

COLABORACIÓN ESPECIALRecibido: 5 de octubre de 2020
Aceptado: 26 de octubre de 2020
Publicado: 16 de diciembre de 2020**IMPACTO DE LA INCLUSIÓN DE PRUEBAS DE SEGUNDO NIVEL EN EL PROGRAMA DE CRIBADO NEONATAL DE CATALUÑA Y EN OTROS PROGRAMAS INTERNACIONALES****Sonia Pajares García (1,2), Rosa M^a López Galera (1,3), Jose Luis Marín Soria (1), Ana Argudo Ramírez (1), Jose Manuel González de Aledo-Castillo (1), Antonia Ribes Rubió (1,2,3), Blanca Prats Viedma (4), Laia Asso Ministral (4) y Judit García-Villoria (1,2,3)**

(1) Sección Errores Congénitos del Metabolismo-IBC. Servicio de Bioquímica y Genética Molecular. Hospital Clínic de Barcelona. Barcelona. España.

(2) Ciber de Enfermedades Raras (CIBERER). España.

(3) Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS). Barcelona. España.

(4) Servicio de Salud Materno-infantil. Subdirección General de Promoción de la Salud. Agencia de Salud Pública de Cataluña. Departamento de Salud. Generalitat de Catalunya. Barcelona. España.

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de interés.

RESUMEN

Fundamentos: Los programas de cribado neonatal (PCN) han experimentado un gran avance cualitativo debido a la implementación de la espectrometría de masas en tándem. Sin embargo, las pruebas utilizadas dan lugar a falsos positivos (FP) generando una excesiva solicitud de segundas muestras con la consiguiente ansiedad de las familias. Con el fin de evitar este problema diversos programas han desarrollado pruebas de segundo nivel (2TT).

Métodos: En este artículo se presenta nuestra experiencia en la implementación de 2TT en el PCN de Cataluña, así como en otros programas internacionales.

Resultados: Desde el año 2004 hasta la actualidad se han desarrollado pruebas de 2TT para más de 30 enfermedades. La utilización de 2TT ayuda a disminuir la tasa de FP y aumentar el valor predictivo positivo (VPP). En el PCN de Cataluña, la implementación de 2TT para la detección de acidemias metilmalónicas y propiónica, homocistinurias, jarabe de arce y citrulinemia, ha conseguido aumentar el VPP a un 95% y disminuir la tasa de FP a menos del 0,01%. En la fibrosis quística la aplicación de 2TT aumenta ligeramente el VPP pero con disminución significativa de la solicitud de segundas muestras y de los casos referidos a las unidades clínicas.

Conclusiones: La introducción de los 2TT en los PCN permite reducir considerablemente los FP, disminuye el número de muestras solicitadas, así como la ansiedad y el estrés de las familias, a la vez que se reducen los costes hospitalarios y se aumenta el VPP, mejorando notablemente la eficiencia de los PCN.

Palabras clave: Cribado neonatal, Marcador de segundo nivel (2TT), Espectrometría de masas, Inmunoanálisis, Enfermedades metabólicas hereditarias, Fibrosis quística, Enfermedades lisosomales, X-ALD, Hiperplasia suprarrenal congénita, Inmunodeficiencia combinada grave.

ABSTRACT**Impact of the inclusion of second-tier tests in the newborn screening program of Catalonia and in other international programs**

Background: Newborn screening programmes (NBSP) have experienced a qualitative breakthrough due to the implementation of tandem mass spectrometry. However, the tests used give rise to false positives (FP) generating an excessive request for second samples with the consequent anxiety of the families. In order to avoid this problem several programmes have developed second-tier tests (2TT).

Methods: This article presents our experience in the implementation of 2TT in the NBSP of Catalonia, as well as in other international programmes.

Results: From 2004 to the present, 2TT tests have been developed for more than 30 diseases. The use of 2TT helps to decrease the FP rate and increase the positive predictive value (PPV). In the NBSP of Catalonia, the implementation of 2TT for the detection of methylmalonic and propionic acidemias, homocystinurias, maple syrup disease and citrulinaemia, has managed to increase the PPV to 95% and decrease the PF rate to less than 0.01%. In cystic fibrosis, the application of 2TT slightly increases PPV but with a significant decrease in the request for second samples and in the number of cases referred to clinical units.

Conclusions: The introduction of 2TT in the NBSP allows to reduce considerably the FP, decreases the number of requested samples, as well as both anxiety and stress of the families, at the same time that the hospital costs are reduced and the PPV is increased, improving notably the efficiency of the NBSP.

Key words: Newborn screening, Second-tier test, Mass spectrometry, Immunoassay, Inherited metabolic diseases, Cystic fibrosis, Lysosomal diseases, X-ALD, Congenital adrenal hyperplasia, Severe combined immunodeficiency.

Correspondencia:
Judit García Villoria
Sección de Errores Congénitos del Metabolismo-IBC
Servicio de Bioquímica y Genética Molecular
Hospital Clínic de Barcelona
C/ Mejía Lequerica, s/n
Edificio Helios III, planta baja
08028 Barcelona, España
jugarcia@clinic.cat

Cita sugerida: Pajares García S, López Galera RM, Marín Soria JL, Argudo Ramírez A, González de Aledo-Castillo JM, Ribes Rubió A, Prats Viedma B, Asso Ministral L, García-Villoria J. Impacto de la inclusión de pruebas de segundo nivel en el programa de cribado neonatal de Cataluña y en otros programas internacionales. Rev Esp Salud Pública. 2020; 94: 16 de diciembre e202012158.

INTRODUCCION

El Cribado Neonatal (CN) es un programa de prevención secundaria en salud pública, dirigido a identificar precozmente los recién nacidos (RN) afectados por determinadas enfermedades, con el fin de realizar un diagnóstico precoz y un tratamiento adecuado para prevenir complicaciones y secuelas adicionales, además de garantizar una mejor calidad de vida en el RN.

El primer programa de cribado neonatal (PCN) universal se inició en Massachusetts en 1963 con la detección de la fenilcetonuria (PKU) y diversos países comenzaron a partir de entonces a establecer sus propios programas.

En los años 90, los PCN experimentaron un importante salto cuantitativo y cualitativo con la introducción de la espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Ésta es una técnica analítica que permite la identificación y cuantificación de compuestos en una muestra biológica según la relación masa/carga. Esta metodología fue uno de los factores desencadenantes de la revisión y expansión de los PCN en todo el mundo, ya que permitía la medición simultánea de varios metabolitos y en consecuencia, la detección de varias enfermedades en una misma muestra y en un único análisis^(1,2). Además, la espectrometría de masas ha permitido la medida de relaciones entre varios analitos, mejorando así la especificidad del cribado⁽³⁾. Por esta razón esta técnica se utiliza actualmente en muchos PCN⁽⁴⁾.

Desde entonces, el alcance de los PCN ha seguido ampliándose de manera rápida hacia diferentes grupos de enfermedades tomando un papel importante, cada vez más, en la detección de entidades que pueden causar muerte prematura y que disponen de un tratamiento.

Sin embargo, igual que otras técnicas analíticas de laboratorio, las pruebas utilizadas en

los PCN también generan falsos positivos (FP). Por ello, en algunos laboratorios se han desarrollado segundos marcadores o pruebas de segundo nivel (del inglés *second tier-test* o 2TT), que se realizan en la primera muestra de sangre impregnada en papel del RN. La utilización de un 2TT permite, por un lado, disminuir el punto de corte (*cut-off*) del marcador primario y, en consecuencia, reducir al mínimo el número de falsos negativos (FN). Por otro lado, evita la solicitud de segundas muestras, disminuye la tasa de falsos FP y por ende, el número de RN referidos a las unidades clínicas de referencia (UCR), lo que implica un menor estrés y ansiedad familiar, así como una reducción de los costes derivados.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este artículo se presenta la experiencia de la implementación de los 2TT en primera muestra de sangre impregnada en papel en el PCN de Cataluña y una revisión de los 2TT utilizados en los PCN a nivel internacional.

Los 2TT se analizan en la muestra inicial tras la alteración de uno o varios marcadores primarios concretos. Existen dos categorías de 2TT: valoración del mismo analito identificado en el cribado inicial utilizando una metodología con mayor sensibilidad y especificidad o bien la valoración de otros marcadores más específicos no detectables en la prueba inicial.

La mayoría de 2TT analizados mediante MS/MS se realiza por un procedimiento con separación cromatográfica previa. Por otro lado, también hay que tener presente otras técnicas de análisis de 2TT como la inmunofluorescencia o la biología molecular.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El PCN de Cataluña se inició con la detección de la fenilcetonuria en el año 1969. En el año

1982 se amplió el programa con la detección del hipotiroidismo congénito y en el año 1999 se incorporó la detección de fibrosis quística.

En el año 2013, el cribado se amplió con la incorporación de 19 enfermedades metabólicas hereditarias mediante MS/MS. Dada la experiencia previa de otros PCN^(5,6,7,8), se consideró necesario incluir, desde su inicio, pruebas de 2TT en nuestro programa, con el fin de optimizar la eficiencia del mismo.

1) 2TT en sangre impregnada en papel para las enfermedades metabólicas hereditarias.

1.1) Acidurias orgánicas

1.1.1) 2TT para el aumento de propionilcarnitina (C3)

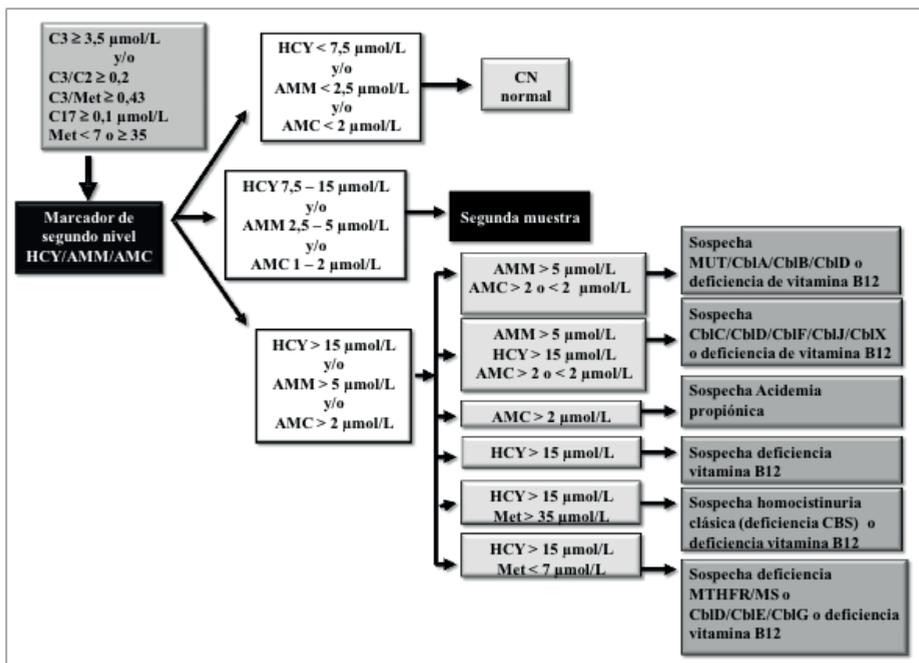
El incremento de C3 es el parámetro que genera mayor número de FP en el CN expandido. La especificidad analítica para este metabolito es relativamente baja para la detección de acidemia propiónica y acidemia metilmalónica con y sin homocistinuria, así como para los defectos de biotinidasa o de holocarboxilasa sintetasa, por lo que es necesaria la implementación de 2TT con la valoración de metabolitos más específicos para estas entidades. Las pruebas de 2TT que utilizan la mayoría de PCN incluyen la valoración de los ácidos metilmalónico (AMM), 3-hidroxi propiónico, metilcitrónico (AMC) y de homocisteína (HCY) mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS)^(5,6,7,8,9,10).

En el PCN de Cataluña, en el año 2015, se incluyó como prueba de 2TT el análisis simultáneo de AMM, AMC y HCY mediante ultracromatografía líquida (UPLC)-MS/MS. Se aplica la prueba de 2TT en la muestra inicial de los RN que presentan una alteración del marcador primario: incremento de C3, heptadecanoilcarnitina (C17), metionina (Met) baja, o elevada y/o alteración de las ratios relacionadas

(C3/acetilcarnitina (C2) y C3/Met), ver **figura 1**. Incluir esta estrategia nos permitió disminuir el *cut-off* de C3 a 3,5 $\mu\text{mol/L}$ evitando en lo posible el número de FN. Se decidió aplicar dicho valor en base a nuestra experiencia, debido a un FN de acidemia metilmalónica con homocistinuria tipo CblC, cuando se aplicaba un *cut-off* de 4,5 $\mu\text{mol/L}$. En la **tabla 1** se puede observar que nuestro programa tiene el *cut-off* de C3 más bajo en comparación con el resto, y en consecuencia, es el que tiene un mayor número de RN para aplicar 2TT: 14.831 recién nacidos (4,3%) de los 334.140 analizados durante el periodo 2015-noviembre 2019, mientras que en otros programas se realizan las pruebas de 2TT sobre un 0,2% de los RN. Con esta estrategia en 14.498 muestras no se encontraron alteraciones, evitando solicitar una segunda muestra en el 98% de los casos, reduciendo así la ansiedad y el estrés de las familias. Por otro lado, se ha disminuido notablemente la tasa de FP de un 4,1% a un 0,005% y se ha aumentado el valor predictivo positivo (VPP) del 1,4% a un 92% (**tabla 1**), resultados similares a los obtenidos en otros PCN^(6,8). En este periodo de tiempo se refirieron 233 RN a la UCR y se confirmó el diagnóstico en 213 pacientes, incidencia 1:1.568, (18 fueron FP y en 2 casos no se pudo localizar a la familia). Los diagnósticos confirmados fueron de 5 acidemias propiónicas (incidencia 1:66.828), 8 acidemias metilmalónicas sin homocistinuria con mutaciones en los siguientes genes: 4 *MUT*, 1 *MMAA*, 1 *MMAB*, 1 *ACSF3*, 1 *SUCLA2*, con una incidencia de 1:41.767, 3 acidemias metilmalónicas con homocistinuria con mutaciones en estos genes: 2 *MMACHC* y 1 *CD320*, con una incidencia de 1:167.070 y 193 casos con deficiencia de vitamina B12 adquirida (incidencia 1:1.731), es decir de causa no genética, que también se beneficiaron del programa.

En resumen, tal como se muestra en la **tabla 1**, la aplicación de 2TT disminuye considerablemente el número de FP y aumenta el VPP en todos los PCN.

Figura 1
Algoritmo diagnóstico para la detección de las acidemias metilmalónicas, acidemia propiónica y homocistinuria en el Programa de Cribado Neonatal de Cataluña.



AMC: ácido metilcátrico; AMM: ácido metilmalónico; C3: propionilcarnitina; C2: acetilcarnitina; C17: heptadecanoilcarnitina; CBS: cistationina-β-sintasa; CN: cribado neonatal; HCY: homocisteína; Met: metionina; MS: metionina sintasa; MTHFR: metilentetrahidrofolato reductasa; MUT: metilmalonil-CoA mutasa; CblA: acidemia metilmalónica tipo CblA; CblB: acidemia metilmalónica tipo CblB; CblC: acidemia metilmalónica con homocistinuria tipo CblC; CblD: acidemia metilmalónica con o sin homocistinuria tipo CblD; CblF: acidemia metilmalónica con homocistinuria tipo CblF; CblJ: acidemia metilmalónica con homocistinuria tipo CblJ; CblX: acidemia metilmalónica con homocistinuria tipo CblX; CblE: homocistinuria por defecto del metabolismo de cobalamina; CblG: homocistinuria por defecto del metabolismo de cobalamina.

Tabla 1
Impacto de los segundos marcadores para la detección de acidurias orgánicas mediante MS/MS en los Programas de Cribado Neonatal.

Marcador primario	Programa de cribado	Cut-off (µM)	Nº del RN del estudio	Nº o % de RN que se aplica 2TT	2TT (método)	Tasa FP sin 2TT %	Tasa FP con 2TT %	VPP sin 2TT %	VPP con 2TT %	Referencia
Aumento de C3: Propionilcarnitina	Toscana (Italia)	5,6	67.586	124 (0,18%)	3-hidroxi propiónico y metilmalónico (LC-MS/MS)	0,17	0	4	100	(6)
	Minnesota (EEUU)	5,25 (4)	176.819	3.556 (2,01%)	Ácidos metilmalónico, 2-metilcitróico y homocisteína (LC-MS/MS)	0,049	0,009	11	37 (60)	(5,7)
	Fukui (Japón)	3,6	65.000	16 (0,024%)	Ácido metilmalónico (GC-MS)	0,018	0	25	100	(8)
Aumento de C5: Isovaleril o 2-metilbutirilcarnitina	Cataluña (España)	3,5	334.140	14.831 (4,3%)	Ácidos metilmalónico, 2-metilcitróico y homocisteína (UPLC-MS/MS)	4,1	0,005	1,4	92	Datos no publicados
	Fukui (Japón)	0,6	146.000	1.065 (0,72%)	Isovalerilglicina (LC-MS/MS)	0,71	0	0,09	100	(8)
	Sheffield (R.Unido)	1	?	33	Isovalerilcarnitina, valerilcarnitina, 2-metilbutirilcarnitina y pivaloilcarnitina (UPLC-MS/MS)	24	8	38	100	(16)

2TT: prueba segundo nivel; FP: falsos positivos; GC-MS: cromatografía de gases-espectrometría de masas; LC-MS/MS: cromatografía líquida de alta resolución-espectrometría de masas en tándem; UPLC-MS/MS: ultra cromatografía líquida de alta resolución-espectrometría de masas en tándem; VPP: valor predictivo positivo.

1.1.2) 2TT para el aumento de isobutiril o butirilcarnitina (C4)

El incremento de C4 es marcador para la detección de la deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta (SCAD), de isobutiril-CoA deshidrogenasa (IBCD), de deficiencia múltiple de acil-CoA deshidrogenasas (MAD) y de encefalopatía con aciduria etilmalónica (ETHE1). Aunque no se especifica en la **tabla 1**, por falta de información poblacional, en Dallas (EE.UU.) aplican la separación de los isómeros: isobutirilcarnitina y butirilcarnitina mediante UPLC-MS/MS, con el fin de diferenciar entre las deficiencias de SCAD e IBCD(11). En la Clínica Mayo de Rochester, Minnesota (EE.UU.) valoran simultáneamente los ácidos etilmalónico, metilsuccínico, glutárico, 2-hidroxi-glutárico y 3-hidroxi-glutárico mediante LC-MS/MS, lo que permite diferenciar entre las entidades SCAD, ETHE1, aciduria glutárica tipo I y MAD. Recientemente se ha publicado un estudio realizado en California para la detección de la deficiencia de SCAD en el que demuestran que aplicar esta prueba de 2TT antes de realizar el estudio genético, reduce en un 50% los casos referidos a la UCR y mejora el VPP de la detección de la deficiencia SCAD por encima del 75%(12).

Actualmente en Cataluña estamos desarrollando una metodología de 2TT para el aumento de C4. Hasta su implementación, nuestra estrategia se basa en solicitar una segunda muestra de sangre impregnada en papel, para reanalizar el marcador primario y una muestra de orina impregnada en papel para realizar ácidos orgánicos y poder diferenciar entre estas entidades, aunque la única entidad detectada por aumento de C4 que está incluida en nuestro panel es la deficiencia de MAD.

1.1.3) 2TT para el aumento de isovaleril o de 2-metilbutirilcarnitina (C5)

El incremento de C5 es marcador primario para la detección de acidemia isovalérica,

2-metilbutirilglicinuria, la deficiencia de MAD y ETHE1. Sin embargo, esta acilcarnitina también puede verse aumentada con la administración de antibióticos (ya sea en el niño o en la madre) que contienen ácido pivalico en su estructura(13). Por otro lado, existen cremas para el cuidado del pezón que contienen ésteres de pantotenato, los cuales pueden pasar a la forma neopantotenato en el momento de succionar y detectarse en forma de pivaloilcarnitina(14) dando lugar a FP.

Las pruebas de 2TT mediante LC-MS/MS publicadas para la detección de estas entidades son la valoración de isovalerilglicina(8) o la separación cromatográfica de isovalerilcarnitina, valerilcarnitina, 2-metilbutirilcarnitina y pivaloilcarnitina(11,15,16).

En la **tabla 1** se muestra un ejemplo del impacto del uso de los 2TT en algunos países demostrando una mejora en la eficiencia de los PCN.

Actualmente en Cataluña estamos desarrollando una metodología de 2TT para el aumento de C5. Hasta su implementación, se solicita una segunda muestra de orina impregnada en papel, además de una muestra de sangre impregnada en papel, para realizar el análisis de ácidos orgánicos y poder diferenciar entre estas entidades.

1.1.4) 2TT para el aumento de glutarilcarnitina (C5DC)

En Rochester, Minnesota (EE.UU.), la valoración simultánea de los ácidos etilmalónico, metilsuccínico, glutárico, 2-hidroxi-glutárico y 3-hidroxi-glutárico mediante LC-MS/MS, permite diferenciar entre aciduria glutárica tipo I y deficiencia de MAD(12).

Actualmente en Cataluña estamos desarrollando una metodología de 2TT para el aumento de C5DC, hasta su implementación,

nuestra estrategia se basa en solicitar una segunda muestra de orina impregnada en papel, además de una muestra de sangre impregnada en papel, para analizar ácidos orgánicos y confirmar la orientación diagnóstica.

1.2) Trastornos de los aminoácidos

1.2.1) 2TT para la disminución o el aumento de metionina (Met)

La detección de niveles elevados de Met serían indicativos de una homocistinuria clásica (CBS) o de hipermetioninemia, mientras que la detección de niveles bajos podría ser compatible con un defecto en la remetilación de HCY o en el metabolismo de la vitamina B12. Sin embargo, existen causas inespecíficas que pueden dar lugar a falsas alteraciones de Met, por ello, el uso de 2TT para estos casos resulta de gran interés. En la mayoría de los PCN, al igual que en el nuestro (figura 1), se valora la HCY y AMM mediante HPLC-MS/MS para realizar el diagnóstico diferencial entre homocistinuria aislada y acidemia metilmalónica con homocistinuria^(5,7). Otros programas valoran únicamente la HCY para la detección de CBS⁽¹⁷⁾ o bien todos los aminoácidos mediante LC-MS/MS⁽¹⁸⁾.

En el PCN de Cataluña desde el 2015 hasta noviembre del 2019 se analizaron 334.140 RN, de los cuales 4.297 (1,3%) presentaron una alteración de Met, a los que se les aplicó la prueba de 2TT. Entre ellos, 31 presentaron una alteración de 2TT, se refirieron a la UCR y se confirmó el diagnóstico de 4 CBS (incidencia 1:83.535), 1 hipermetioninemia (incidencia 1:334.140) y 18 deficiencias de vitamina B12 adquiridas (la incidencia ya se ha incluido en el apartado 1.1.1). Se obtuvo también el diagnóstico de 2 enfermedades no incluidas en el programa: un paciente con deficiencia de deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada y una hemocromatosis neonatal. Finalmente, 2 casos fueron de diagnóstico incierto, uno de

ellos por no poder localizar a la familia y 5 casos fueron FP. Con dicha estrategia se consiguió reducir la tasa de FP del 1,3% al 0,001% y aumentar el VPP del 0,6% al 84%, siendo éste superior al de otros países⁽⁷⁾ (tabla 2). Esta diferencia podría explicarse por el *cut-off* aplicado al primer marcador y porque consideramos las deficiencias adquiridas de vitamina B12 como casos positivos.

Cabe destacar que algunos de los RN que presentaron disminución de Met fue debida a una mala conservación de la muestra por problemas en el transporte. Sin embargo, desde enero del 2020 se implementó en nuestro programa un transporte de muestras unificado desde todos los centros maternos al laboratorio. La mayoría de las muestras llegan antes de los 4 días tras su obtención, por lo que esperamos observar una disminución del número de pruebas de 2TT a realizar por disminución de Met.

1.2.2) 2TT para la elevación de aminoácidos ramificados

La enfermedad de jarabe de arce (MSUD) se caracteriza por el aumento de aminoácidos ramificados (leucina, isoleucina y valina) y de alloseucina, que es patognomónica de esta enfermedad. La metodología MS/MS utilizada en los PCN no consigue separar los aminoácidos isobáricos (Xleu): leucina, isoleucina, allo-isoleucina e hidroxiprolina. Por otro lado, los RN que reciben nutrición parenteral pueden presentar niveles elevados de aminoácidos ramificados lo que contribuye a la generación de FP. Por ello, el desarrollo de pruebas de 2TT para esta entidad ha sido esencial. Dicha prueba consiste en la separación cromatográfica de dichos aminoácidos por HPLC^(19,20) o bien en la valoración de todos los aminoácidos por LC-MS/MS⁽¹⁸⁾.

En nuestro programa en el año 2013 incluimos el análisis de todos los aminoácidos mediante cromatografía líquida de ultra-alta

Tabla 2 Impacto de los segundos marcadores para la detección de aminoacidopatías mediante MS/MS en Programas de Cribado Neonatal.										
Marcador primario	Programa de cribado	Cut-off (µM)	Nº de RN del estudio	Nº o % de RN que se aplica 2TT	2TT (método)	Tasa FP sin 2TT %	Tasa FP con 2TT %	VPP sin 2TT %	VPP con 2TT %	Referencia
Disminución o aumento de metionina	Minnesota (EEUU)	< 8 > 40	-	-	Homocisteína y ácidos metilmalónico, 2-metilcitrónico (LC-MS/MS)	0,049	0,008	11	60	(7)
	Cataluña (España)	< 7 > 35	334.140	4.297 (1,3%)	Homocisteína y ácidos metilmalónico, 2-metilcitrónico (UPLC-MS/MS)	1,3	0,001	0,6	84	Datos no publicados
Aumento Xleu (Leucina, isoleucina y allo-isoleucina)	Minnesota (EEUU)	200	20.620	0,45%	Leucina, isoleucina, allo-isoleucina, valina e hidroxiprolina (LC-MS/MS)	0,44	0,09	17	41	(19)
	Sidney (Australia)	350	51.566	205 (0,39%)	Leucina, isoleucina, allo-isoleucina y valina (UPLC-MS/MS)	?	0	?	100	(20)
Aumento de citrulina	Cataluña (España)	280	478.756	110 (0,03%)	Separación cromatográfica de todos aminoácidos (UPLC)	0,03	0	4,5	100	Datos no publicados
	Cataluña (España)	60	478.756	140 (0,04%)	Separación cromatográfica de todos aminoácidos (UPLC)	0,03	0,005	2,1	11	Datos no publicados

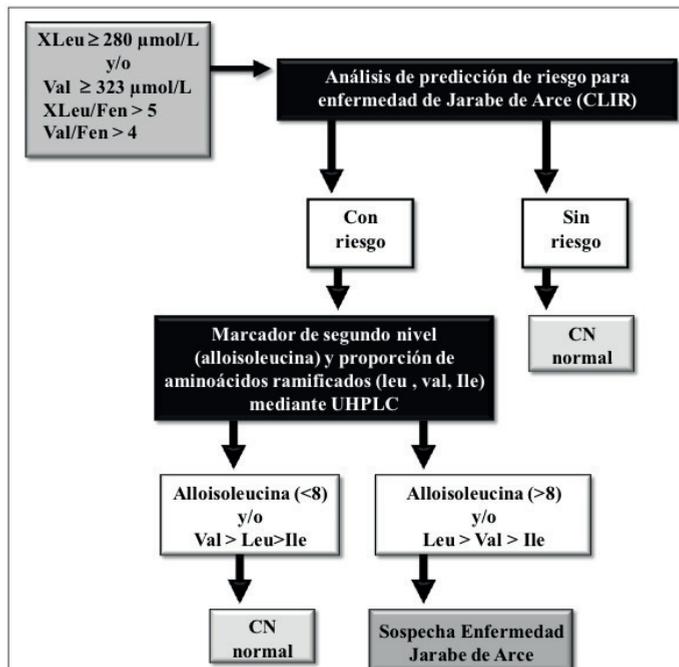
2TT: prueba segundo nivel; FP: falsos positivos; LC-MS/MS: cromatografía líquida de alta resolución-espectrometría de masas en tándem; RN: recién nacido; UPLC-MS/MS: ultra cromatografía líquida de alta resolución- espectrometría de masas en tándem; VPP: valor predictivo positivo.

resolución (UPLC) como prueba de 2TT. Este método se aplica cuando los marcadores primarios para la detección de MSUD: XLeu, valina (Val) y las relaciones XLeu/fenilalanina (Fen), Val/Fen se hallan aumentados (figura 2). De 478.756 RN analizados se observó un aumento de los marcadores primarios y se estudiaron los aminoácidos como 2TT en 110 muestras (0,03%), mostrando alteración sólo en 1 RN que se derivó a la UCR donde se confirmó el diagnóstico de MSUD (incidencia: 1:478.756). El impacto de la utilización de esta prueba también ha sido notable, consiguiendo una tasa de FP del 0% y un VPP del 100%,

de manera similar al programa de CN de Australia⁽²⁰⁾ (tabla 2).

Además cabe mencionar que la herramienta post-analítica CLIR (*Collaborative Laboratory Integrated Reports*)⁽²¹⁾, ha sido de gran utilidad para poder distinguir entre tratamiento con nutrición parenteral y casos de MSUD. Por ello, lo hemos incluido en nuestro algoritmo de trabajo (figura 2), reduciendo desde el inicio el número de muestras a las que se aplica el análisis de 2TT. Esta evidencia estaría en concordancia con otros PCN internacionales que así lo describen^(22,23), demostrando la utilidad de CLIR como 2TT.

Figura 2
Algoritmo diagnóstico para la detección de la enfermedad de jarabe de arce en el Programa de Cribado Neonatal de Cataluña.



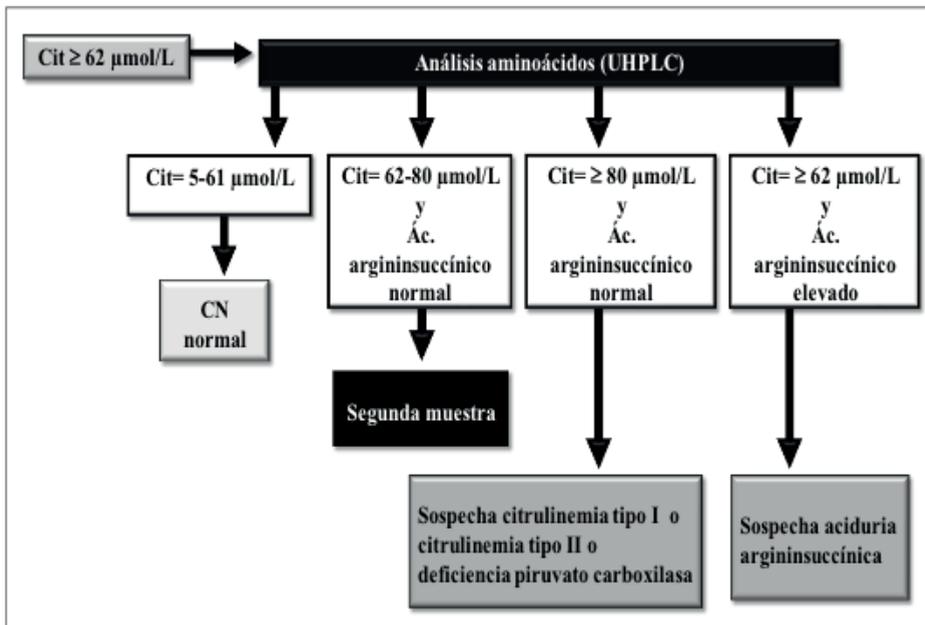
CN: cribado neonatal; CLIR: Collaborative Laboratory Integrated Reports; fen: Fenilalanina; Ile: isoleucina; Val: valina; UHPLC: cromatografía líquida de ultra-alta resolución; XLeu: leucina, isoleucina, alloisoleucina y hidroxiprolina.

1.2.3) 2TT para el aumento de citrulina

Concentraciones elevadas de citrulina detectadas en el PCN podrían asociarse a citrulinemia tipo I y tipo II, aciduria argininsuccínica o deficiencia de piruvato carboxilasa. Sin embargo, se han detectado aumentos de citrulina influenciados por el estado de la muestra, por saturación de la misma u otros factores que no hemos sabido identificar, dando lugar a FP. En el PCN de Cataluña cuando obtenemos un aumento de citrulina en primera muestra, se analiza como 2TT los aminoácidos mediante UPLC, comentado en el apartado anterior (figura 3).

Esta separación cromatográfica nos permite identificar con mayor especificidad la citrulina y, además, identificar si hay presencia de ácido argininsuccínico y aumento de alfa-alanina, pudiendo hacer un diagnóstico diferencial de las distintas entidades que cursan con elevación de citrulina. De 478.756 RN analizados se observó un aumento de citrulina en 140 casos (0,04%), en 29 de ellos se confirmó el aumento de citrulina mediante UPLC y se refirieron a la UCR. Se confirmó el diagnóstico de 3 citrulinemias tipo I (incidencia 1:159.585) y 1 aciduria argininsuccínica (incidencia 1:478.756). 25 fueron FP, siendo dos de ellos portadores de

Figura 3
Algoritmo diagnóstico para la detección de la citrulinemia en el Programa de Cribado Neonatal de Cataluña.



Cit: citrulina; CN: cribado neonatal; UHPLC: cromatografía líquida de ultra-alta resolución.

citrulinemia tipo I. Con la inclusión de la prueba de 2TT se ha conseguido disminuir la tasa de FP de un 0,03% a un 0,005 %, aumentando el VPP de un 2,1% a un 11% (tabla 2).

Cabe destacar que también utilizamos el análisis de aminoácidos por UPLC cuando obtenemos unos niveles de citrulina bajos en el cribado inicial. Con ello se ha conseguido diagnosticar 1 caso de deficiencia de carbamil fosfato sintetasa y 1 caso de deficiencia de N-acetilglutamato sintasa.

1.2.4) 2TT para el aumento de tirosina

El incremento de tirosina es el marcador primario para la detección de tirosinemia tipo I. Sin embargo, la tirosina a menudo se encuentra aumentada de forma transitoria y benigna en el RN, lo que genera FP. Por un lado, se detecta elevación de este aminoácido en la tirosinemia tipo II y tipo III (que en general no se incluyen en los PCN) y por otro, existen pacientes con tirosinemia tipo I cuyos niveles de tirosina son normales, por lo que lo óptimo es utilizar la succinilacetona como marcador primario. En Cataluña se escogió un kit que incluyera dicho metabolito en el cribado inicial. En Italia, a pesar de utilizar la succinilacetona como marcador primario, han desarrollado un método más específico que el utilizado en CN para la valoración de succinilacetona como 2TT⁽²⁴⁾.

1.2.5) 2TT para el aumento leve de fenilalanina

En el caso de las hiperfenilalaninemias se ha desarrollado una metodología para la determinación de biopterina y neopterina en primera muestra mediante UPLC-MS/MS⁽²⁵⁾.

1.3) Galactosemia clásica

Muchos países han incluido la galactosemia clásica en sus PCN. La medida del marcador

primario puede realizarse bien por un método fluorométrico⁽²⁶⁾ o bien mediante MS/MS⁽²⁷⁾. En particular, los métodos fluorimétricos presentan mayor número de FP y se han desarrollado como 2TT el análisis molecular de ciertas mutaciones concretas⁽²⁸⁾, la metodología multiplex enzimática por UPLC-MS/MS⁽²⁹⁾ o el análisis del test rápido de la galactosa deshidrogenasa⁽³⁰⁾.

1.4) 2TT para la detección de la deficiencia de guanidinoacetato metiltransferasa (GAMT)

En algunos programas valoran los niveles de guanidinoacetato para detectar la deficiencia de GAMT. Sin embargo, la tasa de FP es elevada, por ello se ha desarrollado como 2TT la valoración de guanidinoacetato mediante UPLC-MS/MS. En Canadá y en EE.UU se ha conseguido una disminución de la tasa de FP del 0,19% al 0,0002%^(31,32).

1.5) 2TT para la detección de enfermedades lisosomales

La introducción de MS/MS en los PCN está facilitando también la expansión en la detección de las enfermedades lisosomales. En los últimos años se han desarrollado métodos para el análisis múltiple de actividades enzimáticas mediante MS/MS como marcador primario, así como pruebas de 2TT con el fin de reducir el número de FP, especialmente debidos a pseudodeficiencias y heterocigotos.

1.5.1) Mucopolisacaridosis tipo I (MPSI)

En la MPSI el marcador primario utilizado es la actividad enzimática de la alfa-iduronidasa. En Rochester, Minnesota, Kentucky e Italia, han incluido como 2TT el análisis de glicosaminoglicanos mediante LC-MS/MS^(23,33,34), logrando una tasa de FP del 0,0018% y un VPP del 50% en algunos casos⁽²³⁾.

1.5.2) Enfermedad de Pompe

En la enfermedad de Pompe también se ha descrito una alta frecuencia del alelo de pseudodeficiencia en la población asiática dando lugar a un aumento de FP^(35,36). En el PCN de Taiwan utilizan como 2TT la actividad total de la enzima alfa-glucosidasa (GAA) medida a pH 3,8 sin acarbosa⁽³⁷⁾. En EE.UU. han descrito la ratio (creatina/creatinina)/actividad GAA como 2TT en esta enfermedad, siendo útil para diferenciar entre los casos verdaderos infantiles y de presentación tardía, del resto de FP (portadores y pseudodeficiencias de la enzima)⁽²²⁾. Además, se ha evaluado la utilidad de incluir la herramienta CLIR⁽²¹⁾ en la estrategia, demostrando que su uso puede evitar un 92% de FP⁽²²⁾ y otros autores consiguen un VPP del 100% y una tasa de FP del 0%⁽²³⁾.

Por otro lado, algunos estados de EE.UU han incluido como 2TT el análisis genético mediante secuenciación de última generación para la enfermedad de Pompe^(38,39,40,41).

1.5.3) Enfermedad de Krabbe

Nueva York fue el primer estado de EE.UU en incluir en su PCN la detección de la enfermedad de Krabbe en el año 2006. Con la inclusión de la secuenciación del gen *GALC* como 2TT, han conseguido reducir un 43,8% la tasa de pacientes derivados a las UCR para su estudio⁽⁴²⁾. En el estado de Missouri también utilizan el estudio genético como 2TT pero sólo analizan la mutación prevalente IVS10del30kb⁽⁴³⁾. Sin embargo, la identificación de variantes de significado incierto o mutaciones asociadas a formas de presentación tardía de la enfermedad continúan siendo un inconveniente para el diagnóstico y pronóstico. Como consecuencia, algunos centros han evaluado la psicossina como otro posible 2TT^(23,44,45,46), consiguiendo en algunos casos un VPP del 100% y una tasa de FP del 0%⁽²³⁾. Además, se ha demostrado que existe

una relación entre el nivel de concentración de la psicossina y el pronóstico de la enfermedad⁽⁴⁶⁾.

Por otro lado, el PCN de Kentucky también ha evaluado la integración de la herramienta CLIR⁽²¹⁾ en su algoritmo de trabajo para la enfermedad de Krabbe demostrando su utilidad para la selección de los casos en los que es necesario el análisis de un 2TT⁽²³⁾.

1.5.4) Enfermedad de Gaucher y de Fabry

Recientemente el PCN de Italia ha publicado su experiencia acerca de la implementación de lisoGb1 como 2TT en la enfermedad de Gaucher y lisoGb3 en la enfermedad de Fabry. En el caso de Gaucher, han conseguido aumentar el VPP al 100% y demuestran que la concentración de ambos biomarcadores en el periodo neonatal se correlaciona con las formas clásicas de ambas enfermedades⁽³⁴⁾. Sin embargo, en las formas clínicas de presentación tardía de Fabry la concentración de lisoGb3 puede estar en menor grado elevada o incluso ser normal⁽³⁴⁾. Estos resultados se correlacionan con los ya descritos previamente en el estudio piloto del PCN en Taiwan de la enfermedad de Fabry^(47,48). De manera similar en otro estudio se recoge la experiencia con dos hermanos afectados de Fabry. Uno de ellos fue detectado en la edad neonatal presentando niveles elevados de lisoGb3 en primera muestra, los cuales fueron incrementando progresivamente hasta la edad de aparición de los síntomas, lo que demuestra que el estudio de este marcador en la etapa presintomática puede ser de utilidad para una prevención terapéutica⁽⁴⁹⁾ y apoya una vez más su utilidad como 2TT en los PCN.

1.6) 2TT para la detección de la adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X (XALD)

La detección de la X-ALD se realiza a través del análisis de lisofosfatidilcolina C26:0 (C26:0LPC) mediante MS/MS. Nueva York fue

el primer estado de EE.UU en incluir la X-ALD en su PCN y utilizan como 2TT el análisis específico de C26:0-LPC mediante LC-MS/MS seguido de un marcador de tercer nivel que incluye la secuenciación del gen *ABCD1*⁽⁵⁰⁾. En el año 2015 se aprobó realizar un estudio piloto para la detección de X-ALD en el PCN de Holanda, que se está realizando en la actualidad y recientemente han desarrollado una estrategia que incluye hasta 4 niveles de marcadores. La diferencia con respecto a los programas de EE.UU radica en la inclusión del “Factor X”, un 2TT que mide el número de cromosomas X. Con esta herramienta, dado que la herencia de esta entidad es ligada al cromosoma X, se evitan errores de interpretación con registros demográficos incorrectos y permite identificar las niñas con síndrome de Turner, las cuales tendrían niveles normales de C26:0-LPC y serían consideradas como casos negativos en el PCN. Es de esperar que las niñas con síndrome de Turner y X-ALD tengan la misma probabilidad de desarrollar la forma cerebral similar a un niño con X-ALD. De este modo, esta estrategia ayudaría a identificar estos casos⁽⁵¹⁾.

2) 2TT en sangre impregnada en papel para otras enfermedades

2.1) 2TT para la detección de fibrosis quística (FQ)

Los PCN para la detección de FQ utilizan la tripsina inmunorreactiva (TIR) como marcador primario mediante técnicas de enzimoimmunoanálisis. La TIR no es un marcador específico de FQ y puede estar alterada en otras situaciones fisiopatológicas que se pueden dar en el período perinatal. Por ello, se utilizan diferentes estrategias para optimizar la eficacia de su detección: cuantificación de TIR combinada con el análisis en primera muestra del gen *CFTR* (DNA) o de la proteína asociada a pancreatitis (PAP) mediante métodos de inmunoanálisis (fluorescencia o fotométrico).

En la **tabla 3** se muestra el impacto de las diferentes estrategias estudiadas de forma retrospectiva o prospectiva en los diferentes países. Se puede observar que las estrategias que combinan TIR1 + DNA presentan un VPP más elevado, sin embargo, la tasa de FP también es elevada, con un coste-efectividad muy alto si se compara con la estrategia TIR1+PAP (ver Francia, Alemania y Holanda en **tabla 3**). Para aquellas estrategias que valoran TIR2 (TIR en segunda muestra), la inclusión del PAP en primera muestra también aumenta el VPP y disminuye la tasa de FP (ver España y Portugal en **tabla 3**), siendo aún mejor si se aplica la estrategia TIR1+PAP+DNA (ver República Checa en **tabla 3**). Francia fue pionera en Europa en plantear la necesidad de un 2TT para la detección de la FQ^(52,53,54) y aunque actualmente utilizan la estrategia TIR+DNA, en un estudio retrospectivo publicado recientemente concluyen que incorporar la PAP aumenta la eficiencia siendo conveniente cambiar la estrategia a TIR+PAP+DNA⁽⁵⁵⁾. En Alemania (Heidelberg) en el año 2016 decidieron incorporar la valoración de la PAP^(56,57,58,59,60) mientras que en Bélgica, tras diferentes estudios, concluyeron que la estrategia con PAP era mejor en cuanto a coste-efectividad aunque recomiendan la estrategia TIR+DNA por su VPP más alto y mejor cumplimiento de los requisitos propuestos por la Sociedad Europea de Fibrosis Quística⁽⁶¹⁾. Holanda incorporó la estrategia TIR+PAP+DNA a partir del 2011⁽⁶²⁾ y recientemente han publicado un estudio retrospectivo de efectividad comparando cuatro estrategias diferentes y concluyen que la estrategia utilizada hasta el momento es altamente coste-efectiva con un VPP del 63% al 77% según el estudio molecular utilizado⁽⁶³⁾. Resultados similares se obtuvieron en la República Checa pero no se ha llegado a incorporar la PAP como 2TT⁽⁶⁴⁾. Portugal incorporó la detección de FQ en 2014 con la estrategia TIR1+PAP+TIR2⁽⁶⁵⁾. En España,

Tabla 3
Impacto de los segundos marcadores para la detección de fibrosis quística en los Programas de Cribado Neonatal.

Programa de Cribado	Estudio	Nº RN del estudio	Inmuno análisis 2TT (PAP)	Estrategia (TIR y PAP en ng/mL)	VPP sin PAP %	VPP con PAP %	FP sin PAP %	FP con PAP %	Programa de Cribado con 2TT (PAP)	Referencia
Alemania	Prospectivo	73.759	Fotométrico	TIR1+DNA vs TIR1+PAP TIR1 \geq p99+PAP \geq 1	17,9	12,2	0,06	0,12		(56)
	Prospectivo	328.181	Fotométrico	TIR1+DNA vs TIR1+PAP TIR1 \geq p99+PAP \geq 1,6	15,3	8,8	0,10	0,18	SI (>09/2016)	(58)
			Fluorimétrico	50 \leq TIR1 < 100 +PAP \geq 3 TIR1 \geq 100 + PAP \geq 1,6						
Alemania	Retrospectivo	410.111	Fotométrico	TIR1+PAP vs TIR1+DNA 50 \leq TIR1 < 100 +PAP \geq 1,8 TIR1 \geq 100 + PAP \geq 0,6	9,4	8,9	NA	0,17		(60)
			Fluorimétrico	TIR1 \geq p99+PAP \geq 1,6						
			Fluorimétrico	TIR1 x PAP \geq 165						
España Andalucía oriental	Prospectivo	68.502	Fluorimétrico	TIR1+TIR2+TS vs TIR1+PAP+TIR2+TS TIR1 \geq 50 +PAP \geq 2,1 TIR2 \geq 40/TIR2 \geq 35+PAP \geq 3,8	15,1	37,1	0,12	0,03	NO	(66)
				TIR1 x PAP \geq 167,4 TIR2 \geq 40/TIR2 \geq 35+PAP \geq 3,8						
				TIR1+TIR2+DNA vs TIR1+PAP+TIR2+DNA 50 \leq TIR1 < 80 +PAP \geq 1,95 80 \leq TIR1 < 150+PAP \geq 1,0 TIR2 \geq 35						
España Cataluña	Prospectivo	64.722	Fluorimétrico	TIR1+TIR2+DNA vs TIR1+PAP+TIR2+DNA 50 \leq TIR1 < 80 +PAP \geq 1,95 80 \leq TIR1 < 150+PAP \geq 1,0 TIR2 \geq 35	4,3	9,2	0,21	0,10		(67)
				TIR1+PAP+TIR2+DNA 50 \leq TIR1 < 80 +PAP \geq 1,95 80 \leq TIR1 < 150+PAP \geq 1,0 TIR2 \geq 35						
				TIR1+PAP+TIR2+DNA 60 \leq TIR1 < 80 +PAP \geq 1,95 80 \leq TIR1 < 150+PAP \geq 1,0 TIR2 \geq 35						
España Cataluña	Prospectivo	53.854	Fluorimétrico	TIR1+PAP+TIR2+DNA 60 \leq TIR1 < 80 +PAP \geq 1,95 80 \leq TIR1 < 150+PAP \geq 1,0 TIR2 \geq 35	NA	4,2	NA	0,22	SI (>11/2017)	(68)
				TIR1+PAP+TIR2+DNA 60 \leq TIR1 < 80 +PAP \geq 1,95 80 \leq TIR1 < 150+PAP \geq 1,0 TIR2 \geq 35						
	Prospectivo	62.041	Fluorimétrico	TIR1+PAP+TIR2+DNA 60 \leq TIR1 < 80 +PAP \geq 1,95 80 \leq TIR1 < 150+PAP \geq 1,0 TIR2 \geq 35	NA	4,3	NA	0,20		2019 (datos sin publicar)

Tabla 3 (continuación) Impacto de los segundos marcadores para la detección de fibrosis quística en los Programas de Cribado Neonatal.										
Programa de Cribado	Estudio	Nº RN del estudio	Inmuno análisis 2TT (PAP)	Estrategia (TIR y PAP en ng/mL)	VPP sin PAP %	VPP con PAP %	FP sin PAP %	FP con PAP %	Programa de Cribado con 2TT (PAP)	Referencia
Francia	Prospectivo	204.749	Fotométrico	TIRI+DNA vs TIRI+PAP 50 ≤ TIRI < 100 + PAP ≥ 1,8 TIRI ≥ 100 + PAP ≥ 1	21,4	8,6	0,09	0,38		(52)
	Prospectivo	553.167	Fotométrico	TIRI+DNA vs TIRI+PAP 50 ≤ TIRI < 100 + PAP ≥ 1,8 TIRI ≥ 100 + PAP ≥ 0,6	27,1	8,6	0,04	0,16	NO	(53)
	Retrospectivo	552.915	Fotométrico	TIRI+DNA vs TIRI+PAP+DNA 50 ≤ TIRI < 100 + PAP ≥ 1,8 TIRI ≥ 100 + PAP ≥ 0,6	33,6	41,1	0,03	0,02		(54)
Holanda	Prospectivo	72.874	Fotométrico	TIRI+DNA vs TIRI+PAP+DNA 60 ≤ TIRI < 100 + PAP ≥ 3 TIRI ≥ 100 + PAP ≥ 1,6	76	85,9	0,15	0,0013	SI (>2011)	(62)
	Retrospectivo	819.879	Fluorimétrico	TIRI+PAP+DNA 60 ≤ TIRI < 100 + PAP ≥ 3 TIRI ≥ 100 + PAP ≥ 1,6	NA	63	NA	0,0041		(63)
Portugal	Prospectivo	255.000	Fluorimétrico	TIRI+PAP+TIR2+DNA 65 ≤ TIRI < 100 + PAP ≥ 1,6 100 ≤ TIRI < 150 + PAP ≥ 0,5 TIR2 ≥ 50	NA	41,3	NA	0,018	SI (>2014)	(65)
	Prospectivo	106.522	Fluorimétrico	TIRI+DNA vs TIRI+PAP+DNA 50 ≤ TIRI < 100 + PAP ≥ 1,8 TIRI ≥ 100 + PAP ≥ 1	16,1	62,5	0,10	0,011	NO	(64)

2TT: prueba de segundo nivel; FP: falsos positivos; PAP: proteína asociada a pancreatitis; TIR: tripsina inmunorreactiva; TIRI: tripsina inmunorreactiva en primera muestra; TIR2: tripsina inmunorreactiva en segunda muestra. TS: test de sudor; VPP: valor predictivo positivo.

el PCN de Andalucía Oriental realizó un estudio prospectivo de dos años comparando su estrategia actual TIR1+TIR2 vs estrategias que incorporan PAP: TIR1+PAP+TIR2 y TIR1xPAP+TIR2, concluyendo que esta última es más efectiva, aunque no la han incorporado en su programa⁽⁶⁶⁾.

En Cataluña nuestro PCN para la detección de FQ empezó en el año 1999 con estrategia a doble muestra (TIR1+TIR2). En el año 2016 se realizó un estudio piloto prospectivo para analizar diferentes estrategias combinando TIR con PAP vs estrategia TIR1+TIR2+DNA⁽⁶⁷⁾. La estrategia TIR1+PAP+TIR2 fue elegida la más adecuada mostrando una disminución teórica del 30% en la solicitud de segundas muestras y del 53% de casos positivos referidos a la UCR, además de aumentar el VPP de un 4,3% al 9,2%. En noviembre de 2017 se incorpora la PAP para la detección de la FQ en estrategia de doble muestra TIR siendo el primer PCN a nivel nacional en utilizar la PAP como 2TT⁽⁶⁸⁾, obteniendo una disminución del 38% en segundas muestras y del 44% de casos positivos referidos a la UCR⁽⁶⁸⁾. En junio de 2019, se modificó el punto de corte de la TIR1 (de 50 a 60 ng/mL) reduciéndose un 5,5% la solicitud de segundas muestras y un 3,5% los casos positivos detectados, mientras que el VPP se mantuvo con respecto al del año 2018. Con el objetivo de aumentar el VPP y disminuir el tiempo de diagnóstico de la enfermedad, se está realizando actualmente durante el 2020 un estudio piloto con la estrategia TIR1+PAP+DNA (datos no publicados). En la **figura 4** se describen los diferentes puntos de corte de TIR y PAP utilizados en las estrategias en estos tres últimos años en nuestro programa. El VPP obtenido en nuestro PCN con la estrategia TIR a doble muestra, tanto antes como después de incorporar el PAP como 2TT, es inferior con respecto al de los otros programas (**tabla 3**), ya que la mayoría utilizan el PAP en estrategia simple para después realizar estudio molecular y con puntos de

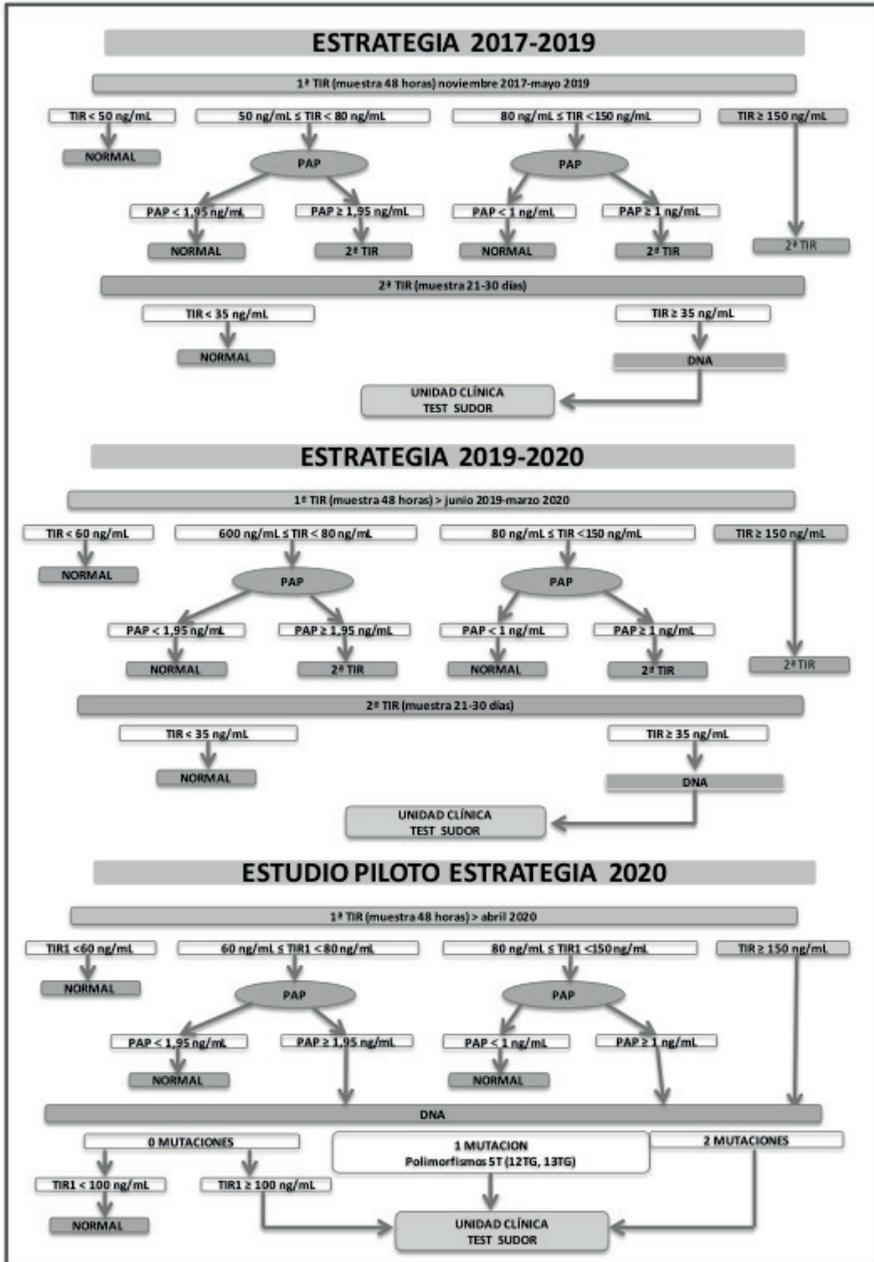
corte para TIR y PAP más elevados. Algunos PCN, como Holanda, utilizan tanto PAP como DNA al mismo tiempo en primera muestra como 2TT. Sólo Portugal y Andalucía Oriental reportan datos con estrategia a doble muestra. Por un lado, Portugal, con una incidencia de FQ de 1:7.500, aplica una estrategia idéntica a la que utilizábamos hasta marzo de 2020, con puntos de corte de TIR1 y TIR2 más altos (65 ng/mL y 50 ng/mL), lo que hace tener una tasa de FP algo inferior y un VPP más alto pero a costa de tener algún FN que con nuestro punto de corte no hubiéramos tenido. Andalucía Oriental que reporta una incidencia de FQ de 1:4.893, aplica el test del sudor después de una TIR2 positiva (a diferencia de nuestro PCN que aplica DNA) y también presenta un VPP algo más elevado, siendo el punto de corte de TIR1 del mismo orden (≥ 61 ng/mL), aunque para la TIR2 es más alto (≥ 40 ng/mL), lo que implica también un menor número de FP. Cabe destacar que en nuestro programa hemos tenido verdaderos positivos en un rango de concentraciones de TIR2 entre 35-40 ng/mL.

La incidencia de FQ en Cataluña desde su inicio (1999-2019) es de 1:7.203, aunque la tendencia en los últimos cinco años es a la baja con una incidencia de 1:11.087 (2015-2019), siendo inferior con respecto a otros PCN a nivel nacional y europeo. Esto podría explicarse porque es uno de los programas con más años de experiencia en la detección y manejo de esta enfermedad asociado a los avances en la medicina de reproducción y el asesoramiento genético, lo que ha ayudado a la prevención de nacimientos de niños afectados de FQ.

2.2) 2TT para la detección de la hiperplasia suprarrenal congénita (CAH)

La detección de 17-hidroxiprogesterona mediante enzimoinmunoanálisis es la técnica utilizada mayoritariamente para la detección de la CAH. Sin embargo, esta prueba tiene un alto

Figura 4
Algoritmo diagnóstico con diferentes estrategias variando los puntos de corte de tripsina inmunorreactiva (TIR) y proteína asociada a pancreatitis (PAP) en los últimos tres años.



número de FP debido a la reacción cruzada con otros esteroides y el aumento de dicha hormona en los niños prematuros. Aunque se ha intentado ajustar el *cut-off* en base al peso al nacer, la edad gestacional o la edad en el momento de la toma de muestra, el VPP sigue siendo inferior al 1%. En base a estas premisas, algunos PCN han incluido como 2TT el análisis simultáneo mediante LC-MS/MS de varios esteroides (17-hidroxiprogesterona, androstenediona y cortisol), consiguiendo una reducción de la tasa de FP y un aumento del VPP (EE.UU.: tasa de FP del 0,64% al 0,06 % y VPP del 0,8% al 7,3%⁽⁵⁾; Utah: FP del 2,6% a 0,06%, VPP del 0,4% al 9,4%⁽⁶⁹⁾; Corea: VPP de 1,9% al 100%⁽⁷⁰⁾; Alemania⁽⁷¹⁾, Hungría⁽⁷²⁾, entre otros).

Otros programas han optado por utilizar como 2TT el estudio genético completo o de mutaciones concretas del gen *CYP21A2* en aquellas muestras que tienen elevación del marcador primario^(73,74), resultando en una reducción del 88% de las segundas muestras en algunos casos⁽⁷³⁾.

2.3) 2TT para la detección de inmunodeficiencias combinadas graves (IDCG)

Algunos PCN detectan las IDCG mediante la valoración de TREC (círculos de escisión del gen del receptor de linfocitos T). Sin embargo, se han descrito tanto FP, como FN y en algunos países como en Italia se ha implementado la valoración de marcadores más específicos mediante LC-MS/MS: adenosina y 2-deoxiadenosina para la detección de la deficiencia de adenosina deaminasa⁽⁷⁵⁾ y de 2-deoxiguanosina y 2-deoxi-inosina para la deficiencia de purina nucleósido fosforilasa⁽⁷⁶⁾. Por otro lado, algunos países ya han incorporado como 2TT el análisis de un panel específico de genes mediante secuenciación masiva de última generación (en inglés *Next Generation Sequencing* o NGS)^(77,78) consiguiendo una tasa de re-análisis/segundas muestras del 0,02%-0,07%⁽⁷⁹⁾.

3) NGS como 2TT para varias enfermedades

En EE.UU. ya se está implementando como 2TT el estudio genético mediante NGS en sangre impregnada en papel para distintas enfermedades. Se estudia un panel de 126 genes con una capacidad para analizar de 8 a 20 casos en 105 horas (4,3 días), aunque el tiempo se alargaría en algunos casos según el tipo de mutación⁽⁷⁹⁾.

En Taiwan (China) se aplica el estudio genético como 2TT para la deficiencia de citrina y la deficiencia primaria de carnitina⁽⁸⁰⁾.

Recientemente, también en Alemania se ha implementado la estrategia de utilizar NGS como 2TT en aquellas muestras heterocigotas identificadas en el ensayo de qPCR (marcador primario) en la detección de cistinosis nefropática⁽⁸¹⁾.

CONCLUSIONES

La tendencia actual en los PCN es cubrir una amplia gama de condiciones. Desde el año 2004 hasta la actualidad se han desarrollado pruebas de segundo nivel en muestra inicial para más de 30 enfermedades. La combinación de pruebas de primer y segundo nivel constituye una práctica de trabajo excelente para lograr el mayor beneficio de los programas, reduciendo considerablemente los FP, con lo que se disminuye la ansiedad y el estrés de las familias, a la vez que se reducen los costes hospitalarios y se aumenta el VPP, mejorando sustancialmente la eficiencia de los PCN.

AGRADECIMIENTOS

A todo el personal técnico y administrativo del área de cribado neonatal, así como a todas la matronas que realizaron la toma de muestras.

BIBLIOGRAFIA

1. Millington DS, Kodo N, Terada N, Roe D, Chace DH. The analysis of diagnostic markers of genetic disorders in human blood and urine using tandem mass spectrometry with liquid secondary ion mass spectrometry. *Int J Mass Spectrom Ion Process.* 1991; 111:211–228.
2. Chace DH, Adam BW, Smith SJ, Alexander JR, Hillman SL, Hannon WH. Validation of accuracy-based amino acid reference materials in dried-blood spots by tandem mass spectrometry for newborn screening assays. *Clin Chem.* 1999; 45(8 Pt 1):1269-77.
3. 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;12:255–261.
4. GarciaVilloria Judit, Pajares S, López RM, Marin JL, Ribes A. Neonatal Screening for Inherited Metabolic Diseases in 2016. *Seminars in Pediatric Neurology.* 2016; 23 (4): 257-272.
5. Matern D, Tortorelli S, Oglesbee D, Gavrilov D, Rinaldo P. Reduction of the false-positive rate in newborn screening by implementation of MS/MS-based second-tier tests: the Mayo Clinic experience (2004-2007). *J Inherit Metab Dis.* 2007;30(4):585-592.
6. 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; 53(7):1364-1369.
7. Turgeon CT, Magera MJ, Cuthbert CD, Loken PR, Gavrilov DK, Tortorelli S *et al.* Determination of total homocysteine, methylmalonic acid, and 2-methylcitric acid in dried blood spots by tandem mass spectrometry. *Clin Chem.* 2010; 56(11):1686-95.
8. Shigematsu Y, Hata I, Tajima G. Useful second-tier tests in expanded newborn screening of isovaleric acidemia and methylmalonic aciduria. *J Inherit Metab Dis.* 2010; 33(Suppl 2):S283-8.
9. Al-Dirbashi OY, McIntosh N, McRoberts C, Fisher L, Rashed MS, Makhseed N *et al.* Analysis of methylcitrate in dried blood spots by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *JIMD Rep.* 2014;16:65-73.
10. Monostori P, Klinke G, Richter S, Baráth A, Fingerhut R, Baumgartner MR *et al.* Simultaneous determination of 3-hydroxypropionic acid, methylmalonic acid and methylcitric acid in dried blood spots: Second-tier LC-MS/MS assay for newborn screening of propionic acidemia, methylmalonic acidemias and combined remethylation disorders. *PLoS One.* 2017;12(9):e0184897.
11. Forni S, Fu X, Palmer SE, Sweetman L. Rapid determination of C4-acylcarnitine and C5-acylcarnitine isomers in plasma and dried blood spots by UPLC-MS/MS as a second tier test following flow-injection MS/MS acylcarnitine profile analysis. *Mol Genet Metab.* 2010;101(1):25-32.
12. Adhikari AN, Currier RJ, Tang H, Turgeon CT, Nussbaum RL, Srinivasan R *et al.* Genomic Analysis of Historical Cases with Positive Newborn Screens for Short-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency Shows That a Validated Second-Tier Biochemical Test Can Replace Future Sequencing. *Int J Neonatal Screen.* 2020; 6(2): 41.
13. Abendur JE, Chamoles NA., Guinle AE, Schenone AB, Fuertes AN. Diagnosis of isovaleric acidemia by tandem mass spectrometry: false positive result due to pivaloylcarnitine in a newborn screening program. *J Inherit Metab Dis.* 1998; 21(6): 624–630.
14. Boemer F, Schoos R, de Halleux V, Kalenga M, Debray FG. Surprising causes of C5-carnitine false positive results in newborn screening. *Mol Genet Metab.* 2014; 111(1):52-4.
15. Sinclair GB, Ester M, Horvath G, van Karnebeek CD, Stockler-Ipsirogu S, Vallance H. Integrated Multianalyte Second-Tier Testing for Newborn Screening for MSUD, IVA, and GAMT Deficiencies. *J Inborn Errors Metab Screen.* 2016; 4: 1–7.

16. Carling RS, Burden D, Hutton I, Randle R, John K, Bonham JR. Introduction of a Simple Second Tier Screening Test for C5 Isobars in Dried Blood Spots: Reducing the False Positive Rate for Isovaleric Acidaemia in Expanded Newborn Screening. *JIMD Rep.* 2017; 20.
17. Okun JG, Gan-Schreier H, Ben-Omran T, Schmidt KV, Fang-Hoffmann J, Gramer G *et al.* Newborn Screening for Vitamin B6 Non-responsive Classical Homocystinuria: Systematical Evaluation of a Two-Tier Strategy. *JIMD Rep.* 2017; 32: 87–94.
18. Wang C, Zhu H, Zhang W, Song F, Liu Z, Liu S. Second-tier test for quantification of underivatized amino acids in dry blood spot for metabolic diseases in newborn screening. *Amino Acids.* 2013;44(2):661-71.
19. Oglesbee D, Sanders KA, Lacey JM, Magera MJ, Casetta B, Strauss KA *et al.* Second-tier test for quantification of alloisoleucine and branched-chain amino acids in dried blood spots to improve newborn screening for maple syrup urine disease (MSUD). *Clin Chem.* 2008; 54(3):542–549.
20. Alodaib A, Carpenter K, Wiley V, Sim K, Christodoulou J, Wilcken B. An improved ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of alloisoleucine and branched chain amino acids in dried blood samples. *Ann Clin Biochem.* 2011; 48(Pt 5):468-70.
21. CLIR (Collaborative Laboratory Integrated Reports), <https://clir.mayo.edu>
22. Tortorelli S, Eckerman J, Orsini JJ, Stevens C, Hart J, Hall PL *et al.* Moonlighting newborn screening markers: the incidental discovery of a second-tier test for Pompe disease. *Genetics in Medicine.* 2018;20(8):840–846.
23. Minter Baerg MM, Stoway SD, Hart J, Mott L, Peck DS, Nett SL *et al.* Precision newborn screening for lysosomal disorders. *Genet Med.* 2018;20(8):847-854.
24. La Marca G, Malvagia S, Pasquini E, Cavicchi C, Morrone A, Ciani F *et al.* Newborn screening for tyrosinemia type I: Further evidence that succinylacetone determination on blood spot is essential. *JIMD Rep.* 2011; 1:107–109.
25. Santagata S, Di Carlo E, Carducci C, Leuzzi V, Angeloni A, Carducci C. Development of a new UPLC-ESI-MS/MS method for the determination of biopterin and neopterin in dried blood spot. *Clin Chim Acta.* 2017;466:145-151.
26. Fujimoto A, Okano Y, Miyagi T, Isshiki G, Oura T. Quantitative Beutler test for newborn mass screening of galactosemia using a fluorometric microplate reader. *Clin Chem* 2000; 46(6Pt1):806–810.
27. Jensen UG, Brandt NJ, Christensen E, Skovby F, Nørgaard-Pedersen B, Simonsen H. Neonatal screening for galactosemia by quantitative analysis of hexose monophosphates using tandem mass spectrometry: A retrospective study. *Clin Chem.* 2001;47(8)1364–1372.
28. Dobrowolski SF, Banas RA, Suzow JG. Analysis of Common Mutations in the Galactose-1-Phosphate Uridyl Transferase Gene New Assays to Increase the Sensitivity and Specificity of Newborn Screening for Galactosemia. *J Mol Diagn.* 2003;5(1):42–47.
29. Ko DH, Jun SH, Park KU, Song SH, Kim JQ, Song J. Newborn screening for galactosemia by a second-tier multiplex enzyme assay using UPLC-MS/MS in dried blood spots. *J Inherit Metab Dis.* 2011;34(2):409–414.
30. Ohlsson A, Guthenberg C, von Döbeln U. Galactosemia Screening with Low False-Positive Recall Rate: The Swedish Experience. *JIMD Rep.* 2012;2:113–117.
31. Pasquali M, Schwarz E, Jensen M, Yuzyuk T, DeBiase I, Randall H *et al.* Feasibility of newborn screening for guanidinoacetate methyltransferase (GAMT) deficiency. *J Inherit Metab Dis* 2014; 37(2):231–236.
32. Sinclair GB, van Karnebeek CDM, Ester M, Boyd F, Nelson Tanya, Stockler-Ipsiroglu S *et al.* A three-tier algorithm for guanidinoacetate methyltransferase (GAMT) deficiency newborn screening. *Mol Genet Metab.* 2016; 118(3):173-7.
33. Tortorelli. Congreso ESGH; 2017.
34. Burlina AB, Polo G, Rubert L, Gueraldi D, Cazzorla C, Duro G, *et al.* Implementation of Second-Tier Tests in

- Newborn Screening for Lysosomal Disorders in North Eastern Italy. *Int J Neonatal Screen*. 2019; 5:24.
35. Kumamoto S, Katafuchi T, Nakamura K, Endo F, Oda E, Okuyama T *et al*. High frequency of acid alpha-glucosidase pseudodeficiency complicates newborn screening for glycogen storage disease type II in the Japanese population. *Mol Genet Metab*. 2009;97(3):190–195.
 36. Yang CF, Liu HC, Hsu TR, Tsai FC, Chiang SF, Chiang CC *et al*. A large-scale nationwide newborn screening program for Pompe disease in Taiwan: towards effective diagnosis and treatment. *Am J Med Genet A*. 2014;164A:54–61.
 37. Chiang SC, Hwu WL, Lee NC, Hsu LW, Chien YH. Algorithm for Pompe disease newborn screening: Results from the Taiwan screening program. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2012;106(3): 281–286.
 38. Tang H, Feuchtbaum L, Sciortino S, Matteson J Mathur D, Bishop T, Olney RS. The First Year Experience of Newborn Screening for Pompe Disease in California. *Int J Neonatal Screen*. 2020;6:9.
 39. Burton BK, Charrow J, Hoganson GE, Darrell W, Tinkle B, Braddock SR *et al*. Newborn Screening for Pompe Disease in Illinois: Experience with 684,290 Infants. *Int J Neonatal Screen*. 2020; 6(1):4.
 40. Ruiz-Schultz N, Oakson K, Jones D, Rindler M, Hart K, Rohrwasser A. Targeted Second-Tier Confirmatory Next Generation Sequencing Newborn Screening Pipeline. In Poster Abstracts of the Newborn Screening & Genetic Testing Symposium; Chicago, IL, USA; 2019.7–10 April 2.
 41. Smith LD, Bainbridge MN, Parad, RB, Bhattacharjee A. Second Tier Molecular Genetic Testing in Newborn Screening for Pompe Disease: Landscape and Challenges. *Int J Neonatal Screen*. 2020;6(2):32.
 42. Orsini J J, Kay DM, Saavedra-Matiz CA, Wenger DA, Duffner PK, Erbe RW *et al*. Newborn screening for Krabbe disease in New York State: the first eight years' experience. *Genetics in Medicine*. 2016;18(3):239–248.
 43. Hopkins PV. slide 10 of <https://www.aphl.org/conferences/proceedings/Documents/2016/NBS-Genetic-Testing-symposium/05Hopkins.pdf>. Accessed 1 July 2016.
 44. Chuang WL, Pacheco J, Zhang XK, Martin MM, Biski CK, Keutzer JM *et al*. Determination of psychosine concentration in dried blood spots from newborns that were identified via newborn screening to be at risk for Krabbe disease. *Clinica Chimica Acta*. 2013;419:73–76.
 45. Escolar ML, Kiely BT, Shawgo E, Hong X, Gelb MH, Orsini JJ *et al*. Psychosine, a marker of Krabbe phenotype and treatment effect. *Mol Genet Metab*. 2017;121(3):271–278.
 46. Turgeon CT, Orsini JJ, Sanders KA, Magera MJ, Langan TJ, Escolar ML *et al*. Measurement of psychosine in dried blood spots — a possible improvement to newborn screening programs for Krabbe disease. *J Inheret Metab Dis*. 2015;38(5):923–929.
 47. Johnson B, Mascher H, Mascher D, Legnini E, Hung CY, Dajnoki A. Analysis of Lyso-Globotriaosylsphingosine in Dried Blood Spots. *Ann Lab Med*. 2013;33(4):274–278.
 48. Chien YH, Bodamer OA, Chiang SC, Mascher H, Hung C, Hwu WL. Lyso-globotriaosylsphingosine (lyso-Gb3) levels in neonates and adults with the Fabry disease later-onset GLA IVS4+919G>A mutation. *J Inheret Metab Dis*. 2013;36(5):881–885.
 49. Spada M, Kasper D, Pagliardini V, Biamino E, Giachero S, Porta F. Metabolic progression to clinical phenotype in classic Fabry disease. *Italian Journal of Pediatrics*. 2017;43(1):1.
 50. Moser AB, Jones RO, Hubbard WC, Tortorelli S, Orsini JJ, Caggana M *et al*. Newborn Screening for X-Linked Adrenoleukodystrophy. *Int J Neonatal Screen*. 2016; 2(4).
 51. Barendsen RW, Dijkstra IME, Wouter F. Visser, Alders M, Blik J *et al*. Adrenoleukodystrophy Newborn Screening in the Netherlands (SCAN Study): The X-Factor. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:499.
 52. Sarles J, Berthézène P, Le Louarn C, Somma C, Perini JM, Catheline M *et al*. Combining immunoreactive

trypsinogen and pancreatitis-associated protein assays, a method of newborn screening for cystic fibrosis that avoids DNA analysis. *J Pediatr.* 2005;147(3):302-5

53. Sarles J, Giorgi R, Berthéze P, Munck A, Cheillan D, Dagorn JC *et al.* Neonatal screening for cystic fibrosis: comparing the performances of IRT/DNA and IRT/PAP. *J Cyst Fibros.* 2014; 13(4):384-90.

54. Seror V, Cao C, Roussey M, Giorgi R. PAP assays in newborn screening for cystic fibrosis: a population-based cost-effectiveness study. *J Med Screen.* 2016; 23(2):62-9.

55. Munck A, Delmas D, Audrézet MP, Lemonnier L, Cheillan D, Roussey M. Optimization of the French cystic fibrosis newborn screening programme by a centralized tracking process. *J Med Screen.* 2018; 25 (1): 6–12.

56. Sommerburg O, Lindner M, Muckenthaler M, Kholmüller D, Lieble S, Feneberg R *et al.* Initial evaluation of a biochemical cystic fibrosis newborn screening by sequential analysis of immunoreactive trypsinogen and pancreatitis-associated protein (IRT/PAP) as a strategy that does not involve DNA testing in a Northern European population. *J Inherit Metab Dis.* 2010; 33: S263–S271.

57. Sommerburg O, Krulisova V, Hammermann J, Lindner M, Stahl M, Muckenthaler M *et al.* Comparison of different IRT-PAP protocols to screen newborns for cystic fibrosis in three central European populations. *J Cyst Fibros.* 2014; 13: 15–23.

58. Sommerburg O, Hammermann J, Lindner M, Stahl M, Muckenthaler M, Kholmüller D *et al.* Five years of experience with biochemical cystic fibrosis newborn screening based on IRT/PAP in Germany. *Pediatr Pulmonol.* 2015; 50: 655–664

59. Sommerburg O, Stahl M, Hammermann J, Okun JG, Kulozik A, Hoffmann G *et al.* Newborn Screening on Cystic Fibrosis in Germany: Comparison of the new Screening Protocol with an Alternative Protocol. *Klin Padiatr.* 2017; 229(2):59-66.

60. Weidler S, Stopsack KH, Hammermann J, Sommerburg O, Mall MA, Hoffmann GF. A product of immunoreactive

trypsinogen and pancreatitis-associated protein as second-tier strategy in cystic fibrosis newborn screening. *J Cyst Fibros.* 2016; (15):752–758

61. Schmidt M, Werbrouck A, Verhaeghe N, De Wachter E, Simoens S, Lieven Annemans L *et al.* A model-based economic evaluation of four newborn screening strategies for cystic fibrosis in Flanders, Belgium. *Acta Clin Belg.* 2020;75(3):212-220

62. Cornel MC, Gille JJP, Loeber JG, Vernooij-van Langen AMM, Dankert-Roelse J, Bolhuis PA. Improving test properties for neonatal cystic fibrosis screening in the Netherlands before the nationwide start by May 1st 2011. *J Inherit Metab Dis.* 2012;35(4):635-40.

63. Dankert-Roelse JE, Bouva MJ, Jakobs BS, Janssens HM, de Winter-de KM Groot, Yvonne Schönbeck Y *et al.* Newborn blood spot screening for cystic fibrosis with a four-step screening strategy in the Netherlands. *J Cyst Fibros.* 2019;18(1):54-63.

64. Krulišová V, Balašáková M, Skalická V, Piskáčáková T, Holubová A, Paderová J *et al.* Prospective and parallel assessments of cystic fibrosis newborn screening protocols in the Czech Republic: IRT/DNA/IRT versus IRT/PAP and IRT/PAP/DNA. *Eur J Pediatr.* 2012; 171(8):1223-9.

65. Marcão A, Barreto C, Pereira L, Guedes Vaz L, Cavaco J, Casimiro A *et al.* Cystic Fibrosis Newborn Screening in Portugal: PAP Value in Populations with Stringent Rules for Genetic Studies. *Int J Neonatal Screen.* 2018; 22 (4):1-12.

66. Sadik I, Pérez de Algaba I Jiménez R, Benito C, Blasco-Alonso J, Caro P *et al.* Initial Evaluation of Prospective and Parallel Assessments of Cystic Fibrosis Newborn Screening Protocols in Eastern Andalusia: IRT/IRT versus IRT/PAP/IRT. In: *J Neonatal Screen.* 2019;32 (5): 1-12.

67. López RM, Argudo A, Pajares S, Delgado G, Flores JE, Ramón E, Badenas C, Gatner S, Cols M, Asensio O, Fernández RM, Ribes A, Marín JL. Análisis de estrategias con la proteína asociada a pancreatitis como prueba de segundo nivel para la detección de fibrosis quística en el

Programa de Cribado Neonatal de Cataluña. XII Congreso Nacional de Errores Congénitos del Metabolismo, Las Palmas de Gran Canaria 18-20 de octubre de 2017.

68. López RM, Argudo A, Pajares S, Delgado G, Flores JE, Ramón E, Badenas C, Gartner S, Cols M, Asensio O, Fernández RM, Ribes A, Marín JL. Analysis of strategies with immunoreactive trypsin and pancreatitis-associated protein for the detection of cystic fibrosis. Application in the Catalonia Neonatal Screening Program. 11th ISNS European Regional Meeting, Bratislava 14-17 octubre 2018.

69. Schwarz E, Liu A, Randall H, Haslip C, Keune F, Murray M *et al.* Use of Steroid Profiling by UPLC-MS/MS as a Second Tier Test in Newborn Screening for Congenital Adrenal Hyperplasia: The Utah Experience. *Pediatric Research*. 2009;66(2):230–235.

70. Seo JY, Park HD, Kim JW, Oh HJ, Yang JS, Chang YS *et al.* Steroid profiling for congenital adrenal hyperplasia by tandem mass spectrometry as a second-tier test reduces follow-up burdens in a tertiary care hospital: a retrospective and prospective evaluation. *J Perinat Med*. 2014; 42(1):121-7.

71. Peter M, Janzen N, Sander S, Korsch E, Riepe FG, Sander J. A case of 11beta-hydroxylase deficiency detected in a newborn screening program by second-tier LC-MS/MS. *Horm Res* 2008; 69(4):253–256.

72. Monostori P, Szabó P, Marginean O, Bereczki C, Karg E. Concurrent Confirmation and Differential Diagnosis of Congenital Adrenal Hyperplasia from Dried Blood Spots: Application of a Second-Tier LC-MS/MS Assay in a Cross-Border Cooperation for Newborn Screening. *Horm Res Paediatr*. 2015;84(5):311-8.

73. Kösel S, Burggraf S, Fingerhut R, Dörr HG, Roscher AA, Olgemöller B. Rapid Second-Tier Molecular Genetic Analysis for Congenital Adrenal Hyperplasia Attributable to Steroid 21-Hydroxylase Deficiency. *Clin Chem*. 2005;51(2):298-304.

74. Kopacek C, Prado MJ, da Silva CMD, de Castro SM, Beltrão LA, Vargas PR *et al.* Clinical and molecular profile of newborns with confirmed or suspicious congenital adre-

nal hyperplasia detected after a public screening program implementation. *J Pediatr (Rio J)*. 2019;95(3):282-290.

75. Azzari C, la Marca G, Resti M. Neonatal screening for severe combined immunodeficiency caused by an adenosine deaminase defect: A reliable and inexpensive method using tandem mass spectrometry. *J Allergy Clin Immunol*. 2011; 127(6):1394–1399.

76. La Marca G, Giocaliere E, Malvagia S, Villanelli F, Funghini S, Ombrone D *et al.* Development and validation of a 2nd tier test for identification of purine nucleoside phosphorylase deficiency patients during expanded newborn screening by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med*. 2016; 54(4):627-632.

77. Al-Mousa H, Al-Dakheel G, Jabr A, Elbadaoui F, Abouelhoda M, Baig M *et al.* High Incidence of Severe Combined Immunodeficiency Disease in Saudi Arabia Detected Through Combined T Cell Receptor Excision Circle and Next Generation Sequencing of Newborn Dried Blood Spots. *Front Immunol*. 2018;9:782.

78. Strand J, Aftab GK, Christian EH, Lundman E, Berge MC, Trømborg AK *et al.* Second-Tier Next Generation Sequencing Integrated in Nationwide Newborn Screening Provides Rapid Molecular Diagnostics of Severe Combined Immunodeficiency. *Front Immunol*. 2020;11:1417.

79. Bhattacharjee A, Sokolsky T, Wyman SK, Reese MG, Puffenberger E, Strauss K *et al.* Development of DNA confirmatory and high-risk diagnostic testing for newborns using targeted next-generation DNA sequencing. *Genet Med*. 2015; 17(5):337-47.

80. Wang LY, Chen NI, Chen PW, Chiang SC, Hwu WL, Lee NC *et al.* Newborn screening for citrin deficiency and carnitine uptake defect using second-tier molecular tests. *BMC Medical Genetics* 2013, 14:24.

81. Fleige T, Burggraf S, Czibere L, Häring J, Glück B, Keitel LM *et al.* Next generation sequencing as second-tier test in high-throughput newborn screening for nephropathic cystinosis. *European Journal of Human Genetics*. 2020;28:193–201.