metilmaloniche (mut,cblA,B,C,D)
2MBG	Deficit del 2-Metil butiril-CoA deidrogenasi	ESI	ElectroSpray Ionization	MRM	Multiple Reaction Monitoring
3MCC	Deficit del 3-Metil crotonil-CoA carbossilasi	FAOD	Malattie ossidazione degli acidi grassi	MS/MS	Spettrometria di massa tandem
3MGA	Aciduria 3-Metil glucaconica	FIGLU	Deficit di formimino glutamato transferasi	MSUD	Malattia urine a sciroppo d'acero
AAP	American Academy of Pediatrics	GA I	Acidemia glutarica tipo I	NACB	National Academy of Clinica Biochemistry USA
ACMG	American College of Medical Genetics	GA2	Acidemia glutarica tipo II	NAS	National Academy of Sciences
AGAT	Deficit di glicina amidinotransferasi	GAMT	Deficit di guanidinoacetato metiltransferasi	NIH	National Institutes of Health USA
ARG	Argininemia	GC/MS	Gas Chromatography/Mass Spectrometry	NKHG	Iperglicinemia non chetotica
ASA	Acidemia Argininosuccinica	HCY	Omocistinuria	NSQAP	Newborn Screening Quality Assurance Program
ASA	Deficit argininosuccinato liasi	HGSA	Human Genetics Society of Australasia	OCT	Deficit Ornitina Transcarbamilasi
BIOPT (BS)	Deficit biosintesi cofattore bioterina	HHH	Sindrome HHH	OH-HP	iperidrossi prolinemia
BIOPT (REG)	Deficit rigenerazione cofattore bioterina	HIS	Istidinemìa	PA	Acidemia Propionica
BKT	Deficit del Beta-chetotilasi	HMET	Iper metioninemia	PC	Deficit del piruvato carbossilasi
CACT	Deficit carnitina-acilcarnitina translocasi	HMG	Deficit 3-idrossi-3-metilglutaril CoA liasi	PIS	Product Ion Scan
CAP	College of American Pathologists	HPA	Iperfenilalaninemia	PKU	Fenilchetonuria
CIA,B	Acidemia metilmalonica (A,B)	H-PHE	Iperfenilalaninemia benigna	PRO	Prolinemia
Cbl C,D	Acidemia Metilmalonica (Cbl C,D)	HTA	Health Technology Assessment	SBCAD	Deficit acil-CoA deidrogenasi a catena corta ramificata
CDC	Center for Disease Control and Prevention	IBG	Deficit Isobutiril-CoA deidrogenasi	SCAD	Deficit dell'acil CoA deidrogenasi a catena corta
CIT	Citrullinemia	IVA	Acidemia Isovalerica	SCHAD	Difetti idrossiacil-CoA deidrogenasi a catena corta
CIT II	Citrullinemia tipo II	LCHAD	Deficit idrossiacil CoA deidrogenasi a catena lunga	SISMME	Società Italiana Studio Malattie Metaboliche Ereditarie
CLIA	Clinical Laboratory Improvement Amendments	LMPG	Laboratory Medicine Practice Guidelines	SISN	Società Italiana Screenings Neonatali
CPT I	Deficit di Carnitina palmitoil-transferasi (I)	M/SCHAD	Deficit 3-OH acyl-CoA deidrogenasi a catena media/corta	SSIEM	Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism
CPT II	Deficit di Carnitina palmitoil-transferasi II	MAL	Aciduria Malonica (Deficit malonil CoA decarbossilasi)	TFP	Deficit della proteina trifunzionale
CSN	Centro Screening Neonatale	MCAD	Deficit acil CoA deidrogenasi a catena media	TYR I	Tirosinemia tipo I
CUD	Deficit uptake della carnitina	MCC	Deficit di 3-Metilcrotonil-CoA carbossilasi	TYR II	Tirosinemia tipo II
DE-RED	Deficit Dienoil reductasi	MCD	Deficit Multiplo carbossilasi	TYR III	Tirosinemia tipo III
EE	Encefalopatia Etilmalonica	MCKAT	Deficit chetoacil -CoA deidrogenasi a catena media	VLCAD	Deficit dell'acil CoA deidrogenasi a catena molto lunga



1.POSIZIONE DEL PROBLEMA

1.1 LE LINEE GENERALI DI SVILUPPO

L'inserimento di una patologia nell'ambito di quelle sottoposte allo screening neonatale necessariamente corrisponde a precisi criteri, definiti inizialmente nel 1968 da Wilson e Jungner (1) e successivamente discussi e parzialmente modificati in occasione della revisione dei modelli organizzativi e/o delle linee guida finora usati.

Da allora lo screening neonatale è profondamente cambiato: lo stato dell'arte negli anni 2000-2005 è ben esemplificato da tre dati: l'introduzione e lo sviluppo delle tecnologie MS/MS;(2,3) lo sviluppo delle tecnologie diagnostiche su spot (oltre 150 metodi censiti da Mei al 2002)(4); le prime valutazioni su una possibile introduzione nel settore dello screening delle tecnologie di analisi del DNA con microarray (5); i dosaggi diretti multipli di enzimi o di proteine lisosomiali (6,7). Si può oggi ben affermare che la previsione di Scriver del 1980 "*Predictive medicine : a goal for genetic screening*" (8) si sia compiutamente avverata.

L'applicazione dei criteri di Wilson, fatta con molto rigore negli USA e in EU negli anni '80, ha posto come condizione per l'introduzione della MS/MS o di altri programmi multianalitici nei programmi ufficiali, il raggiungimento di alcune condizioni di base (possibilità di terapia, presenza delle opportune competenze laboratoristiche e diagnostiche, incidenza relativa etc.). Un atteggiamento di cautela è ben esemplificato da diverse reviews (8,9,10) e in particolare dal lavoro di Seymour (11) il quale nel 1997 affermava che, fino alla definizione dei vantaggi della MS/MS, che avrebbe richiesto almeno 5 anni di studi pilota, sarebbe opportuno un "*embargo on the introduction of MS/MS technology*" nei programmi operativi.

L'opportunità di una revisione critica si è profilata negli anni 1997-2000, sotto l'impatto di tre diversi fattori:

- a) Un generale innalzamento del livello della richiesta di salute nelle società a struttura sanitaria avanzata e l'acquisizione di una coscienza sanitaria sempre più orientata alla prevenzione
- b) I sostanziali avanzamenti nelle possibilità terapeutiche, sia come applicazione di nuove terapie, sia come attività sul campo di nuovi gruppi di clinici esperti nel settore degli IEM
- c) Un rilevante aumento delle possibilità diagnostiche legato alla introduzione di nuove tecnologie analitiche quali la MS/MS e il sempre maggiore uso di modelli informatizzati nella diagnostica e nella raccolta di dati.

I criteri tradizionali di Wilson e Jungner per l'inserimento di nuove malattie nel pannello analitico si sono dimostrati inadeguati al nuovo contesto. Anche dal punto di vista dell'analisi del rapporto costo/beneficio, i costi aggiuntivi dell'inclusione di nuove malattie si sono dimostrati estremamente vantaggiosi (12,13,14), anche in considerazione della frequenza, precedentemente non rilevata, di marcatori comuni a diverse malattie.

Erano quindi maturi i tempi perchè la Comunità Scientifica riesaminasse il problema e rivedesse l'atteggiamento fino allora tenuto che, per inciso, aveva comunque consentito di realizzare, "*one of the major child health advances of this past century*" (Carlson, 15).

Erano infatti cambiati molti dei principi di base su cui si fondava l'atteggiamento "conservatore" della comunità scientifica, in particolare:

1: Lo screening neonatale è oggi considerato una *responsabilità essenziale del sistema di salute pubblica* ed è ritenuto di importanza critica per migliorare la salute dei bambini affetti.

2: La politica di sviluppo dello screening neonatale viene oggi considerata *primariamente diretta all'interesse dei neonati affetti* mentre sono secondari gli interessi dei neonati sani, delle famiglie, degli operatori sanitari e del pubblico.

3: Le raccomandazioni per l'implementazione dello screening neonatale possono oggi essere esclusivamente *basate sulla evidenza scientifica e sull'opinione degli esperti*.

4: Per essere inclusa nel pannello di screening secondo i criteri odierni una condizione deve: essere identificabile in epoca preclinica, possibilmente entro le 48 ore di vita, deve essere



disponibile un test sensibile e specifico e debbono essere evidenti i benefici di un precoce intervento, che non si limitano al trattamento efficace ma che consistono nel miglioramento della qualità della vita anche in presenza di sintomi clinici e nel consiglio genetico alla famiglia.

5. Il programma di screening deve *comunque riportare ogni altro eventuale rilievo di potenziale significato clinico.*

6. Ai programmi di screening deve essere applicato il concetto di *qualità totale.*

Tra i documenti da riesaminare criticamente, alla luce di questi nuovi principi, sono le diverse linee guida approvate dai singoli Stati, in particolare quelle definite nel 1975 da importanti Istituzioni scientifiche quali la National Academy of Sciences (9), nel 1997 dalla Task Force on Genetic Screening dell'NIH (10) e, sempre nel 1997, dal sistema sanitario UK, Health Technology Assessment (HTA) (11).

Questo compito di trarre le conseguenze dei cambiamenti in corso e di *rivedere i principi di base per l'inclusione di una malattia nel pannello di screening* è stato conferito dai rispettivi Governi a diverse Organizzazioni, tra cui si citano, per il particolare rilievo dei documenti prodotti, la American Academy of Pediatrics (AAP) (16), l'American College of Medical Genetics (ACMG) (17) e il National Health Service del Regno Unito con una specifica edizione degli Health Technology Assessment (HTA) (18). Questa revisione ha portato nel quinquennio 2002-2007 nei Paesi a struttura sanitaria avanzata, alla progressiva trasformazione dello screening cosiddetto "esteso" in MS/MS da *programma pilota a programma di salute pubblica* uscendo dall'ambito della ricerca e sperimentazione per entrare a pieno titolo in quello assistenziale della medicina predittiva e preventiva.

Tale passaggio è stato reso possibile anche dall'analisi (anche dal punto di vista del rapporto costo-beneficio) delle performance dei numerosi programmi pilota attivati negli USA e in EU, che ha evidenziato una loro sostanziale rispondenza ai criteri richiesti. Quindi si è deciso di passare alla fase dello screening operativo. Per la fine del 2007 negli USA lo screening in MS/MS raggiungerà (19) il 98% dei neonati e in alcuni Paesi Europei (20,21) sta per raggiungere la totalità della popolazione neonatale. Programmi applicati in questo periodo non sempre erano omogenei per pannello di malattie, per tecniche analitiche e per protocolli di conferma e follow up.

Le summenzionate linee guida, basate sull'evidenza clinica prodotta con i programmi pilota, hanno come obiettivo anche la correzione di questa disomogeneità, con la sostanziale unificazione dei diversi pannelli diagnostici e delle procedure utilizzate.

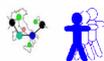
Nella quasi totalità dei Paesi, queste proposte sono state trasformate in precise disposizioni legislative o regolamentari e sono stati utilizzati protocolli diagnostici ed organizzativi elaborati in accordo con le Società scientifiche o con gruppi di Ricercatori.

1.2 LA SITUAZIONE ITALIANA

In Italia, nonostante alcune situazioni di avanguardia (22,23,24) che da anni hanno consentito l'attivazione di programmi locali di screening MS/MS non è ancora possibile disporre di linee generali e condivise di organizzazione e di sviluppo dello screening nell'ambito del SSN.

La situazione appare quindi arretrata rispetto al contesto internazionale. Inoltre, come in molti altri settori della Sanità si osservano, tra le diverse Regioni, differenze tali da condizionare il funzionamento stesso di una rete nazionale omogenea. La Comunità dei Ricercatori che si occupa dello screening neonatale ha intensamente lavorato in questi anni per attivare linee analitiche e formare tecnici esperti in MS/MS; ha condiviso protocolli diagnostici e controlli con i gruppi internazionali ed ha attivato una intensa e proficua discussione nell'ambito delle Società scientifiche. Inoltre ha contribuito all'elaborazione e alla discussione di alcuni dei succitati documenti internazionali di linee guida in maniera non marginale.

C'è quindi un iato tra il livello dei contributi dei Ricercatori del settore e la sostanziale disomogeneità organizzativa e tecnologica che si osserva tra i diversi Centri operanti in Italia.



Una possibile causa è la mancanza di una politica unificante e di adeguati finanziamenti; infatti la produzione legislativa nazionale e regionale riguardante i programmi di screening non appare particolarmente omogenea , come è indicato nella Tabella 1 seguente :

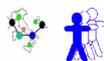
Tabella 1 :Alcune Leggi nazionali e regionali sullo screening neonatale

dispositivo	Titolo legge
L. 104, 5 Feb 1992	Legge quadro per l'assistenza, l'integrazione sociale e i diritti delle persone handicappate
L. 548, 23 Dic 1993	Disposizioni per prevenzione e cura fibrosi cistica
DPCM 9 Lug 1999	Atto di indirizzo alle regioni per screening per ipotiroidismo ,fenilchetonuria e fibrosi cistica
Prop.Legge #2810 Camera /Bianchi	Disposizioni a favore della ricerca sulle malattie rare nonché per l'estensione delle indagini diagnostiche neonatali obbligatorie (decaduta)
Prop. legge # 1815 Senato/Baio	Norme in materia di diagnosi precoci neonatale obbligatorie in ambito di malattie metaboliche ereditarie (decaduta)
Finanziaria 2008	Art 280 della Finanziaria 2008 (testo definitivo del 21/12/2007) "Stanziamiento fondi per tandem massa":
Piemonte	DGR 26 giugno 2003, n. 36-9747 ; DGR n. 58-8036 del 30 giugno 1981
Veneto	L.R-30 /05/1975 n.57
Liguria	L.R. 17-8-1973 N.31 – "Provvedimenti per l'individuazione ed il trattamento della malattia fenilchetonuria" L.R. 8-9-1986 N. 26 – "Provvedimenti per l'individuazione ed il trattamento della malattia dell'ipotiroidismo e della fenilchetonuria"
Toscana	D.R. 301 del 2.06.1981 "Avvio attività accertamento Ipotiroidismo congenito e fenilchetonuria ASL FI 10-Area Pisana-Area Senese D.R. 800 020804 "Estensione screening neonatale NME con strumentazione MS/MS BURT 34 02/08/04
Lazio	LR 64/1985 Provvedimenti per l'individuazione precoce e la prevenzione di alcune malattie di interesse sociale
Campania	D.G.R. 3788/93; D.G.R. 8196/99; D.G.R. 2912/2000
Sicilia	Decreto assessoriale del 1 Aprile 1989 n. 74035
Sardegna	Piano Sanitario Regionale approvato 19 gennaio 2007
Abruzzo	L.R 16/09/97 Prevenzione degli handicaps preconcezionale, prenatale e neonatale.

In un contesto sanitario come quello italiano, in cui la regionalizzazione dei servizi ,la molteplicità dei centri decisionali e le sostanziali differenze esistenti nella sensibilità dei politici nei confronti della prevenzione,oltre alla presenza di lobbies molto attive ,condiziona l'attivazione stessa e l'uniformità dei modelli organizzativi, è *ovvia la necessità di linee guida condivise per lo sviluppo di un programma su base nazionale.*

La situazione attuale ricorda quella dei primi anni '80 quando il problema dell'allargamento dello screening all'ipotiroidismo congenito fu in grado di mobilitare la comunità scientifica molto in anticipo rispetto alle tardive regolamentazioni da parte degli Assessorati delle diverse Regioni e del Parlamento. Occorre però non ripetere gli errori di allora che portarono a definire delle linee guida condivise con molto ritardo, oltre 15 anni dopo l'attivazione dei programmi di screening (23); ciò compromise a lungo molte delle iniziative di politica sanitaria nel settore e impose tardive correzioni di modelli organizzativi che già all'atto della loro istituzione erano in base a ogni evidenza , inefficaci.

Compito delle Società Scientifiche è quello di offrire le proprie competenze per uniformare e ottimizzare il sistema. Se, a partire dal 1985 c'è stato un minimo comun denominatore nelle attività di screening neonatale , ciò si deve all'azione della SISN che ha saputo coinvolgere in progetti comuni (vedi Controllo di Qualità, Censimento nazionale dello screening etc) gli operatori dei Centri e impostare un primo tentativo di uniformare i protocolli di intervento regionale (26, 27) .



Per questo la SISN e la SISMME sono oggi pienamente in condizione di proporre un intervento di regolazione e di uniformazione del servizio attraverso la definizione di opportune linee guida.

I tempi per raggiungere questo obiettivo sono (ancora) adeguati e tale iniziativa comporta due sostanziali vantaggi:

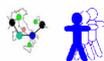
- Quello di fornire ai gruppi di lavoro in ritardo dei criteri che consentano loro di ridurre il gap.
- Quello di ridurre le possibilità di errori organizzativi e di diminuirne costi e tempi di correzione.

Tale valutazione deve essere il risultato di una iniziativa multidisciplinare, analogamente a quanto la nostra Comunità ha fatto per l'ipotiroidismo congenito e altri gruppi di lavoro per la Fibrosi Cistica. Le competenze necessarie, in questa prima fase sono quelle di Pediatria, di Patologia Clinica, di Genetica Medica e di Biochimica Clinica. Altre competenze, quali quelle di Economia sanitaria, di Epidemiologia o di Bioetica possono essere arruolate in un secondo tempo.

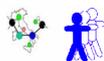
Come d'uso per la SISN a partire dall'anno 1990, vengono censite le attività e i Centri di screening sul territorio nazionale. In occasione del 6° Congresso Congiunto delle Società Scientifiche, il 16° Rapporto Tecnico Sui Programmi di Screening Neonatale in Italia presenta i dati relativi all'anno 2006. I dati relativi allo screening in MS/MS a tutto ottobre 2007 sono riportati nella tabella seguente. In aggiunta al consueto sistema di rilevazione è stato inviato ai centri che già eseguono lo screening esteso un ulteriore questionario sulle risorse e tecnologie presenti e sulle malattie comprese nel pannello di analisi. I risultati sono indicati nella tabella 2 seguente.

Tabella 2 :Attività' di screening MS/MS in Italia al 30 ottobre 2007

	TOSCANA	LAZIO	VENETOPD	LIGURIA	TOT MS/MS
Numero totale campioni eseguiti in MS/MS	136000	21447	19994	28876	186323
Numero neonati/anno	33000	5400	4000	2000	
Bacino totale /anno	31390	52000	50000	11957	
Pannello malattie	39	39	39	39	39
Diagnosi effettuate al 30/10/07	72	13	6	13	98
Richiami	1.210	427	21	292	1.950
Recall Rate globale	0,89	1,99	0,105	1,01	1,00
Detection rate	1:1888	1:1649	1:3329	1:2221	1:2273
Valore Predittivo Positivo	5,95	3,05	28,57	4,46	5,33
Pannello principale (in verde le malattie oggetto di screening , i numeri indicano i casi scoperti)					
1.PA Acidemia propionica	2				2
2.IVA Acidemia isovalerica	1				1
3.GA I Acidemia glutarica tipo I	1			1	2
4.MCC Difetti 3-metilcrotonil CoA carbossilasi	3	1	1	1	6
5.BKT Difetti β-chetotilasi					0
6.HMG Difetti 3-idrossi-3-metilglutaril CoA liasi					0
7.MCD Difetti multipli carbossilasi					0
8.MAL Difetti malonil CoA decarbossilasi					0
9.MSUD Malattia delle urine a sciroppo d'acero					0
10.MMA Acidemia metilmalonica	3	1	1		5
11.MCAD Difetti acil-CoA deidrogenasi a catena media	6	1	1		8
12.VLCAD Difetti acil-CoA deidrogenasi a catena molto lunga	1				1
13.LCHAD/TFP Difetti idrossiacil-CoA deidrogenasi a catena molto lunga e proteina trifunzionale		1			1
14.CUD Difetti 'uptake di carnitina					



15.HPA	Iperfenilalaninemie	38	7	1	8	54
		TOSCANA	LAZIO	VENETOPD	LIGURIA	TOT MS/MS
16.TYR I	Tirosinemia Tipo I			2		2
17.CIT	Citrullinemia	2+1				3
18.HCY	Omocistinuria					0
19.ASA	Difetti argininosuccinato liasi				1	1
20.MGA	Acidemia 3-metilglutaconica					0
21.IBDH	Difetti isobutirril-CoA deidrogenasi	6				6
22.MHBA	Difetti 2-metil-3-idrossibutirril-CoA-deidrogenasi					0
23.SCAD	Difetti acil-CoA deidrogenasi a catena corta	2	1		1	4
24.SBCAD	Difetti acil-CoA deidrogenasi a catena corta ramificata		1			1
25.GA II	Acidemia glutarica tipo II					0
26.CPI	Difetti carnitina palmitoiltransferasi I					0
27.CPII	Difetti carnitina palmitoiltransferasi II				1	1
28.CACT	Difetti carnitina-acilcarnitina translocasi					0
29.TYR II	Tirosinemia Tipo II					0
30.TYR III	Tirosinemia Tipo III					0
31.ARG	Argininemia					0
32.MET	Ipermetioninemia					0
Altre patologie						
33.HHH	Sindrome HHH					0
34.HIS	Istidinemìa					0
35.PRO	Prolinemia					0
36.NKHG	Iperglicinemia non chetotica					0
37.CUD (mat)	Difetti uptake di carnitina materni	1			1	2
38.GAMT						0
39.AGAT						0
40.FIGLU		3 (DISMES SO)				3
41OH-Prolinemia		2 (DISMES SO)				2
42.def OCT		1				1
43.SCHAD	Difetti idrossiacil-CoA deidrogenasi a catena corta					0
TECNOLOGIE E METODI ANALITICI						
apparecchi in funzione(screening)		3	2	2	1	7
Potenzialità analitica teorica settimanale		3500	2000	1000	1000	7500
Numero medio di campioni da screening / settimana		700	160	100	400	1360
La linea viene usata anche per scopi diagnostici non da screening?		SI	SI	SI	SI	
Che tipo di controllo di qualità si usa?		INT/EST	INT/EST	INT/EST	INT/EST	
CONTESTO LABORATORISTICO GENERALE						
Laboratorio ad hoc, destinato alla sola attività MS/MS		NO	NO	NO	NO	
Sezione di un Lab specialistico nella diagnostica ECM		SI	SI	SI	SI	
Sezione di un Lab generale		NO	NO	NO	NO	
Sezione di un Lab dedicato all'attività di screening		NO	NO	NO	NO	
ATTIVITA' DI CONFERMA DISPONIBILI IN SEDE						
Dosaggio Aminoacidi Plasma/Urine		SI	SI	SI	SI	
Dosaggio Acidi organici Plasma/urine		SI	SI	SI	SI	
Patologia molecolare/analisi DNA		SI	SI	SI	SI	



RAPPORTI CON L'ATTIVITÀ CLINICA.					
	TOSCANA	LAZIO	VENETO	LIGURIA	
I Controlli vengono inviati a un'equipe					
a) interna alla Unità di cui fa parte quella che esegue lo screening	SI	SI	SI	SI	
b) esterna	NO	NO	NO	NO	
c) vengono eseguiti dallo stesso personale medico addetto allo screening	SI	NO	NO	NO	
Caratterizzazione dell'equipe clinica come					
a) Centro pediatrico accreditato per Malattie metaboliche ereditarie	NO	SI	SI	NO	
Una unità di terapia intensiva neonatale/pediatrica					
a) è presente nell'Ospedale presso cui opero	SI	SI	SI	SI	
Un DEA pediatrico di II livello					
a) è presente nell'Ospedale	SI	SI	SI	SI	
FINANZIAMENTO DELL'ATTIVITÀ MS/MS					
Ad hoc su fondi regionali	SI	SI	SI	SI	
fondi aziendali	NO	NO	SI	SI	
Convenzioni con le Maternità o gli Ospedali	SI	NO	SI	NO	
	ASL 1 Umbria				

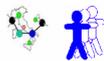
Nel complesso si osserva una sostanziale uniformità pur nelle evidenti differenze di esperienza nelle attività dei diversi programmi di screening esteso. In termini di pannello analitico i tre centri di Firenze, Genova e Roma funzionano in maniera sovrapponibile. Il Centro di Napoli, non riportato nella precedente tabella, esegue lo screening in MS/MS delle sole Iperfenilalaninemie. Di un certo rilievo la constatazione che i centri operativi dichiarano tutti rapporti molto stretti con il sistema di controllo e conferma, con le équipes cliniche e con le strutture di genetica medica, caratteristiche queste del tutto essenziali per una buona operatività del Centro.

BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

1. Wilson JMG, Jungner G. Principles of screening for disease. Geneva: World Health Organization, 1968
2. Chace DH, Kalas TA, Naylor EW. Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns. *Clin Chem* 49: 1797-1817, 2003
3. Wilcken B, Wiley V, Hammond J, et al. 2003. Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. *N Engl J Med* 348:2304-2312.
4. J V. Mei, J. R Alexander, B W. Adam and W. H Hannon: Use of Filter Paper for the Collection and Analysis of Human Whole Blood Specimens *J. Nutr.* 131: 1631S–1636S, 2001.
5. Green NS, Pass KA; neonatal screening by DNA Microarray: spots and Chips. *Nature Reviews Genetica* 6:147;2005
6. Gelb MH, Turecek F, Scott CR, Chamoles NA (2006) Direct multiplex assay of enzymes in dried blood spots by tandem mass spectrometry for the newborn screening of lysosomal storage disorders. *J Inherit Metab Dis* 29: 397–404.
7. Meikle PJ, Grasby DJ, Dean CJ, et al (2006) Newborn screening for lysosomal storage disorders. *Mol Genet Metab* 88: 307–314.
8. Scriver CR Predictive Medicine: a Goal for Genetic Screening; in Neonatal screening for inborn errors of metabolism Bickel H, Guthrie R, Hammersen G. Eds. Springer Verlag 1980
9. National Research Council, Committee for the Study of Inborn Errors of Metabolism; Genetic screening: programs, principles, and research. Washington, DC: National Academy of Sciences, 1975.
10. Holtzman A, Watson MS. Task Force on Genetic Testing: Promoting Safe and Effective Genetic Testing in the United States. Baltimore: Johns Hopkins Press, 1997.



11. Seymour CA et al : Newborn Screening for inborn errors of metabolism : A systematic review ; Health Technol Assess 1997;1:11
12. Watson MS, Mann MY, Lloyd-Puryear MA, Rinaldo P, Howell RR [editors]. (2006) Newborn screening: Toward a uniform screening panel and system [Executive summary]. *Genet Med* 8(Supplement):1S-11S.
13. Pandor A, Eastham J, Chilcott J, Paisley S, et al. (2006) Economics of tandem mass spectrometry screening of neonatal inherited disorders. *Int J Technol Assess Health Care* 22:321-326.
14. Carroll AE, Downs SM. (2006) Comprehensive cost-utility analysis of newborn screening strategies. *Pediatrics* 117:S287-S295.
15. Carlson MD Recent advances in newborn screening by MS/MS for neurometabolic disorders *Curr Opin Neurol* 17;133-138,2004
16. Academy of Pediatrics. Serving the family from birth to the medical home: A report from the Newborn Screening Task Force convened in Washington DC, May 10-11, 1999. *Pediatrics* 2000;106:383-42
17. Watson MS, Mann MY, Lloyd-Puryear MA, Rinaldo P, Howell RR [editors]. (2006) Newborn screening: Toward a uniform screening panel and system . *Genet Med* 8 :5: 12S-252S.
18. Pandor A, Eastham J, Beverley C, Chilcott J, et al. (2004) Clinical effectiveness and cost-effectiveness of neonatal screening for inborn errors of metabolism using tandem mass spectrometry: a systematic review. *Health Technol Assess* 8:1-121.
19. Bennett MJ - Overview : in Follow-up testing for metabolic disorders identified by expanded newborn screening using tandem mass spectrometry . NACB-LMPG Draft version #10 sept5 2007.
20. Shulze A et al .Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism by electrospray ionization-tandem mass spectrometry: results, outcome, and implications. *Pediatrics*. 2003 Jun;111(6 Pt 1):1399-406.
21. Bodamer OA ,Hoffmann GF Lindner M Expanded newborn screening in Europe *Jlher.Metab.Dis* 30:439-444 2007
22. Carducci C, Santagata S, Leuzzi V, Antonozzi I. et al Quantitative determination of guanidinoacetate and creatine in dried blood spot by flow injection analysis-electrospray tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta*. 2006 Feb;364(1-2):180-7.
23. Cerone R, Cassanello M, Caruso U, Schiaffino MC, Lorini R. Neonatal screening for congenital errors of metabolism by means of Tandem Mass: Italian experience. *Minerva Pediatr*. 2007 Oct;59(5):488-489.
24. La Marca G Donati MA Zammarchi 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 Jul;53(7):1364
25. Antonozzi, M. Baserga, T. Berti, I. Bucci, U. Caruso, A. Cassio, R. Cerone, et al : Proposte di linee guida per lo screening dell'ipotiroidismo congenito; *Riv. Ital. Ped.*, (UP)2000; 26:731-736
26. Cerone R, Cassanello M, Caruso U, Schiaffino MC, Lorini R. Neonatal screening for congenital errors of metabolism by means of Tandem Mass: Italian experience, *Minerva Pediatr*. 2007 Oct;59(5):488-9.
27. Relazioni annuali SISN : L'attività di screening in Italia anni 2000 -2005
28. Relazioni annuali SISN : il controllo di qualità per le procedure di screening anni 2000 -2005



2. METODOLOGIA DELLO STUDIO

Il ritardo con cui ci stiamo muovendo ha il vantaggio di assicurare un'ampia e consolidata base scientifica, in grado di indirizzare la costruzione di un modello omogeneo con quello usato globalmente.

Un documento prodotto da una Società Scientifica naturalmente *deve utilizzare metodologie di analisi rigorose e criteri obiettivi, basati sulla valutazione dell'evidenza*.

La metodologia seguita nello studio della ACMG, il più completo e complesso, è stata proposta dallo Steering Committee della American Academy of Pediatrics (AAP) (1) ed ha il vantaggio di produrre un sistema dinamico in cui il cambiamento del grado di evidenza e della forza della raccomandazione produce automaticamente effetti sulla operatività del modello attraverso la variazione del punteggio assegnato ai singoli items. Questo formato di valutazione è ormai internazionalmente accettato nella formulazione delle linee guida, ed allo stesso ci atterremo in questo lavoro.

Lo schema logico dello studio condotto dalla ACMG è quello della :

a. *posizione del problema.*

b. *graduazione dell'evidenza* su una scala di tre punti (1-risultati consistenti in più studi ben progettati e ben condotti 2- evidenza sufficiente ma limitata dalla qualità e/o dimensione degli studi; 3-evidenza insufficiente per deficit di significatività degli Studi)

c. *graduazione della forza della raccomandazione* conseguente al grado di evidenza (Forte raccomandazione; raccomandazione; raccomandazione contro; evidenza insufficiente alla raccomandazione) .

I punteggi sono assegnati da diversi ricercatori indipendenti .

Lo stesso schema logico viene utilizzato nella valutazione dei problemi di organizzazione generale e nella stesura delle procedure diagnostiche delle singole malattie (2)

Questo studio della ACMG ha coinvolto gran parte della Comunità Scientifica dello screening neonatale negli anni 2002-2006 e con la pubblicazione dell'Executive Summary e del Rapporto Completo (3) *ha posto le basi della revisione dei programmi di screening analizzando sia le linee generali dell'organizzazione sia , attraverso singole schede, la situazione per le singole malattie candidate.*

Ma oltre al Report ACMG del 2006 vanno considerate di importanza primaria anche altre 4 fonti di informazione che, con metodologia simile anche se con risultati non sovrapponibili, hanno rivisto i criteri di applicazione dello screening MS/MS:

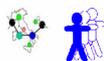
a) Il report del programma Health Technology Assessment (HTA) del Sistema Sanitario UK del 2004 (4) che è centrato sulla efficacia clinica ed economica dello screening in MS/MS ;tale report va considerato anche nella prospettiva di revisione rispetto ai criteri espressi in due precedenti report HTA del 1997 (5 ,6) e nel suo atteggiamento di innovazione molto più cauta rispetto alla ACMG (proposta di un pannello limitato a due sole malattie in MS/MS).

b) Il report della AAP Newborn Screening Task Force del 2000 "Newborn screening: a blueprint for the future " che in un certo senso fissa i principi generali alla base della revisione dei programmi di screening del primo decennio 2000 (7)

c) Le linee guida sullo screening esteso e sulla conferma , (Laboratory Medicine Practice Guidelines, LMPG) della National Academy of Clinical Biochemistry USA (NACB) in discussione in un open forum già da molti mesi una Linea guida prevalentemente dal punto di vista della Patologia Clinica (8) che probabilmente sarà licenziata , nella forma definitiva, nei prossimi mesi .

d) I "Newborn screening ACT sheets and confirmatory algorithms" , pubblicato nel proprio sito nel 2006 da parte della ACMG; un complesso di procedure diagnostiche e di links continuamente aggiornabile e aperto alla collaborazione che standardizza le procedure di conferma e short term follow up (2).

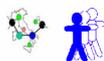
Come documentazione secondaria possono essere considerate altre Linee guida , Nazionali o sopranazionali , con un impianto meno completo e reperibili nei rispettivi siti (9,10,11,12,13,14) .



E' quindi oggi disponibile una massa di dati utilizzabile per la valutazione dell'evidenza e della forza della raccomandazione. Naturalmente possono essere presenti divergenze con tali valutazioni, basate su altre diverse opinioni sull'evidenza o su condizioni particolari circa la praticabilità locale di alcuni programmi. Appare quindi necessaria una analisi critica, evidenziando quando esistono le divergenze legate a condizioni o esperienze particolari dei diversi contesti nazionali (15). Tali difformità vanno registrate e indicate, secondo lo stesso criterio utilizzato nei lavori originali, indicando la graduazione dell'evidenza e la forza della raccomandazione.

BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

1. Marcuse EK, Shiffman RN. (2004) Classifying recommendations for clinical practice guidelines. *Pediatrics* 114:874-877
2. http://www/acmg.net/resources/policies/ACT/condition_analyte-links.htm
3. Watson MS, Mann MY, Lloyd-Puryear MA, Rinaldo P, Howell RR [editors]. (2006) Newborn screening: Toward a uniform screening panel and system. *Genet Med* 8:5: 12S-252S.
4. Pandor A, Eastham J, Chilcott J, Paisley S, et al. (2006) Economics of tandem mass spectrometry screening of neonatal inherited disorders. *Int J Technol Assess Health Care* 22:321-326.
5. Pollitt RJ, Green A, McCabe CJ, et al. Neonatal screening for inborn errors of metabolism: cost, yield and outcome. *Health Technol Assess.* 1997;1:i-iv, 1-202
6. Seymour CA et al : Newborn Screening for inborn errors of metabolism : A systematic review ; *Health Technol Assess* 1997;1:11
7. Academy of Pediatrics. Serving the family from birth to the medical home: A report from the Newborn Screening Task Force convened in Washington DC, May 10-11, 1999. *Pediatrics* 2000;106:383-42
8. NACB-LMPG _Follow up testing for metabolic disease identified by expanded newborn screening using tandem mass spectrometry –Draft version #10 sept 5 ,2007
9. French Neonatal Screening Society. www.afdphe.
10. German Neonatal Screening Society. www.screening
11. International Society for Neonatal Screening. www.isns-neoscreening.org
12. UK Newborn Screening Programm Centre. www.newbornscreening-bloodspot.org.uk
13. Spanish Neonatal Screening Homepage. www.seqc.es/cemc
14. Danish Serum Staten Institute. www.ssi.dk
15. Pollitt RJ Introducing new screens: Why are we all doing different things? *J inher Metab Dis* 30:423-429 2007



3.LINEE ORGANIZZATIVE GENERALI

3.1 IL PANNELLO DI MALATTIE

Obiettivo di questo settore delle linee guida è quello di definire un pannello di malattie (diagnosticabili con l'introduzione di uno screening esteso in MS/MS) che si aggiunga alle 3 (PKU,CH,FC) attualmente oggetto di screening in Italia su una alta percentuale della popolazione neonatale (>99% le prime 2 >74% la terza) (1).

Vengono prese in considerazione in questa sede le sole malattie diagnosticabili con la spettrometria MS/MS .

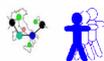
Per le altre condizioni, diagnosticabili con tecnologie diverse ci si limita alla considerazione che esistono in letteratura e sul territorio nazionale esperienze significative e studi pilota sufficienti per la formulazione di una linea guida. Di conseguenza non vengono trattate, se non per eventuali richiami alla MS/MS l'ipotiroidismo congenito, le emoglobinopatie ed eritropatie, la galattosemia, etc. Lo screening della Iperplasia Congenita delle surrenali non viene per il momento preso in considerazione nonostante siano stati descritti metodi MS/MS per la determinazione degli steroidi interessati da questa patologia (2) non essendo, al momento, disponibili in Italia esperienze sufficientemente ampie nel settore.

Per quanto riguarda lo screening MS/MS sono disponibili ampie e recenti reviews (3,4,5) che trattano le condizioni morbose diagnosticabili con questa tecnologia. L'ampiezza di questo numero, la frequenza globale e quella delle singole malattie, la complessità in molte di queste di disporre di un pannello diagnostico di seconda istanza, la diversa rilevanza medico-sociale hanno fatto sollevare il problema di quali criteri usare per inserire una determinata condizione nel pannello dello screening.

La soluzione proposta nella relazione ACMG (6) è quella di non porre il problema dell'inserimento come un semplice sì/no, ma piuttosto conferire a ogni condizione un diverso grado di priorità (legato a grado di evidenza e forza della raccomandazione). Quindi, sulla base di questo punteggio e delle risorse disponibili (nel contesto USA) la ACMG ha proposto un pannello di malattie in cui lo screening è *raccomandato*, un pannello in cui invece lo screening può essere considerato *facoltativo* e un *ultimo gruppo in cui invece lo screening neonatale non è indicato*. Questo tipo di valutazione ha il vantaggio di essere facilmente aggiornabile sulla base delle evidenze, delle esigenze sopravvenute e delle risorse disponibili e contemporaneamente lo svantaggio di poter essere applicato con qualche difficoltà a realtà diverse dagli USA.

La notevole potenza analitica della MS/MS non si limita a consentire la diagnosi di "più malattie" ma tende anche a cambiare l'approccio dell'Operatore al problema della diagnostica precoce di laboratorio. Infatti, diversamente dalle tecnologie tradizionali usate nello screening, la MS/MS è in condizione di evidenziare decine di patterns di alterazioni, che *in alcuni casi non costituiscono malattie clinicamente apparenti* e in molti costituiscono *quadri morbosi di notevole rarità* di cui può non essere (ancora) definita una strategia terapeutica. Certamente queste eccezioni non corrispondono ai comuni criteri di inclusione nello screening. Occorre comunque tenere conto, nel decidere il pannello delle malattie da includere di problemi di tipo etico (è corretto *non comunicare un sospetto* ai genitori?) ma contemporaneamente occorre valutare le possibilità reali di offrire, in uno specifico contesto l'assistenza necessaria. Naturalmente, in base al principio che *"il programma di screening deve comunque riportare ogni altro rilievo di potenziale significato clinico"* occorrerà anche in questi casi una decisione motivata circa l'atteggiamento da tenere da parte del Responsabile del Centro Screening e a concordare con estrema cura con le équipes cliniche il follow up di questi pazienti.

Un altro fatto di cui occorre tenere conto è che in alcuni casi gli stessi markers sono in condizione di evidenziare, oltre alla malattia obiettivo dello screening (obiettivo primario), anche degli obiettivi secondari, ovvero quadri morbosi con caratteristiche meno cogenti per la loro inclusione nello screening (7). La condivisione del marcatore biochimico di una condizione per cui è fortemente



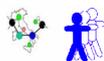
indicato lo screening (“primaria”) e con un’altra che non soddisfa le condizioni d’inclusione (“secondaria”), comporta comunque la diagnosi di entrambe nel corso della diagnosi differenziale. Quindi se si sceglie di effettuare screening per la patologia “primaria” è inevitabile effettuare lo screening anche per la patologia “secondaria”. In questi casi occorre utilizzare il principio dell’incremento del costo aggiuntivo (trascurabile in questo caso) rispetto al costo operativo di base dello screening .

Il rapporto del Gruppo di Esperti dell’ American College of Medical Genetics (6) e il rapporto HTA (8) hanno rivisto criticamente la letteratura per definire il pannello di malattie da raccomandare per l’inclusione nei programmi di screening . Le evidenze scientifiche valutate dai due gruppi di ricerca, una volta contestualizzate, hanno portato a soluzioni molto diverse circa il pannello di malattie da sottoporre a screening. In pratica, l’ACMG propone un pannello di oltre 40 malattie, tra primarie e secondarie, mentre il report HTA si limita a proporre il solo screening di PKU e MCAD . Tra queste due posizioni “estreme” , come è evidente nella tabella 2 tratta da Pollitt 2007 (9) in altri contesti si sono operate scelte intermedie, con pannelli di 20 malattie (Danimarca ,10) 10 malattie, (Germania ,11) , 12 malattie (Olanda, 12) .

Vanno comunque tenute nella dovuta considerazione le posizioni di maggior cautela rispetto all’introduzione di nuove malattie nel pannello . Le motivazioni sono ampiamente esaminate e riassunte nei lavori di Botkin del 2006 (13) , di Holtzmann del 2003 (14) e di Natowicz del 2005 (15) . Nel complesso le motivazioni espresse da questi autori trovano conferma nella opinione di molti Ricercatori Italiani.

Tabella 3: Pannelli analitici raccomandati nello screening MS/MS . Da : Pollitt RJ Introducing new screens: Why are we all doing different things? (J Inher Metab Dis 30:423-429 2007 (9)).

Patologia	USA 2006 ^a	Danimarca 2005	Germania2004	Olanda 2005	Gran Bretagna 2007
Fenilchetonuria	P	+	+	+	+
Malattia delle urine allo sciroppo d’acero	P	+	+	+	
Omocistinuria	P			+	
Tirosinemia tipo I	P			+	
Citrullinemia	P	+			
Aciduria argininosuccinica	P	+			
Argininemia	S	+			
Sindrome HHH		+			
Deficit dell’acil CoA deidrogenasi a catena molto lunga	P	+	+	+	
Deficit dell’acil CoA deidrogenasi a catena lunga ^b	P	+	+	+	
Deficit dell’acil CoA deidrogenasi a catena media	P	+	+	+	+
Deficit dell’acil CoA deidrogenasi a catena corta	S	+			
Deficit delle acil CoA deidrogenasi (aciduria glutarica tipo II)	S	+			
Deficit della carnitina palmitoiltrasferasi tipo I	S	+	+		
Deficit della carnitina palmitoiltrasferasi tipo II	S	+	+		
Deficit della Carnitina acilcarnitina traslocasi	S	+	+		
Deficit del trasportatore (OCTN2) della Carnitine	P				
Acidemia Propionica	P	+			
Acidemia Methylmalonica	P ^c	+			



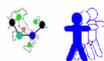
Patologia	USA 2006 ^a	Danimarca 2005	Germania2004	Olanda 2005	Gran Bretagna 2007
Acidemia Isovalerica	P		+	+	
Deficit del Glutaryl-CoA deidrogenasi	P	+	+	+	
Deficit multiplo delle carbossilasi	P			+	
Deficit del3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA liasi	P	+		+	
Deficit del Beta-chetotilasi (T2)	P	+			
Deficit del 3-Methylcrotonyl-CoA carbossilasi	P	+		+	
Più altre 17 condizioni patologiche	S				

Il dilemma che si apre circa l'introduzione di nuove malattie tra quelle oggetto di screening non è legato solo alla tecnologia MS/MS, ma a tutto il trend di sviluppo tecnologico attuale; e tenderà ad aggravarsi non appena saranno disponibili le tecnologie di analisi del DNA con microarray (16) o non appena saranno più diffuse le tecnologie Tipo Luminex X-map (17)

Abbiamo quindi bisogno, per compiere questo primo passo verso gli screening multipli *di aver chiare le prospettive generali*. Poiché non è ragionevolmente possibile, nonostante gli avanzamenti tecnologici ed informatici sottoporre a screening tutte le malattie in cui ciò è tecnicamente fattibile, dobbiamo scegliere tra tre possibili opzioni:

1. Il programma sceglie di *non mettere in evidenza* alcuni analiti, con ciò evitando di diagnosticare alcune malattie. E' una scelta a cui la MS/MS si presta bene, attraverso l'uso della MRM. Questo tipo di approccio *non comporta una sostanziale riduzione dei costi* e di conseguenza il rapporto tra l'informazione prodotta e suo costo tende a essere meno favorevole. Non si tratta di una scelta molto gradita alla mentalità del Laboratorista; inoltre vengono sottratte informazioni potenzialmente utilizzabili da parte delle strutture cliniche e della famiglia. Di converso, questa scelta pur non particolarmente gradevole dal punto di vista deontologico, non espone il CSN a possibili problemi di responsabilità civile.
2. Il programma, *pur evidenziando quadri di analiti sospetti, non li prende in considerazione diagnostica* e di conseguenza non attiva le procedure di richiamo. Questa scelta è stata fatta in Germania, in cui una specifica disposizione regolamentare del Ministero della Salute prevede che, in caso si osservino quadri sospetti non appartenenti alle malattie inserite nel pannello "ufficiale", i relativi risultati siano immediatamente distrutti (9). Si tratta di una scelta che contrasta con l'atteggiamento comune degli operatori dei CSN e richiede, per essere resa operativa una chiara scelta a livello superiore, attraverso una procedura di legittimazione che sia in grado di sollevare l'operatore da ogni responsabilità. Si rilevano comunque in questo caso, significativi problemi deontologici ed etici da parte dell'Operatore che potrebbe fare obiezione rispetto a tale scelta.
3. Il programma offre i risultati anche per le condizioni in cui è disponibile una limitata evidenza di benefici e/o una scarsa o assente potenzialità o possibilità diagnostica. E' la scelta fatta dalla ACMG (2) e dal progetto Danese (10). E' evidente in questo caso che occorre una ampia opera di informazione del pubblico e che sia opportuna una informazione singolarmente data a tutti i genitori sul pannello delle malattie e sulle possibilità diagnostico-terapeutiche.

Non è certo facile fare una scelta che riguarda il futuro con le conoscenze e le possibilità di oggi; il compito di una Società scientifica non è però quello di fare delle scelte, ma di presentare opzioni certificate a chi deve scegliere: Utenti e loro Associazioni, Amministratori e Politici. Queste opzioni dovranno agire in un processo molto lungo e quindi tra i compiti delle Società saranno anche quelli di indicare i criteri generali per l'attivazione e il controllo del processo.

**RACCOMANDAZIONI GENERALI E PRELIMINARI**

1. *L'implementazione dello screening esteso va condotta all'interno di un paradigma di ricerca che assicuri controllo e uniformità delle definizioni diagnostiche dei casi , nonché la standardizzazione dei protocolli terapeutici e di follow-up*
2. *E' indispensabile il coordinamento dei gruppi clinici , con formazione di gruppi cooperativi su singoli argomenti e settori di patologia*
3. *E' essenziale la raccolta centralizzata dei dati clinici ed epidemiologici . Un modello possibile e che ha dato ottimi frutti è quello del Registro dell'Ipotiroidismo Congenito presso l'Istituto Superiore di Sanità, ma deve prevedere una collaborazione attiva dei CSN , che non sia limitata al solo invio delle notizie. Il modello non deve essere confuso con il Registro delle malattie Rare , che ha obiettivi e finalità differenti.*
4. *E' essenziale che una organizzazione indipendente (SISN) raccolga, con un formato unico per tutti i Centri procedure, dati sulle performances e sui costi e tenga un Registro Nazionale dei CSN .*
5. *E' vitale la formazione degli Operatori Clinici e Laboratoristi , con una valutazione delle probabili necessità dei prossimi anni anche con il contributo ed il supporto delle Società Scientifiche nazionali (SISN-SISMMME) e internazionali (SSIEM – ISNS) e delle Università. Si raccomandano i corsi ECM .*
6. *La scelta del pannello da sottoporre a screening va contestualizzata rispetto alle situazioni reali (locali) e in particolare alle risorse diagnostiche cliniche e laboratoristiche ,all'orientamento delle équipes cliniche presenti, alle proposte delle Associazioni di Pazienti*

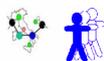
RACCOMANDAZIONI GENERALI	
Grado evidenza	A
Forza raccomandazione	1

Considerando comunque i seguenti punti :

- a)il basso e quasi trascurabile costo aggiuntivo per malattia oltre le tre più importanti e frequenti . (18,19)
 - b)il rilevante fattore limitante costituito dal recall rate e dal numero di falsi positivi complessivo del pannello prescelto , che, ove superi alcuni ben precisi limiti, potrebbe causare significativi problemi di allarme tra i genitori (20) .
 - c) la complessiva robustezza del modello proposto dalla ACMG
- E' possibile formulare la seguente raccomandazione.

RACCOMANDAZIONE :*Il pannello indicato dalla ACMG si presta ottimamente a fornire il layout di base su cui misurare le specifiche valutazioni dei Ricercatori , degli Utenti e degli Amministratori per la definizione del pannello analitico dello screening MS/MS italiano .*

Nella tabella 3 seguente , tratta con modifiche dalla Draft version # 10 del LMPG NACB sullo screening esteso (21) sono indicate le diverse malattie passibili di screening in MS/MS con una indicazione del grado di evidenza e della forza di raccomandazione per una loro inclusione nello screening. Tale tabella costituisce il risultato di una ampia e metodologicamente robusta valutazione e di conseguenza si presta ottimamente a *costituire la base per l'elaborazione della proposta di un pannello condiviso* . Eventuali differenze di valutazione da parte delle Società Scientifiche nazionali interessate allo screening MS/MS e basate su criteri epidemiologici (22,23) o di organizzazione dei servizi sono registrate nell'ultima colonna della Tabella e adeguatamente motivate con la stessa metodologia usata dall'ACMG, ovvero in base alla valutazione dell'evidenza e della forza della raccomandazione.



RACCOMANDAZIONE La scelta del pannello di malattie dovrà essere sottoposta a revisione periodica (almeno triennale?) sulla base dei dati epidemiologici e di funzionamento raccolti

REVISIONE PERIODICA DEL PANNELLO	
Grado evidenza	A
Forza raccomandazione	2

Tabella4: Le malattie passibili di uno screening in MS/MS , con indicazione del grado di evidenza e della forza della raccomandazione per l'inserimento nei pannelli di screening , rispettivamente indicate dalla NACB e dalla SISN (ultime due colonne) Tratta con modifiche da : Rinaldo et al: Evidence based rationale for expanded newborn screening ; National Academy of Clinical Biochemistry : Laboratory Medicine Practice Guidelines :Draft version #10 –Sept 5 , 2007 .

Legenda della tabella :

Incidenza: incidenza stimata negli USA; occorre valutare le possibili diverse stime desumibili da studi epidemiologici sulla popolazione italiana, Europea (15,16) e dagli studi pilota finora condotti ().

Pannello ACMG : UP Pannello Uniforme , ovvero obiettivi primari ;ST obiettivi secondari N/A non inclusa nel pannello

Altre malattie con lo stesso marker : Ottenuto cumulando, dalla originale tabella di Rinaldo 2 voci: condizioni primarie e condizioni secondarie con lo stesso marker,

AGMG2006 : score riportato nel report ACMG è stato calcolato come media di scores assegnati indipendentemente da un minimo di 2 ricercatori esperti nello specifico settore .

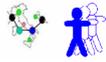
Criteri LMPG : Valutati secondo la seguente Tabella :

FORZA DELLA RACCOMANDAZIONE	
A	Forte raccomandazione di adozione / chiara evidenza di miglioramento della salute / benefici sostanzialmente superiori ai possibili danni
B	Raccomandazione di adozione / discreta evidenza di miglioramento della salute / benefici superiori ai possibili danni
C	Raccomandazione di non adozione / evidenza di inefficacia / benefici inferiori ai possibili danni
I	Evidenza insufficiente per fare una raccomandazione / entità di danni e benefici non valutabile
GRADUAZIONE DELL'EVIDENZA	
I	derivante da studi ben progettati e ben condotti su popolazioni rappresentative
II	Sufficiente per determinare gli effetti , ma limitata dal numero, qualità o consistenza dei singoli studi ; dalla generalizzabilità alla pratica routinaria;dalla natura indiretta delle evidenze
III	Insufficiente a determinare gli effetti per limiti nel numero e nel valore degli studi , per imperfezioni nel disegno o conduzione , per falle nella catena dell'evidenza

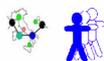
Criteri SISN : valutati secondo la seguente tabella

FORZA DELLA RACCOMANDAZIONE	
A	Forte raccomandazione di adozione / chiara evidenza di miglioramento della salute
B	Raccomandazione di adozione / discreta evidenza di miglioramento della salute
C	Raccomandazione di non adozione / evidenza di inefficacia
I	Evidenza insufficiente per fare una raccomandazione
GRADUAZIONE DELL'EVIDENZA	
1	derivante da studi ben progettati e ben condotti su popolazioni rappresentative
2	Sufficiente per determinare gli effetti , ma limitata dal numero, qualità o consistenza dei singoli studi ; dalla generalizzabilità alla pratica routinaria;dalla natura indiretta delle evidenze
3	Insufficiente a determinare gli effetti per limiti nel numero e nel valore degli studi , per imperfezioni nel disegno o conduzione , per falle nella catena dell'evidenza
4	Eleggibile per studi pilota ulteriori

GRUPPO	MALATTIA	SIGLA	INCIDENZA	MARKER PRIMARIO	RAPPORTI SIGNIFIC	ALTRE MALATTIE CON LO STESSO MARKER	SCORE ACMG 2006	CRITERI LMPG	CRITERI SISN-SISMME
AA	Fenilchetonuria	PKU	>1: 25,000	Phe	Phe/Tyr	H-PHE, BIOPT (BS) & (REG)	2.00	A-I	A 1
AA	Iperfenilalaninemia	H-PHE	>1:25.000	Phe	Phe/Tyr	PKU H-PHE, BIOPT	n/a	A-I	A 3



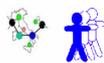
	benigna					(BS) & (REG)			
AA	Deficit biosintesi cofattore bioterina	BIOPT (BS)	<1:100,000	Phe	Phe/Tyr	PKU H-PHE, BIOPT (REG)	2.00	A-I	A 2
AA	Deficit rigeneraz cofattore bioterina	BIOPT (REG)	<1:100,000	Phe	Phe/Tyr	PKU H-PHE, BIOPT (BS)	2.50	A-I	A 2
FAO	Deficit dell'acil CoA deidrogenasi a catena media	MCAD	>1: 25,000	C6 C8 C10:1	C8/C2 C8/C10	GA2, MCKAT	1.63	A-I	A 1
OA	Acidemia glutarica tipol	GA I	>1: 75,000	C5DC	C5DC/ C5OH C5DC/ C8 C5DC/ C16	GA2	2.25	A-I	A 2
OA	Acidemia Isovalerica	IVA	<1:100,000	C5	C5/C0 C5/C2 C5/C3	2MBG, GA2, EE	1.33	A-I	A 2
AA	Malattia delle urine allo sciroppo d'acero	MSUD	<1:100,000	Val lle+Leu	Val/Phe (lle+Le u)/Phe (lle+Le u)/Ala		2.13	A-II	A 2
AA	Tirosinemia tipo I	TYR I	<1:100,000	Tyr SUAC	Tyr/Cit	TYR II, TYR III	1.94	A-II	A 2
FAO	Deficit del trasporto della carnitina	CUD	<1:100,000	C0	(C0+C2 +C3+C 16+C18 :1)/CIT	GA I, 3MCC	2.25	A-II	A 2
FAO	Deficit dell'idrossiacil CoA deidrogenasi a catena lunga	LCHAD	>1: 75,000	C16:1- OH C16- OH C18:1- OH C18- OH	C16- OH/C1 6	TFP	2.75	A-II	A 2
FAO	Deficit della proteina trifunzionale	TFP	<1:100,000	C16:1- OH C16- OH C18:1- OH C18- OH	C16- OH/C1 6	LCHAD	3.50	A-II	A 2
FAO	Deficit dell'acil CoA deidrogenasi a catena molto lunga	VLCAD	>1: 75,000	C14:2 C14:1 C14	C14:1/ C16	GA2	2.58	A-II	A 2
OA	3-Idrossi 3-metil glutarico aciduria	HMG	<1:100,000	C5OH C6DC	C5OH/ C8	3MCC MCD BKT 2M3HBA 3MGA	2.13	A-II	A 2
OA	Deficit del Beta- chetotilasi	BKT	<1:100,000	C5:1 C5OH	C5OH/ C8	3MCC MCD HMG 2M3HBA 3MGA	3.50	A-II	A 2
OA	Acidemia Metilmalonica (A,B)	Cbl A,B	<1:100,000	C3	C3/C2 C3/C16	MUT PA Cbl C,D	2.75	A-II	A 2
OA	Acidemia Metilmalonica (Mut)	MUT	>1: 75,000	C3	C3/C2 C3/C16	Cbl A,B PA Cbl C,D	2.57	A-II	A 2
OA	Acidemia Propionica	PA	>1: 75,000	C3	C3/C2 C3/C16	MUT Cbl A,B Cbl C,D	1.50	A-II	A 2
OA	Acidemia Metilmalonica (Cbl C,D)	Cbl C,D	<1:100,000	C3	C3/C2 C3/C16 C3/Met	MUT Cbl A,B PA	2.75	A-II	B 2
AA	Acidemia Argininosuccinica	ASA	<1:100,000	Cit	Cit/Arg	CIT CIT II, PC	2.50	B-II	A 2
AA	Citrullinemia ASA	CIT	<1:100,000	Cit	Cit/Arg	ASA CIT CIT II, PC	3.00	B-II	A 2
AA	Omocistinuria (CBS deficiency)	HCY	<1:100,000	Met	Met/Ph e	- MET	2.00	B-II	A 2
AA	Argininemia	ARG	<1:100,000	-	-	-	3.50	B-II	B 4
AA	Citrullinemia tipo II	CIT II	<1:100,000	Cit	Cit/Arg	ASA CIT CIT II, PC	2.71	B-II	B 2
AA	Iper-metioninemia	MET	<1:100,000	Met	Met/Ph e	HCY -	1.75	B-II	B 4
AA	Tirosinemia tipo II	TYR II	<1:100,000	Tyr	Tyr/Cit	TYR I TYR III	2.38	B-II	A 2
AA	Tirosinemia tipo III	TYR III	<1:100,000	Tyr	Tyr/Cit	TYR I TYR II	3.63	B-II	B 2
FAO	Deficit di Carnitina palmitoil-transferasi	CPT Ia	<1:100,000	C0 (high)	C0/(C1 6+C18)	- -	3.75	B-II	B 2



	(L)			C16 (low) C18 (low)					
FAO	Deficit di Carnitina palmitoil-transferasi II	CPT II	<1:100,000	C16 C18:2 C18:1 C18	C0/(C1 6+C18)	- CACT	3.38	B-II	A 2
FAO	Acidemia glutarica tipo II	GA2	<1:100,000	C4-C18 saturi o insaturi	Tutti i rapporti applic abili	MCAD, GA I, IVA SCAD, IBG, EE	3.38	B-II	A 2
FAO	Deficit dell'acil CoA deidrogenasi a catena corta	SCAD	>1: 75,000	C4	C4/C2 C4/C3 C4/C8	GA II, IBG, EE	2.63	B-II	B 2
FAO	Deficit Carnitina/acil-carnitina translocasi	CACT	<1:100,000	C16 C18:2 C18:1 C18	C0/(C1 6+C18)	CPT II	2.58	B-II	B 2
OA	Deficit del 3-Metil crotonil-CoA carbossilasi	3MCC	>1: 75,000	C5OH	C5OH/ C8 C5OH/ C0	MCD HMG BKT 2M3HBA 3MGA	2.63	B-II	B 2
OA	Deficit Multiplo delle carbossilasi	MCD	<1:100,000	C5OH	C5OH/ C8	3MCC HMG BKT 2M3HBA 3MGA	2.33	B-II	A2
OA	Deficit del 2-Metil butiril-CoA deidrogenasi	2MBG	<1:100,000	C5	C5/C0 C5/C2 C5/C3	IVA GA2, EE	2.00	B-II	B 2
OA	Aciduria 3-Metil glucagonica	3MGA	<1:100,000	C5OH	C5OH/ C8	3MCC MCD HMG BKT 2M3HBA	2.50	B-II	B 2
OA	Deficit del Isobutiril-CoA deidrogenasi	IBG	<1:100,000	C4	C4/C2 C4/C3 C4/C8	- GA2, SCAD, EE	2.13	B-II	B 2
OA	Aciduria Malonica	MAL	<1:100,000	C3DC	C3DC/ C10 -	-	4.00	B-II	B 2
AA	Iperglicemia non chetotica	NKHG	<1:100,000	Gly	Gly/Ala	-	n/a	I	I
AA	Deficit del piruvato carbossilasi	PC	<1:100,000	Cit	Cit/Arg	ASA CIT CIT II	n/a	I	I
FAO	Deficit del Dienoil reductasi	DE-RED	<1:100,000	C10:2	C10:2/ C10	-	4.00	I	I
FAO	Deficit del 3-OH acyl-CoA deidrogenasi a catena media/corta	M/SCHAD	>1:100,000	C4-OH	-	-	4.00	I	I
FAO	Deficit del chetoacil - CoA deidrogenasi a catena media	MCKAT	<1:100,000	C8	C8/C2 C8/C10	MCAD, GA2 -	4.00	I	I
OA	Aciduria 2-Metil 3-idrossi butirrico	2M3HBA	<1:100,000	C5-OH	C5OH/ C8	3MCC MCD HMG BKT 3MGA	3.75	I	I
OA	Encefalopatia Etilmalonica	EE	<1:100,000	C4 C5	Tutti i rapporti applic abili	IVA SCAD, IBG, GA2	n/a	I	I

BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

1. SISN ,reports annuali sulle attività di screening , anni2003-2005
2. Minutti CZ lacey JM et al Steroid profiling by tandem mass spectrometry improves the positive predictive value of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia.J Clin Endocrinol Metab. 2004 Aug;89(8):3687-93.
3. Chace DH, Kalas TA, Naylor EW. 2003. Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns. Clin Chem 49:1797-1817.
4. Schulze A, Lindner M, Kohlmuller D, et al. 2003. Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism by electrospray ionization-tandem mass spectrometry: results, outcome, and implications. Pediatrics. 111:1399-406.
5. Wilcken B, Wiley V, Hammond J, et al. 2003. Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. N Engl J Med 348:2304-2312.
6. Watson MS, Lloyd-Puryear MA, Mann MY, Rinaldo P, Howell RR [editors]. (2006) Newborn screening: Toward a uniform screening panel and system [Main report]. Genet Med 8(Supplement):12S-252S.
7. Howell RR. 2006. We need expanded newborn screening. Pediatrics 117:1800-1805.
8. Pandor A, Eastham J, Beverley C, Chilcott J, et al. (2004) Clinical effectiveness and cost-effectiveness of neonatal screening for inborn errors of metabolism using tandem mass spectrometry: a systematic review. Health Technol Assess 8:1-121.



9. Pollitt RJ Introducing new screens: Why are we all doing different things? *J Inher Metab Dis* 30:423-429 2007
10. Lund AM (2005) Neonatal metabolic screening in Denmark. 101. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin, Bremen. Abstract K058.02V. <http://www.mh-hannover.de/tagungen/abs/dgkj2005/web/abstract/0190.htm>;
11. Bodamer OA, Hoffmann GF and Lindner M. Expanded newborn screening in Europe 2007. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2007; 30: 439-444
12. Health Council of the Netherlands Neonatal screening. 2005 publication no 2005/11E. www.healthcouncil.nl.
13. Botkin JR, Clayton EW, Fost NC, et al. 2006. Newborn screening technology: proceed with caution. *Pediatrics* 117:1793-1799.
14. Holtzman NA Expanding newborn screening: how good is the evidence? *JAMA*. 2003 Nov 19;290(19):2606-8.
15. Natowicz M Newborn screening--setting evidence-based policy for protection. *N Engl J Med*. 2005 Sep 1;353(9):867-70.
16. Green NS, Pass KA; neonatal screening by DNA Microarray: spots and Chips. *Nature Reviews Genetica* 6:147;2005
17. Skogstrand K, Thorsen P, Nørgaard-Pedersen B, Schendel DE, Sørensen LC, Hougaard DM (2005) Simultaneous measurement of 25 inflammatory markers and neurotrophins in neonatal dried blood spots by immunoassay with xMAP technology. *Clin Chem* 51: 1854–1866.
18. Pandor A, Eastham J, Chilcott J, Paisley S, et al. (2006) Economics of tandem mass spectrometry screening of neonatal inherited disorders. *Int J Technol Assess Health Care* 22:321-326.
19. Carroll AE, Downs SM. (2006) Comprehensive cost-utility analysis of newborn screening strategies. *Pediatrics* 117:S287-S295.
20. Waisbren SE, Albers S, Amato S, et al. (2003) Effect of expanded newborn screening for biochemical genetic disorders on child outcomes and parental stress. *JAMA* 290:2564-2572.
21. Rinaldo P, Whitley RJ, Rhead WJ, Hannon WH : evidence based rationale for expanded newborn screening : National Academy of Clinical Biochemistry : Laboratory Medicine Practice Guidelines :Draft version #10 –Sept 5 , 2007
22. Dionisi-Vici et al. "Inborn Errors of Metabolism in the Italian Paediatric Population: A National Retrospective Survey" *J.Pediatr.* 2002 Mar; 140(3):321-7
23. Hoffmann GF, von Kries R, Klose D, et al. 2004. Frequencies of inherited organic acidurias and disorders of mitochondrial fatty acid transport and oxidation in Germany. *Eur J Pediatr* 163:76-80.

3.2 DIMENSIONI DEL BACINO DI UTENZA

Uno dei fattori che consentono di mantenere uno standard elevato di qualità nei programmi di screening è il numero di campioni positivi alla prima istanza e quindi la frequenza di attivazione degli algoritmi di controllo e conferma. In letteratura è univocamente considerato ottimale, per lo screening esteso, un bacino di utenza non inferiore a 30.000 neonati/anno.(1,2) A fronte di questo dato non si può non considerare con preoccupazione il fatto che in Italia lo screening di circa 570.000 neonati/anno avvenga in 33 diverse strutture e che ancora permangano situazioni di Centri che insistono sullo stesso territorio e si differenziano per le malattie sottoposte a screening ([Rapporti SISN 2003-2007](#)). D'altra parte questo stesso problema è rilevato anche a livello EU, considerando che il numero dei neonati afferenti ai singoli CSN varia da un minimo di 18.000 a un massimo di 77.000 (3). Il modello attuale dello screening per HPA, IC e FC è solo teoricamente basato sulla territorialità regionale. Esistono, infatti Regioni *con più Centri* e Centri che coprono più Regioni. Appare evidente che questo modello non è immediatamente e semplicemente trasferibile allo screening esteso. Le nuove problematiche legate all'alta tecnologia ed alle nuove scelte strategiche *richiedono infatti un approccio diverso e omogeneo a livello nazionale*.

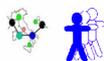
Quindi, pur considerando una serie di fattori relativi alla situazione italiana (regionalizzazione della Sanità, situazioni locali di elevato Know-how, flussi "storici" di pazienti) appare necessaria in genere e indispensabile in occasione dell'introduzione dello screening esteso una *revisione delle dimensioni dei bacini di utenza*.

E' prevedibile infatti che, nelle attuali condizioni di frammentazione organizzativa si potrà rapidamente raggiungere un punto critico del sistema, dovuto a due fattori:

- a) il costo degli investimenti necessari per un modello basato su 25-30 Centri di screening.
- b) l'impossibilità di preparare in tempi compatibili i 60-80 tecnici di alta specializzazione necessari per far funzionare un sistema di screening esteso in un contesto organizzativo frammentato come quello attuale.

Non c'è dubbio quindi che sia urgente il coordinamento dei bacini di utenza attuali in strutture sovraregionali, in analogia con quanto correntemente attuato in altri Paesi (4)

La programmazione dello screening esteso a livello nazionale dovrà individuare nuovi criteri (tutti



da soddisfare) per l'attivazione dei Centri di screening esteso e dei relativi dei bacini di utenza. Tra questi criteri si segnalano come rilevanti i seguenti alcuni inerenti il Centro Screening, altri l'equipe clinica :

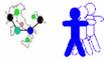
RACCOMANDAZIONI

1. *Centro screening 1: valorizzare le competenze e le esperienze esistenti ed operare sui flussi di campioni , indirizzandoli verso le strutture già funzionanti*
2. *Centro screening 2: Tali strutture devono assorbire un numero di campioni/anno tale da giustificare gli investimenti in impianti e strumentazione. Il punto di breack-even è attualmente considerato 35.000 campioni/anno e va raggiunto razionalizzando i flussi di campioni e accorpando aree geografiche contigue .*
3. *Equipe clinica 1: le aree geografiche vanno accorpate considerando la disponibilità dell'equipe clinica e la necessità di evitare spostamenti disagiati per le famiglie dei pazienti.*
4. *Equipe clinica 2: . In considerazione della necessità di integrare diverse reti di competenze e centri diversi (Terapia dell'ipotiroidismo , della Fibrosi cistica ,della PKU , dei FAOD etc) occorre un lungo periodo di sperimentazione organizzativa*
5. *Generale: Si ritiene che , in base alle condizioni osservate sul territorio nazionale la dimensione ottimale del bacino di utenza debba essere pari o superiore a 50.000 neonati/anno, comunque non inferiore a 35000 neonati/anno*

Criteri per il dimensionamento del bacino di utenza	
Grado di evidenza	A
Forza Raccomandazione	1

BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

1. Therrell BL, Panny SR, Davidson A, et al. US Newborn Screening Systems Guidelines. Statement of the Council of Regional Networks for Genetic Services. *Screening*. 1992;1:135–147
2. Therrell BL, ed. *Laboratory Methods for Neonatal Screening*. Washington,DC: American Public Health Association; 1993
3. Bodamer OA ,Hoffmann GF Lindner M Expanded newborn screening in Europe *Jlher.Metab.Dis* 30:439-444 2007
4. Tuerck JM, Buist NR. Pacific northwest regional newborn screening: a paradigm of prevention. *J Med Syst*. 1988;12:97–104



4 SCREENING :LINEE GUIDA FASE PREANALITICA

4.1 RACCOLTA E TRASPORTO DEI CAMPIONI

Il tempo che intercorre tra la nascita e la raccolta del campione continua ad essere di notevole rilevanza anche con lo screening MS/MS. E' dubbio che il prelievo precoce possa essere una causa di falsi negativi nello screening della PKU (1) ma nel caso della MS/MS il contemporaneo dosaggio della Tyr è in condizione di ridurre tale rischio. In altre malattie come ed esempio la VLCADD il prelievo ritardato può intervenire in una fase di normalizzazione delle Acilcarnitine . Vanno considerate le condizioni del paziente . Fare riferimento a linee guida già definite (2)

RACCOMANDAZIONI

- 4.1.1 *Per la raccolta del campione si raccomanda di seguire gli Standard NCCLS/CLSI*
- 4.1.2 *Si raccomanda di minimizzare la variabilità dovuta alle possibili variazioni dell'ematocrito e il loro effetto sui dosaggi (4)*
- 4.1.3 *Campioni spot - I campioni dopo adeguato essiccamento devono essere giornalmente inviati al laboratorio a temperatura ambiente*
- 4.1.4 *Il trasporto deve avvenire in maniera da escludere qualsiasi contatto del campione con gli operatori o con altri campioni*
- 4.1.5 *La consegna dei campioni al vettore di trasporto deve essere effettuato entro le 24 ore successive al prelievo, 6 giorni a settimana (lunedì-sabato). I campioni dovranno essere consegnati al Centro di Screening nelle 24 h successive alla raccolta da parte del vettore (i campioni ritirati il sabato potranno essere consegnati il lunedì) assicurando la consegna del campione al Centro di Screening entro 48h dalla prelievo.*

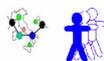
RACCOLTA E TRASPORTO CAMPIONI	
Grado di evidenza	A
Forza Raccomandazione	1

BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

1. Pass K, Levy H, eds (1995) Early Hospital Discharge: Impact on Newborn Screening. Atlanta GA: Council of Regional Networks for Genetic Services.
2. UK (2005) Newborn blood spot screening in the UK Policies and Standards. UK Newborn Screening Programme Centre. London: Department of Health. www.newbornscreeningbloodspot.org.uk.
3. H.W: Hannon et Al Blood Collection on Filter Paper for Newborn Screening Programs; Approved Standard - Fifth Edition CLSI vol27-A20 07/25/2007
4. J V. Mei,2 J. R Alexander, B W. Adam and W. H Hannon: Use of Filter Paper for the Collection and Analysis of Human Whole Blood Specimens1J. Nutr. 131: 1631S–1636S, 2001.

4.2 CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Il problema dei tempi di conservazione dei campioni, nel caso dello screening esteso appare più complesso rispetto ai tradizionali programmi, a causa del gran numero di malattie diagnosticabili, della maggiore necessità di controlli, dell'opportunità di mantenere comunque una possibilità di conferma del dato per lungo tempo dopo lo screening. Therrel già nel 1996 (1) , nel definire il background delle linee guida sulla conservazione dei campioni faceva notare l'estrema eterogeneità delle politiche tra i diversi Centri e indicava il possibile uso di queste biobanche non solo per lo screening neonatale, pur in un ambito di estrema cautela e garanzia. Ancora nel 2006 però negli USA Olney (2) rileva notevoli discrepanze nella politica di conservazione, con la mancanza di una procedura scritta nel 57% dei casi e una informazione dei genitori limitata al 16% dei casi. In Australia e nuova Zelanda (3 ,4) la HGSA ha definito precise politiche di conservazione degli spots,.



In Europa si rilevano marcate differenze tra i diversi Centri; in generale non sembra ancora essere raggiunta una completa aderenza ai principi della Direttiva EU 95/46EC sulla protezione dei dati personali. Un esempio di corretto approccio al problema è quello offerto dal Ministero della Salute Danese, che ha prodotto una prima direttiva e relativo regolamento nel 1993; nel 2002, anche in seguito ai nuovi problemi posti dallo screening esteso c'è stato un significativo cambiamento dell'atteggiamento, che ha portato nel 2004 alla pubblicazione di nuove linee guida per la conservazione e l'uso degli spot e nel 2005 alla creazione di uno Steering Committee ad hoc, nel quadro di un largo progetto di combinazione del NBS con il Central Personal Register di identificazione individuale (5). La raccolta dei campioni e il loro immagazzinamento indefinito viene attuata con il consenso informato dei genitori per un eventuale uso finalizzato alla documentazione, controllo e futuro uso diagnostico, per un controllo della qualità e efficienza e per ricerca. Il sistema è coperto da diverse certificazioni e controlli ai fini di sicurezza. Naturalmente il numero relativamente basso di nascite e una storia di rigore ed efficienza amministrativa sono fattori che rendono più accettabile tali procedure; contemporaneamente va considerato che anche nel nostro paese cominciano ad essere dibattuti i problemi delle biobanche per la popolazione nativa ed immigrata.

Allo stato, in Italia la conservazione *non è regolata da alcuna indicazione guida né da alcuna norma specifica*, ed ogni Responsabile del CSN è costretto a farsi carico senza alcuna copertura di comportamenti che potrebbero essere messi in discussione. Non c'è quindi da meravigliarsi della notevole disomogeneità osservata. Fatte salve le disposizioni che regolano la raccolta e la conservazione di dati e/o materiali per l'analisi genetica (Provvedimento del Garante per la protezione dei dati personali del 22.02.07 G.U. 65 del 19.03.07), si fanno le seguenti raccomandazioni:

RACCOMANDAZIONI

4.2.1 I campioni negativi allo screening vanno conservati, al fine di eventuali ripetizioni o controlli, a temperatura ambiente per almeno 12 mesi dopo l'arrivo al Centro Screening

4.2.2 I campioni per cui viene richiesto un controllo vanno conservati in freezer per almeno 12 mesi e comunque fino a diagnosi definitiva

4.2.3 I campioni di soggetti affetti per cui si sia raggiunta una diagnosi definitiva vanno tenuti indefinitamente in freezer a -80°C , una volta ottenuto dagli esercenti la tutela il consenso informato scritto previsto dalle vigenti regolamentazioni, per eventuali controlli o per il loro uso nel CQ e nel PT.

4.2.4 La conservazione di campioni per scopi scientifici o di controllo dei metodi è consentita solo dopo aver provveduto alla loro anonimizzazione.

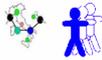
CRITERI PER CONSERVAZIONE CAMPIONI	
Grado di evidenza	A
Forza Raccomandazione	2

Può essere opportuno prevedere un intervento legislativo ad hoc, a malleva dei Responsabili dei Centri di Screening: si veda una opzione possibile su :

<http://www.health.state.mn.us/divs/fh/mcshn/nbsopt.htm>

BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

1. Therrell BL, Hannon WH, Pass KA, et al (1996) Guidelines for the retention, storage, and use of residual dried blood spot samples after newborn screening analysis: Statement of the Council of Regional Networks for Genetic Services. *Biochem Mol Med* 57: 116–124.
2. Olney RS et al Storage and use of residual dried blood spots from state newborn screening programs. *J Pediatr*. 2006 May;148(5):618-22.
3. HGSA (2000) HGSA Policy on the Retention Storage and Use of Sample cards from Newborn Screening Programs. Alexandria, VIC: Human Genetics Society of Australasia. www.hgsa.com.au.
4. Webster D Storage and use of residual dried blood spots ;2003; *Southeast Asian J trop Med public Health* 34 :S2; 49-51
5. Norgaard-Petersen B. Hougaard DM Storage policies and use of the Danish Newborn Screening Biobank *J Inher*



Metab Did 30:530-536 2007

4.3 CAMPIONI DA SOTTOPORRE A TRATTAMENTI SPECIALI

Occorre ricordare che la popolazione sottoposta allo screening deve essere rigorosamente omogenea, a termine e alimentati da un periodo di tempo sufficiente, coerente quindi con la popolazione utilizzata per stabilire i valori di riferimento. Ogni uso di questi valori per lo screening di soggetti diversi va considerato un errore. Tutti i soggetti comunque non riferibili a tale popolazione, non possono essere sottoposti alle procedure standard. Si raccomandano le seguenti procedure speciali:

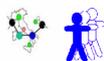
RACCOMANDAZIONI

- 4.3.1 Soggetti prematuri - I campioni relativi ai soggetti prematuri vanno identificati e analizzati in duplicato. I neonati con basso peso alla nascita non vanno inseriti nella normale routine dello screening e ad essi deve essere riservata una specifica procedura: per i neonati con peso alla nascita inferiore a 1800 g (1) si preveda almeno tre diversi campioni da raccogliere nel corso del primo mese di vita (48 ore, 15, 30 giorni), con notifica della sospetta patologia metabolica solo dopo l'ultimo prelievo ovvero immediatamente se in presenza di un'alterazione biochimica fortemente significative. Va attentamente considerata la correlazione tra dieta somministrata e andamento di valori degli aminoacidi e delle acilcarnitine.
- 4.3.2 I campioni relativi a soggetti da sottoporre a exanguino trasfusione vanno prelevati prima dell'intervento, eventualmente anticipandoli rispetto alle 48 h. I campioni vanno identificati come provenienti da questi soggetti e i genitori vanno informati. Va programmato un nuovo prelievo a 7 giorni dopo exanguino trasfusione.
- 4.3.3 I campioni relativi a soggetti in nutrizione parenterale vanno identificati come tali e va programmato un nuovo prelievo a 48 h dalla fine della procedura di nutrizione parenterale.
- 4.3.4 I campioni relativi a soggetti deceduti pre-screening, devono essere specificamente segnalati ed è opportuno definire un *protocollo peri-mortem* di raccolta di materiale biologico: spot di sangue, plasma, urine, cute, sangue x DNA e, se possibile, bile su carta bibula.

Screening : CAMPIONI SPECIALI	
Grado evidenza	A
Forza raccomandazione	2

BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

1.P. Rinaldo, S. Zafari, S. Tortorelli, D. Matern Making the case for objective performance metrics in Newborn Screening by Tandem Mass Spectrometry Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews 12: 255 – 261 (2006)



5. SCREENING :LINEE GUIDA FASE ANALITICA

5.1 CARATTERISTICHE DELLA STRUTTURA ANALITICA DELLO SCREENING

Il processo di proceduralizzazione delle attività di laboratorio e di certificazione delle strutture e delle metodologie secondo criteri internazionalmente validi riveste una particolare importanza nel settore dello screening neonatale e , considerata la notevole variabilità della situazione italiana , si raccomandano le seguenti linee organizzative :

RACCOMANDAZIONI

5.2.1 Personale :

a) Il Direttore del Laboratorio presso cui si eseguono lo screening e le analisi di controllo e conferma deve disporre della Laurea specialistica in Medicina e Chirurgia ovvero in Scienze Biologiche, Chimica, Chimica Farmaceutica o equipollenti. E' fortemente raccomandata la Specializzazione in una branca della Medicina di Laboratorio coerente con l'attività da svolgere (Biochimica clinica, Patologia Clinica). Costituisce un titolo rilevante il Dottorato di ricerca svolto in argomenti di Metabolismo , Genetica, Medicina Sperimentale o Pediatria. E' richiesta una esperienza almeno quinquennale nella direzione di laboratori di Patologia clinica, Biochimica clinica , Genetica Medica, Genetica Molecolare.

b) I responsabili delle linee analitiche devono disporre di Laurea specialistica e devono avere seguito corsi di training e specializzazione nello specifico settore . In particolare il responsabile della linea analitica MS/MS deve disporre di una comprovata frequenza a corsi di specializzazione nel settore e/o una pregressa attività di almeno 2 anni nel settore.

c) L'ottimizzazione strumentale e la validazione del metodo, deve essere effettuata da personale specializzato nell'utilizzo della spettrometria di massa tandem, con titoli comprovanti la formazione nel campo della chimica analitica.

d) deve essere prevista la figura del Consulente Clinico , con laurea specialistica in Medicina e Chirurgia, specializzazione in Pediatria ovvero Genetica Medica ovvero Patologia Clinica. Tale figura può confluire in quella del Direttore , ove questi disponga dei predetti requisiti .

5.2.2 Certificazione della struttura

Il Laboratorio deve essere certificato a norma da parte dell'Azienda entro cui opera . La certificazione impiantistica e procedurale ISO 9000:2000 deve essere ottenuta , in via di ottenimento ovvero l'Azienda deve certificare l'inizio delle procedure necessarie.

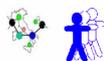
5.2.3 Linee analitiche coordinate

La struttura analitica dello screening deve avere collegamenti diretti con la struttura analitica deputata alla conferma (vedi oltre) e collegamenti funzionali stretti con un Laboratorio di Patologia clinica di base.

Screening : STRUTTURA ANALITICA	
Grado evidenza	B
Forza raccomandazione	2

BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

1. American College of Medical Genetics. F: Clinical biochemical genetics. In: Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories. 2006 <http://www.acmg.net/resources/s-g/s-g-yes-no.asp>
2. P. Rinaldo, S. Zafari, S. Tortorelli, D. Matern Making the case for objective performance metrics in Newborn Screening by Tandem Mass Spectrometry Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews 12: 255 – 261 (2006)



5.2 PANNELLO DELLE MALATTIE

La tabella seguente indica il pannello delle malattie oggetto di screening definito dalla ACMG(1). Tra queste sono indicate su sfondo blu quelle diagnosticabili in MS/MS e attualmente screenate nei programmi pilota o operativi, su sfondo giallo quelle comunemente sottoposte a screening nei programmi Italiani e su sfondo celeste quelle il cui screening, a livello di studio pilota, sarebbe possibile in tempi brevi acquisendo le risorse necessarie.

Tabella 5 – Pannello generale (screening esteso in MSMS + altre) delle malattie oggetto di screening definito dalla ACMG

Pannello	OA	FAO	AA	Hbpatie	Altre
Pannello principale					
	IVA	MCAD	PKU	Hb SS _a	CH
	GA I	VLCAD	MSUD	Hb S/ Th _a	BIOT
	HMG	LCHAD	HCY _a	Hb S/C _a	CAH _a
	MCD	TFP	CIT		GALT
	MUT _a	CUD	ASA		HEAR
	3MCC _a		TYR I _a		CF
	Cbl A,B _a				
	PA				
	BKT				
Target Secondari					
	Cbl C,D _a	SCAD	H-PHE	Var Hb _a	GALK _a
	MAL	GA2	TYR II		GALE
	IBG	M/SCHAD	BIOPT(BS)		
	2M3HBA	MCKAT	ARG		
	2MBG	CPT II	TYR III		
	3MGA	CACT	BIOPT(REG)		
		CPT IA	MET		
		DE RED	CIT II		

OA indica deficit del metabolismo degli acidi organici; FAO, deficit del metabolismo degli acidi grassi; AA, difetti del metabolismo degli aminoacidi. Le abbreviazioni usate per le condizioni patologiche sono elencate nella tabella 1. Le condizioni patologiche per cui sia presente una discussione specifica si trovano nel testo.

Da:

American College of Medical Genetics : Newborn Screening Expert Group :MS. Watson, MY. Mann, MA. Lloyd-Puryear, P Rinaldo, et al

Newborn Screening: Toward a Uniform Screening Panel and System— *Pediatrics* 2006;117:296-307

5.3 METODI ANALITICI CONSIGLIATI

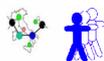
Lo screening neonatale esteso si basa sull'analisi delle acilcarnitine e degli aminoacidi nello spot di sangue essiccato su carta. Numerosi metodi affidabili sono riportati in letteratura, e si possono formulare le seguenti raccomandazioni

RACCOMANDAZIONI

5.3.1. Possono essere utilizzati spot da 1/8" (3,18 mm) o da 3/16" (4,76 mm).

5.3.2. Le acilcarnitine e gli aminoacidi devono essere estratti dallo spot mediante estrazione solido- liquido. I solventi utilizzati dovranno essere ultrapuri per HPLC.

5.3.3. La determinazione quantitativa deve essere effettuata mediante l'aggiunta ad ogni campione di quantità note di standard interni marcati con isotopi stabili identici agli analiti. Se non è



commercialmente disponibile lo standard marcato dell'analita, potrà essere utilizzato lo standard marcato omologo con peso molecolare più simile.

5.3.4 Anche se è possibile determinare la concentrazione delle acilcarnitine e degli aminoacidi con un'analisi diretta senza derivatizzazione quest'ultima è fortemente raccomandata per aumentare la specificità e la sensibilità del metodo.

5.3.5. L'analisi delle acilcarnitine e degli aminoacidi deve essere fatta mediante l'utilizzo della spettrometria di massa tandem (MS/MS) con sorgente elettrospray (ESI) in ionizzazione positiva utilizzando lo scan degli ioni precursori (PIS), la scansione della perdita di un frammento neutro (NL) e il monitoraggio di singole transizioni (MRM). Anche se l'analisi di ogni analita può essere fatta in MRM con l'aumento della precisione e della sensibilità analitica, l'analisi in scansione ha il vantaggio di evidenziare la presenza di interferenti e la qualità analitica della singola analisi.

Screening : METODI ANALITICI	
Grado evidenza	A
Forza raccomandazione	2

5.4 VALORI DI RIFERIMENTO, PUNTI DI CUT OFF, SOGLIE DECISIONALI

Il corretto funzionamento di un sistema di screening dipende dalla conoscenza del segnale nella popolazione dei soggetti non affetti (valori di riferimento), nella popolazione dei soggetti affetti, dal corretto setting del punto di Cut-off per la separazione delle due popolazioni, dalla definizione e proceduralizzazione di precise soglie decisionali per ogni conseguente azione.

RACCOMANDAZIONI

5.4.1 Valori di riferimento

5.4.1.1 Analizzare una popolazione di 5000 campioni di neonati sani a termine

5.4.1.2 Calcolare i rapporti tra gli analiti che hanno una rilevanza diagnostica

5.4.1.3 Effettuare l'analisi statistica dei dati: media, mediana, SD, CV, e percentili.

5.4.1.4 Confrontare i dati con i valori di riferimento riportati in letteratura . Molto utile in questa fase è il confronto coi i valori riportati nello studio collaborativo internazionale finalizzato all'aumento della qualità nello screening neonatale esteso (www.region4genetics.org)

5.4.1.5 Non si applica ai neonati non a termine .

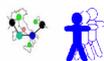
5.4.2 Calcolo dei valori di cut-off

5.4.2.1 I valori dei cut-off devono essere definiti in base alla distribuzione dei valori nella popolazione di riferimento e della distribuzione dei valori nei soggetti affetti. Per questo è necessario valutare i valori patologici riportati in letteratura. Vedi i dati riportati nello studio collaborativo internazionale finalizzato all'aumento della qualità nello screening neonatale esteso (www.region4genetics.org), in cui ad oggi sono riportati 4461 casi positivi raccolti da 41 centri di screening USA e 46 centri internazionali.

Per quanto riguarda la popolazione dei soggetti affetti si raccomanda uno studio collaborativo tra i diversi CSN Italiani che consenta in tempi ragionevoli di raccogliere un numero sufficienti di casi , essendo del tutto problematico per molti degli attuali Centri osservare in tempi accettabili un numero sufficiente di pazienti.

I valori dei cut-off devono ricadere nel range definito dal 99 %ile della popolazione di riferimento e il 5 %ile della distribuzione dei valori nei positivi. Eccezioni: a) nel caso di marcatori secondari; b) nel caso in cui il 5 %ile della distribuzione dei valori nei soggetti affetti ricada all'interno della distribuzione dei valori normali.

5.4.2.4. Deve essere valutata e implementata l'uniformità dei valori di cut-off nei diversi centri di screening; fermo restando che il processo di definizione dei punti di cut-off , indicato nell'algoritmo seguente deve essere applicato da tutti i Centri si raccomanda che i valori relativi ai punti di cut-off siano comunque disponibili per la consultazione da parte delle altre strutture di screening .



5.4.2.5. . La distribuzione delle popolazioni di riferimento va confrontata con quella delle diverse mandate analitiche e se si osservano significativi scostamenti della misura di tendenza centrale della variabilità , sono raccomandati aggiustamenti del punto di cut-off per singola mandata analitica.

5.4.2.6 Prima di procedere a una decisione (richiamo si/no etc) sulla base del valore assoluto occorre valutare le concentrazioni assolute e relative degli analiti correlati .

5.4.2.7 Il campione che risulti al di fuori del punto di cut-off deve essere , prima di procedere al richiamo, sottoposto a reflex testing in duplicato . Quando possibile (ad es nel caso di un aumento degli aminoacidi in MS/MS) si deve procedere al dosaggio dell'analita al di fuori del cut-off con un metodo alternativo di pari gerarchia (ad es nel caso degli aminoacidi , HPLC o cromatografia a scambio ionico)

5.4.2.8.Nel caso di conferma al ritest , occorre eseguire una analisi decisionale che tenga conto della possibile gravità della malattia, della entità della lesione biochimica osservata ,del contesto assistenziale a cui far riferimento e su questa base classificare il soggetto come a basso o alto rischio .

5.4.3 Soglie decisionali :

5.4.3.1 Si procede al richiamo del soggetto per ripetere l'analisi su un nuovo campione , attraverso procedure di comunicazioni impostate in maniera differenziale per i soggetti a alto e a basso rischio .

5.4.3.2 .E' essenziale che il CSN discuta e definisca le procedure di richiamo con l'equipe clinica

5.4.3.3 E' possibile il richiamo del soggetto conseguentemente alla sola positività del test di screening quando le caratteristiche della malattia (possibilità di insorgenza acuta e precoce) e l'operatività del laboratorio (impossibilità di confermare il risultato in tempi adeguati) lo rendano necessario.

Screening :VALORI DI RIFERIMENTO E VALORI DI CUT-OFF	
Grado evidenza	A
Forza raccomandazione	2
Screening : SOGLIE DECISIONALI	
Grado evidenza	B
Forza raccomandazione	2

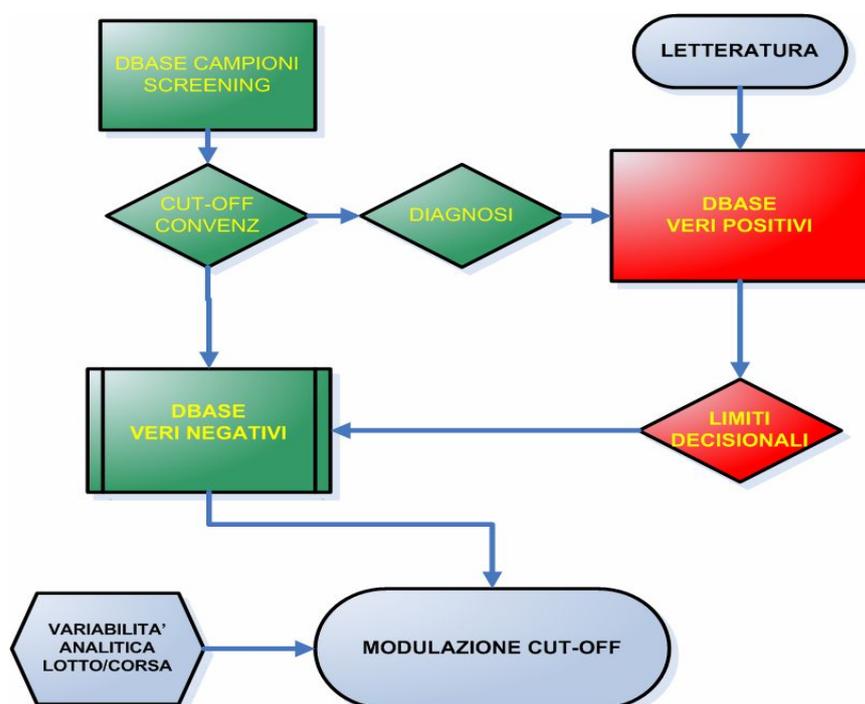
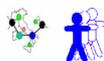


Figura 1 : Algoritmo generale per la definizione dei punti di cut-off e dei limiti decisionali . I dati rilevati direttamente e quelli della letteratura vanno integrati per la definizione dei punti di cut off e dei limiti decisionali . I database dei veri positivi e dei veri negativi sono cumulativi e periodicamente utilizzati per la definizione dei cut-off, che possono essere condizionati , attraverso una procedura predefinita , da eventuali variabilità analitiche di lotto o di batch.

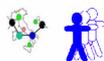
5.5 CRITERI GENERALI DI INTERPRETAZIONE E DI RICHIAMO

La piattaforma multiplex cambia sostanzialmente l'approccio decisionale e diagnostico: essa consente infatti di valutare il continuum di variabilità esistente tra non affetti, eventuali eterozigoti e soggetti omozigoti affetti sia in termini di variazione di un singolo metabolita che di covariazione dei metaboliti correlati: ne consegue che per buona parte delle malattie è la valutazione di un profilo che fa la differenza:

Il numero di richiami che avranno luogo utilizzando un ampio pannello in MS/MS sarà notevolmente aumentato rispetto a quello attualmente osservato nei diversi programmi operativi per due – tre linee analitiche. Gli studi disponibili sul recall rate dei diversi programmi di screening esteso non sono facilmente comparabili, occorre inoltre considerare che il numero di richiami finora riportato nei programmi pilota può essere superiore a quello osservabile in un programma completamente a regime ; inoltre il recall rate del programma nel suo complesso può non essere la semplice somma dei recall rates delle singole malattie sottoposte a screening , in quanto l'analisi dei livelli relativi e dei patterns tende a ridurre il numero dei richiami introducendo un fattore di controllo e verificare l'interno (1,2,3).

In ogni caso, l'aumento del numero delle malattie sottoposte a screening si correla con l'aumento del numero di richiami . In letteratura , sono riportati diversi recall rates . Limitando per semplicità le considerazioni al solo numero di Falsi Positivi (FP) ,Zytkowicz nel 2001(4) su un pannello di oltre 20 malattie riporta un FP rate dello 0.3%; Shulze (5) nel 2003 su un pannello di 23 malattie un FP rate del 0.33% . Wilcken (6) riporta, per i diversi programmi esaminati FP rates da 0.2 a 0.33 .

Il problema dei FP non va assolutamente sottovalutato in quanto può potenzialmente essere causa di due gravi inconvenienti :



1.L'ansietà da screening; si tratta di percezioni errate di malattia da parte dei genitori con i conseguenti trattamenti differenziati del neonato FP : descritte già nel 1984 (7) , e ripetutamente segnalate (8,9) fino alla recente review di Waisbren (2003),(10).

2.La descrizione di non malattie : problema già noto da tempo , che aveva sconsigliato lo screening dell'istidinemia (11) e che è particolarmente rilevante nel caso dello screening esteso in cui sono descritte forme del tutto benigne e clinicamente silenti (12,13,14) .

In un contesto in cui il fattore limitante principale della eventuale applicazione dello screening è rappresentato dalla carenza di risorse cliniche, il numero dei controlli e quindi il carico sulle strutture cliniche appare essenziale alla progettazione del sistema . Il recente lavoro di Tarini (15) basato sulla attività MS/MS negli USA valuta tre possibili livelli di specificità (per singolo test) , il 99.95 % come scenario intermedio , il 99.995 % come scenario ottimale e il 99.9% come scenario pessimistico e ipotizza sulla popolazione USA , pari a circa 4.200.000 neonati, 2575 richiami falsi positivi nel caso ottimale, 25.644 nel caso intermedio e 51.059 nel caso pessimistico. Riportando questo calcolo nella popolazione italiana (tabella 3) di circa 570.000 neonati ciò significherebbe richiamare rispettivamente 349 ; 3459 e 6846 neonati falsi positivi. Facendo lo stesso calcolo con i dati del lavoro di Rinaldo (16) che prevede una percentuale di FP dal 3% allo 0.1% con una performance media dello 0.5%, il numero di richiami sarebbe ancora più difficilmente gestibile e potrebbe arrivare (tabella 6) addirittura a circa 17.000 neonati nella ipotesi pessimistica .

Anche se l'ordine di grandezza ipotizzato dai diversi autori coincide, confrontando i dati di Tarini con il numero di FP effettivamente osservati nei diversi programmi si nota generalmente un andamento decisamente orientato verso il dato ottimistico. Lo stesso Rinaldo corregge le stime fatte rilevando che in realtà , sulle grandi casistiche dell'ordine di 200.000 casi, il numero di FP tende progressivamente a diminuire nel tempo , scendendo a valori dell'ordine dello 0.06 % per 45 malattie (16). In questo caso si potrebbero ipotizzare, in Italia , annualmente 342 falsi positivi. Naturalmente i precedenti calcoli sono fatti sulla popolazione di neonati a termine , in quanto i neonati prematuri richiedono un approccio differenziato.

Tabella 6 stima del numero di Falsi Positivi in Italia , basato sui dati USA

	neonati/anno	falsi positivi			malattie
		ottimistica	media	pessimistica	
USA (TARINI)	4.200.000	2.575	25.644	51.059	22
USA (RINALDO)	4.200.000	4.200	21.000	126.000	45
ITALIA TARINI	570.000	349	3.459	6.846	22
ITALIA RINALDO	570.000	570	2.850	17.100	45

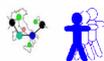
Diversi fattori sono in grado di condizionare il progressivo trend in diminuzione del numero dei FP;naturalmente il primo è il progressivo miglioramento operativo e procedurale del programma e di esperienza degli operatori. I tempi necessari per implementare il funzionamento sono inversamente proporzionali alle dimensioni del bacino di utenza e al numero di casi Veri positivi diagnosticati per anno .

La seconda importante causa è la attivazione di un secondo livello di valutazione (17,18,19,20,21,22) che consente in molti casi di ridurre significativamente il numero di richiami ; ad esempio i rapporti tra analiti ad es Tyr e Phe , il dosaggio dell'acido metilmalonico , metilcitrico e idrossipropionico o dell'alloisoleucina nello spot di sangue o del succinilacetone.

RACCOMANDAZIONE

L'interpretazione dei risultati dello screening e le decisioni ad essa correlate devono essere basate :

- a) sui livelli assoluti dei singoli metaboliti analizzati ,*
- b) sui livelli relativi di metaboliti contigui nella via metabolica ,*
- c) sulla identificazione di quadri tipici*
- d) sulla correlazione tra rilievi positivi e negativi .*

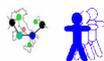


e) sui dati relativi al singolo paziente (nutrizione, uso di farmaci, stato clinico etc.)
f) su eventuali test eseguiti in fase di ritec, prima dell'eventuale richiamo

Screening : CRITERI DI INTERPRETAZIONE	
Grado evidenza	A
Forza raccomandazione	1

BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

- Whitley RJ, Hannon WH, Dietzen DJ, Rinaldo P: Pre-analytical, analytical and postanalytical issues related to follow up testing of positive newborn screens. National Academy of Clinical Biochemistry: Laboratory Medicine Practice Guidelines: Draft version #10 –Sept 5, 2007
- Meyburg J, Schultze A et al. Acylcarnitine profiles of preterm infants over the first four weeks of life. *Pediatrics* 2002;110:720-723
- Rinaldo P, Hahn SH, Matern D. 2005. Inborn errors of amino acid, organic acid, and fatty acid metabolism. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, eds. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 4th ed., W.B. Saunders, pp. 2207-2247.
- Zytovicz TH, Fitzgerald EF, Marsden D, et al (2001) Tandem mass spectrometric analysis for amino, organic, and fatty acid disorders in newborn dried blood spots: a two-year summary from the New England Newborn Screening Program. *Clin Chem* 47: 1945–1955.
- Schulze A, Lindner M, Kohlmüller D, Olgemöller K, Mayatepek E, Hoffmann GF. Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism by electrospray ionization-tandem mass spectrometry: results, outcome, and implications. *Pediatrics*. 2003;111:1399–1406
- 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
- Sorenson JR, Levy HL, Mangione TW, Sepe SJ. Parental response to repeat testing of infants with "false-positive" results in a newborn screening program. *Pediatrics*. 1984;73:183–187
- Fyro K, Bodegard G. Four-year follow-up of psychological reactions to false-positive screening tests for congenital hypothyroidism. *Acta Paediatr Scand*. 1987;76:107–114
- Tluczek A, Mischler EH, Farrell PM, et al. Parents' knowledge of neonatal screening and response to false-positive cystic fibrosis testing. *J Dev Behav Pediatr*. 1992;13:181–186
- Waisbren SE, Albers S, Amato S, et al. Effect of expanded newborn screening for biochemical genetic disorders on child outcomes and parental stress. *JAMA*. 2003;290:2564–2572
- Levy HL, Shih VE, Madigan PM. Routine newborn screening for histidinemia: clinical and biochemical results. *N Engl J Med*. 1974;291:1214–1219
- Ledley FD, Levy HL, Shih VE, Benjamin R, Mahoney MJ. Benign methylmalonic aciduria. *N Engl J Med*. 1984;311:1015–1018
- Rhead WJ, Allain D, Van Calcar S, et al (2002) Short chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD) and 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase (MCC) deficiencies: tandem mass spectrometry newborn screening detects many clinically benign cases. *J Inher Metab Dis* 25:
- van Maldegem BT, Duran M, Wanders RJ, et al (2006) Clinical, biochemical, and genetic heterogeneity in short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *JAMA* 296: 943–952.
- Tarini BA, Christakis DA, Welch GH. State Newborn Screening in the Tandem mass spectrometry Era: more tests more false positive results. *Pediatrics* 118-448456 2006
- Rinaldo P, Zafari S, Tortorelli S, Matern D. Making the case for objective performance metrics in newborn screening by tandem mass spectrometry. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2006;12(4):255-61.
- Matern D, Tortorelli S, Oglesbee D, Gavrillov D, Rinaldo P. Reduction of the false-positive rate in newborn screening by implementation of -based second-tier tests: the Mayo Clinic experience (2004-2007). *J Inher Metab Dis*. 2007 Aug;30(4):585-92.
- Magera MJ, Gunawardena ND, Hahn SH, Tortorelli S, Mitchell GA, Goodman SI, Rinaldo P, Matern D. Quantitative determination of succinylacetone in dried blood spots for newborn screening of tyrosinemia type I. *Mol Genet Metab*. 2006 May;88(1):16-21.
- Sweetmann L, Forni S, Alvarado L, Roe D, Fu X, Roe C. Second tier testing for differential diagnosis of short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency, isobutyryl-CoA dehydrogenase def, isovaleric acidemia and 2-methylbutyryl-CoA dehydrogenase deficiency. 16th ISNS International Meeting 2006, Japan Abstract P7
- Oglesbee D, Lacey J, Spolar C, et al (2006) Newborn screening for MSUD: increased specificity by addition of 2nd-tier assay for allo-isoleucine by LC-. 16th ISNS International Meeting 2006, Japan Abstract P88
- La Marca G, Malvagia S, Pasquini E, Innocenti M, Fernandez MR, Donati MA, Zammarchi E. The inclusion of succinylacetone as marker for tyrosinemia type I in expanded newborn screening programs. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2008;22(6):812-8.
- La Marca G, Malvagia S, Pasquini E, Innocenti M, Donati MA, Zammarchi E. 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 Jul;53(7):1364-9.



5.6 CONTROLLO DI QUALITA' (CQ) E PROFICIENCY TESTING (PT)

Lo screening neonatale , come attività di laboratorio deve naturalmente essere inquadrato in un sistema complessivo di controllo di qualità previsto per queste attività nelle singole regolamentazioni locali . Negli USA tutti i servizi devono rispettare gli standard della regolamentazione del 1988 Clinical Laboratory Improvement Amendment (CLIA 88) che , oltre a definire le procedure analitiche comprendono il ricorso a specifici programmi di CQ e PT (1).

Naturalmente per questo tipo di programmi e per questo tipo di campioni è indispensabile una speciale competenza e per questo motivo Il National Research Council USA ha raccomandato l'unificazione delle procedure di controllo e la National Academy of Sciences USA(NAS) (2)ha raccomandato che un singolo laboratorio del Center for Disease Control (CDC) si occupasse del CQ e PT dei diversi laboratori screening USA . Tale struttura ha attivato un programma, il Newborn Screening Quality Assurance Program (NQSAP) che è disponibile da oltre 20 anni ed è utilizzato anche da a molti laboratori extra-USA (3) . Al momento attuale almeno 6 laboratori italiani partecipano al programma NQSAP della CDC

La valutazione delle performances complessive dei programmi di screening esteso (quindi non dei semplici CQ e PT) è naturalmente un problema decisamente di complessità maggiore , che comporta valutazioni di politica assistenziale che esulano le competenze dei tecnici del settore. Ma d'altra parte è indispensabile un insieme di parametri che consenta di valutare il raggiungimento degli obiettivi in termini di costo, efficacia ed efficienza. Da questo punto di vista , senza voler entrare nella discussione sui dati economici dello screening,si rimanda alle linee guida del Council of Regional Networks for Genetic Services (CORN) (4)

5.6.1. Il controllo di qualità CQ

Il CQ e il PT costituiscono un settore del programma di particolare rilievo e importanza , in considerazione dei seguenti fattori :

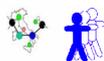
1. La variabilità preanalitica legata alle modalità del prelievo e al suo trasporto è significativamente superiore a quella comunemente osservata in laboratorio con i tradizionali metodi su siero/plasma
2. La procedura dello screening non fruisce di alcuni dei comuni meccanismi di controllo e di validazione del dato che si utilizzano nella prassi laboratoristica comune , quali ad esempio il controllo di plausibilità clinica o il controllo longitudinale
3. la rarità di alcune patologie non consente facilmente , specie nei programmi con ridotto bacino di utenza, di costruire una sufficiente esperienza negli operatori.

RACCOMANDAZIONE

Il CQ va assicurato a tre diversi livelli :

- a) *il CQ intralaboratorio , con campioni a concentrazione nota o con campioni spiked , prevalentemente caratterizzati da concentrazioni intorno al punto di cut-off e con campioni assimilabili o relativi a soggetti positivi .*
- b) *il CQ interlaboratorio nazionale , sotto la responsabilità del Gruppo ad hoc della SISN*
- c) *il CQ interlaboratorio internazionale , con particolare riguardo a una uniformità del pannello dei controlli internazionali seguiti dai diversi Centri .*
- d) *E' raccomandata la partecipazione ad almeno uno di questi programmi di CQ*

Ente erogante	nazionalità	Settore controllato
CDC	USA	SCREENING NEONATALE SPOT



SISN	ITALIA	SCREENING NEONATALE HPHE
------	--------	--------------------------

La pubblicazione e la discussione dei risultati del CQ nazionale avviene tramite il sito della SISN/SISMME e le riunioni della Società

5.6.2.il Proficiency testing PT

Nel caso dello screening esteso si pone, accanto a una mera valutazione quantitativa una valutazione qualitativa, di pattern, particolarmente complessa, che richiede una lunga esperienza e che ha come benchmark il numero di casi diagnosticati. Le dimensioni subottimali dei bacini di utenza di molti programmi rendono questo periodo di autoapprendimento del sistema screening particolarmente lungo e difficile . Il proficiency testing , ovvero la verifica delle capacità diagnostiche di un sistema testandolo con campioni normali e patologici , oltre a elementari fini di controllo dell'efficacia del sistema ha infatti anche una importante funzione didattica e di uniformazione decisionale .

Si basa sulla circolazione dei campioni veri positivi (con diagnosi confermata) tra in diversi Centri , al fine di condividere le esperienze delle diverse strutture.Si propone una regola/prassi generale che preveda la notifica delle diagnosi e invio di un certo numero di spot dei campioni positivi a un gruppo ad hoc della SISN che provvederà a organizzare il PT inviando tali campioni e recependo le risposte dai diversi Centri

La pubblicazione e la discussione dei risultati del PT avviene tramite il sito della SISN e le riunioni della Società

RACCOMANDAZIONE

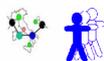
E' raccomandata al partecipazione a almeno uno dei seguenti programmi di PT

Ente erogante	nazionalità	Settore controllato
CDC	USA	SCREENING NEONATALE SPOT
SISN	ITALIA	Programma nazionale PT per lo screening esteso
SISN	ITALIA	SCREENING NEONATALE HPHE

Screening :CONTROLLI QUALITA' E PROFICIENCY TESTING	
Grado evidenza	A
Forza raccomandazione	1

BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

1. Public Law 100-578: Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988
2. National Research Council. Committee for the Study of Inborn Errors of Metabolism. Genetic Screening: Programs, Principles and Research. Washington, DC: National Academy of Sciences; 1975
3. CDC (2007) Quality Assurance and Proficiency Testing for Newborn Screening. Bethesda, MD Centers for Disease Control. www.cdc.gov.
4. Therrell BL, Panny SR, Davidson A, et al. US Newborn Screening Systems Guidelines. Statement of the Council of Regional Networks for Genetic Services. Screening. 1992;1:135-147
5. ERNDIM – European Research Network Quality Assurance and Proficiency Testing. www.erndimqa.nl
6. University of Hamburg-Eppendorf Dr.Lukacs www.uke.uni-hamburg.de



6.CONFERMA :LINEE GUIDA PER LA CONFERMA ANALITICA

6.1 SCREENING E CONFERMA :DUE COMPITI DELLA STESSA STRUTTURA

Una legge fondamentale dello screening è che il test di screening *non è in se diagnostico* ma costituisce solo l'inizio di un processo che attraverso l'applicazione di test di secondo livello e la loro integrazione a livello clinico porta alla formulazione della diagnosi , alla istituzione di una eventuale terapia e alla programmazione del follow-up.

I programmi di screening sono studiati in maniera di dimostrare il massimo grado di sensibilità, per minimizzare il numero di falsi negativi . Tradizionalmente ai metodi usati nella fase di screening vengono coordinati i metodi da applicare nella successiva fase di conferma e follow up , metodi che vengono applicati su una popolazione di veri positivi e di falsi positivi con l'obiettivo di distinguere i due gruppi : quindi metodi caratterizzati dalla massima specificità.

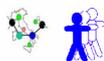
Questo orientamento generale era valido quando , in prima istanza si usavano tecnologie di prima o seconda generazione , come ad es.il Bacterial inhibition assay o i metodi fluorimetrici o immunometrici.Metodi discretamente sensibili ma meno specifici di quanto di sarebbe desiderato. Erano quindi indispensabili , per la conferma analitica, linee di media-alta complessità con caratteristiche di sensibilità e specificità più spinte ,quali la cromatografia a scambio ionico , la HPLC, la gascromatografia e la GC/MS, che consentivano di rispettare la regola generale che i test di screening , ove indicativi (se positivi o se negativi in condizioni di alto rischio) *devono necessariamente essere confermati attraverso l'applicazione, sullo stesso campione o su un nuovo prelievo , di metodiche analitiche con maggiore validità (sensibilità e specificità ,precisione e accuratezza analitica)* .

Nelle linee guida CLSI del Maggio 2006(1) che trattano dei metodi e delle procedure relative alla conferma e al follow up, quest'ultimo è stato suddiviso in *short-term* e *long-term follow up*: il primo si configura prevalentemente come conferma diagnostica(clinica e di laboratorio) più le eventuali misure terapeutiche da istituire prima della consegna del paziente all'equipe specialistica. Questa impostazione conferma la proposta già avanzata nel 2000 dal CORN USA .(2)

Di particolare rilievo nelle attività di short-term Follow-up sono le procedure di comunicazione con il Pediatra di base e con quelli delle Strutture Cliniche non specialistiche che prendono in carico il neonato (la Medical Home della Pediatria USA) . La comunicazione è particolarmente delicata considerando che nella gamma delle malattie sottoposte a screening possono essere presenti condizioni *con molte varianti , dal lieve al grave , con età di comparsa diverse , con sintomatologie critiche eventualmente correlate a stress di diversa natura*. Il processo decisionale che porta alla richiesta del controllo deve in qualche maniera essere condiviso tra il Responsabile clinico dello screening e il Medico curante. Ciò è possibile solo attraverso una informazione chiara, puntuale , se possibile proceduralizzata . Da questo punto di vista una risorsa di grande interesse è rappresentata dai FACT SHEETS (3) e dagli ACT SHEETS pubblicati dalla ACMG (4). Questi algoritmi diagnostici mettono il medico di base in condizione di capire il significato del richiamo e costituiscono il mezzo ideale per la successiva condivisione delle responsabilità e per il passaggio dallo short-term al long-term follow up. Ovviamente svolgono anche un'altra essenziale funzione: quella di diffondere le conoscenze sulle patologie oggetto di screening. Occorre valutare la possibilità di comunicare con le lettere di richiamo questo tipo di informazione.

La MS/MS , data la sua elevata sensibilità e specificità ,si presta all'uso sia nella fase dello screening di prima istanza sia nella fase della conferma analitica (short term follow-up) ; ciò sconsiglia la duplicazione delle linee analitiche in laboratori differenti deputati alle due diverse funzioni in quanto tale metodo per le sue caratteristiche di versatilità , di robustezza e validità analitica si configura come possibile *“metodo primario per lo screening e per le analisi di secondo livello”* .

Poiché la qualità dell'attività di screening è correlata con il volume dell'attività di conferma (vedi anche Dimensione del Bacino di Utenza) è essenziale la piena integrazione tra screening e



conferma diagnostica e quindi che il laboratorio screening *disponga direttamente delle linee analitiche di conferma.* (5) .

Inoltre, la possibilità di migliorare il sistema di conferma (con MS/MS) interessa anche la definizione del pannello di ingresso dello screening, in quanto facilita l'inclusione di tutte le patologie che comunque possono essere soggette a conferma sullo spot iniziale, senza costi aggiuntivi salvo quello dell'analisi ,(5) favorendo l'aggiornamento della lista degli obiettivi secondari.(6)

Ciononostante, non appare al momento facilmente sostituibile la struttura laboratoristica tradizionale che vede funzionare, accanto alle linee analitiche dello screening (in MS/MS , in Fluorimetria , in immunometria) almeno una linea analitica in HPLC o in scambio ionico per il dosaggio degli aminoacidi su spot e su liquidi fisiologici, una linea analitica per il dosaggio degli acidi organici su urine in GC-MS , una linea analitica per il dosaggio delle acilcarnitine in MS/MS, nonché linee analitiche specifiche per altri metaboliti necessari alla diagnosi.

Di conseguenza un obiettivo nel breve termine è quello dell'accorpamento di screening conferma in strutture unificate.

Non si considerano , in questo contesto ,se non in termini generali ed ai fini di sottolineare l'opportunità di un loro complessivo coordinamento altri esami , a livello proteomico o genomico indispensabili alla caratterizzazione diagnostica del soggetto positivo allo screening. Tali test devono essere nella disponibilità dell'equipe clinica, ma non avendo un ruolo diretto nell'incrementare la robustezza del profilo metabolomico , possono essere eseguiti in laboratori diversi , sotto la stretta valutazione e integrazione da parte del clinico che è responsabile del processo diagnostico e dello short-term follow-up.

RACCOMANDAZIONI

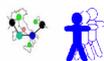
Le attività di conferma analitica dello short term follow up è opportuno siano eseguite dalla stessa struttura che esegue lo screening,per motivi di omogeneità delle prestazioni e di organizzazione del servizio e per garantire il ritorno di informazioni indispensabile alla corretta operatività del sistema di screening. Questo tipo di organizzazione comporta inoltre significativi risparmi economici.

Screening : SCREENING E CONFERMA PARTE DELLA STESSA STRUTTURA	
Grado evidenza	A
Forza raccomandazione	2

Di conseguenza si indicano brevemente alcune raccomandazioni riguardanti il secondo livello **direttamente** correlato con lo screening in MS/MS

BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

1. J.Tuerck, et al Newborn Screening Follow-up; Approved Guideline :ILA27-A vol 26 n 18 05/302006 su: <http://www.clsi.org/Source/Custom/Currentdocs.cfm?Section=Current_Versions_of_CLSI_documents
2. Pass KA et AL US newborn screening system guidelines II: follow-up of children, diagnosis, management, and evaluation. Statement of the Council of Regional Networks for Genetic Services (CORN).J Pediatr. 2000 Oct;137(4 Suppl):S1-46.
3. Kaye CI, Accurso F, La Franchi S, et al (2006) Introduction to the newborn screening fact sheets. Pediatrics 118: 1304–1312.
4. ACMG Neonatal Screening ACT Sheets. www.acmg.net/resources/policies/ACT/condition-analyte-links.htm
5. Howell RR ,Engelson G Structures for clinical follow-up: newborn Screenign J. Inher Metb Dis 30:600-605 2007
6. Howell RR. 2006. We need expanded newborn screening. Pediatrics 117:1800-1805.



6.2 CARATTERISTICHE DELLA STRUTTURA ANALITICA DI CONFERMA

RACCOMANDAZIONI

6.2.1 Personale : Il Direttore del laboratorio presso cui si eseguono (lo screening e) le analisi di controllo e conferma deve disporre della Laurea specialistica in Medicina e Chirurgia , in Scienze Biologiche , in Chimica o in Chimica Farmaceutica. con Specializzazione in una branca della Medicina di Laboratorio (Biochimica clinica, Patologia Clinica) ovvero in Genetica Medica. Costituisce un titolo rilevante il Dottorato di ricerca svolto in argomenti di Metabolismo , Genetica , Medicina Sperimentale .

I responsabili delle linee analitiche devono disporre di Laurea specialistica o breve nel settore della Medicina di Laboratorio e devono avere seguito corsi di training e specializzazione nello specifico settore ,e/o disporre di esperienza almeno biennale nel settore .

6.2.2 Certificazione della struttura : deve essere ottenuta, in via di ottenimento o richiesta da parte dell'Azienda responsabile la certificazione della struttura laboratoristica ISO 9000:2000. E' considerato adeguato anche un processo di accreditamento mediante organismi internazionali (vedi JCI)

6.2.3 Linee analitiche coordinate : Deve essere presente , utilizzabile e logisticamente raggiungibile nell'ambito Aziendale un Laboratorio di Patologia Clinica Generale certificato.

Screening : CARATTERISTICHE STRUTTURA DI CONFERMA	
Grado evidenza	B
Forza raccomandazione	1

6.3 TRASPORTO E IMMAGAZZINAMENTO DEI CAMPIONI

RACCOMANDAZIONI

6.3.1 Campioni spot - I campioni devono essere trasportati e inviati al laboratorio a temperatura ambiente.

6.3.2 Campioni plasma - I campioni vanno immediatamente trasportati in laboratorio per l'analisi e l'immagazzinamento a -20°

6.3.3 Campioni urine –I campioni urine per il dosaggio degli aminoacidi e/o acilcarnitine non sono raccomandati e per scopi diagnostici è da preferire il dosaggio degli aminoacidi su plasma . Al contrario il dosaggio degli acidi organici sulle urine è da considerarsi un test diagnostico attendibile e non vicariabile, allo stato dal dosaggio dagli acidi organici sul plasma . Le quantità degli analiti presenti vanno sempre riportate all'escrezione di creatinina.

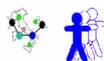
6.3.4 E' prescritto l'immagazzinamento a -70° per tempo indefinito dei campioni che in conferma si dimostrano positivi

6.3.5 I campioni negativi alla conferma devono essere immagazzinati per almeno 12 mesi a -20°

Screening : TRASPORTO E IMMAGAZZINAMENTO CAMPIONI CONFERMA	
Grado evidenza	B
Forza raccomandazione	1

6.4 DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DEGLI AMINOACIDI

Nella seguente tabella, (tratta da Rinaldo et al: Evidence based rationale for expanded newborn screening ; National Academy of Clinical Biochemistry : Laboratory Medicine Practice Guidelines :Draft version #10 –Sept 5 , 2007) modificata, sono indicati i percorsi tra screening e follow-up , con lo score di evidenza- Non sono riportate, rispetto alla tabella originale a cui si rimanda, le citazioni bibliografiche relative. Le graduazioni dell'evidenza e della forza della raccomandazione



sono indicate nella tabella.

Tabella 7 : Conferma diagnostica aminoacidopatie .

DISTURBI CATABOLISMO E TRASPORTO AMINOACIDI	MARKER SCREENING	ANALISI FOLLOW-UP	MARKERS FOLLOW-UP	TEST AGGIUNTIVI	CRITERI LMPG	CRITERI SISN- SISMME
Fenilchetonuria (inclusa iperfenilalaninemia benigna e deficit metabolici delle pterine)	Fenilalanina Tirosina	Aminoaci plasmatici	Fenilalanina Tirosina	Metaboliti delle pterine nelle urine. Attività della Diidropteridina reductasi	A-I	A 1
Tirosinemia Tipo 1 Tipo 2	Tirosina	Acidi organici urinari Aminoaci plasmatici	Succinilacetone Tirosina >1000 µM all'esordio	Nessun ulteriore test indicato	A-I	A 1
Malattia delle urine a sciroppo d'acero	Isoleucina + leucina + alloisoleucina	Aminoaci plasmatici Acidi organici urinari	Isoleucina, Leucina, valina, alloisoleucina	Nessun ulteriore test indicato	A-I	A 1
Citrullinemia Tipo 1 Tipo 2	Citrullina Citrullina	Aminoacidi urinari/plasmatici	Citrullina, Argininosuccinato	Ammonemia, bilirubina, fosfatasi alcalina, GGT. Test genetici possono distinguere tipo I dal Tipo II.	A-I B-II	A 1
Acidemia Argininosuccinica	Citrullina	Aminoacidi urinari/plasmatici	Citrullina, Argininosuccinato	Nessun ulteriore test indicato	A-I	A 1
omocistinuria	Metionina	Aminoacidi urinari/plasmatici Acidi organici urinari	Omocisteina Metionina, omocistina Acido Metilmalonico	Il rapporto Folato/Vitamin B1	A-I	A 1

RACCOMANDAZIONI

6.4.1 Il determinazione quantitativa degli aminoacidi

I metodi cromatografici non quantitativi (TLC) e i test colorimetrici qualitativi o semiquantitativi non hanno caratteristiche di validità sufficienti per la conferma dello screening e non vanno assolutamente utilizzati a questo scopo

La determinazione quantitativa degli aminoacidi su spot o plasma (sequenze da 6 o da 24) eseguito in cromatografia a scambio ionico, in HPLC o in MS/MS costituisce il percorso principale delle analisi di seconda istanza per la diagnosi delle aminoacidopatie dopo screening. Sulle urine, ancorché marginalmente utile, non costituisce un esame con sufficiente sensibilità e specificità diagnostica e di conseguenza il suo uso andrebbe scoraggiato come secondo livello dello screening e limitato ai casi appropriati quali ad esempio i disordini del trasporto degli aminoacidi.

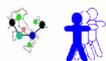
6.4.2 Standard preanalitici

a- il campione di scelta è il plasma, raccolto con eparina di sodio o di litio. Il plasma raccolto con EDTA è considerato accettabile; il siero non è raccomandato ed è particolarmente sconsigliato per la determinazione degli aminoacidi solforati e di quelli del ciclo dell'urea

b- il campione non deve essere emolizzato, la separazione deve essere immediata al momento dell'arrivo in laboratorio. Il tempo limite tra il prelievo e la separazione è considerato 4 h.

c - il campione non immediatamente analizzato o eventuali aliquote vanno immagazzinati a -20°C (stabilità per due mesi) o a -80 °C (per periodo > 2 mesi) - Nei campioni immagazzinati in freezer si osserva comunque una trasformazione della maggior parte degli aminoacidi che è complessivamente di scarsa significatività tranne nel caso della glutamina e asparagina, trasformate in acido glutammico e aspartico.

b- il dosaggio su spot è accettabile purché oltre ai valori assoluti si valutino i rapporti e i valori relativi



d- il determinazione degli aminoacidi nei campioni di urine delle 24 h assume raramente carattere diagnostico . La raccolta va fatta evitando ogni contaminazione fecale e mantenendo a 4°C il recipiente durante la raccolta.

In caso di campioni random si raccomanda comunque la refrigerazione . I campioni (delle 4 h o random vanno testati per i comuni indicatori di contaminazione batterica (pH e nitriti) e , in caso di positività, scartati. Le urine vanno accuratamente mescolate , aliquotate, va dosata la creatinina e quindi immagazzinate in freezer a -20 °C o, se possibile a -70°C.

6.4.3 standard analitici

a- i metodi analitici non quantitativi , come ad esempio la TLC sono da considerare obsoleti e da non usare per l'analisi degli aminoacidi.

b- le tecnologie considerate di elezione sono la cromatografia a scambio ionico, la HPLC, la MS/MS e la GC/MS

c- un adeguato processo di deproteinizzazione va eseguito per preparare l'analisi.. Sono possibili e accettabili numerosi metodi , chimici ,separazione in dialisi o in fase solida o estrazioni in metanolo o attraverso ultrafiltrazione. Il piu comune è il trattamento con acido solfosalicilico o tricloroacetico seguito da centrifugazione con raccolta del sopranatante.

d- Le tecniche di derivatizzazione pre o post colonna sono ampiamente usate sia per la cromatografia a scambio ionico sia per la HPLC. In caso di cromatografia a scambio ionico il metodo di elezione è la derivatizzazione post-colonna con ninidrina.

e- nel caso della MS/MS si raccomanda la derivatizzazione a butilesteri .

f- le performance della cromatografia a scambio ionico e della HPLC devono essere tali da risolvere e quantificare un miscuglio di 40 aminoacidi in un massimo di 4 h

g- nel caso del dosaggio degli aminoacidi in MS/MS il metodo di elezione è la HPLC-ESI MS/MS in full scan mode con una neutral loss di m/z102 . Alcuni aminoacidi possono richiedere un monitoraggio di singole transizioni (SIM) , ad esempio citrullina, arginina ornitina e glicina .

h- nel caso della cromatografia a scambio ionico e della HPLC è prescritto l'uso di almeno due standard interni , che eluiscano in zone diverse del cromatogramma .

i- nel caso della MS/MS è opportuno l'uso di standard marcati costituiti da isotopi stabili per ogni analita.

l - è fortemente raccomandato l'uso , per ogni serie di campioni , di due soluzioni standard contenenti almeno 24 aminoacidi in concentrazioni note. Si raccomanda che i due controlli abbiano concentrazioni rispettivamente al disopra e al disotto dei limiti di riferimento .

6.4.4 standard postanalitici

a- I valori di riferimento devono essere stabiliti/controllati dai singoli laboratori utilizzando gruppi campione di età comparabile e di numerosità sufficiente. L'uso di range di riferimento pubblicati in letteratura può essere accettabile solo dopo una attenta analisi critica e con una chiara avvertenza nel referto.

b- L'interpretazione dei risultati deve essere basata sui livelli assoluti , sui livelli relativi , sulla identificazione di quadri tipici e sulla correlazione tra rilievi positivi e negativi .Occorre tenere presenti i diversi fattori di variabilità fisiologica degli aminoacidi , in particolare età , fattori nutrizionali, peso,

c- in caso di referto interpretativo per il clinico vanno specificati i criteri di interpretazione. Il referto interpretativo presuppone una richiesta che espliciti la possibile ipotesi diagnostica ovvero il problema clinico correlabile con il sospetto di aminoacidopatia

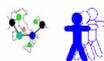
d- va presa in esame e esplicitamente menzionata nel referto la possibilità della presenza di sostanze interferenti con l'analisi . come esempi : iperglicinemia da terapia con dipropilacetato

6.4.5 controlli di qualità

a. deve essere disponibile un CQ interno possibilmente per ogni corsa analitica, e comunque con frequenza non inferiore alla settimana

b. è essenziale la partecipazione e ai programmi di CQ esterno , nazionali e internazionali

c. E' essenziale anche un audit interno (eseguito da persona esterna al laboratorio) della



performance nei programmi di QC

d. è raccomandata la partecipazione a programmi di Proficiency testing (PT) che controllino la sensibilità e specificità diagnostica dei test.

e. sono raccomandati i programmi intralaboratorio di scambio dei campioni, con verifica formale dei risultati

f. Si raccomanda la partecipazione ai programmi:

1. Programma ERNDIM

2. programma CAP

Screening : DOSAGGIO AMINOACIDI , CONFERMA	
Grado evidenza	A
Forza raccomandazione	2

BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

1. American College of Medical Genetics. F: Clinical biochemical genetics. In: Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories. 2006 <http://www.acmg.net/resources/s-g/s-g-yes-no.asp>
2. Shih VE. Amino Acid Analysis. In: Blau N, Duran M, Blaskovics ME, Gibson KM (Eds): *Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases*, Second Edition, Springer, Berlin, 2003, pp. 11-26
3. Bremer HJ, Duran M, Kamerling JP, Przyrembel H, Wadman SK. *Disturbances of Amino Acid Metabolism: Clinical Chemistry and Diagnosis*. Baltimore: Urban and Schwarzenberg, 1981.
4. Rinaldo P et al: Evidence based rationale for expanded newborn screening; National Academy of Clinical Biochemistry: Laboratory Medicine Practice Guidelines :Draft version #10 –Sept 5,
5. Sahai S, Uhlhaas S. Stability of amino acids in human plasma. *Clin Chem Acta* 1985; 148: 225-9.
6. Walker V, Mills GA. Quantitative methods for amino acid analysis in biological fluids. *Ann Clin Biochem* 1995; 32: 28-57.
7. Ersser RS, Davey JF. Liquid chromatographic analysis of amino acids in physiological fluids: recent advances. *Med Lab sci* 1991; 48: 59-71.
8. Moodie IM, Shephard GS, Labadarios D. a review of quantitative ion exchange, high performance liquid and gas chromatographic analyses of amino acids in physiological fluids. *J High Resol Chromatogr* 1989; 12:509-16.
9. Ananth N. Laboratory generated artifacts in plasma amino acid quantitation. *Online J Health Allied Scs.* 2002; 3:4-7.
10. Chase DH. Mass spectrometry in the clinical laboratory. *Chem Rev* 2001; 101:445-477.
11. Armstrong MD, Stave U. A study of plasma free amino acid levels. I. A study of factors affecting validity of amino acid analyses. *Metabolism* 1973; 22:549-60.
12. Bremer HJ, Duran M, Kamerling JP, Przyrembel H, Wadman SK. *Disturbances of Amino Acid Metabolism: Clinical Chemistry and Diagnosis*. Baltimore: Urban and Schwarzenberg, 1981.
13. Parvy P, Bardet J, Rabier D, Kamoun P. Age-related reference values for free amino acids in first morning urine specimens. *Clin Chem* 1988; 34:2092-5
14. CLSI. Statistical quality control for quantitative measurements: principles and definitions - second edition; approved guideline C24-A3. Wayne, PA: CLSI, 1996
15. Rattenbury JM, Townsend JC. Establishment of an external quality-assessment scheme for amino acid analyses: results from assays of samples distributed during two years. *Clin Chem* 1990; 36: 217-24.
16. Parvy P, Bardet J, Rabier D, Gasquet M, Kamoun P. Intra- and inter-laboratory quality control for assay of amino acids in biological fluids: 14 years of the French experience. *Clin Chem* 1993; 39:1831

6.5 DOSAGGIO DELLE ACILCARNITINE

Il dosaggio delle acilcarnitine in MS/MS ha consentito la diagnosi delle malattie della beta-ossidazione degli acidi grassi e di diverse acidurie organiche, contribuendo in maniera significativa alla conoscenza ed alla caratterizzazione di questo settore di patologia. Il dosaggio è possibile sui diversi liquidi fisiologici (spot, plasma, urine) e in condizioni particolari quali ad esempio nella diagnostica post-mortem, nella bile. Il dosaggio nel liquido amniotico è di utilità nella diagnosi prenatale.

Nella seguente tabella, tratta da Rinaldo et al: Evidence based rationale for expanded newborn screening; National Academy of Clinical Biochemistry: Laboratory Medicine Practice Guidelines :Draft version #10 –Sept 5, 2007, modificata, sono indicati i percorsi tra screening e follow-up, con lo score di evidenza. Non sono riportate, rispetto alla tabella originale a cui si rimanda, le citazioni bibliografiche relative.

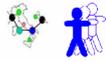


Tabella 8 : Conferma diagnostica FAOD .

+	Marker Screening	Analisi Follow-up	Marker Follow-up	Test addizionali	CRITERI LMPG	CRITERI SISN-SISME
Deficit dell'acil CoA deidrogenasi a catena media (MCAD)	Acilcarnitine C6, C8, C10	Dosaggio acilcarnitine Acidi organici urinari	Acilcarnitine C6, C8, C10	Analisi molecolare per mutazione predominante A985G	A-I	A 1
Deficit dell'acil CoA deidrogenasi a catena molto lunga (VLCAD)	Acilcarnitine C14:0, C14:1	Dosaggio acilcarnitine Acidi organici urinari	Acilcarnitine C14:0, C14:1, C16:0, C16:1, C18:0, C18:1 Aumento degli acidi dicarbossilici a catena lunga/media	L'analisi genetica può discriminare le forme ad esordio acuto da quelle ad esordio tardivo	A-II	A 2
Deficit dell'acil CoA deidrogenasi a catena lunga (LCHAD)/ deficit diITFP	Acilcarnitine C16-OH, C18-OH, C18:1-OH	Dosaggio acilcarnitine Acidi organici urinari	Acilcarnitine C16-OH, C18-OH, C18:1OH Aciduria 3-idrossi dicarbossilica con limitata chetosi	80-90% degli alleli mostra la mutazione G1528C. La diagnosi differenziale con il deficit di TFP richiede dosaggio attività enzimatica	A-II	A 2
Deficit dell'acil CoA deidrogenasi a catena corta (SCAD)	Carnitina C4	Acidi organici urinari	Acidi etilmalonico e metilsuccinico	Il profilo dell'ossidazione degli acidi grassi sui Fibroblasti è indicato quando il dosaggio degli acidi organici urinari è dubbio.	B-II	B 1
Deficit dell'idrossiacil CoA deidrogenasi a catena medio/corta (M/SCHAD)	Carnitina C4-OH	Acidi organici urinari	Acido 3-OH adipico, 3-OH sebacico, 3-OH suberico.	Non sono indicati test addizionali	B-II	B 1
Deficit primari di Carnitina	Carnitina libera (C0)	Carnitina libera Totale	Bassi livelli di carnitina libera e totale. Elevati livelli di Carnitina urinaria.	Secondaria? Ridotto uptake di carnitina nei fibroblasti	B-II	B 2

6.5.1 Standard preanalitica

a- il campione di scelta è il plasma , raccolto con eparina di sodio o di litio . il campione deve essere immediatamente separato e il plasma trasportato al laboratorio in ghiaccio secco e tenuto a -80°C fino al momento dell'analisi.

c – il campione non immediatamente analizzato o eventuali aliquote vanno immagazzinati -80 °C (per periodo indefinito)-

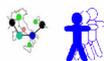
b- il dosaggio su spot è accettabile purchè oltre ai valori assoluti si valutino i rapporti e i valori relativi . I campioni vanno trasportati e conservati a temperatura ambiente , salvo che si prevedano lunghi tempi di conservazione

d- il dosaggio della acilcarnitine nei campioni di urine è scarsamente utilizzato ma può fornire interessanti indicazioni . il campione va trattato come il plasma . Le urine vanno accuratamente mescolate , aliquotate, va dosata la creatinina e quindi immagazzinate in freezer a -80°C o in ghiaccio secco .

6.5.2 Standard analitici

a. si raccomanda l'uso di standard interni di acilcarnitine (isotopi stabili)

b. si raccomanda l'uso di calibratori multipli contenenti concentrazioni note di acilcarnitine , che consentano di valutare le caratteristiche del metodo per ogni singola acilcarnitina. c. IL dosaggio diretto delle acilcarnitine non derivate è possibile , ma se ne raccomanda la derivatizzazione per incrementare la sensibilità e la specificità analitica del metodo .



Tipicamente si applica una trasformazione nei rispettivi butilesteri
d. le acilcarnitine vanno separate dalla matrice attraverso una estrazione liquido liquido o in fase solida .
e. le Acilcarnitine sono analizzate in electrospray ionization MS/MS , mode positive-ion usando sia precursor ion-scan , sia multiple rection monitoring o ambedue i metodi
f. si raccomanda l'uso di almeno due controlli con ogni mandata analitica . Un controllo deve contenere concentrazioni entro i limiti di riferimento , il secondo concentrazioni al disopra.
g. si raccomanda una stretta attenzione sulle caratteristiche di performance del metodo: sensibilità analitica, accuratezza, precisione, range di linearità

6.5.3 Standard postanalitici

a. Valori di riferimento da stabilire in ciascun laboratorio , per gruppi di età
b. L'interpretazione dei risultati deve essere basata sui livelli assoluti , sui livelli relativi , sulla identificazione di quadri tipici e sulla correlazione tra rilievi positivi e negativi .
c- in caso di referto interpretativo per il clinico vanno specificati i criteri di interpretazione. Il referto interpretativo presuppone una richiesta che espliciti la possibile ipotesi diagnostica ovvero il problema clinico correlabile con il sospetto di acidurie organica , aminoacidopatia o deficit della Beta-ossidazione
d. va presa in esame e esplicitamente menzionata nel referto la possibilità della presenza di sostanze interferenti con l'analisi . come esempi : diversi antibiotici inducono test falsi-positivi; dipropilacetato ; alcuni additivi per cibi

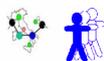
6.5.4 Controlli di qualità

a. deve essere disponibile un CQ interno possibilmente per ogni corsa analitica, e comunque con frequenza non inferiore alla settimana b. è essenziale la partecipazione e ai programmi di CQ esterno , nazionali e internazionali
c. è essenziale la partecipazione a programmi interni ed esterni di Proficiency testing (PT) che controllino la sensibilità e specificità diagnostica dei test. la partecipazione a programmi esterni di QC non è raccomandata, ma essenziale.
d. E' essenziale anche un audit interno (eseguito da persona esterna al laboratorio) della performance nei programmi di QC
e. sono raccomandati i programmi intralaboratorio di scambio dei campioni , con verifica formale dei risultati
f . Si raccomanda la partecipazione ai programmi :
1- Programma CDC
2. Programma ERNDIM
3. Programma CAP

Screening : DOSAGGIO ACILCARNITINE, CONFERMA	
Grado evidenza	A
Forza raccomandazione	2

BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

1. Chase DH, Hillman SL, Vanhove JLK, Naylor EW. Rapid diagnosis of MCAD deficiency – quantitative analysis of octanoylcarnitine and other acylcarnitines in newborn blood spots by tandem mass spectrometry. Clin Chem 1997; 43: 2106-13.
2. Millington DS, Chace DH. Carnitine and acylcarnitines in metabolic disease diagnosis and management. In: Desiderio DM (ed). Mass Spectrometry: Clinical and Biomedical Applications. Volume 1. New York: Plenum Press; 1992, pp 199-219.
3. Chace DH, DiPerna JC, Mitchell BL, Sgroi B, et al. Electrospray tandem mass spectrometry for analysis of acylcarnitines in dried postmortem blood specimens collected at autopsy from infants with unexplained cause of death. Clin Chem 2001;47:1166-1182.
4. Tortorelli S, Hahn SH, Cowan TM, Brewster TG et al.. The urinary excretion of glutarylcarnitine is an informative tool in the biochemical diagnosis of glutaric acidemia type I. Mol Genet Metab 2005;84:137-143



5. Chace DH. Mass spectrometry in the clinical laboratory. *Chem Rev.* 2001;101:445-477
6. Chase DH, Kalas TA, Naylor EW. Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried specimens from newborns. *Clin Chem* 2003; 49:1797-1817.
7. rinaldo P, Cowan T, Matern D. Acylcarnitine profile analysis: American College of Medical Genetics Standards and Guidelines for Clinical Genetic Laboratories, 2007, in press.
8. Millington DS. Tandem mass spectrometry in clinical diagnosis. In: Blau N, Duran M, Blaskovics ME, Gibson KM (eds) *Physician's guide to the laboratory diagnosis of metabolic diseases*. Springer, Berlin, 2nd edition, 2003, pp 57-75.
9. Matern D. Acylcarnitine analysis. In: Blau N, Duran M, Gibson KM (eds) *Laboratory guide to the methods in biochemical genetics*. Springer, Berlin, 2007,
10. European Research Network for evaluation and improvement of screening, *Diagnosis and treatment of Inherited disorders of Metabolism* (ERNDIM) see <http://www.erndimqa.nl/>

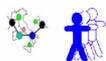
6.6 DOSAGGIO DEGLI ACIDI ORGANICI

Il dosaggio degli acidi organici su liquidi fisiologici, possibile con metodi qualitativi, semiquantitativi e quantitativi in Gascromatografia, in HPLC o in Gascromatografia-spettrometria di massa, costituisce il perno diagnostico delle acidurie organiche, di alcune aminoacidopatie e di alcuni deficit della Beta-ossidazione. Diversamente dal dosaggio degli aminoacidi e delle acilcarnitine, il dosaggio degli acidi organici è un metodo strettamente utilizzabile nella conferma diagnostica. Come per le acilcarnitine, l'escrezione urinaria è correlata a diversi fattori e frequentemente va incontro a cospicue variazioni correlate alle condizioni del paziente. Nella seguente tabella, sono indicati i percorsi tra screening e follow-up, con lo score di evidenza- Non sono riportate, rispetto alla tabella originale a cui si rimanda, le citazioni bibliografiche relative.

Tabella 9: Conferma diagnostica Acidurie organiche

Acidurie organiche	Marker di Screening	Analisi Follow-up	Marker Follow-up	Test aggiuntivi	CRITERI LMPG	CRITERI SISN-SISMME
Mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase deficiency	Acilcarnitina C5-OH, C5:1	Acidi organici urinari	Ac. 2-metil-3-OH butirrico, tigilglicine, AcAc, 2 MeAcAC, butanone, 3-OH butirrico	Glicemia anion gap. Dosaggio enzim su FB	A-II	A 2
Deficit di 3-OH-3-Metilglutaril CoA (HMGCoA) Liasi	acilcarnitina C5-OH, C6-DC, C6OH-DC	Acidi organici urinari	Ac. 3-OH-3-metilglutarico, 3-metilglutarico, 3-methylglutaconic, acido 3-OH isovalerico	sensibilità <100%. Una alterazione Mild dei metaboliti suggerisce lo studio dell'attività enzimatica.	A-II	A 1
Aciduria Glutarica Tipo 1 Tipo 2	acilcarnitina (glutaril) C5DC C5DC, C5, C5OH, C6, C8, C10-C16	Acidi organici urinari	Ac. Glutarico, Ac 3-OH glutarico, 2-OH glutarico, adipico, suberico, sebacico etilmalonico, 3-OH isovalerico, isobutirrico,	Non sono indicati test addizionali. L'attività dell'ETF non è facilmente disponibile.	A-I	A 1
Deficit di Biotinidasi	acilcarnitina C5-OH, C3	Attività Biotinidasi + Acidi organici urinari	3-OH propionico, 3-OH isovalerico, tigilglicina, 3-meticrotonilglicina metilcitrato	Attività enzimatiche di specifiche carbosilasi + dosaggio biotina per escludere deficit multipli delle carbosilasi.	A-I	A 1
Deficit multipli delle carbosilasi	acilcarnitina C5-OH, C3	Acidi organici urinari + plasma acilcarnitine	3-OH propionico, 3-OH isovalerico, tigilglicina metilcitrato, 3-MCC (glicina), lattato	Attività delle singole carbosilasi + dosaggio biotina.	A-II	A 1
Deficit di 3-Metilcrotonil CoA Carbosilasi	acilcarnitina C5-OH	Acidi organici urinari + plasma acilcarnitine	3metilcrotonilglicina acido i3-OH sovalerico. 3-OH isovaleril-carnitina.	Concomitante test sui campioni materni.	A-I	A 1
Acidemia Propionica	acilcarnitine C3	Acidi organici urinari	Ac. 3-OH propionico, tigilglicine, metilcitrato	Dosaggio della vitamina B12.	A-I	A 1
Acidemia Metilmalonica	acilcarnitine C3	Acidi organici urinari	Ac. Metilmalonico, 3-OH propionico, tigilglicina, metilcitrato	Analisi di complementazione. Dosaggio della vitamina B12.	A-I	A 1
Acidemia Isovalerica	acilcarnitine C5	Acidi organici urinari	Ac. 3-OH isovalerico, isovaleril glicina	Non sono indicati test addizionali	A-II	A 1

Tratta da Rinaldo et al: Evidence based rationale for expanded newborn screening; National Academy of Clinical Biochemistry: Laboratory Medicine Practice Guidelines: Draft version #10 –Sept 5, 2007, modificata



6.6.1 standard preanalitica

a. il campione di scelta sono le urine sia in campioni random che temporizzati. Va registrata analizzata e

eventualmente menzionata nel referto la correlazione della raccolta con lo stato clinico del pz , in quanto il campione raccolto durante o subito dopo un fatto acuto assume maggiore sensibilità e specificità diagnostica. , il campione deve essere immediatamente tappato ermeticamente e trasportato al laboratorio . Se non immediatamente analizzato va congelato e tenuto a -20°C fino al momento dell'analisi. Le urine vanno accuratamente mescolate , aliquotate, va dosata la creatinina e quindi immagazzinate in freezer a -80°C o in ghiaccio secco .

b.. il campione non immediatamente analizzato o eventuali aliquote vanno immagazzinati -80 °C (per periodo indefinito)-

c. il dosaggio su spot (urine applicate su spot e essiccate) è accettabile purchè oltre ai valori assoluti si valutino i rapporti e i valori relativi . I campioni vanno trasportati e conservati a temperatura ambiente , salvo che si prevedano lunghi tempi di conservazione

d. il dosaggio degli acidi organici nei campioni di plasma ,CSF ,bile o è scarsamente utilizzato ma può fornire interessanti indicazioni . il campione va trattato come il plasma .

6.6.2 standard analitici

Il metodo di scelta per il dosaggio degli AO è la Gascromatografia con rivelatore in spettrometria di massa . (GCMS) . L'identificazione con la semplice tecnica gas-cromatografica non offre sufficienti garanzie di sensibilità e specificità e non è assolutamente consigliata.

a. si raccomanda l'uso di standard interni assenti nelle urine che non coeluiscono con acidi presenti.

b. si raccomanda l'uso di calibratori contenenti concentrazioni note di acidi organici , che consentano di valutare le caratteristiche del metodo . Devono essere determinate e tenute sotto stretto controllo le performance analitiche , ovvero il range di linearità, il range di misura, il limite inferiore di sensibilità analitica per ciascun acido organico

c. gli acidi organici vanno separati dalla matrice attraverso una estrazione liquido liquido o in fase solida .

d. Il dosaggio diretto degli acidi organici non derivati è possibile , ma si raccomanda la derivatizzazione per incrementare la sensibilità e la specificità analitica del metodo . Tipicamente si applica una trasformazione nei rispettivi trimetilsililderivati

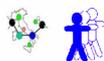
e. gli Acidi organici sono analizzati con una tecnica di GC capillare con detector in spettrometria di massa (GC-MS). Il programma di eluizione prevede una temperatura variabile programmata del forno.

f. si raccomanda l'uso di almeno due controlli con ogni mandata analitica . Un controllo deve contenere concentrazioni entro i limiti di riferimento , il secondo concentrazioni al disopra.

g. la acquisizione dei dati si ottiene in scan mode e gli acidi organici sono identificati attraverso lo spettro di massa.Tale identificazione si basa sul confronto dello spettro ottenuto con le biblioteche disponibili . Il livello di concordanza degli spettri per una identificazione non deve essere inferiore all'80% . In considerazione del fatto che nelle urine sono stati identificati oltre 500 acidi organici è importante una attenta valutazione dei cromatogrammi , in special modo in alcune aree critiche ed è essenziale che i Lab integrino i dati disponibili delle diverse biblioteche di spettri con propri rilievi

h. analisi qualitativa/semiquantitativa . basata sulla identificazione dei picchi presenti nel cromatogramma ottenuto da un campione corrispondente a una quantità definita di creatinina , con valutazione del pattern di escrezione assoluto e relativo dei diversi AO.

i. analisi quantitativa : I metodi possono variare tra i diversi laboratori e non sempre sono direttamente comparabili. Può essere ottenuta sia utilizzando il metodo della diluizione isotopica sia con il metodo tradizionale, utilizzando del calibratori e almeno uno standard interno;con i metodi di diluizione isotopica si usano isotopi stabili come standard interni . La concentrazione è espressa relativamente alla concentrazione di creatinina. Per i dosaggi quantitativi si raccomanda fortemente l'uso di metodi analitici specifici con l'utilizzo di isotopi stabili. I metodi con standard esterni sono da considerarsi semiquantitativi



6.6.3 standard postanalitici

- a. valori di riferimento da stabilire in ciascun laboratorio , per gruppi di età
- b. L'interpretazione dei risultati deve essere basata sui livelli assoluti , sui livelli relativi , sulla identificazione di quadri tipici e sulla correlazione tra rilievi positivi e negativi . L'interpretazione deve essere basata nel profilo complessivo dell'escrezione piuttosto che su valori singoli al di fuori della norma.
- c. L'interpretazione va correlata allo stato clinico del paziente non essendo insolito che il quadro in fase non acuta tenda a normalizzarsi.
- d. Il referto deve riportare l'informazione sul paziente , il risultato e i valori di riferimento appropriati nonché eventuali interpretazioni del quadro osservato . In caso di referto interpretativo vanno specificati i criteri di interpretazione. Il referto interpretativo presuppone una relazione clinica dettagliata che accompagni la richiesta di analisi. Eventuali quadri anomali devono essere descritti , correlati con l'informazione clinica e con i test eventualmente da eseguire per l'accertamento , nonché con elementi di diagnosi differenziale di laboratorio.
- e. va presa in esame e esplicitamente menzionata nel referto la possibilità della presenza di sostanze interferenti con l'analisi . come esempi : diversi antibiotici ; dipropilacetato ; aspirina alcuni additivi per cibi ; diete chetogeniche , nutrizione parenterale , contaminazione batterica

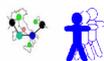
6.6.4 controlli di qualità

- a. deve essere disponibile un CQ interno possibilmente per ogni corsa analitica, e comunque con frequenza non inferiore alla settimana
- a. è fortemente raccomandata la partecipazione e ai programmi di CQ esterno , nazionali e internazionali
- c. è raccomandata la partecipazione a programmi di Proficiency testing (PT) che controllino la sensibilità e specificità diagnostica dei test.
- d. sono raccomandati i programmi intralaboratorio di scambio dei campioni , con verifica formale dei risultati
- e. Si raccomanda la partecipazione ai programmi :
 1. Programma ERNDIM
 2. programma CAP

Screening : DOSAGGIO ACIDI ORGANICI, CONFERMA	
Grado evidenza	A
Forza raccomandazione	2

BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

1. Chalmers RA, Lawson AM. Analytical chemistry, biochemistry and diagnosis of the organic acidurias. In *Organic Acids in Man*. Chapman and Hall, London, 1982.
2. Sweetman L. Organic acid analysis. In: *Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics*. Hommes FA, ed. Wiley-Liss, New York, 1991:143-176.
3. American College of Medical Genetics. F: Clinical biochemical genetics. In: Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories. 2006 <http://www.acmg.net/resources/s-g/s-g-yes-no.asp>
4. Bennett M. Recommendations for the measurement of urine organic acids. In: Sherwin JE, Lockitch G, Rosenthal P, et al (au). Laboratory Medicine Practice Guidelines: Maternal-Fetal Risk Assessment and Reference Values in Pregnancy. National Academy Clinical Biochemistry, Washington, DC, 2006: 59-62.
5. Hoffmann G, Aramaki S, Blum-Hoffmann E, Nyhan WL, Sweetman L. Quantitative analysis for organic acids in biological samples: batch isolation followed by gas chromatographic–mass spectrometric analysis. *Clin Chem* 1989;35:587-595.
6. Hoffmann G, Feyh P. Organic acid analysis. In: Blau N, Duran M, Blaskovics ME, Gibson KM (eds). *Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases*, Second Edition, Springer, pp. 27-44.
7. Sweetman L. Organic acid analysis. In: *Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics*. Hommes FA, ed. Wiley-Liss, New York, 1991:143-176.
8. Ozand PT, Generoso GG. Organic acidurias: A review. Part 2. *J Child Neurol* 1991; 288-303.
9. Kumps A, Duez P, Mardens Y. Metabolic, Nutritional, Iatrogenic, and Artifactual Sources of Urinary Organic Acids: A Comprehensive Table. *Clin Chem* 2002; 48: 708-

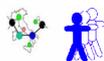


7. LA CONFERMA A LIVELLO PROTEOMICO E GENOMICO

Per le malattie indicate nella successiva tabella sono disponibili tecniche di conferma a livello proteomico e/o genomico.

TABELLA 10 Test di conferma II livello

MALATTIA (Per gli acronimi utilizzati vedi tab XX)	GENE CORRELATO	MUTAZIO NI "TARGET "1	SEQUENZIAMENTO INTERO GENE 2	ATTIVITA' ENZIMATICA	ALTRO
DISORDINI BETA OSSIDAZIONE ACIDI GRASSI					
CUD	SLC22A5		X		Saggio di uptake
LCHAD/TFP	HADHA	X	X	X	
	HADHB	X	X		
MCAD	ACADM	X	X	X	
VLCAD	ACADVL		X	X	
DE-RED (DECR1)	DECR-1				
CPT I DEF.	CPT1A	X	X	X	
CPT II DEF	CPT2	X	X	X	
GA II	tipo A	ETFA	X	X	
	tipo B	ETFB			
	tipo C	ETFDH			
M/SCHAD	HADHSC		♦		(MIM 601609 non confondere con HADH2: MIM300256)
MCKAT					
SCAD	ACADS	X	X	X	
CACT	SLC25A20		X	X	
ACIDURIE ORGANICHE					
3MCC	(MCCD tipo I)	MCCC1		X	X
	(MCC2 DEF.)	MCCC2			
HMG CoA LYASE DEF.	HMGCL		X		
BKT DEF.	ACAT1		♦	X	
GA I	GCDH	X	X	X	
IVA	IVD	X	X		
MMA	tipo mut	MUT	X	X	Test di complementazione
	tipo cblA	MMAA		X	
	tipo cblB	MMAB		X	
	tipo cblC	MMACHC		X	
MCD	HLCS DEF.	HLCS		X	X
	BTD DEF.	BTD	X	X	
PA (PCC DEF)		PCCA		X	X
		PCCB	X	X	
2M3HBA (MHBD DEF.)	HADH2		♦		(MIM 300256)
2MBG (SCADD)	ACADSB		♦		
3MGA	tipo I	AUH		X	X
	tipo II	TAZ	X	X	
	tipo III	OPA3	X	X	
	tipo IV				
	tipo V	DNAJC19	X	♦	
IBG (IBD DEF.)	ACAD8		♦		
MAL (MALONYL CoA DEC. DEF.)	MLYCD		X		Analisi delezioni/duplicazioni
EE (ENCEPHALOPATHY ETHILMALONIC)	ETHE1		X	X	
AMINOACIDOPATIE					
ASA (ASL DEF.)	ASL	X	X	X	



CIT (ASS DEF.)	tipo I	CTLN1(ASS 1)		X	X	
	tipo II	CTNL2 (SLC25A13)		X		
HCY (CBS DEF)		CBS	X	X	X	Note: i deficit di MTHFR, MTR, MTRR non sono rilevati dallo screening esteso
MSUD	tipo IA	BCKDHA	X	X	X	
	tipo IB	BCKDHB	X	X		
	tipo II	DLD	X	◆		
	tipo III	<u>DBT</u>	X	X		
PKU/HPHE		PAH	X	X		Analisi delezioni/duplicazioni
BIOPT-BIOS		GCH1	X	X	X	Analisi delezioni/duplicazioni
		PTS	X	X	X	
		SPR	X	X	X	
BIOPT-REG		QDPR		X	X	
		PCBD	X	◆		
TYR	tipo I	FAH	X	X		
	tipo II	TAT		◆		
	tipo III	HPD		◆		
ARG		ARG1		◆	X	
MET (HYPERMETHIONINEMIA)		MAT1A		◆		
		AHCY		◆		
		GNMT		◆		
NKHG		AMT		X	X	Analisi delezioni/duplicazioni
		GLDC		X		
		GCSH		X		
PC		PC		◆	X	

X= dal data base NIH: <http://www.genetests.org>

◆=non presente nel data base come prestazione diagnostica ma presente in letteratura come attività di ricerca. Vedi OMIM: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>

 Non è stato descritto il gene-malattia

¹ = La tabella è stata compilata in base alle informazioni disponibili, per i test diagnostici, sul data base dell' NIH (include i laboratori degli Stati Uniti e qualche laboratorio europeo). Nella colonna "mutazioni target" si indica il test molecolare indirizzato all'identificazione di 1 o più mutazioni che devono essere presenti con una frequenza elevata, in associazione alla patologia indicata e/o nella popolazione studiata. Quando in una patologia ci sono mutazioni ricorrenti è vantaggioso, sia per i costi di analisi sia per i tempi di risposta, effettuare prima il test per la ricerca di queste mutazioni. Qualora il test dovesse risultare negativo per 1 o 2 alleli si può passare all'analisi tramite sequenziamento dell'intero gene. E', comunque, da tener presente che spesso la frequenza delle mutazioni-causanti malattia può variare tra le popolazioni e quindi rendere diversa la sensibilità (e l'applicabilità) del test.

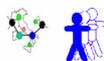
² = Il sequenziamento dell'intero gene prevede l'analisi delle regioni codificanti e delle giunzioni intro/esoniche di tutto il gene associato alla malattia. E'un test a elevata sensibilità diagnostica, ma non può rilevare oltre che variazioni di sequenza introniche, delezioni e duplicazioni se non quelle puntiformi. Per l' analisi delle duplicazioni e delezioni è necessario utilizzare un test specifico.

Il grado di rilevanza dell' analisi molecolare – sia a livello di acidi nucleici che di proteine - ai fini diagnostici è indicato con un colore dello sfondo: (indicazioni suggerite dalle Action Sheets: <http://acmg.net/resources/policies/act/condition-analyte-links.htm>)

Legenda colore sfondo:

Sfondo rosso = si deve fare l'analisi molecolare per confermare la diagnosi

Sfondo verde= si deve fare l'analisi molecolare per la diagnosi differenziale



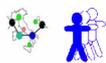
Sfondo celeste = si puo' fare l'analisi molecolare

Sfondo arancione= si deve fare l'analisi molecolare solo se gli acidi organici sono negativi

RACCOMANDAZIONE

Fermo restando che le tecnologie di analisi del DNA non rientrano nelle comuni competenze di una struttura orientata allo screening , deve essere definita una procedura logistica uniforme per i diversi Centri per ottenere l'accesso

Screening : CONFERMA GENOMICA	
Grado evidenza	B
Forza raccomandazione	2



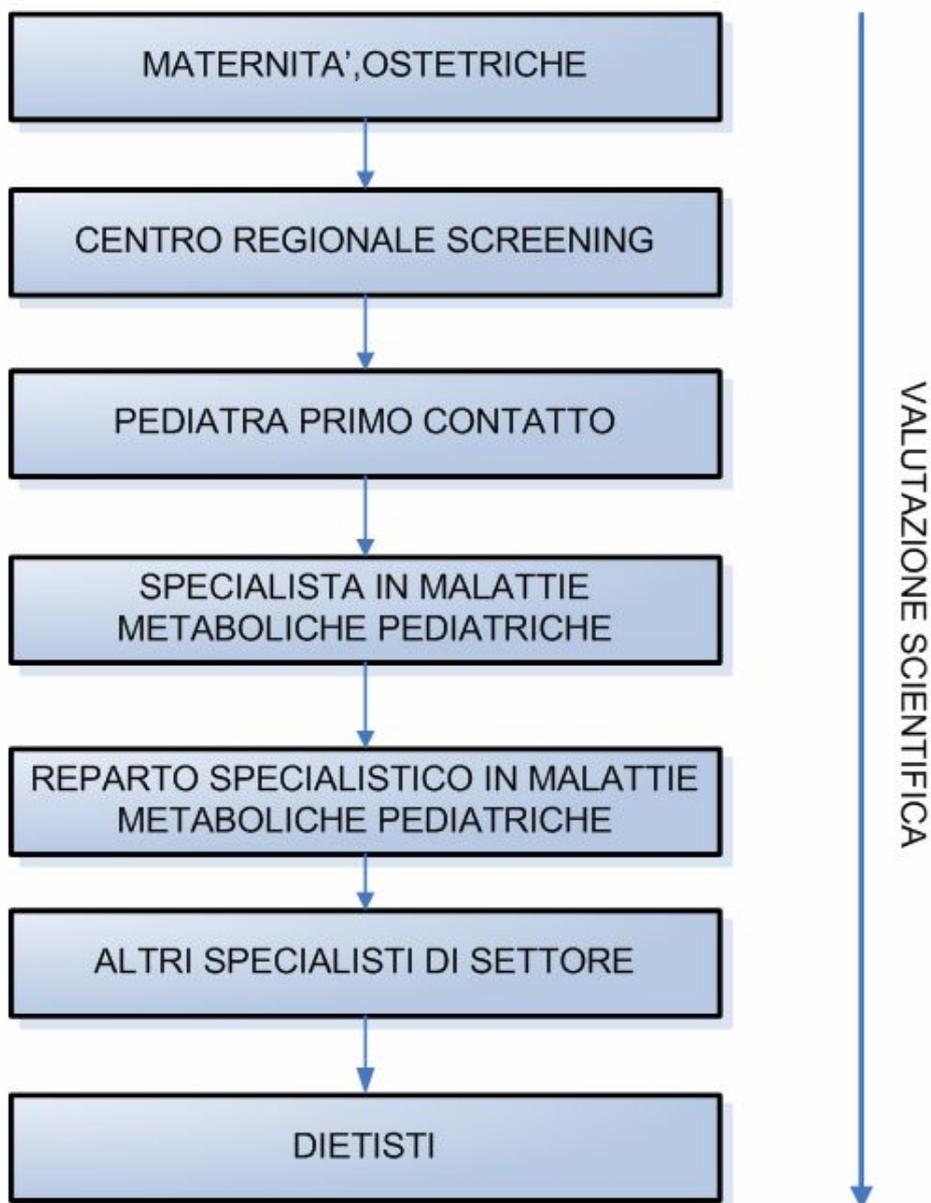
8.IL POST-SCREENING E IL RITORNO CLINICO

8.1 ALGORITMO E CARATTERISTICHE GENERALI DEL PROCESSO

Un programma di screening è un complesso processo collaborativo che coinvolge un ampio numero di operatori in diversi settori, come riportato in Fig 2 elaborata dal Prof Olaf Bodamer in cui si evidenziano gli elementi costitutivi di un programma di screening.

Figura 2

ELEMENTI COSTITUTIVI DI UN PROGRAMMA DI SCREENING (Bodamer , tradotta)





E' evidente che il notevole aumento del numero di parametri utilizzati nello screening esteso comporterà un incremento sostanziale del numero dei richiami e quindi un significativo aumento dei contatti con le famiglie, con i pediatri di base, con le maternità, con i laboratori di secondo e terzo livello. Quindi andranno ipotizzati dei contatti con gli Operatori periferici molto più frequenti e le informazioni da scambiare saranno certamente molto più complesse, che riguardano patologie meno conosciute e che richiedono generalmente decisioni caratterizzate da una urgenza clinica molto maggiore.

Utenza e operatori di base sono ormai familiari con lo screening dei pannelli tradizionali, ma non hanno ancora piena conoscenza delle patologie oggetto dello screening esteso. Inoltre lo schema mentale usato per la PKU, ovvero della completa asintomaticità dei primi mesi seguita da un danno grave neuropsicologico non si adatta facilmente a molte delle "nuove" malattie, in cui la caratteristica peculiare è quella di una sintomatologia aspecifica, episodica, correlata a alterazioni ematochimiche generali anch'esse del tutto aspecifiche e a un quadro metabolomico specialistico di non facile interpretazione.

Il risultato di una applicazione dello screening esteso, per numero di pazienti e per tipologia delle malattie, non potrà quindi non essere che quello di un *affollamento dei canali di contatto con l'utenza e con gli operatori periferici*. Questa situazione rende particolarmente delicato lo screening di malattie come ad esempio alcune Acidurie organiche, in cui l'intervallo di screening è particolarmente ristretto e in cui un possibile risultato del quadro clinico non curato in tempo non è un maggiore o minore ritardo, ma l'exitus del paziente.

Va poi considerato che, sia per la particolare tipologia delle malattie oggetto di screening, sia per la presenza di numerosi falsi positivi e/o di positivi veri ma non malati, il numero di casi positivi ma in attesa di definizione che occupa i canali di comunicazione tra lo screening, le famiglie, i Pediatri di base, le maternità e le equipe cliniche di secondo e di terzo livello può raggiungere livelli tali da creare serie disfunzioni al sistema nonché significative ricadute sui genitori (ansia, rifiuto del controllo, rifiuto del percorso diagnostico offerto).

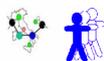
Il problema principale è quindi quello di identificare procedure semplici, rapide, standardizzate che da una parte consentano l'accertamento diagnostico nel minor tempo e con la maggiore accuratezza possibile e dall'altra mettano al riparo i genitori dall'ansia da screening e gli operatori da possibili errori. *Obiettivo delle procedure è la prontezza del follow up, della diagnosi e della terapia per evitare morbilità e mortalità dei neonati affetti e per ridurre il periodo di incertezza nei neonati non affetti.*

8.2 RACCOMANDAZIONI GENERALI

Un algoritmo generale è indicato in figura 3. La differenza principale dai classici algoritmi usati attualmente è la classificazione del soggetto positivo al ritest come a basso o alto rischio e dalle conseguenti azioni.

Questo particolare tipo di richiamo, per le sue caratteristiche di urgenza e per la necessità di una chiara comunicazione con la famiglia del paziente sposta il peso dell'intervento piuttosto che sulla maternità di partenza, come è stato finora nei programmi di screening, *sul pediatra di famiglia* che ha un duplice compito: quello della *conferma del rischio in base alla situazione clinica pregressa* e quello della *informazione alla famiglia*: ambedue questi compiti devono tendere al comune obiettivo di una comunicazione che sia tanto equilibrata da non creare ansie immotivate e da non portare alla sottovalutazione del caso.

Vi sono quindi da fare alcune raccomandazioni generali su tre versanti: quello della informazione agli utenti e agli operatori di base; quello della quantità e qualità dell'informazione prodotta e accumulata nel corso dello screening; quello del feed-back dei risultati clinici sulle procedure di screening.



Nelle precedenti tabelle sono indicati i test di conferma raccomandati rispetto all'ipotesi formulata in prima istanza. Per questi test di conferma (con l'eccezione dei test genomici) è considerato essenziale mantenere un TAT <12h.

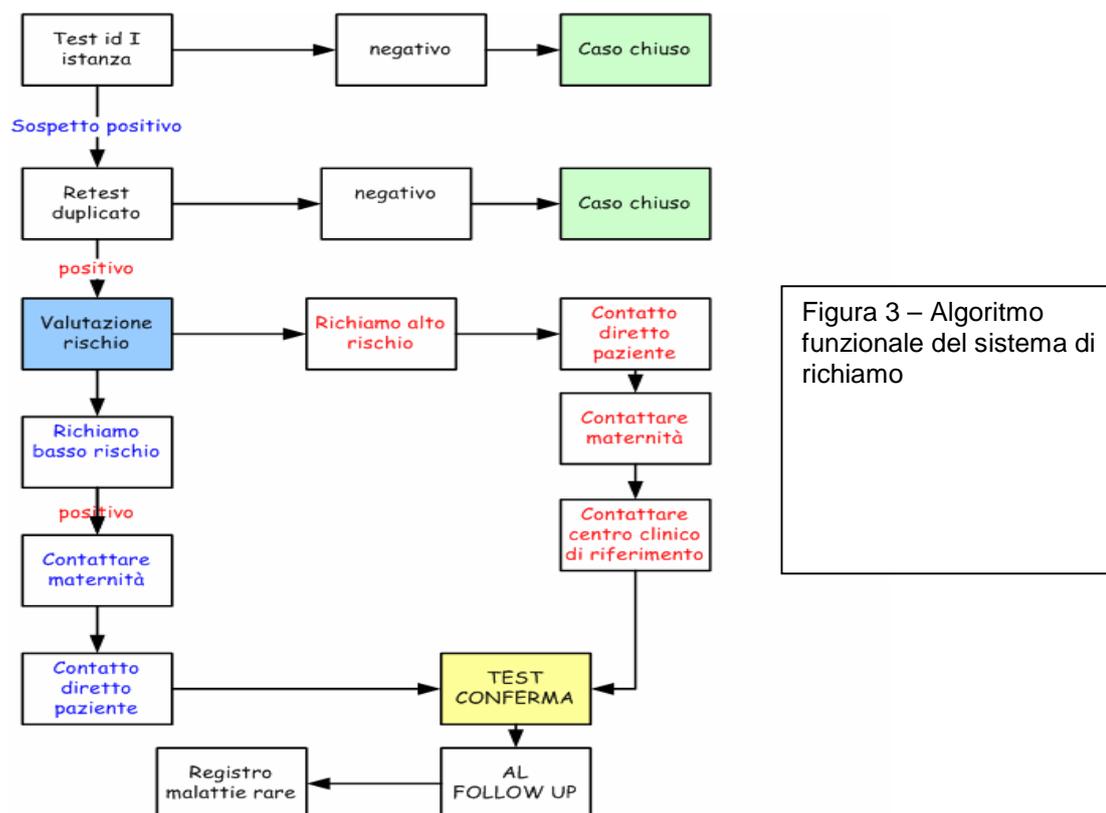
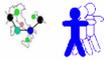


Figura 3 – Algoritmo funzionale del sistema di richiamo

RACCOMANDAZIONI
 I soggetti positivi vengono immediatamente ritestati in duplicato (TAT per il secondo test < 12 h). Sulla base della media delle due determinazioni del reflex test il soggetto viene classificato come ad alto rischio e a basso rischio.
 I livelli decisionali per questa classificazione devono essere chiaramente codificati nelle procedure del Laboratorio ed essere esibibili su richiesta del Pediatra che prende in carico il neonato.
 Nei casi a basso rischio si richiede, per le vie ordinarie un secondo campione, nel caso di un risultato a alto rischio si contatta immediatamente famiglia, maternità e pediatra curante di base, si allerta l'equipe medica e si procede al richiamo, che prevede la applicazione dei test di conferma diagnostica e la visita del paziente.

Screening : ALGORITMO GENERALE	
Grado evidenza	A
Forza raccomandazione	1



8.2.1 Il ruolo del Pediatra di Famiglia dei presidi di secondo livello nello screening esteso

Lo screening neonatale, man mano che aumenta le sue possibilità teoriche di intervento, richiede un sempre maggiore livello di comunicazione con il Professionista sanitario. A questa figura spettano responsabilità importanti in caso di richiamo ed è esperienza comune per chi attua lo screening della estrema difficoltà di attuare questo contatto, per mancata comunicazione, per mancata scelta del Pediatra da parte della coppia o per altri motivi. Anche in caso di identificazione, può darsi l'evenienza che non si disponga delle competenze necessarie e la probabilità che non si abbiano conoscenze sull'attività di screening operativa su scala locale. C'è quindi un momento di grave criticità nella procedura di controllo e conferma che non può essere bypassata affidando direttamente tali responsabilità all'equipe specializzata. Il Concetto di Medical Home usato negli USA (1) non appare facilmente attuabile nel contesto nazionale ma certamente appare indispensabile una ampia discussione tra le Società interessate al fine di definire una ipotesi di lavoro.

Il flusso di pazienti (falsi positivi e veri positivi in questo caso pongono problemi simili alla struttura clinica e, per brevità vengono considerati assieme) che origina dall'applicazione sul campo dello screening esteso incontra la struttura pediatrica a quattro livelli diversi: a) un livello di base, rappresentato dal pediatra di base e dal responsabile della Maternità di partenza; b) un livello intermedio, lo specialista in malattie metaboliche pediatriche a cui si deve necessariamente fare riferimento per la fase propriamente diagnostica e di impostazione terapeutica; c) un livello di struttura clinica integrata (reparto degenza ordinaria e reparto terapia intensiva/subintensiva) d) un livello di specialisti diversi (genetista medico, patologo clinico, specialista in endocrinologia e metabolismo etc).

Si tratta naturalmente di contesti molto diversi tra di loro e molto differenziati al loro interno: sì che il successo di un programma di screening esteso non dipende solo dalla sua coerenza interna, ma soprattutto dall'efficacia del rapporto tra screening e situazione locale. Il processo di innovazione della pratica pediatrica innescato dai programmi avanzati, come gli screening estesi, va accuratamente indirizzato e governato per ottenere i maggiori benefici per l'utente e il massimo delle ricadute innovative per la struttura che lo accoglie.

Non è naturalmente questa la sede per una discussione comparativa sui modelli di assistenza pediatrica in funzione in EU o in USA. Il concetto di "Medical Home" del sistema USA ha un suo omologo in EU e in Italia nella definizione del Pediatra di base responsabile che, naturalmente non può che essere il primo punto di riferimento nei rapporti tra CSN e popolazione sottoposta allo screening esteso.

Nella seguente tabella vengono identificati alcuni dei principali punti funzionali dello screening esteso con i responsabili primari e secondari. Le soluzioni operative dovranno tenere conto delle specifiche situazioni locali, molto differenziate, essendoci Regioni senza Centri screening e altre senza strutture cliniche esperte nel settore. Il livello di organizzazione e di programmazione complessivo non potrà quindi che comprendere una valutazione territoriale "allargata" che, indipendentemente dai confini amministrativi, consenta il più rapido e semplice accesso alle risorse diagnostiche e terapeutiche.

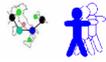
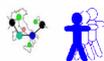


Tabella 11 Fasi e responsabilità dell'operazione di screening esteso

Fase	Azione	Responsabile
Screening	Raccolta e invio campione al CSN	1. responsabile punto nascita 2. pediatra curante
	Mancato consenso allo screening / dichiarazione scritta di dissenso	1. responsabile punto nascita
	Accertamento esecuzione screening / segnalazione non esecuzione	1. pediatra curante
	Comunicazione risultati negativi	1. CSN
	Richiesta ripetizione per campioni non validi	1. CSN
Richiamo	Segnalazione basso/alto rischio a genitori ,pediatra curante , resp maternità	1. CSN
Follow-up a breve termine	Definizione linee di azione predefinite (ACT sheets)	1. Società Scientifiche 2.CSN 3.Responsabili Amministrativi
	Valutazione risultati	1. Responsabile clinico CSN 2.Pediatra curante 3. Specialista
	Rapporto e informazione genitori	1. CSN 2.Pediatra curante
Diagnosi e follow up a lungo termine	Integrazione del team clinico specialistico	Specialista + Pediatra curante + subspecialisti +etc.
	Comunicazione diagnosi al CSN o ai Registri Nazionali	1.Team specialistico 2. pediatra curante
	Sviluppo del piano di trattamento	1.Team specialistico
	Informazione/educazione famiglia	1.Team specialistico
	Monitoraggio trattamento	1.Team specialistico
	Ricoveri per episodi acuti	1.Team specialistico
	Counseling genetico	1.Team specialistico
Transizione alla cura dell'adulto	1.Team specialistico	
Contatti con Associazioni di Pazienti	Team specialistico +CSN	

Tabella 12 Competenze cliniche da implementare e integrare nel sistema di screening e follow up

figura	Compito	Mezzi
Pediatra curante	Acquisisce conoscenze di base sullo screening esteso	ECM , Congressi , articoli sui giornali e bollettini degli Ordini e Associazioni professionali ,materiali vari , interventi di Associazioni di Pazienti
	Acquisisce conoscenze di base sulle patologie oggetto di screening	
	Connettersi ai referenti locali dello screening	
	Connettersi agli specialisti di riferimento	
	Identifica i possibili soggetti non sottoposti allo screening e ne preleva i campioni	Rapporti con il CSN
	Acquisisce la diagnosi e sovrintendere al follow-up a lungo termine	Rapporto con il pediatra specialista
Ostetrico	Informa direttamente e con materiali appositi (multilinguali)le famiglie	
	Conosce l'operazione di screening neonatale	ECM , disposizioni delle Dirazioni Sanitarie , materiali illustrativi da consegnare alla gestante
Resp. maternità	Informa la gestante e ne ottiene il consenso o dissenso con le procedure previste	
	È responsabile del prelievo con i tempi e modi previsti	ECM , disposizioni delle Direzioni Sanitarie, materiali illustrativi , seminari con i CSN e con i pediatri Specialisti
	Richiama i soggetti non sottoposti allo screening	
	Assistere il CSN nel Follow up e nell'identificazione e recupero dei soggetti che non hanno risposto	



	Registra sulla scheda di dimissione se lo screening è stato correttamente eseguito nei casi in cui non ci sia un dissenso registrato nei modi previsti	
	Assicura alle famiglie la distribuzione dei materiali informativi sullo screening	
Pediatra specialista	Imposta diagnosi e follow up del paziente con risultati out-range allo screening Coordina le attività diagnostiche e terapeutiche dei diversi specialisti interessati e ne condivide i risultati con il pediatra curante Imposta con il pediatra di base e con la famiglia la condivisione dei ruoli nel trattamento del paziente con particolare riguardo alle possibilità di episodi critici Collabora con il CSN e con i Registri di pazienti ai fini di un accurato feed-back dei dati Collabora con il CSN e con le Associazioni di pazienti per la preparazione dei materiali indispensabili a diffondere le conoscenze nel settore Collabora con il CSN per definire il contenuto dei materiali per il richiamo (ACT sheets) Collabora alla gestione del paziente in caso di ricovero Imposta la transizione alla cura dell'adulto	ECM , Congressi , seminari con il CSN e con i Pediatri di base . Partecipazione a gruppi di lavoro ad hoc con CSN etc
Struttura degenza	Assicura il ricovero e la terapia in caso di necessità e in particolare in caso di crisi metaboliche Interviene in stretta correlazione con il Pediatra Specialista	Identificazione delle strutture: DEA secondo livello , Terapia intensiva neonatale , terapia intensiva pediatrica
Controllo del sistema clinico	La Regione monitorizza i flussi di informazione e di pazienti Raccolta e controllo delle procedure e dei protocolli clinici e di laboratorio usati nello screening Approva i materiali usati nella comunicazione con i Pazienti e gli Operatori Organizza i corsi di aggiornamento per gli operatori del settore Favorisce , anche in collaborazione con le Università la formazione di pediatri e altri operatori specialisti nel settore Controlla e valuta costi e benefici del sistema	Gruppo di lavoro ad hoc (Assessorato,CSN, Pediatri Specialisti,Pediatri di base)

BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

1. American Academy of Pediatrics, Ad Hoc Task Force on Definition of the Medical Home. The medical home. Pediatrics. 1992;90:774
2. Newborn screening Authoring Committee : newborn screening expands: Recommendations for pediatricians and Medical Homes implications for the system – Pediatrics 2008;121:192-217

8.2.2 Informazione agli Utenti e agli Operatori di base

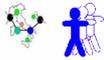
L'informazione alle famiglie costituisce un prerequisito per il successo di qualsiasi programma di screening.

L'informazione deve essere fornita prima e dopo la nascita, oltre che , naturalmente nel corso del follow up e la quantità di informazione fornita condiziona il funzionamento complessivo del programma.(1)

Tra i molti mezzi di informazione si è dimostrato in alcuni casi particolarmente efficace per l'informazione durante il follow up l'uso di questionari (2) , che istituiscono un contatto che aiuta notevolmente nel passaggio di informazioni.

RACCOMANDAZIONI

Le modalità di comunicazione debbono avere le caratteristiche , nel caso della trasmissione verso l'utenza , di una campagna di informazione , promossa dagli Assessorati alla Sanità e condotta dalle Associazioni dei Pazienti , dalle Associazioni professionali , dalle società scientifiche e, in una parola da tutte le associazioni del terzo settore .



*Si raccomanda di utilizzare materiali informativi uniformi e se possibili concordati con gli Assessorati . E' auspicabile , anche se di difficile attuazione nella realtà Italian attuale che tutti i Centri utilizzino moduli uniformi di comunicazione e di refertazione e si raccomanda l'istituzione di un Gruppo di Lavoro ad hoc .
Un modello di notevole interesse è quello degli ACT sheets.*

Screening : MODALITA' COMUNICAZIONE E INFORMAZIONE UTENZA	
Grado evidenza	B
Forza raccomandazione	3

Il passaggio dallo stadio degli studi pilota alla fase dello screening implementato sul campo è caratterizzato dalla acquisizione delle potenzialità messe disposizione da parte dell'utenza e da parte degli operatori di base .Nel caso degli Operatori di base devono essere attivati corsi di aggiornamento con crediti ECM , rivolti a medici generici , pediatri di base, neonatologi, operatori nelle maternità e nei reparti di pediatria e neonatologia. Indispensabile la partecipazione delle Società scientifiche e delle associazioni professionali, possono essere tenuti con un format uniforme su tutto il territorio nazionale.

1. Clayton EW. Symposium: legal and ethical issues raised by human genome project, screening and treatment of newborns. *Houston Law Rev.* 1992;29:85–148
2. Penn TO, Gibson B. Utilization of a questionnaire to provide follow-up services in an infant hearing screening program. *J Am Acad Audiol.* 1994;5:325–329
3. American Academy of Pediatrics, Newborn Screening Task Force. (2000) Serving the family from birth to the medical home: newborn screening a blueprint for the future. *Pediatrics* 106:389-427.

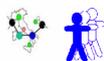
8.2.3 La quantità e la qualità dell'informazione prodotta dallo screening

I punti chiave sono i seguenti :

1. La sensibilità e specificità diagnostica dei metodi usati nello screening deve essere incrementata:
 - a. migliorando le caratteristiche dei metodi analitici, rendendoli più sensibili nei confronti di alterazioni patologiche meno massive.
 - b. assicurando il necessario feed-back derivante dal follow-up dei casi veri positivi, falsi positivi e falsi negativi attraverso la creazione di registri dei casi a livello nazionale e attraverso la circolazione tra i diversi laboratori dei campioni di spot positivi allo screening.
 - c. con valutazioni di consenso e proficiency testing.
2. Occorre investire in personale medico di supporto allo screening che sia in grado di interpretare rapidamente i livelli di rischio derivati dalle procedure di analisi metabonomica
3. Occorre investire nella riduzione del tempo di screening, valutando, in considerazione dei problemi dovuti alle disfunzioni postali, la possibilità di vie diverse per l'adduzione dei campioni al centro.
4. occorre formalizzare e rendere obbligatorio il feedback ai centri screening da parte degli Operatori Clinici e laboratoristici di secondo e terzo livello, al fine di attivare una sorta di espertizzazione del processo di screening.

8.2.4 Il feed back per il controllo degli obiettivi

Il programma di screening migliora le sue caratteristiche operative e dimostra la sua utilità sociale attraverso una accurata analisi dei costi, dei benefici, dell'efficienza e dell'efficacia e del contributo all'avanzamento della medicina preventiva. Non è questa la sede per la discussione dei costi e dei benefici e sui metodi per il loro accertamento , peraltro ben lungi dall'essere universalmente accettati. Si rimanda quindi alle seguenti reviews, (1-11) al fine di produrre un modello di analisi dei costi personalizzato sulle esperienze italiane.



Ci si limita, in questo contesto, al rilievo che lo screening esteso, per la sua stessa complessità, richiede meccanismi di controllo stringenti e centrati sul concetto di controllo dei costi e di qualità totale.

Il concetto di qualità totale nel funzionamento di un programma di screening è stato proposto da molti anni (12,13) e in generale si basa su parametri di equità delle possibilità di accesso, efficienza, efficacia, centralità del paziente e sua soddisfazione. Nel caso di programmi di screening, in cui il contatto col paziente avviene solo in caso di controlli, una valutazione accurata sembra essere più complessa; mentre nell'era dei programmi per due-tre malattie era relativamente semplice registrare le performances del programma, con il passaggio allo screening esteso la notevole complessità del sistema, la sua sperimentalità, la relativamente scarsa esperienza di molti laboratori nel settore rendono indispensabili procedure di controllo molto strette (14).

Mentre per il lavoro in laboratorio gli standard di qualità interni sono evidentemente definibili anche solo in termini di “buona pratica” e di CQ, per il programma nel suo complesso occorre sviluppare dei parametri di controllo che siano in grado di monitorare fasi diverse del processo e riconducibili a tre principali tipologie:

- a. Un processo di benchmarking per quanto riguarda sensibilità e specificità diagnostica, efficienza ed efficacia, costo e beneficio.
- b. Un processo di auditing periodico che consenta di tenere sotto controllo il long term follow up (versante clinico) e il processo di innovazione innescato dallo screening.
- c. Un processo di accreditamento complessivo del sistema; a questo riguardo ricordiamo che gli standards comunemente accettati per i Laboratori di Patologia Clinica (CLIA-88; ISO1589) possono essere allargati sul processo di screening nel suo complesso.

In diverse linee guida specifiche (US Council of Regional Networks, Therrel,1992; Human genetic Society of Australasia, HGSA 2004;14) sono presenti indicazioni relative ai criteri e procedure di benchmarking e auditing. Un lavoro molto recente Therrel (15, 16) ha definito una procedura di auditing applicabile alla screening esteso (PEAS).

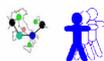
La valutazione della qualità e dell'efficienza del sistema nel suo complesso e in particolare della parte extra-laboratoristica naturalmente ha un limite essenziale, nel nostro Paese nella mancanza della definizione degli obiettivi e delle prescrizioni operative da parte di una qualsivoglia Autorità sovraordinata. Un pericolo concreto potrebbe peraltro essere quello di interventi normativi regionali differenti, che renderebbero di difficile attuazione il benchmarking e l'auditing.

BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

1. US Congress, Office of Technology Assessment. Data and methods used in OTA's cost-effectiveness analysis of strategies for newborn screening. In: *Healthy Children: Investing in the Future*. Washington, DC: US Government Printing Office; 1988: 236–241. Publication OTA-H-345.
2. Cairns J, Shackley P. Sometime sensitive, seldom specific: a review of the economic of screening. *Health Econ* 1993;2:43–53.
3. Weinstein MC, editors. *Cost-effectiveness in health and medicine*. New York: Oxford University Press;1996. pp. 247–75.
4. Pollitt RJ, Green A, McCabe CJ, Booth A, Cooper NJ, Leonard JV, et al. Neonatal screening for inborn errors of metabolism: cost, yield and outcome. *Health Technol Assess* 1997;1(7).
5. Lord J, Thomason MJ, Littlejohns P, Chalmers RA, Bain MD, Addison GM, et al. Secondary analysis of economic data: a review of cost-benefit studies of neonatal screening for phenylketonuria. *J Epidemiol Community Health* 1999;53:179–86.
6. Insinga RP, Laessig RH, Hoffman GL. Newborn screening with tandem mass spectrometry: examining its cost-effectiveness in the Wisconsin Newborn Screening Panel. *J Pediatr*. 2002;141: 524–531
7. Schoen EJ, Baker JC, Colby CJ, To TT. Cost-benefit analysis of universal tandem mass spectrometry for newborn screening. *Pediatrics*. 2002;110:781–786
8. Washington State Department of Health. Least Burden and Cost Benefit Analysis, Newborn Screening for Metabolic Disorders, WAC 246-650; August 12, 2003. Available at: www.sboh.wa.gov/Meetings/Meetings_2003/2003-10_15/documents/Tab09-NBS_analysis.pdf.
9. PriceWaterhouseCoopers. *Newborn Screening Programs: An Overview of Cost and Financing*. New York, NY: Price WaterhouseCoopers; 2002. Available at: www.marchofdimmes.com/files/FinalReport2.pdf.



10. Carroll AE Downs SM Comprehensive cost-utility analysis for newborn screening strategies *Pediatrics* 117: S287-295 2006
11. Pandor A, Eastham J, Chilcott J, Paisley S, et al. (2006) Economics of tandem mass spectrometry screening of neonatal inherited disorders. *Int J Technol Assess Health Care* 22:321-326.
12. Pandor A, Eastham J, Beverley C, Chilcott J, et al. (2004) Clinical effectiveness and cost-effectiveness of neonatal screening for inborn errors of metabolism using tandem mass spectrometry: a systematic review. *Health Technol Assess* 8:1-121. Appendix 47
13. Forsberg SA (1997) Infant metabolic screening: a total quality management approach. *J Obst Gynecol Neonatal Nurs* 26: 257–261.
14. Therrell B, Hannon H (2006) National Evaluation of newborn screening system components. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 12: 236–245.
15. Therrell B (2007) Program Evaluation and Assessment Scheme (PEAS). <http://genes-r-us.uthscsa.edu/PEAS.doc>
16. HGSA (2004) Policy Statement: Newborn Screening. Alexandria, VIC: Human Genetics Society of Australasia. www.hgsa.com.au.



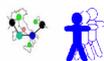
9. ANALISI DEI COSTI

L'analisi dei costi relativi allo screening neonatale, sia tradizionale sia esteso è resa molto complessa dal numero di fattori da considerare, come si dimostra dalla notevole variabilità dei dati riportati in letteratura (pwc, Carroll 2006, Pandor 2004 dimostrano una variazione di 4 o 5 volte tra la stima minima e quella massima). Ciò non deve stupire, in quanto il metodo di rilevazione è spesso molto diverso e, soprattutto le caratteristiche dell'organizzazione di base (quali ad esempio la produttività del personale, la disponibilità di facilities diverse, i tempi di liquidazione etc) sono estremamente differenziate tra EU e USA e tra queste e il nostro Paese. Senza voler impostare il problema in termini di rapporto tra costo e beneficio, ci si limita, in questa sede, alla mera valutazione dei costi e, tra questi si prendono in esame solo quelli direttamente valutabili in maniera precisa.

In linea di larga massima la struttura dei costi è quella indicata nella tabella seguente.

Tabella 13 tipologia generale dei costi per lo screening allargato

Tipologia del costo	Descrizione	Caratteristiche
1. costi indiretti organizzativi	Relativi alle procedure di prelievo, di invio dei campioni, di richiesta dei cartoncini, di archiviazione dei referti, di richiamo del controllo	Afferiscono al SSN attraverso le ASL e gli Ospedali che raccolgono i campioni
2. costi indiretti sanitari	Relativi a controlli clinici sul paziente richiamato	Afferiscono al SSN attraverso le ASL e i Pediatri curanti
3. costi diretti : informazione del pubblico e degli operatori	Non valutabili	Da considerare come una componente di spesa essenziale e da prevedere non come una tantum
4. costi diretti : personale	Valutabili correlativamente all'attività svolta e alla pianta organica di personale necessaria	Hanno prevalentemente un valore indicativo e una funzione di benchmarking
5. costi diretti : impianti laboratoristici	Valutabili in linea di massima, ma scarsamente significativi	Gli impianti si considerano comunque esistenti ed acquisiti
6. Costi diretti : investimenti in apparecchiature	Valutabili con precisione	Ammortamento a 4 anni
7. Costi diretti : manutenzioni apparecchiature	Valutabili con precisione	8% del valore di investimento /anno
8. costi diretti : Reagenti e consumabili	Valutabili con precisione	Prezzi di listino, di kit commerciali certificati; on si considerano riduzioni derivanti da appalti o da service
9. costi diretti : controllo di qualità	Valutabili con precisione	Interno ed esterno, nazionale ed internazionale
10. costi diretti : Sistema informativo	Valutabili con precisione	Hardware e software, implementazione e manutenzione
11. costi diretti : Guthrie Cards	Valutabili con precisione	Modello standard



12. Costi diretti : modulistica	Valutabili con precisione	Modulistica concordata con Assessorati
13. Costi diretti :spese postali	Valutabili con precisione	Richiami , controlli , invio pacchi
14. Costi diretti :spese telefoniche	Valutabili con precisione	Contatti con utenti e Operatori periferici
15. Costi diretti: pulizie	Valutabili approssimativamente	In base all'area del Laboratorio
15. Costi diretti: aggiornamento del personale	Valutabili approssimativamente	7 giorni di aggiornamento /anno /unità
16. Costi diretti : spese generali dell'Azienda	Valutabili approssimativamente	Variabili , di difficile standardizzazione

E tra questi diversi costi si prendono in esame , in questa sede solo quelli da 6 a 14.

Lo sviluppo della spesa relativa è effettuato nella tabella seguente, sulla base dei criteri sotto elencati:

1. Le spese sono relative alla implementazione del programma su un laboratorio già esistente e che a) esegue lo screening su una popolazione di almeno 50.000 campioni b) che è nelle condizioni precedentemente indicate ai punti 6.1,7.1 e 7.2. Non sono ovviamente applicabili a laboratori organizzati ex novo.
2. La spesa del personale è valutata, per un programma di 50.000 neonati, utilizzando il Modello LUISS per la valutazione degli organici laboratoristici, con la modifica di considerare il tempo necessario in minuti per ciascun analita pari a 1.03 minuti invece dei 2.8 minuti considerati dal lavoro LUISS per singolo analita nel normale lavoro laboratoristico. Su questa base viene calcolato l'organico necessario e si valuta il costo (n termini di retribuzione media netta della figura professionale interessata x 2). Sono considerate le spese relative alla consulenza medica per lo short term follow up (valutabile, su 50.000 neonati in circa il 50% del tempo di un Dirigente Medico). Il personale ausiliario è addetto allo smistamento dei cartoncini e all'inserimento nel programma informatizzato dei dati, all'archiviazione e ai rapporti con le strutture periferiche.
3. Le spese di investimento sono naturalmente calcolate nell'ipotesi di disporre comunque di un laboratorio già in funzione sia per lo screening sia per la conferma, con le dimensioni precedentemente indicate.
4. Gli ammortamenti delle apparecchiature sono calcolati su un periodo di 4 anni invece dei 5 comunemente considerati, in ragione della forte dinamica di innovazione del settore.
5. Non sono considerati i costi relativi alla (indispensabile) linea analitica dell'analisi mutazionale, in ragione del fatto che tale struttura è pensabile solo in termini di rete nazionale organizzata in correlazione con quella della Malattie Rare.
6. Il passaggio dai costi teorici a quelli effettivi può essere facilmente calcolato una volta siano conosciuti quali e quanti CSN saranno attivati e le rispettive dotazioni di risorse

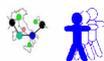


Tabella 14 sviluppo della spesa di base per un programma di screening esteso su un bacino di utenza di 50.000 neonati/anno

CALCOLO ORGANICO NECESSARIO PER : 50.000 NEONATI X 44 ANALITI		2.367.000 PRESTAZIONI/ANNO, VALORE VIRTUALE TARIFFARIO 9.256.320 €				
fattori x definizione organico (LUISS ,1996)	direttore	dir laur	dir tecnici	pers tecnico	pers ausiliario	TOTALE
attività diagnostica in laboratorio in minuti x analita	0,03	0,20	0,20	0,40	0,20	
fattore attività gestionali e controllo (Incremento %)	0,30	0,15	0,05	0,00	0,00	
ore totali /anno	1.539	9.074	8.285	15.780	7.890	42.567
unità personale stimate	0,86	5,08	4,64	8,84	4,42	23,83
costo annuale teorico per singola unità	140.000	80.000	60.000	45.000	50.000	
costo reale del personale	120.603	406.428	278.315	397.592	220.885	1.423.823
INVESTIMENTI E RELATIVE MANUTENZIONI	costo unitario				Ammort/ann	
SPESA TOTALE E ANNUALE PER INVESTIMENTI					1.039.000	259.750
manutenzioni = 8% del valore investimento/anno						83.120
REAGENTI ,CONSUMABILI , CONTROLLI DI QUALITA'	potenz. anal /KIT	costo con IVA			totale x anno	
AMINOACIDI E ACILCARNITINE IN MSMS	1.400	9.504			339.429	
GALATTOSIO IN FLUORIMETRIA	750	2.228			148.533	
TRIPSINA IMMUNOREATTIVA IN DELFIA	750	3.561			237.400	
TSH IN DELFIA	850	2.504			147.294	
REAGENTI VARI PER CONFERMA (AA,OA)					25.000	
CONSUMABILI DIVERSI					15.000	
SPESA TOTALE PER REAGENTI E CONSUMABILI					912.656	912.656
CONTROLLI DI QUALITA'						
totale CQ		8.600			8.600	8.600
SISTEMA INFORMATICO	investim.	ammort, annuale				
SPESA TOTALE E ANNUALE PER IL SISTEMA INFORMATICO	67.000	27.050				27.050
MODULISTICA SPESE POSTA , TELEFONO E ARCHIVIAZIONE	UNITARIO	TOTALE				
GUTHRIE CARDS	0,7	35.000				
MODULISTICA VARIA : Referti , richiami etc		7.000				
spese postali in/out		6.000				
spese telefoniche		2.000				
archiviazione schede e cards	0,05	2.500				
TOTALE		52.500				52.500
SPESA TOT/ ANNO SU 50.000 CAMPIONI						2.767.499
SPESA PER CAMPIONE						55,35
RAPPORTO VALORE VIRTUALE/SPESA						3,34

