

# Gli screening neonatali

P. Cavarzere, R. Gaudino, L. Tatò

*Clinica Pediatrica, Dipartimento Materno Infantile e di Biologia Genetica, Università di Verona*

## Riassunto

Lo screening neonatale rappresenta uno dei maggiori progressi dell'ultimo secolo in ambito di medicina preventiva dell'infanzia. Nel 1963 lo screening era eseguito solo per la diagnosi precoce di fenilchetonuria, ora in Italia tutti i neonati vengono esaminati alla nascita obbligatoriamente anche per l'ipotiroidismo congenito e per la fibrosi cistica, inoltre è possibile diagnosticare precocemente tramite screening molte altre malattie anche grazie alle nuove tecniche di analisi quali la tandem-massa spettrometria. Tuttavia non per tutte le malattie screenate alla nascita vi è accordo generale sull'efficacia e sul rapporto costo-beneficio dello screening stesso e la risoluzione al dibattito in corso è tutt'oggi lontana.

E' importante sottolineare che i test di screening sono tutti basati su dosaggi semiquantitativi ed è quindi inevitabilmente necessario un dosaggio quantitativo eseguito su siero per la conferma definitiva della diagnosi. Presso il nostro centro si attuano diversi test di screening, tra questi lo screening neonatale per l'ipotiroidismo congenito di cui abbiamo decennale esperienza e quello per la sindrome adreno-genitale, che rappresenta una novità i cui risultati sono promettenti.

## Summary

### Newborn screenings

Newborn screening is nowadays an essential component of preventive public health. After a first mass screening program for phenylketonuria in 1963, in the mid-1970s there was an expansion of newborn screenings to numerous disorders and now in Italy neonatal screening for phenylketonuria, congenital hypothyroidism and cystic fibrosis are mandatory by law. The advent of *Tandem Mass* spectrometry makes it possible to test newborns for multiple inherited disorders but this method is still the subject of controversies.

In our screening centre we analyse all newborns from North-Eastern Italy for different congenital diseases. In particular, we will expose in this paper over a decade's worth of experience in neonatal screening for congenital hypothyroidism, and our promising results in congenital adrenal hyperplasia screening.

## Introduzione

Lo screening neonatale rappresenta uno dei maggiori progressi dell'ultimo secolo in ambito di medicina preventiva dell'infanzia.

Negli anni '50, in Europa, si scoprì che la terapia dietetica precoce poteva prevenire il ritardo mentale nei bambini affetti da fenilchetonuria (PKU). Successivamente Robert Guthrie, un ricercatore a cui si deve lo sviluppo di un test di inibizione batterica (BIA) per misurare i metaboliti circolanti in pazienti con tumore, adattò questo tipo di test in modo da poter misurare il livello di fenilalanina su sangue secco assorbito su carta da filtro. Egli era particolarmente interessato a tale

dosaggio avendo un figlio e un nipote con un ritardo mentale causato da PKU. Da allora questo test fu applicato per la ricerca precoce della malattia in tutti i neonati: fu il primo screening neonatale a essere attuato. Era il 1963<sup>1</sup>.

Inizialmente non si trattava ancora di uno screening di massa, quanto di esperimenti locali fatti dai singoli ospedali sui loro neonati. Dopo la scoperta che la fenilalanina era un metabolita che rimaneva stabile su sangue secco assorbito in carta da filtro, e che il campione così raccolto poteva essere spedito a un laboratorio centralizzato con relativa facilità, iniziò un processo di centralizzazione della metodica in un unico centro di

screening per un certo numero di neonati. Si potevano così ottenere risultati più affidabili, permettendo a un unico laboratorio di acquisire una competenza specifica (cosa precedentemente non scontata in quanto la malattia è relativamente infrequente) che implicava anche test di conferma della diagnosi e follow up di malattia<sup>2</sup>.

Fu successivamente nel 1968 che le linee guida con i criteri per l'esecuzione di uno screening neonatale vennero elaborate dalla WHO (*World Health Organization*) e pubblicate da Wilson e Jungner nei *Principles of Early Disease Detection*<sup>3</sup>. Questi criteri, ripresi da Frankenburg nel 1974 per evitare che l'esecuzione di screening neonatali eseguiti senza regole divenissero più dannosi che utili<sup>4</sup> e ora universalmente accettati, sono la base di ogni programma di screening e si possono così riassumere:

- 1) La malattia cercata deve costituire un problema sanitario importante per l'individuo e per la società;
- 2) La malattia può essere identificata dallo screening ad uno stadio latente (pre-sintomatico) o ad uno stadio sintomatico precoce;
- 3) La storia naturale della malattia, inclusa l'evoluzione da forma latente a malattia dichiarata, deve essere adeguatamente conosciuta;
- 4) Un test di screening deve essere disponibile;
- 5) Il test di screening deve essere ben accettato per la popolazione;
- 6) Un trattamento accettato ed efficace deve esistere per la malattia in questione;
- 7) Deve esistere un chiaro protocollo di trattamento (quali pazienti trattare);
- 8) Devono essere disponibili strutture necessarie per la diagnosi ed il trattamento della malattia;
- 9) Il costo dei casi positivi (inclusi conferma diagnostica e trattamento) deve essere noto;
- 10) Lo screening deve essere un processo continuativo;
- 11) I costi dello screening devono essere bilanciati adeguatamente dai costi per la salute (prevenzione dell'handicap).

In quegli stessi anni incominciò l'espansione degli screening neonatali, con un primo esperimento pilota, che documentò l'efficacia dello screening neonatale per l'ipotiroidismo congenito (IC), malattia cinque volte più frequente rispetto alla PKU<sup>5,6</sup>.

Successivamente comparvero i primi dati anche sugli screening neonatali per la fibrosi cistica, la sindrome adeno-genitale e diverse malattie metaboliche<sup>2,7</sup>.

In Italia, i primi screening neonatali per la PKU sono iniziati negli anni '70 utilizzando il test microbiologico di Guthrie che ha permesso di porre diagnosi di malattia già a tre giorni di vita. Attualmente in Italia, in base alla legge 104 del 5/2/1992, devono essere obbligatoriamente effettuati "(...) nel periodo neonatale (...) gli accertamenti utili alla diagnosi precoce per l'individuazione ed il tempestivo trattamento dell'ipotiroidismo congenito, della fenilchetonuria e della fibro-

si cistica (...)”, obbligatorietà poi ribadita nel decreto presidenziale del 9/7/1999. Tutti i neonati vengono dunque esaminati, tramite il prelievo di qualche goccia di sangue da una piccola puntura nel tallone, per queste poche malattie, al fine di diagnosticarle prima che i sintomi si presentino e dunque trattarle efficacemente con terapie adeguate, che consentano normale crescita e sviluppo del bambino. Esistono a tutt'oggi 26 centri di screening, regionali o interregionali, dislocati su tutto il territorio nazionale, che eseguono tutti gli screening obbligatori e altri decisi in base a legislazioni regionali.

Il programma di screening del Centro Regionale Malattie Metaboliche Neonatali di Verona che ha come bacino d'utenza tutti i nati in Veneto, Trentino Alto Adige e Friuli Venezia Giulia, permette di screenare circa 70000 neonati all'anno (nel 2005 complessivamente 67126 neonati). Lo screening è esteso per PKU, IC, come previsto dal decreto del Presidente del Consiglio dei Ministri 9 luglio 1999 (Gazz. Uff. 170 22/07/99), sindrome adeno-genitale, galattosemia, leucinosi, deficit di biotinidasi e deficit di glucosio-6-fosfato deidrogenasi. Mentre per lo screening neonatale dell'IC e della PKU c'è un accordo generale sull'efficacia e la positività del rapporto costo beneficio, la questione relativa agli altri screening neonatali è più complicata<sup>7-9</sup>.

Questa relazione propone una breve descrizione dell'esperienza presso il nostro Centro Regionale Malattie Metaboliche in merito a uno screening di efficacia consolidata e ben riconosciuta a livello mondiale: quello per l'IC, e a uno screening tuttora oggetto di controversie per il non univoco rapporto costo/beneficio: quello per la sindrome adeno-genitale; anche alla luce dell'ultima revisione attuata dall'*American Academy of Pediatrics* nel 1996 riguardante gli screening neonatali. Infine abbiamo voluto citare la *Tandem Mass* spettrometria una rivoluzionaria novità in ambito di screening neonatali tuttora oggetto di molte discussioni.

## Metodica di screening

Tra il terzo e il quinto giorno di vita, ma non oltre la prima settimana, a tutti i neonati viene prelevato del sangue dal calcagno tramite una semplice punzonatura dello stesso. Tale sangue viene assorbito su una particolare carta da filtro, fatto seccare e successivamente inviato al centro di screening di riferimento, completo di nome, cognome, data di nascita, ospedale di riferimento e corredato di qualche notizia clinica del bambino in questione (tipo di dieta, peso alla nascita, settimane di età gestazionale ecc.).

Una volta giunto al centro di screening di riferimento il sangue essiccato viene analizzato con metodiche differenti a seconda del test di screening che si vuole eseguire. I risultati vengono interpretati in base a un cut-off differente, per ogni test di screening (e personalizzato in ogni centro), calcolato in base alla media  $\pm$  2DS o in base al 99° percentile di una popolazione normale di riferimento. In caso di riscontro di un va-

lore definito positivo in base al cut-off così stabilito nel nostro centro ripetiamo il dosaggio del metabolita in esame sullo stesso cartoncino, e se persiste la positività informiamo, mediante lettera, il personale medico dell'ospedale di nascita del bambino. Nel caso che il valore ottenuto al primo dosaggio con la metodica di screening sia di più di due volte superiore al valore soglia, dato che fa ipotizzare un vero positivo, ne viene immediatamente data notizia al medico referente, sia per telefono che per telegramma, in modo tale da iniziare subito l'iter diagnostico specifico per arrivare a una diagnosi definitiva. Va infatti ricordato che le metodiche di screening sono basate su dosaggi semiquantitativi ed è inevitabilmente necessario un dosaggio quantitativo per porre diagnosi definitiva di malattia.

I risultati dei test di screening devono essere necessariamente comunicati al punto nascita di riferimento entro una specifica data che varia per ogni test di screening (in particolare 28 giorni per l'IC e 11 per la sindrome adreno-genitale).

### Ipotiroidismo congenito

In Italia lo screening neonatale per l'ipotiroidismo congenito è iniziato nel 1977 e ora la totalità dei nati viene sottoposta a tale indagine (legge naz. n°104 del 5/2/1992 che prevede nell'ambito della medicina preventiva, lo screening neonatale per l'IC).

L'IC è stata la patologia ideale per lo screening di massa perché con un'incidenza di 1/3000-1/4000, è la più frequente endocrinopatia congenita dell'infanzia.

La diagnosi clinica del deficit ormonale prima che severi e irreversibili danni neuropsichiatrici e neuromotori si siano instaurati, è difficile e solo 1/3 degli ipotiroidici in epoca pre-screening venivano diagnosticati entro il 3° mese di vita<sup>10</sup>.

L'esistenza di un'adeguata terapia ormonale sostitutiva, poco costosa e di semplice somministrazione, inoltre, consente la totale prevenzione di un grave handicap, fisico e mentale purchè iniziata tempestivamente.

Ormai l'obiettivo dello screening di eradicare il severo ritardo mentale dell'IC è stato ottenuto effettuando una diagnosi sicura in tutti i neonati affetti da insufficienza tiroidea e quindi IC mediante l'esclusiva determinazione biochimica del TSH e/o del T4.

Lo screening ha permesso inoltre di individuare la prevalenza delle differenti forme di IC includendo tutte le forme transitorie e quelle legate alla prematurità che sono tutt'oggi oggetto di controversie.

Nel neonato ipotiroidico tireoprivo "classico da manuale" si ha solitamente un T4 basso e un TSH elevato come conseguenza del feed back ipotalamo-ipo-fisario ma il comportamento degli ormoni tiroidei nei neonati affetti da insufficienza tiroidea alla nascita non è sempre così semplice.

Esistono tre principali strategie di screening.

Molti programmi di screening negli Stati Uniti misurano inizialmente la Tiroxina (T4) e successivamente la

tireotropina (TSH) nei neonati con T4 sotto il 10° percentile. Altri programmi di screening, come ad esempio in Canada, preferiscono il dosaggio iniziale del TSH. Con la prima strategia è possibile la diagnosi di neonati con rialzo tardivo del TSH (soprattutto prematuri) e quelli con ipotiroidismo centrale, mentre la seconda strategia permette di diagnosticare i pazienti con ipotiroidismo subclinico. Un recentissimo lavoro olandese ha evidenziato l'efficacia del dosaggio simultaneo del T4 TSH e della *Thyroxine-Binding Globulin* (TBG)<sup>11</sup>. Il nostro centro di screening ha scelto come strategia di screening il dosaggio simultaneo del T4 e TSH che ha come svantaggi un numero maggiore di falsi positivi e costi superiori rispetto al dosaggio singolo del T4 o del TSH ma è la strategia ideale perché consente l'individuazione della quasi totalità dei casi di IC<sup>12</sup>. Da un nostro lavoro infatti è emerso come in 11 anni di attività di screening utilizzando il programma del dosaggio simultaneo del T4 e TSH sono stati diagnosticati 21 bambini che sarebbero stati persi utilizzando le altre strategie. Il costo aggiuntivo è a nostro parere giustificato dai minori costi finanziari e sociali dei pazienti precocemente diagnosticati e trattati<sup>13</sup>.

### Sindrome adreno-genitale

La sindrome adreno-genitale è una patologia causata da difetti enzimatici specifici che bloccano la steroidogenesi surrenalica a vario livello, ereditata in tutti i casi con modalità autosomica recessiva<sup>14</sup>. Nel 90-95% dei casi è dovuta a deficit di 21-idrossilasi che ha un'incidenza mondiale di 1 caso ogni 15000 nati e si estrinseca clinicamente in 2 forme: una forma classica, evidenziabile già alla nascita, dovuta alla completa carenza dell'enzima; e una forma non classica o a insorgenza tardiva<sup>15</sup>. La prima, a sua volta, può presentarsi con perdita di sali, forma spesso misconosciuta soprattutto nei neonati di sesso maschile che non presentano segni clinici evidenti alla nascita e sono per tanto a rischio di morte al sopraggiungere di una grave crisi da insufficienza surrenalica, solitamente entro 1 mese dalla nascita; o con sola virilizzazione<sup>15,16</sup>.

Il primo progetto di screening per la sindrome adreno-genitale iniziò in Alaska tra la fine degli anni settanta e i primi anni ottanta del secolo scorso dopo che uno studio del 1969 rilevava un aumentato rischio di malattia in tale popolazione<sup>17,18</sup>. L'esperimento, pur con tutti i limiti propri di una prima attuazione, confermò la validità di un'indagine atta a riconoscere precocemente i maschi a rischio di perdita di sali e a rivalutare le femmine con grave virilizzazione inizialmente identificate come maschi<sup>19,20</sup>. Successivamente in diverse parti del mondo (Francia, Giappone, Nuova Zelanda, Scozia) iniziarono studi pilota di screening per identificare precocemente tale sindrome, consistenti nella misurazione dei livelli di 17-idrossiprogesterone (17-OHP)<sup>21-23</sup>. Tutti questi programmi utilizzarono inizialmente tecniche di studio radioimmunologiche, a parte lo studio

giapponese in cui si preferì usare un dosaggio immunologico enzima associato. Attualmente si utilizzano metodiche di dosaggio fluoroimmunologiche. Dal 1991 il programma di screening è stato esteso anche ad altri paesi quali Brasile, Svizzera, Svezia, Germania, Portogallo, Canada e Spagna<sup>24</sup>. In ogni paese la metodologia dello screening è attuata in maniera diversa; alcuni programmi richiedono, infatti, due valutazioni distinte a distanza di due settimane l'una dall'altra. Questo metodo di realizzazione è utilizzato sia in Argentina che in Texas, dove si è valutato che, mentre nessun paziente con perdita di sali era risultato negativo al primo controllo, ben il 61% dei pazienti con la sola forma virilizzante della malattia era riscontrata solo al richiamo dopo due settimane<sup>25</sup>.

Lo screening per l'identificazione della sindrome adreno-genitale attualmente impiegato si basa sul rilevamento di livelli elevati di 17-OHP; perciò la metodica è tecnicamente limitata al riscontro del deficit di 21-idrossilasi, ma in rari casi permette anche il riscontro del deficit di 3 $\beta$ -idrossi-steroido-deidrogenasi<sup>24,26</sup>.

Uno dei problemi principali nella metodica è stabilire il cut-off, dato che spesso nei prematuri i livelli del 17-OHP sono più elevati<sup>27</sup>. Proprio per questo ogni programma di screening ha stabilito dei propri valori di cut-off, spesso diversificati in base all'età gestazionale o al peso alla nascita<sup>28-30</sup>. Questa differenziazione ha lo scopo di abbassare il numero dei falsi positivi, di eliminare i falsi negativi e di mantenere accettabile il tasso di richiamo (*recall rate*, RR), cioè il rapporto tra i soggetti con valore di 17-OHP più elevato rispetto al cut-off e il numero totale dei soggetti screenati. Tale tasso abitualmente varia tra 0.5 e 1%<sup>24</sup>. Poiché la sindrome adrenogenitale si presenta con un'ampia variabilità di quadri clinici, un piccolo numero di falsi negativi sarà comunque sempre presente. Ciò, tuttavia, non limita la validità dello screening, poiché il principale obiettivo di questo non è tanto individuare tutti i casi di malattia, quanto quello di garantire il riscontro di tutte le gravi forme associate a perdita di sali, soprattutto nei neonati di sesso maschile asintomatici alla nascita, che possono evolvere, se non adeguatamente trattate, verso un esito infausto<sup>31,32</sup>.

Lo screening per la sindrome adrenogenitale in Veneto è iniziato nel settembre del 2001 e ormai quindi siamo giunti al sesto anno di attuazione. Una prima analisi dei risultati ottenuti con questo screening è stata effettuata dopo i primi 3 anni di esecuzione dello screening<sup>33</sup>. Su 128.282 neonati screenati (48.1% femmine e 51.9% maschi) abbiamo trovato 6 casi di forma classica di malattia con un'incidenza di 1:21380 neonati e 2 neonati affetti da forma non classica. Dei 6 neonati affetti 5 sono stati riscontrati solo grazie alla positività allo screening neonatale. Il breve periodo di tempo in cui era comunicato il risultato dello screening (entro 11 giorni di vita) ha permesso in tutti i casi di evitare seve-

re crisi da perdita di sali. Il RR totale era dello 0.21%, quello tra i neonati prematuri era di 0.94% e quello dei neonati di basso peso era del 1.76%. L'utilizzo di un cut-off correlato all'età gestazionale ha permesso una significativa riduzione del tasso dei richiami tra i neonati prematuri e si è rivelato più adeguato provocando una riduzione del numero totale di bambini richiamati rispetto a un cut-off correlato col peso alla nascita. Questo ha confermato i risultati ottenuti in altri paesi europei<sup>29,34</sup>.

Quanto all'utilità di uno screening per la diagnosi precoce per la sindrome surreno-genitale, permangono dei dubbi non ancora chiariti a livello internazionale data la mancanza di studi specifici. Le argomentazioni contro tale screening riguardano la rarità della malattia, il numero elevato di falsi positivi soprattutto fra i nati prematuri<sup>35,36</sup>, un rapporto costo-beneficio discutibile.

La modificazione del cut-off in relazione al peso alla nascita o all'età gestazionale ha permesso una riduzione dei falsi positivi. Inoltre in via generale l'effettuazione di uno screening precoce per questa malattia potenzialmente mortale viene considerato in generale un atto medicalmente valido. Due lavori condotti rispettivamente in Europa e in America hanno dimostrato che lo screening neonatale riduce il tempo medio di diagnosi di malattia provocando una riduzione della gravità dei sintomi nei soggetti affetti<sup>37,38</sup>. Non ci sono poi studi riguardo ai soggetti riscontrati avere forme non classiche di malattia che rischiano di assumere inutilmente una terapia medica, né riguardo al costo economico o psico-sociale dei falsi positivi allo screening neonatale.

Riguardo al costo economico dello screening sembra incida poco quando inserito nel contesto di un programma di screening già funzionale per altre malattie.

Nel 2002 un rapporto congiunto delle Società di Endocrinologia Pediatrica Americana ed Europea, indicava il beneficio dello screening neonatale per la sindrome adrenogenitale come univoco e ne raccomandava la generalizzazione<sup>35,39</sup>.

## Una nuova tecnologia di screening: la tandem-mass spettrometria

Negli anni '90 Millington sviluppò una nuova tecnologia d'analisi che ha creato nuove importanti possibilità nella diagnostica delle Malattie Metaboliche: la tandem-mass spettrometria. Questa metodica consente, da un volume molto piccolo di materiale biologico, di misurare moltissime sostanze del metabolismo intermedio identificate in base alla loro massa. La metodica può identificare più di 30 metaboliti, ciascuno dei quali è potenzialmente un marker di una malattia metabolica.

Grazie alla diffusione della tandem-mass spettrometria, numerosi paesi (ad esempio la Germania, gli USA e l'Australia) hanno iniziato negli ultimi anni dei programmi di screening neonatale allargato a numerose

malattie metaboliche. In Italia alcune regioni hanno iniziato degli studi pilota, solo la Toscana ha attualmente una legge regionale che regola lo screening neonatale allargato. Tra i diversi paesi dove lo screening allargato funziona già da alcuni anni, vi sono notevoli differenze sul numero ed il tipo di malattie diagnosticate. Non c'è ancora un consenso internazionale su quali malattie sia utile (ed eticamente giusto) diagnosticare alla nascita e la discussione su questo tema è molto attiva e difficile tra gli esperti del campo. Anche all'interno degli USA, diversi stati effettuano lo screening per diverse malattie ed altri stati non lo fanno affatto. Il conflitto principale sta tra la potenza della tecnologia, che può misurare moltissime sostanze e diagnosticare più di 30 malattie metaboliche, e la conoscenza ancora incompleta del decorso naturale delle numerose malattie diagnosticabili, nonché delle limitate possibilità di cura per alcune di queste.

Mancano dati scientifici sicuri su molte di queste malattie ed ogni centro si avvale della propria esperienza basata sulla propria casistica. Anche l'estrema variabilità fenotipica delle malattie metaboliche ereditarie non aiuta in queste difficili decisioni: a parità di difetto enzimatico, alcuni pazienti presentano un decorso clinico molto grave, mentre altri molto più lieve; alcuni rispondono bene ad una terapia dietetica o farmacologica, altri molto meno. È dunque molto difficile predire la prognosi del singolo paziente una volta diagnosticata la malattia, così come la sua possibile risposta terapeutica, e dunque anche l'utilità dello screening (diagnosi pre-sintomatica) sul caso specifico. Su larga scala ci si aspetta in generale un beneficio dallo screening neonatale allargato: aumentando i casi diagnosticati si potrà dunque conoscere e seguire nel tempo questi malati ed apprendere da loro la storia naturale della malattia. A lungo termine, dunque, le conoscenze aumenteranno come anche le possibilità di cura. La possibilità di agire sulla malattia in fase pre-sintomatica è la chiave della prevenzione dell'handicap, soprattutto neurologico, che deriva da queste malattie, e ciò ha un innegabile valore sia per il singolo che per la società<sup>40-42</sup>.

## Bibliografia

- Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* 1963; 32:338-43.
- McCabe LL, Therrell BLJ, McCabe ERB. Newborn screening: rationale for a comprehensive, fully integrated public health system. *Mol Gen Metab* 2002; 77:267-73.
- Wilson JMG, Jungner G. Principles and practise of screening for disease. *Public Health Papers*; 1968: No 34, Geneva: World Health Organization.
- Therrell BL. US newborn screening policy: dilemmas for the twenty-first century. *Mol Gen Metab* 2001; 74:64-74.
- Dussault JH, Laberge C. Thyroxine (T4) determinations in dried blood by radioimmunoassay. A screening method for neonatal hypothyroidism. *Union Med Can* 1973; 102:2062-4.
- Dussault JH, Coulombe P, Laberge C. Preliminary report on a mass screening program for neonatal hypothyroidism. *J Pediatr* 1974; 86:620-4.
- Clague A, Thomas A. Neonatal biochemical screening for disease. *Clin Chim Acta* 2002; 315:99-110.
- Carreiro-Lewandowski E. Newborn screening: an overview. *Clin Lab Sci* 2002; 15:229-38.
- Kerruish NJ, Robertson SP. Newborn screening: new developments, new dilemmas. *J Med Ethics* 2005; 31:393-8.
- Klein AH, Agustin AV, Foley TP. Successful laboratory screening for congenital hypothyroidism. *Lancet* 1974; 2:77-9.
- Kempers MJ, Lanting CI, Van Heijst FJ, Van Trotsenburg AS, Wiedijk BM, De Vijlder JJ, et al. Neonatal screening for congenital hypothyroidism based on thyroxine, thyrotropin and thyroxine-binding globulin measurement: potentials and pitfalls. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:3370-6.
- American Academy of Pediatrics; Rose SR; Section on Endocrinology and Committee on Genetics, American Thyroid Association; Brown RS; Public Health Committee, Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society; Foley T, Kaplowitz PB, Kaye CI, Sundararajan S, Varma SK. Update of newborn screening and therapy for congenital hypothyroidism. *Pediatrics* 2006; 117:2290-303.
- Zamboni G, Zaffanello M, Rigon F, Radetti G, Gaudino R, Tatò L. Diagnostic effectiveness of simultaneous thyroxine and thyroid-stimulation hormone screening measurements. Thirteen years' experience in Northeast Italian Screening programme. *J Med Screen* 2004; 11:8-10.
- Hughes IA. Congenital adrenal hyperplasia-a continuum of disorders. *Lancet* 1998; 352:752-4.
- Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2001; 30:31-59.
- Merke DP, Bornstein SR. Congenital adrenal hyperplasia. *Lancet* 2005; 365:2125-36.
- Pang S, Murphy W, Levine LS, Spence DA, Leon A, La Franchi S, et al. A pilot newborn screening program for congenital adrenal hyperplasia in Alaska. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; 55:413-20.
- Hirschfeld AJ, Fleshman JK. An unusually high incidence of salt-losing congenital adrenal hyperplasia in the Alaskan Eskimo. *J Pediatr* 1969; 75:492-4.
- Nordenström A, Wedell A, Hagenfeldt L, Marcus C, Larsson A. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia: 17-hydroxyprogesterone levels and CYP21 genotypes in preterm infants. *Pediatrics* 2001; 108:E68.
- Witchel SF, Nayak S, Suda-Hartman M, Lee PA. Newborn screening for 21-hydroxylase deficiency: results of CYP21 molecular genetic analysis. *J Pediatr* 1997; 131:328-31.
- Balsamo A, Cacciari E, Piazzzi S, Cassio A, Bozza D, Pirazzoli P, et al. Congenital adrenal hyperplasia: neonatal mass screening compared with clinical diagnosis only in the Emilia-Romagna region of Italy, 1980-1995. *Pediatrics* 1996; 98:362-7.
- Cutfield WS, Webster D. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in New Zealand. *J Pediatr* 1995; 126:118-21.
- Valentino R, Tommaselli AP, Rossi R, Lombardi G, Varro-ne S. A pilot study for neonatal screening of congenital

- adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase and 11- $\beta$ -hydroxylase deficiency in Campania region. *J Endocrinol Invest* 1990; 13:221-5.
24. Therrel BL. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2001; 30:15-30.
  25. Therrel BL, Berenbaum SA, Manter-Kapanke V, Simmank J, Korman K, Prentice L, et al. Results of screening 1,9 million Texas newborns for 21-hydroxylase-deficient congenital adrenal hyperplasia. *Pediatrics* 1998; 101:583-90.
  26. Honour JW, Torresani T. Evaluation of neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *Horm Res* 2001; 55:206-11.
  27. Saeedi SA, Dean H, Dent W, Cronin C. Reference ranges for serum cortisol and 17-hydroxyprogesterone levels in pre-term infants. *J Pediatr* 1995; 126:985-7.
  28. Gruñeiro-Papendieck L, Prieto L, Chiesa A, Bengolea S, Bossi G, Bergadá C. Neonatal screening program for congenital adrenal hyperplasia: adjustments to the recall protocol. *Horm Res* 2001; 55:271-7.
  29. Torresani T, Grüters A, Acherz R. Improving the efficacy of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia by adjusting the cut-off level of 17- $\alpha$ -hydroxyprogesterone to gestational age. *Screening* 1994; 3:77-84.
  30. Allen DB, Hoffman GL, Fitzpatrick P, Laessing R, Maby S, Slyper A. Improved precision of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia using weight-adjusted criteria for 17-hydroxyprogesterone levels. *J Pediatr* 1997; 130:128-33.
  31. Working Group on Neonatal Screening of the European Society for Paediatric Endocrinology. Procedure for neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Horm Res* 2001; 155:201-5.
  32. Root AW. Neonatal screening for 21-hydroxylase deficient congenital adrenal hyperplasia-the role of CYP21 analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 84; 1999:1503-4.
  33. Cavarzere P, Camilot M, Teofoli F, Tatò L. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia in North-eastern Italy: a report three years into the program. *Horm Res* 2005; 63:180-6.
  34. Van Der Kamp HJ, Oudshoorn CGM, Elvers BH, Van Baarle M, Otten BJ, Wit JM, et al. Cutoff level of 17- $\alpha$ -hydroxyprogesterone in neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia should be based on gestational age rather than on birth weight. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:3904-7.
  35. Joint ESPE/LWPES CAH working group: Consensus statement on 21-hydroxylase deficiency from the European Society for Paediatric Endocrinology and Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society. *Horm Res* 2002; 58:188-95.
  36. Berry J, Betts P, Wood PJ. The interpretation of blood spot 17  $\alpha$ -hydroxyprogesterone levels in term and pre-term neonates. *Ann Clin Biochem* 1986; 23:546-51.
  37. Van der Kamp HJ, Noordam K, Elvers B, Van Baarle M, Otten BJ, Verkerk PH. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in the Netherlands *Pediatrics*. 2001; 108:1320-4.
  38. Brosnan PG, Brosnan CA, Kemp SF, Domek DB, Jelley DH, Blackett PL, et al. Effect of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1999; 153:1272-8.
  39. Consensus statement on 21-hydroxylase deficiency from the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society and the European Society for Paediatric Endocrinology. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:4048-53.
  40. Millington DS, Kodo N, Norwood DL, Roe CR. *Tandem Mass* spectrometry: a new method for acylcarnitine profiling with potential for neonatal screening for inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis* 1990; 13:321-4.
  41. Kaye CI; Committee on Genetics; Accurso F, La Franchi S, Lane PA, Northrup H, Pang S, Schaefer GB. Introduction to the newborn screening fact sheets. *Pediatrics* 2006;118:1304-12.
  42. Wilcken B. Recent advances in newborn screening. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30:129-33.