

# Screening Neonatale Esteso



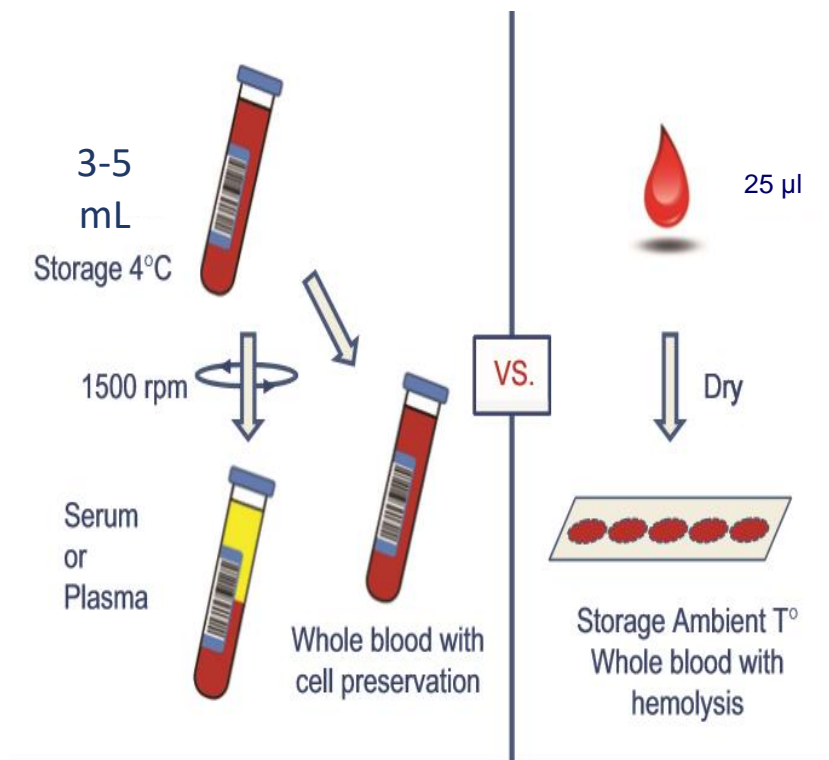
# Prelievo del campione DBS



Area di prelievo

Collezionamento di alcune gocce di sangue sulla cards

# Perchè il DBS?



# Prelievo del campione DBS

PerkinElmer 226 Ahlstrom  
 LOT 110092 / 317442 2020-06-30  
 IVD

MAGAZZINO  
 1000000000  
 CHECK-IN

MAGAZZINO  
 1000000000  
 CHECK-IN

Codice Ospedale  
 Trasferito da altro ospedale Si  No

Cognome neonato  
 Nome neonato  
 Sesso  M  F  
 Peso E.G. +  
 Data nascita Ora (hhmm)  
 Gemello

Patologia meconiale Si  No  Etnia Cau MedOr Isp As Afr  
 Terapia cortisonica Si  No   
 Patologia tiroidea materna Si  No   
 Ittero Si  No  Trasfusione Si  No   
 Terapia antibiotica Si  No

Potestà parentale  
 Cognome  
 Nome  
 Indirizzo  
 Comune  
 CAP Tel.  
 Dissenso analisi genetiche

Parto Naturale  T.C.  Altro   
 Alimentazione Materna  Artificiale   
 Mista  Enterale   
 TPN  TPN + Carnitina

Firma del responsabile del prelievo .....  
 Note

Prelievo  <48h vita   
 Basale   
 Bis   
 Richiamo

TEST  PHE  TSH  IRT  17OHP  GAL  BTD  AA/AC  SCID

PerkinElmer Health Sciences, Inc. 2700 Franklin Ave., Waltham, MA 02451, USA  
 EC REP Emergo Europe, Molendriest 15, 2013 BH The Hague, The Netherlands

## Spot Check

### Valid specimen:



Allow a sufficient quantity of blood to soak through to completely fill the preprinted circle on the filter paper. Fill all required circles with blood. Do not layer successive drops of blood or apply blood more than once in the same collection circle. Avoid touching or smearing spots.

### Invalid specimen:

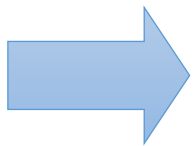
### Possible causes:

- Specimen quantity insufficient for testing.
  - Removing filter paper before blood has completely filled circle or before blood has soaked through to second side.
  - Applying blood to filter paper with a capillary tube.
  - Allowing filter paper to come into contact with gloved or ungloved hands or substances such as hand lotion or powder, either before or after blood specimen collection.
- Specimen appears scratched or abraded.
  - Applying blood with a capillary tube or other device.
- Specimen not dry before mailing.
  - Mailing specimen before drying for a minimum of four hours.
- Specimen appears supersaturated.
  - Applying excess blood to filter paper, usually with a device.
  - Applying blood to both sides of filter paper.
- Specimen appears diluted, discolored or contaminated.
  - Squeezing or "milk" of area surrounding the puncture site.
  - Allowing filter paper to come into contact with gloved or ungloved hands or substances such as alcohol, formula, antiseptic solutions, water, hand lotion or powder, etc., either before or after blood specimen collection.
  - Exposing blood spots to direct heat.
- Specimen exhibits serum rings.
  - Not wiping alcohol from puncture site before making skin puncture.
  - Allowing filter paper to come into contact with alcohol, hand lotion, etc.
  - Squeezing area surrounding puncture site excessively.
  - Drying specimen improperly.
  - Applying blood to filter paper with a capillary tube.
- Specimen appears clotted or layered.
  - Touching the same circle on filter paper to blood drop several times.
  - Filling circle on both sides of filter paper.

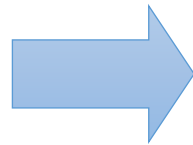
- ✓ 1 goccia di sangue ha un volume di circa 25µL
- ✓ Tipicamente viene utilizzato **uno spot punzonato** per test: **3-3,2 µL** di sangue

# The first week after birth

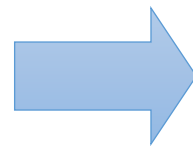
# Timing is Everything!



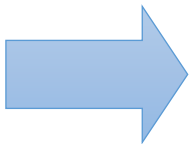
Sample collection within 48-72 hours of life



Shipping of samples to the screening lab within 24-48 hours after sample collection

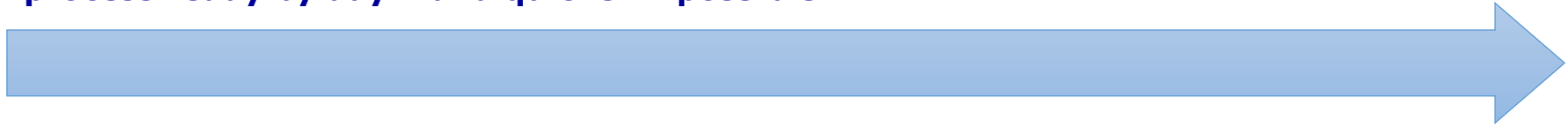


Screening lab work 24-48 hours from the sample arrival in the NBS lab

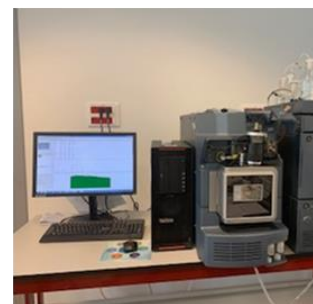
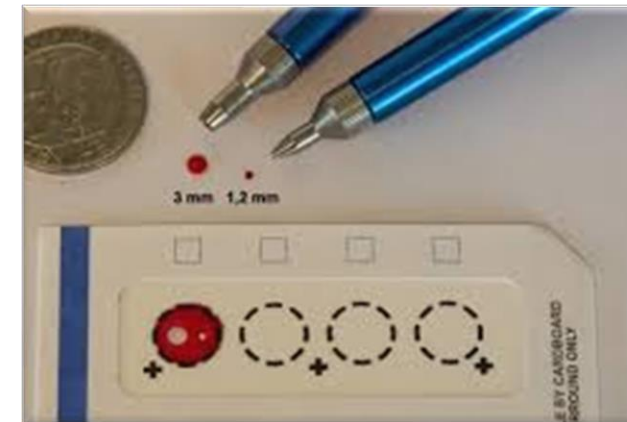
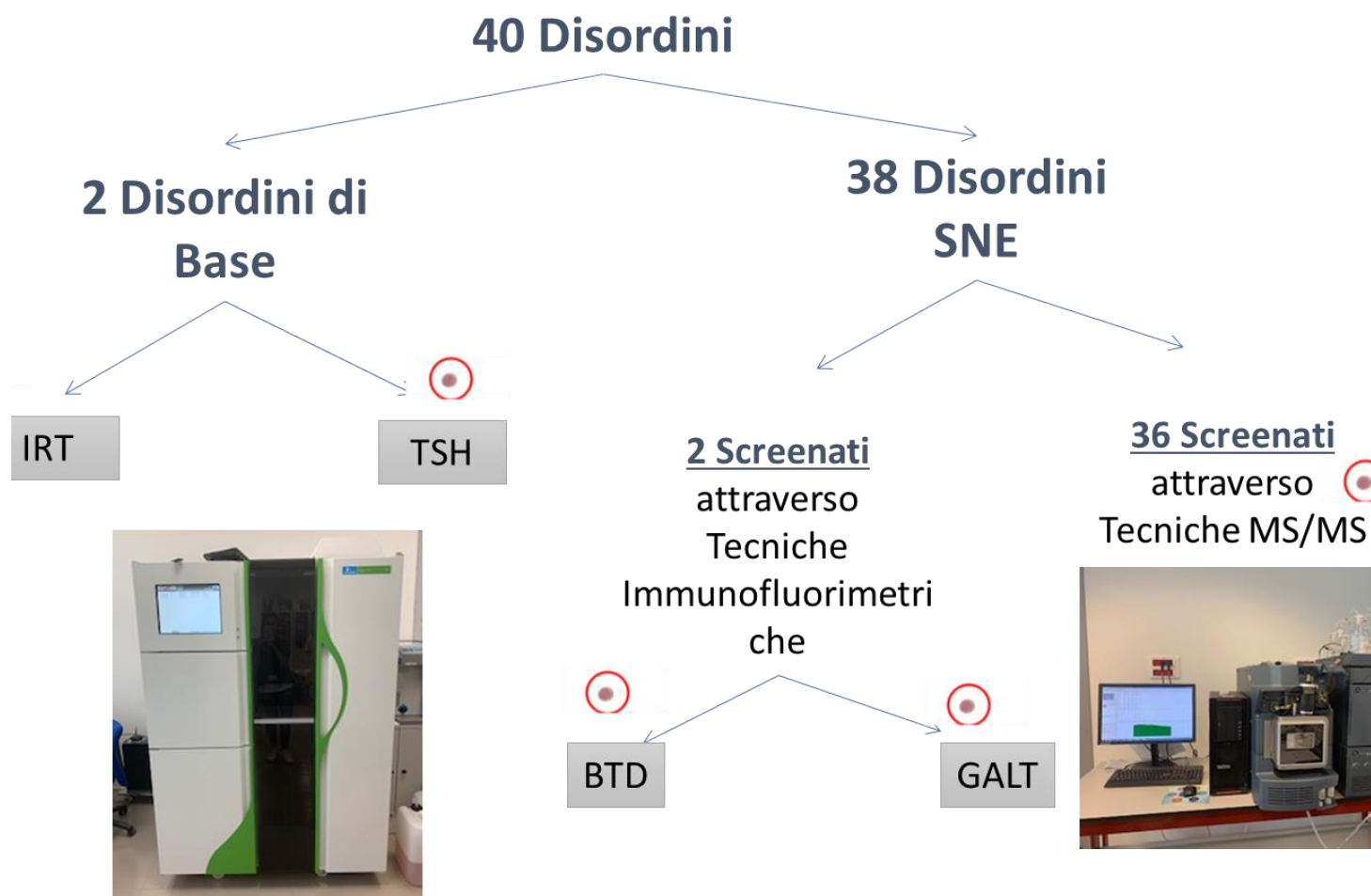


Results reported or baby recalled

Time is very important in newborn screening. An optimal goal is to have the process ready by day 7 and quicker if possible

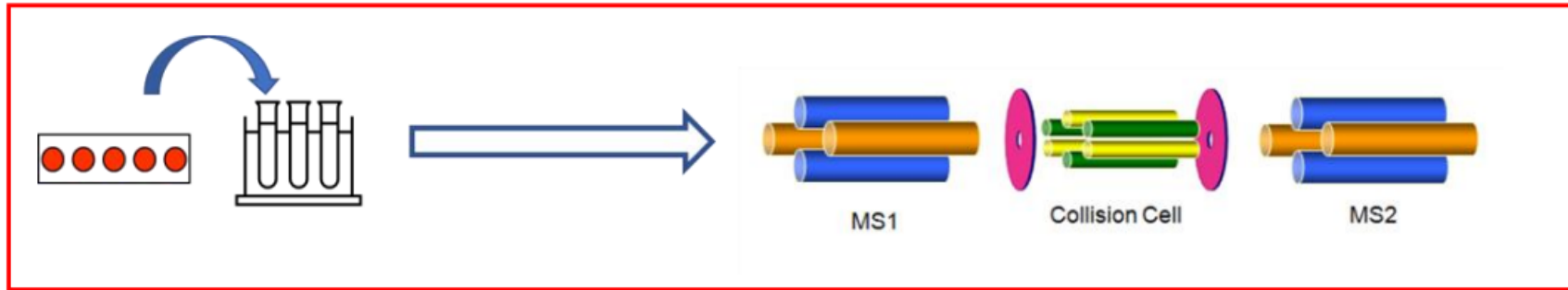


# *I disordini dello screening*

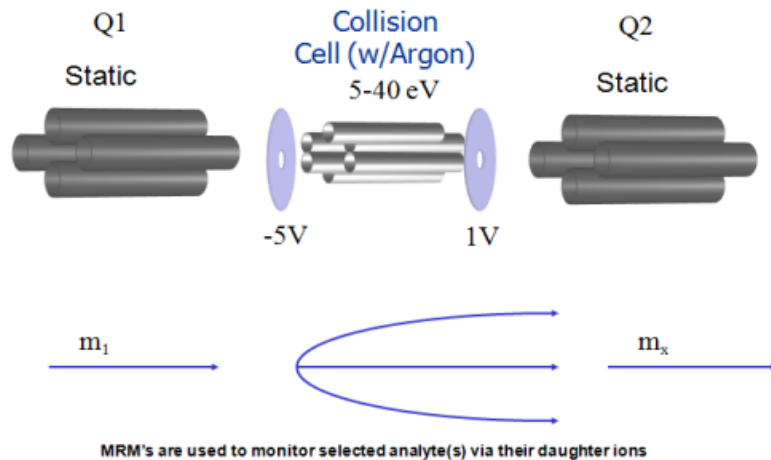


# Principi della Spettrometria di massa tandem

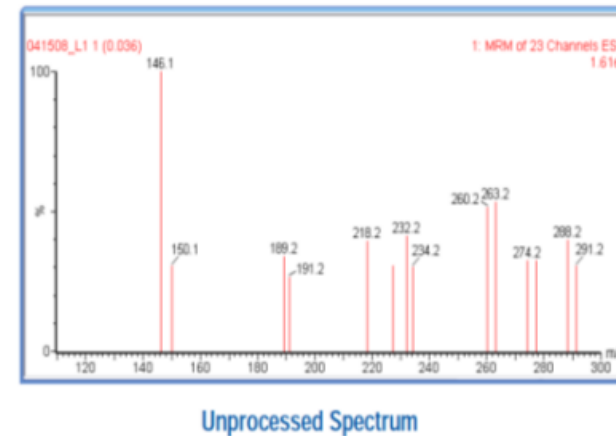
## Workflow analisi di screening



## Tipo di analisi: Multiple Reaction Monitoring (MRM)



## Risultati



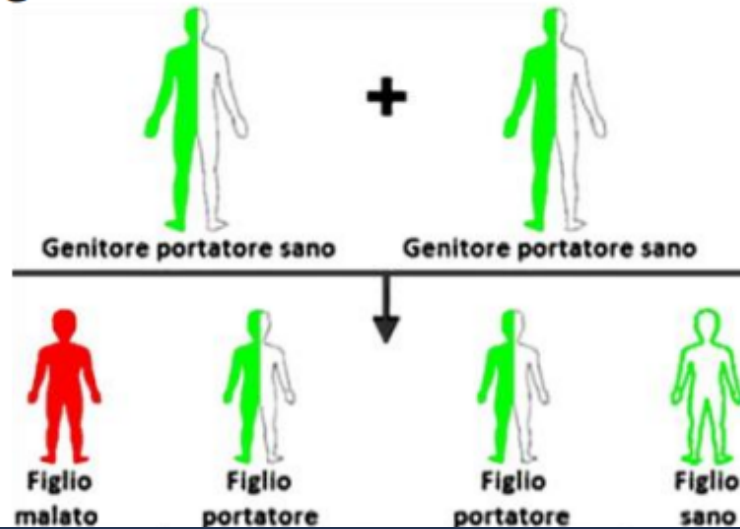
## I disordini dello Screening

Deficit Metabolismo  
AMMINOACIDI

Difetti della Beta-  
Ossidazione

Difetti del Ciclo Dell'Urea

Acidurie Organiche



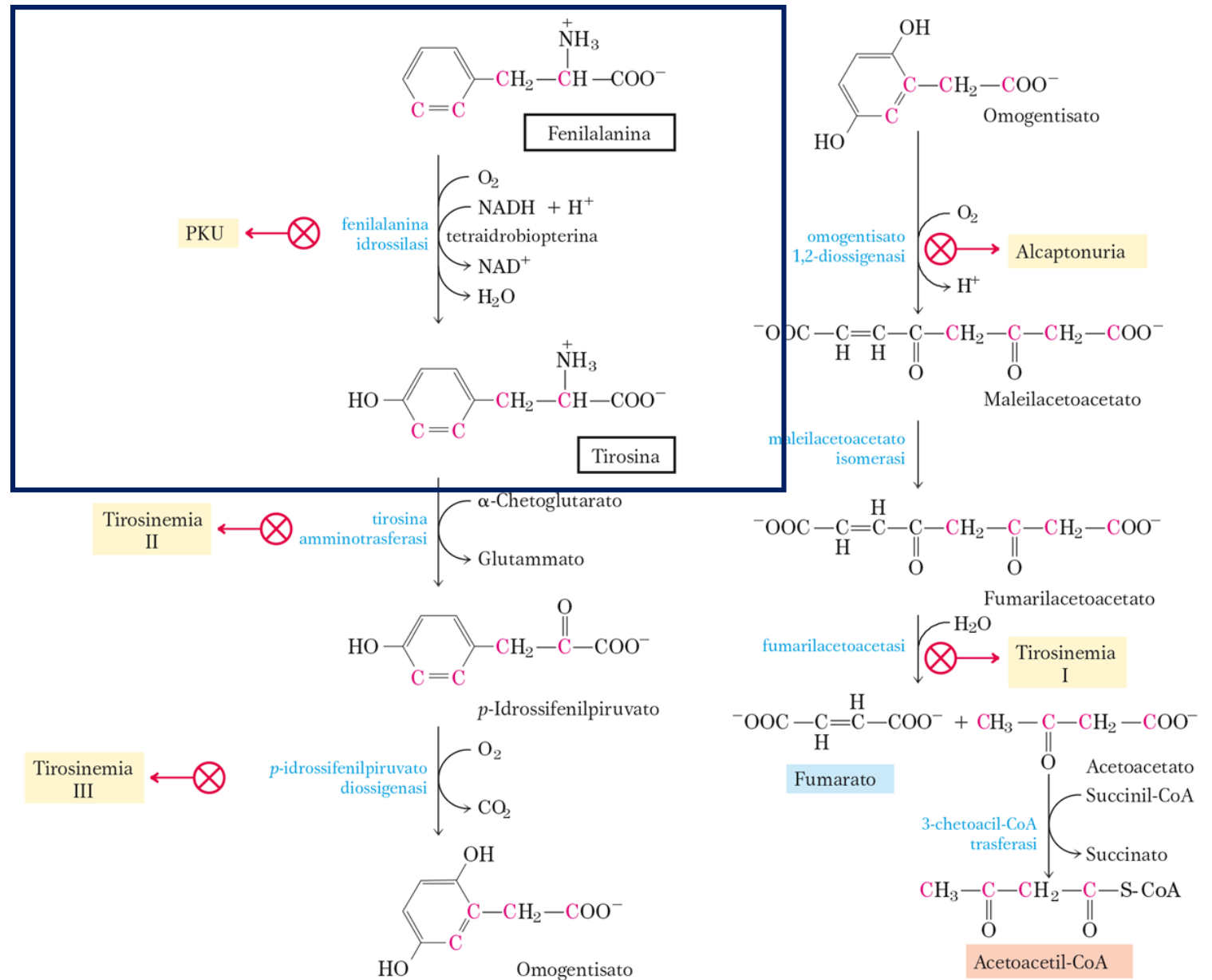


## 1. Disordini del metabolismo del trasporto degli amminoacidi: AA

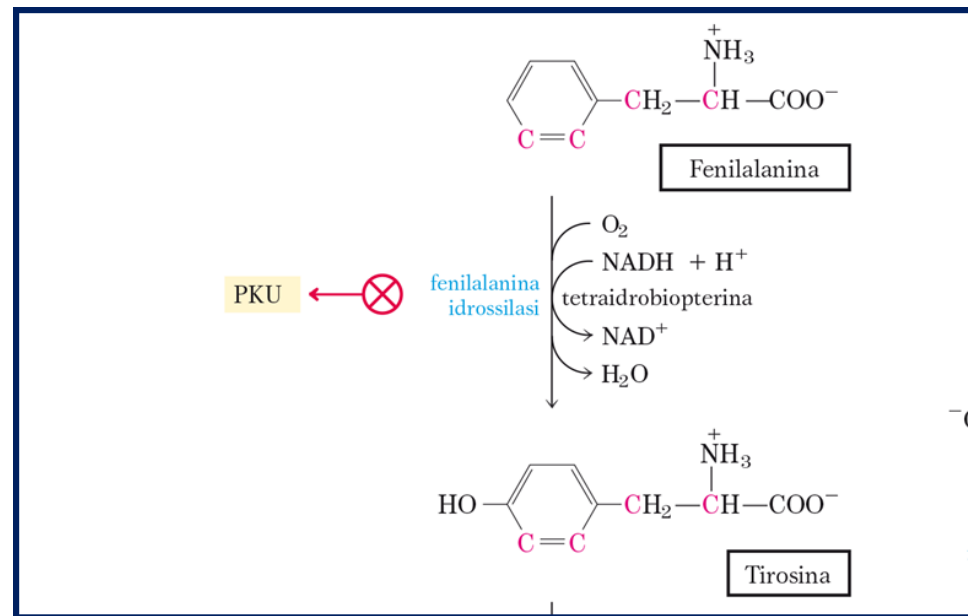
- *Rif. Legge 167/2016 D.M.13 Ottobre 2016 e normative correlate e Documento di consenso SIMMESN 2018*

Malattia	Acronimo	Gruppo	Denominazione del Gruppo Patologia	Marker Primari	ALTO RISCHIO
Fenilchetonuria	PKU	AA	DISTURBI DEL METABOLISMO E DEL TRASPORTO DEGLI AMINOACIDI	Phe	NO
Iperfenilalaninemia benigna	HPA			Phe	NO
Deficit della biosintesi del cofattore biopterina	BIOPT (BS)			Phe	NO
Deficit della rigenerazione del cofattore biopterina	BIOPT (REG)			Phe	NO
Tirosinemia tipo I	TYR I			SUAC	SI
Tirosinemia tipo II	TYR II			Tyr	NO
Malattie delle urine a sciroppo d'acero	MSUD			Val XLeu	SI
Omocistinuria (difetto CBS)	HCY			Met alta	SI
Omocistinuria (difetto severo di MTHFR)	MTHFR			Met bassa	SI

# Fenilchetonuria (PKU): Pathway metabolico



# Fenilchetonuria (PKU): Diagnosi neonatale



2 Metaboliti importanti

Phe

Phe/Tyr

Aumento della SPECIFICITÀ

- Richiamati 6 bambini
- 4 sono stati confermati come iperfenilalaninemie
- 2 PKU

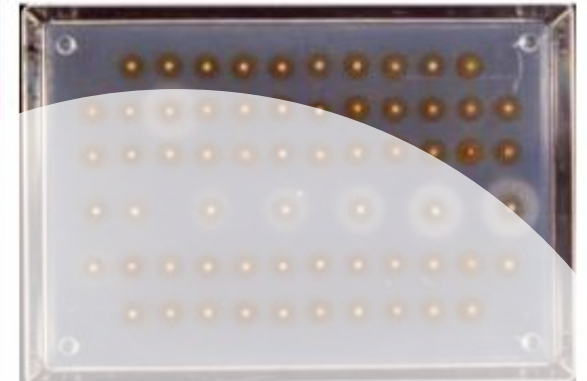
Bacterial inhibition assay (BIA):  
Specialized bacteria that will not grow in an agar culture medium in the absence of Phe



## Guthrie Card



PKU  
Saggio di inibizione batterica



UN PÒ DI  
STORIA

# Newborn Screening for Phenylketonuria

Deficit Multiplo delle carbossilasi

# ACIDEMIE

Deficit del 3-Metil crotonil-CoA carbossilasi

Deficit del 2-Metil butirril-CoA deidrogenasi

Aciduria 3-Metil glutaconica

Deficit del Isobutirril-CoA deidrogenasi

Aciduria Malonica

Acidemia glutarica tipo I

Aciduria 2-Metil 3-idrossi butirrico

Acidemia Isovalerica

Aciduria 3-Idrossi 3-metil glutarica

Deficit del Beta-chetotilasi

Acidemia Metilmalonica

Acidemia Propionica

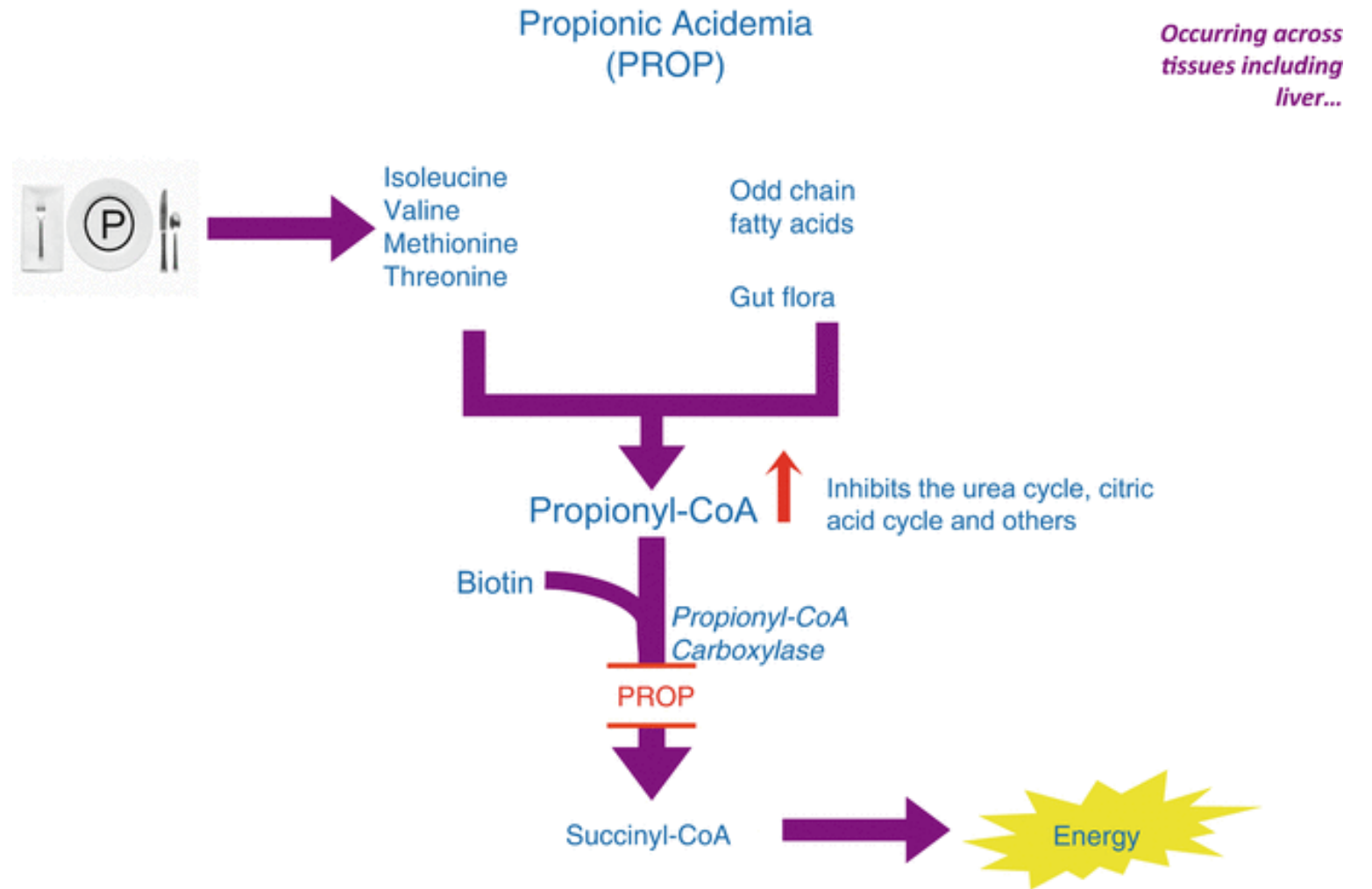


## 2. Acidemie Organiche: OA

- *Rif. Legge 167/2016  
D.M.13 Ottobre 2016 e  
normative correlate e  
Documento di consenso  
SIMMESN 2018*

Malattia	Acronimo	Gruppo	Denominazione del Gruppo Patologia	Marker Primari	ALTO RISCHIO
Acidemia glutarica tipo I	GA I	OA	DISTURBI DEL METABOLISMO E DEL TRASPORTO DEGLI AMINOACIDI	C5DC	SI
<b>Acidemia isovalerica</b>	IVA			C5	SI
Deficit di beta-chetotiolasi	BKT			C5:1 C5OH	SI
Acidemia 3-idrossi 3-metilglutarica	HMG			C5OH C6DC	SI
<b>Acidemia propionica</b>	PA			C3	SI
<b>Acidemia metilmalonica (Mut)</b>	MUT			C3	SI
Acidemia metilmalonica (Cbl-A)	Cbl A			C3	SI
Acidemia metilmalonica (Cbl-B)	Cbl B			C3	SI
Acidemia metilmalonica con omocistinuria (deficit Cbl C)	Cbl C			C3 alta Met bassa	SI
Acidemia metilmalonica con omocistinuria (deficit Cbl D)	Cbl D			C3 alta e/o Met bassa	SI
Deficit di 2-metilbutiril-CoA-deidrogenasi	2MBG			C5	SI
Aciduria malonica	MAL			C3DC	SI
Deficit multiplo di carbossilasi	MCD			C5OH	SI

# ACIDEMIA PROPIONICA



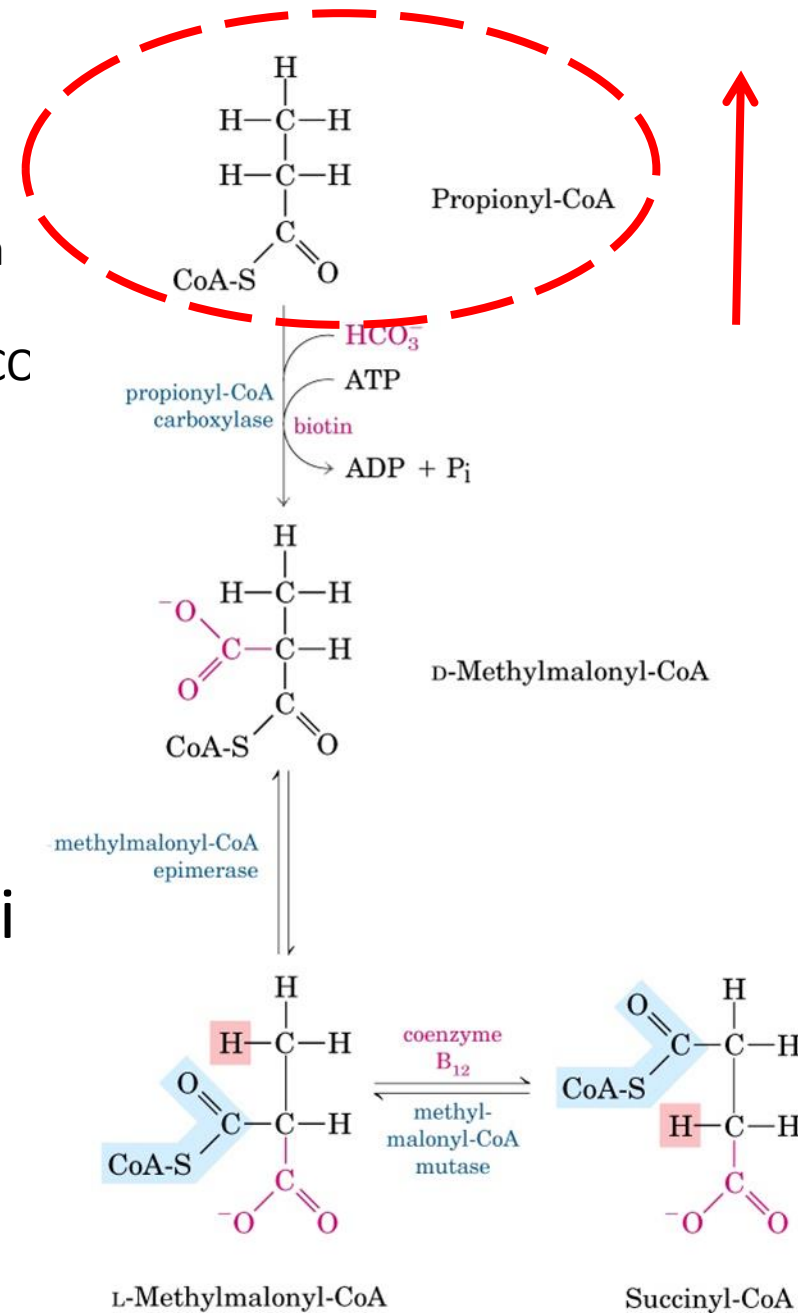
# Acidemia Propionica

L'Acidemia propionica, è un difetto dell'Enzima PropionilCoA carbossilasi, che carbossila il PropionilCoA (C3), per formare METIL-MALONIL CC verso la formazione di SUCCINILCoA.

Incidenza bassissima:  
1-9 / 1 000 000

## Manifestazioni Cliniche

- Si manifesta con scompensi metabolici potenzialmente letali
- Disfunzioni Neurologiche
- Cardiomiopatie



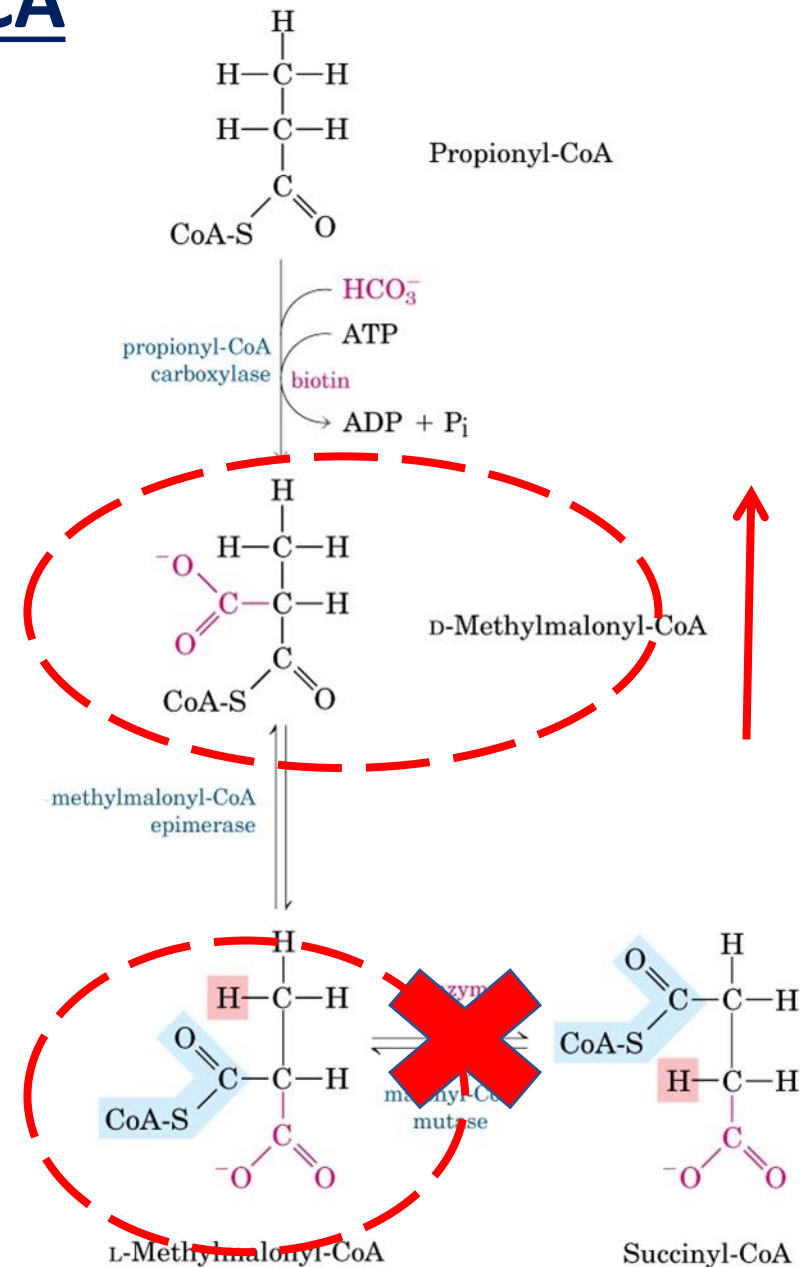


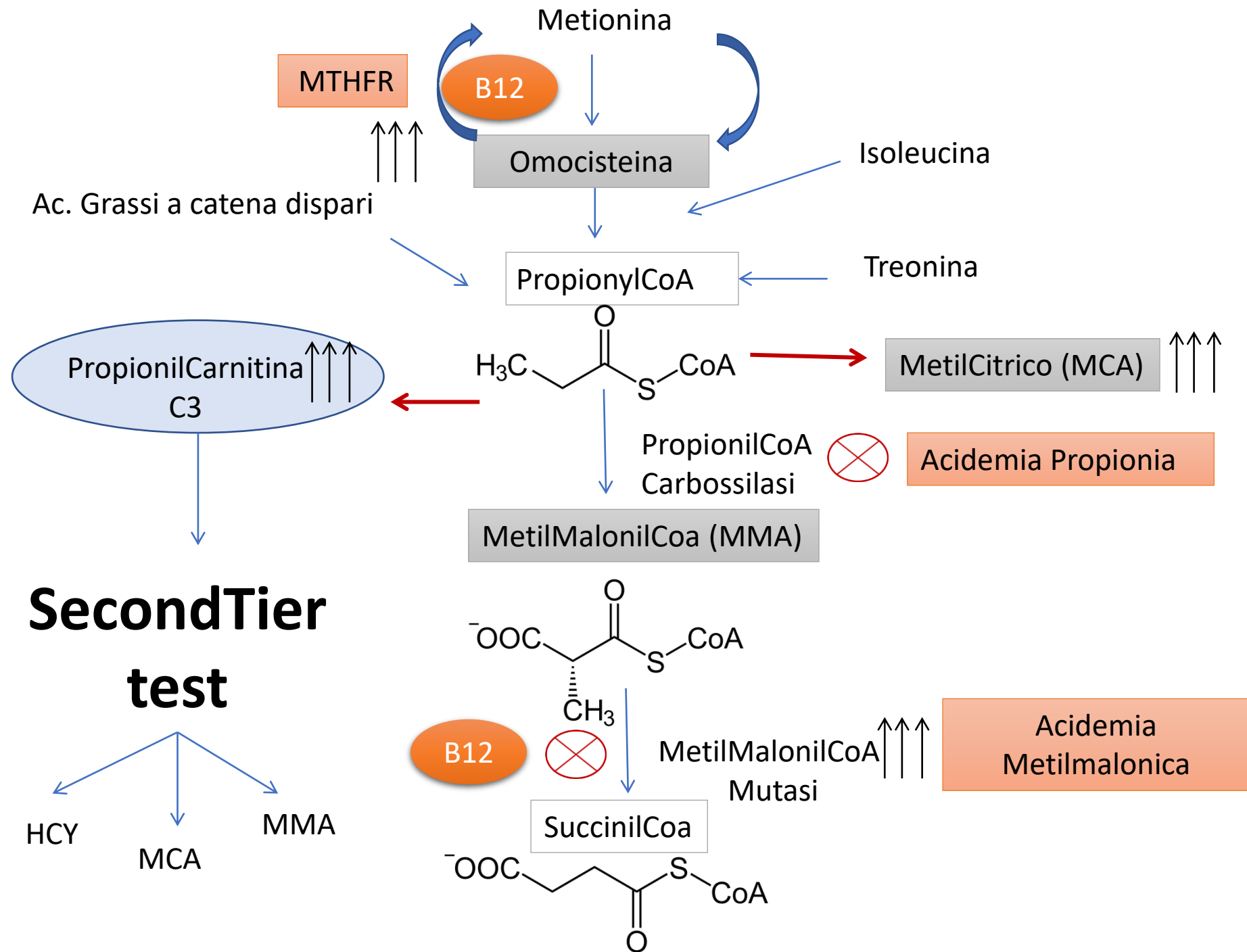
# ACIDEMIA METILMALONICA

La prevalenza complessiva delle diverse forme di MA è stata stimata tra **1/48,000 e 1/61.000** nel Nord America, e 1/26,000 in Cina, anche se solo una piccola parte delle forme corrisponde all'acidemia metilmalonica refrattaria alla vitamina B12.

## Manifestazioni Cliniche

- letargia,
- ritardo della crescita,
- vomito ricorrente,
- disidratazione,
- distress respiratorio,
- ipotonia muscolare,
- epatomegalia e coma.



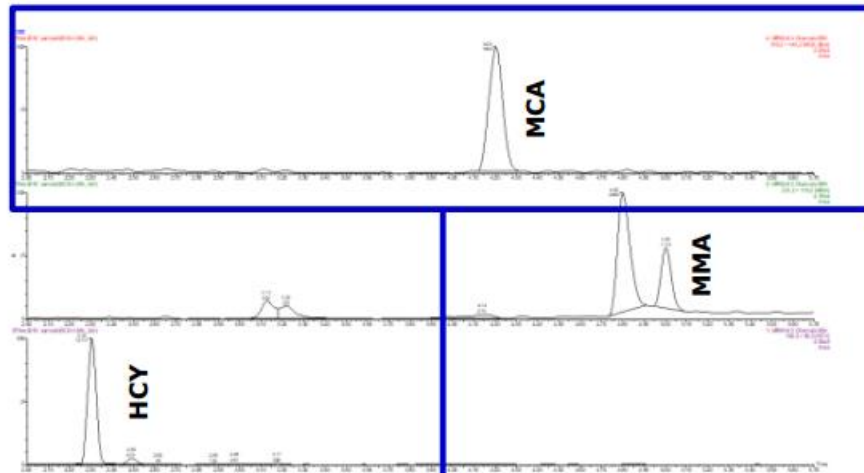


# SECOND TIER TEST: - METILMALONICO (MMA) - OMOCISTEINA (HCY) - ACIDO METILCITRICO (MCA)

## METIL CITRICO (MCA)

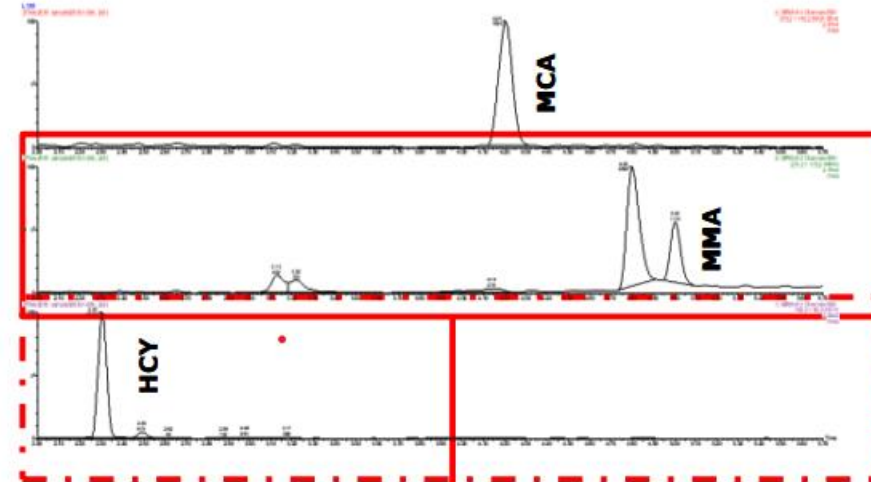
## SECOND TIER TEST:

- METILMALONICO (MMA)
- OMOCISTEINA (HCY)



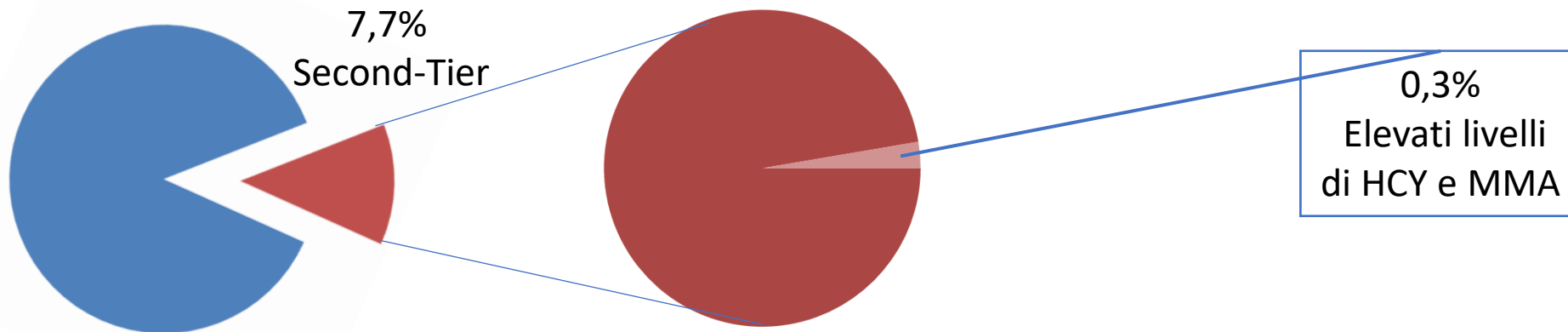
SI DOSA ACIDO METIL CITRICO IN  
CROMATOGRAFIA LIQUIDA  
ACCOPIATA A SPETTOMETRIA DI  
MASSA

RIPRODUZIONE VIETATA



SI DOSA ACIDO MMA E HCY IN  
CROMATOGRAFIA LIQUIDA  
ACCOPIATA A SPETTOMETRIA DI  
MASSA

DATI CENTRO SCREENING DI CHIETI NEL 2020



# Fattori importanti nei Second-Tier

1

**545**  
Second-Tier



**54**  
Sottoposti a  
**Terapia**  
**Antibiotica e/o Cortisonica**



**Nessuno**  
Ha presentato  
Livelli Elevati di  
HCY/MCA/MMA



2

Difetti Materni

**5**

Madri Richiamate



**Tutte**  
Hanno Mostrato  
elevati livelli di HCY  
**Hanno Iniziato**  
**un percorso diagnostico**  
**1** Ha una mutazione MTHFR



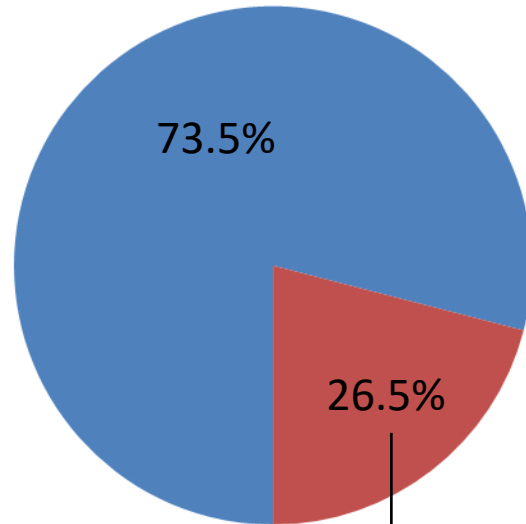
3

Dieta Vegana

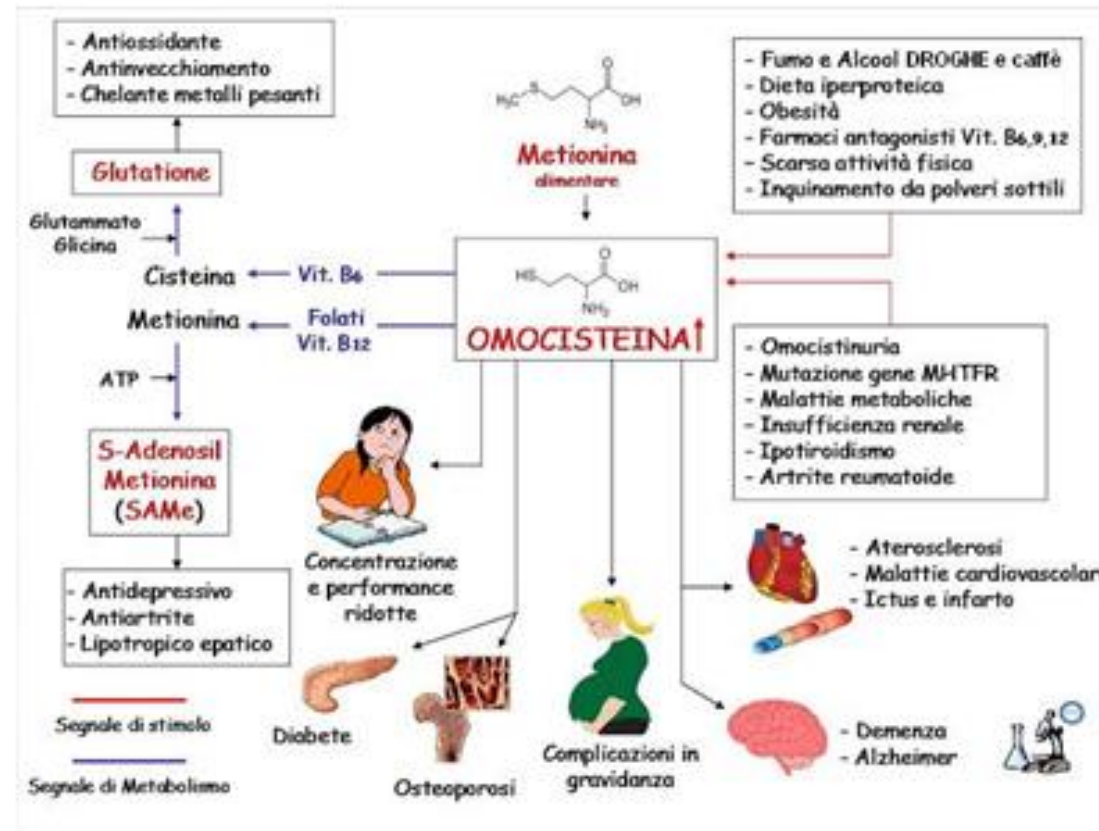
«casi di deficit materno di vitamina B12, identificati attraverso lo screening neonatale esteso, sono triplicati: dai 42 del 2015 ai 126 del 2016» **SIMMESN**



Il Mese di Aprile 2019



DOPPIO DELLA MEDIA ANNUALE



In tali casi sarebbe opportuno, ove possibile il dosaggio di Vit. B12 sia sul neonato che sulla madre.



Posta :: Posta in Arrivo x vita normale mcadd - Cerca con x Triplicati in un anno i casi di una x Triplicati in un anno i casi di una x +

Non sicuro | cometaasmme.org/triplicati-in-un-anno-i-casi-di-una-rara-malattia-metabolica-fra-le-cause-la-dieta-vegana/

**Cometa** A.S.M.M.E.  
Associazione Studio Malattie Metaboliche Ereditarie ONLUS

Da 25 anni al fianco di chi lotta contro le Malattie Metaboliche Ereditarie


HOME M.M.E. CENTRI M.M.E. CHI SIAMO NEWS PROGETTI L'ANGOLO SOLIDALE COLLABORA RIVISTA CONTATTI

**PROGETTI FINANZIATI DA COMETA A.S.M.M.E.:** Disegna il 2007 - Il tempo dei bambini

### Triplicati in un anno i casi di una rara malattia metabolica: fra le cause la dieta vegana

POSTED ON 2 MARZO 2018 BY LORENZO

DA : O.Ma.R. - Autore: Francesco Fuggetta, 01 Marzo 2018



Il deficit materno di vitamina B12 è passato dai 42 casi del 2015 ai 126 del 2016. L'allarme degli esperti, Carlo Dionisi Vici e Giancarlo la Marca: "I bambini rischiano gravi danni neurologici"

Questo sito è dedicato soprattutto, ai pazienti e ai familiari di questa associazione. Si prefigge di essere la voce delle Famiglie che hanno un figlio con una Malattia Metabolica. Cerca informazioni sulle malattie rare. Per dare "voce a chi non ha voce".

Cometa A.S.M.M.E. Mi piace

Utilizziamo i cookie per essere sicuri che tu possa avere la migliore esperienza sul nostro sito. Se continui ad utilizzare questo sito noi assumiamo

# DIFETTI DELLA BETA OSSIDAZIONE



- Sono descritte più di 20 patologie legate a difetti dell'ossidazione degli acidi grassi. Sono tutte patologie molto gravi con difetti cardiaci e neuronali.



**Difetto di Carnitina aciltrasferasi I**

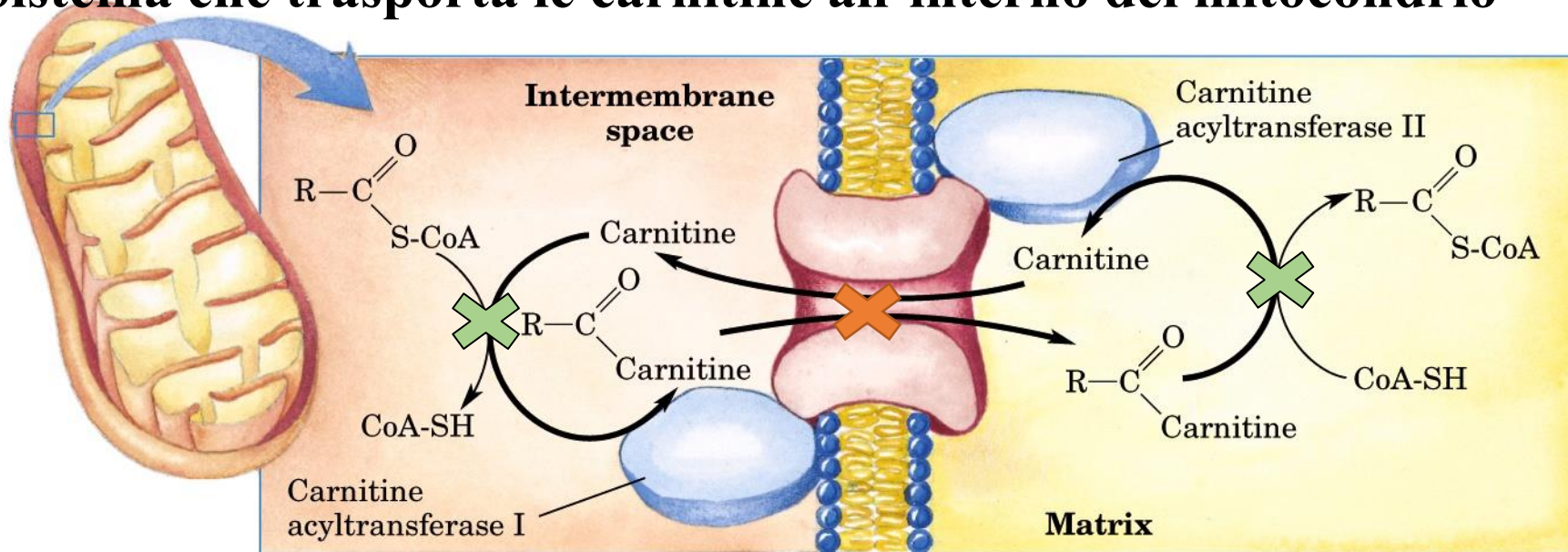
**Difetto di Carnitina aciltrasferasi II**

**Carnitine palmitoyltransferase 1 e 2 Deficit (CPT1 e 2)**

**Difetto di Carnitina-acilcarnitina traslocasi**

**Carnitine-acylcarnitine translocase (CACT)**

**Sistema che trasporta le carnitine all'interno del mitocondrio**



# MARCATORI

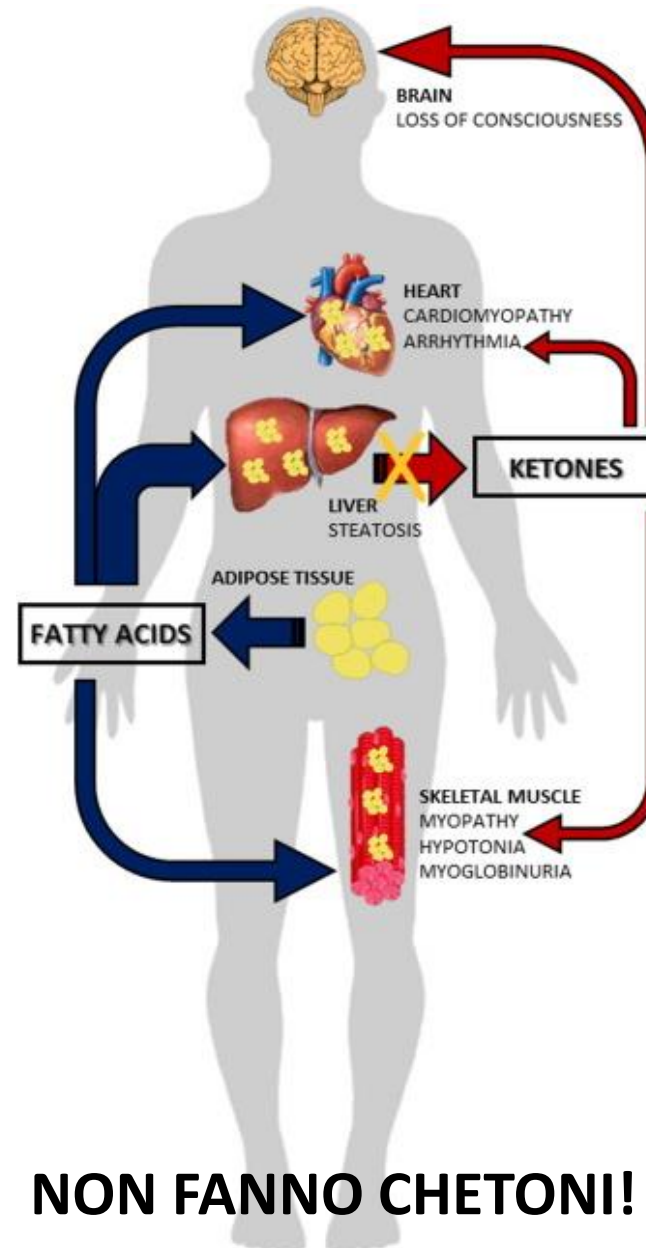
## Carnitine palmitoyltransferase 1 e 2 DEFICIT (CPT1 e 2) Carnitine-acylcarnitine translocase (CACT)

Deficit di carnitina palmitoil-trasferasi I	<b>CPT I</b>			CO alta C16 bassa C18 bassa	$C0/(C16+C18)$ (qui il rapporto è importante)	SI
Deficit di carnitina-acilcarnitina traslocasi	<b>CACT</b>			C16 C18:2 C18:1 C18	$(C16+C18:1)/C$ <u>2</u> (qui il rapporto è _____ più importante) $C0/(C16+C18)$	SI
Deficit di carnitina palmitoil-trasferasi II	<b>CPT II</b>			C16 C18:2 C18:1 18	$(C16+C18:1)/C$ <u>2</u> (qui il rapporto è _____ più importante) $C0/(C16+C18)$	SI

# CPT1-CPT2-CACT Cause e sintomi

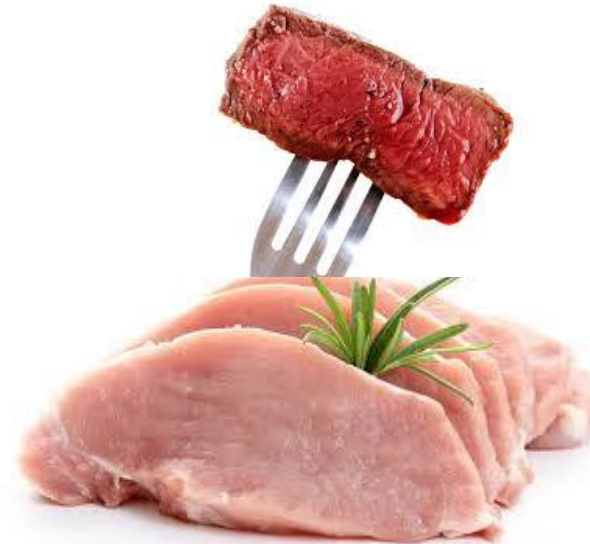
**Incidenza <1 / 1 000 000**

- Sonnolenza estrema
- Modifiche del comportamento
- Umore irritabile
- Perdita dell'appetito
- febbre
- diarrea
- vomito
- ipoglicemia
- Alti livelli di amoniaca nel sangue
- Convulsioni
- Coma



# Qual'e' il trattamento

- Consultare un esperto di alimentazione
- Evitare di rimanere a digiuno, piccoli pasti frequenti
- Dieta povera in grassi, ricca in carboidrati (pane, pasta, frutta, vegetali) e proteine (carne magra e prodotti caseari poveri di grassi)
- olio con trigliceridi a media catena (NON hanno bisogno dei trasportatori)



Con un trattamento precoce e accurato i bambini con questo difetto riescono a vivere avendo una crescita e uno sviluppo normale.

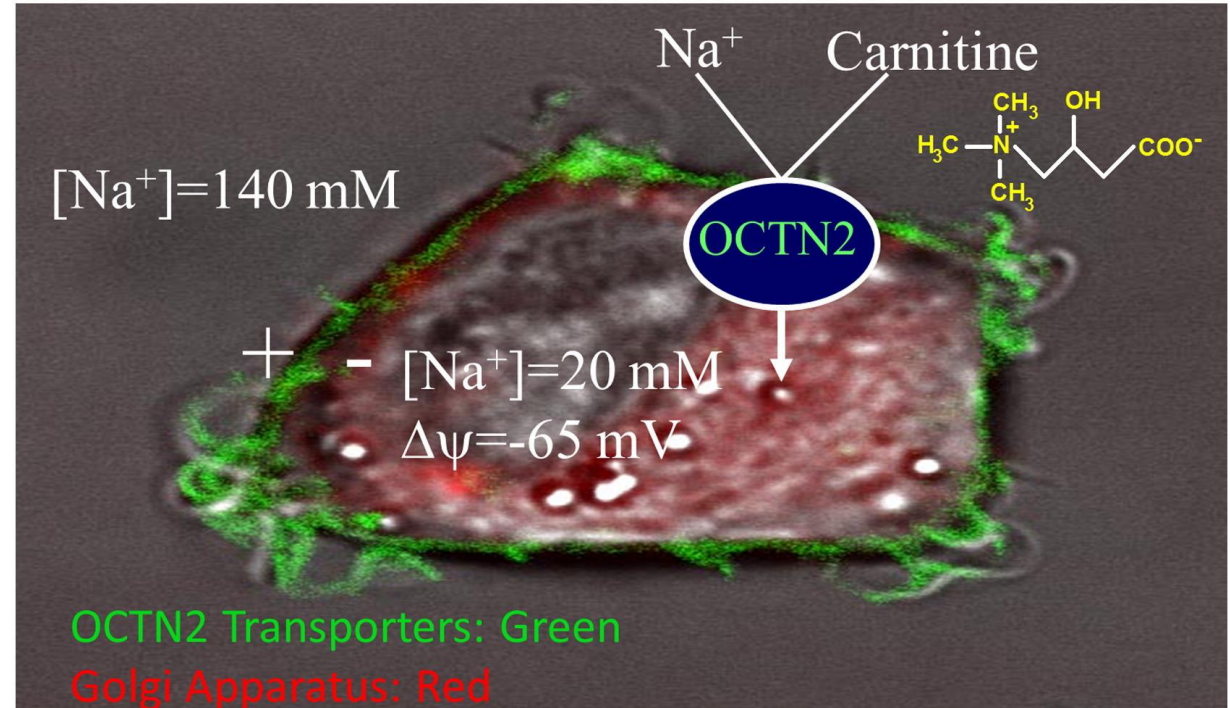
## Difetto di assorbimento di carnitine (CUD)

IL difetto di assorbimento di carnitina, Carnitine uptake defect (CUD), impedisce all'organismo di utilizzare i grassi come fonte di energia in particolare nei periodi di digiuno. Le carnitine sono sostanze naturali introdotte prevalentemente con la dieta. **Nelle persone con CUD non funzionano i trasportatori di carnitina.** Queste proteine normalmente trasportano le carnitine nelle cellule e prevengono la loro eliminazione urinaria. **La frequenza della CUD è circa 1 su 100 000 nati e viene ereditato come malattia autosomica recessiva**

The gene for primary carnitine deficiency, *SLC22A5*



**OCTN2**



OCTN2 Transporters: Green

Golgi Apparatus: Red

# Carnitine Uptake Defect (CUD): INCIDENZA

Tasso di incidenza **1:100 000** nati vivi al mondo, 1:40 000 in Giappone.

Ma la più alta incidenza di CUD è NELLE Isole Faroe in Islanda (1:300) un arcipelago isolato dal continente



Malattia	Acronimo	Gruppo	Denominazione del Gruppo Patologia	Marker Primari	Marker Ratio	ALTO RISCHIO
Deficit del trasporto della carnitina	<b>CUD</b>	FAO	ALTERAZIONI CONGENITE DEL METABOLISMO DELLE LIPOPROTEINE	<b>CO bassa</b> <i>(vedere se sono basse anche C16 e C18)</i>	$(C0+C2+C3+C16+C18)/Cit$	SI

## Conferma diagnostica CUD

- La diagnosi di CUD è confermata dal dosaggio del **livello di carnitine circolanti che sono gravemente ridotte.**
- Mentre sono **aumentate nelle urine.**



*Se il trattamento previene le crisi metaboliche I bambini con CUD hanno una buona prognosi.*

• Il trattamento con **L-carnitina per via orale** è seguito da un lento aumento dei livelli di carnitina plasmatica.

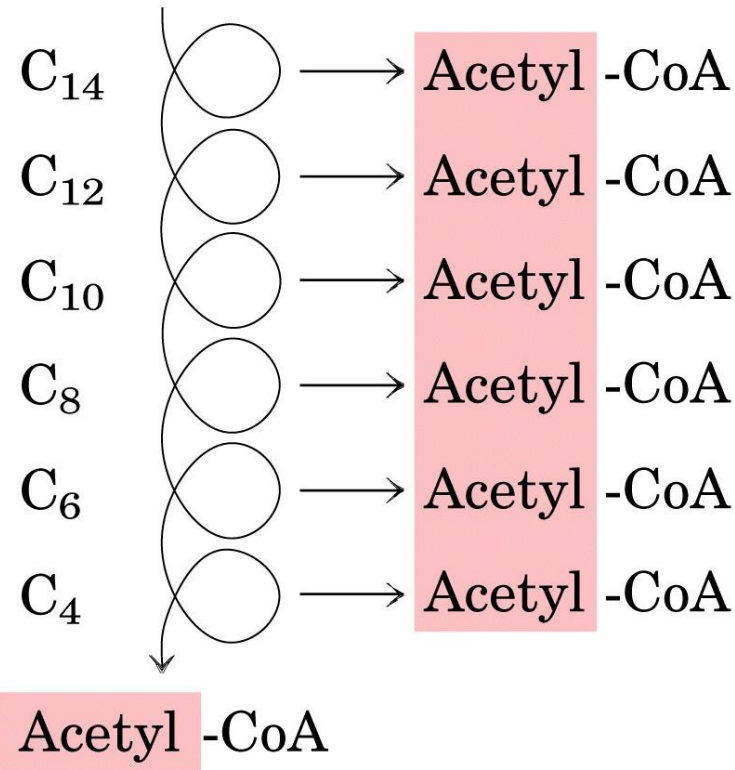
I pazienti con CUD devono comunque evitare periodi di digiuno e devono preferibilmente seguire una dieta povera di grassi e ricca in carboidrati.

Deficit di acil-CoA deidrogenasi a catena molto lunga	<b><u>VLCAD</u></b>	C14:1 C14:2 C14	C14:1/C2 (non si muove mai, richiamo se è ↑) <b>(C14:1/C16)</b>	SI
Deficit della proteina trifunzionale mitocondriale	<b><u>TFP</u></b>	<b>C18OH C16OH</b> C16:1OH C18:1OH	C18OH/C18 C16OH/C16	SI
Deficit di 3-idrossi-acil-CoA deidrogenasi a catena lunga	<b><u>LCHAD</u></b>	<b>C18OH C16OH</b> C16:1OH C18:1OH	C18OH/C18 C16OH/C16	SI
Deficit di acil-CoA deidrogenasi a catena media	<b><u>MCAD</u></b>	C8 C6 C10 C10:1 (nell'ordine)	C8/C10 C8/C2	SI
Deficit di 3-idrossi-acil-CoA deidrogenasi a catena media/corta	<b><u>M/SCHAD</u></b>	C4OH		SI



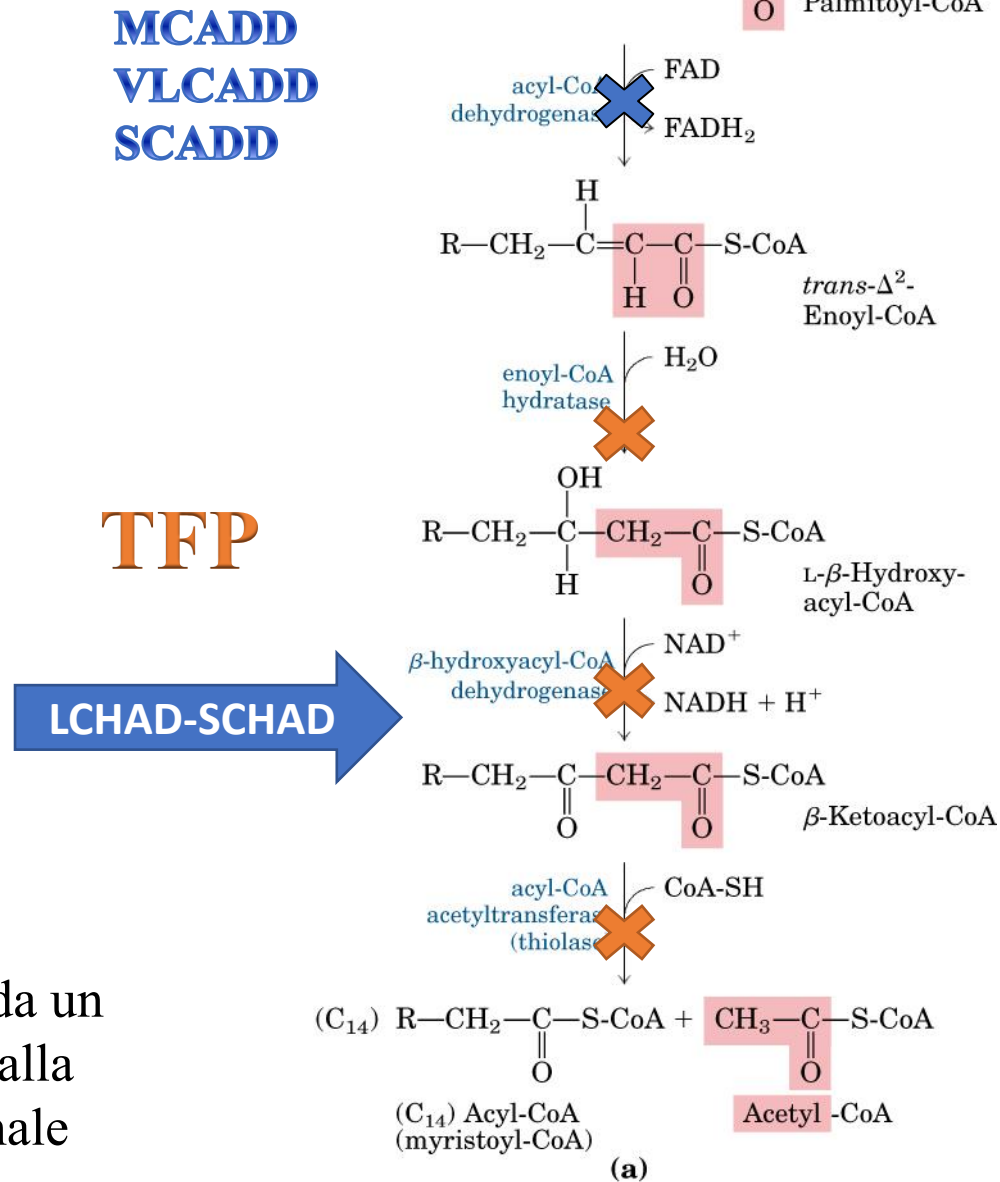


# La $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi



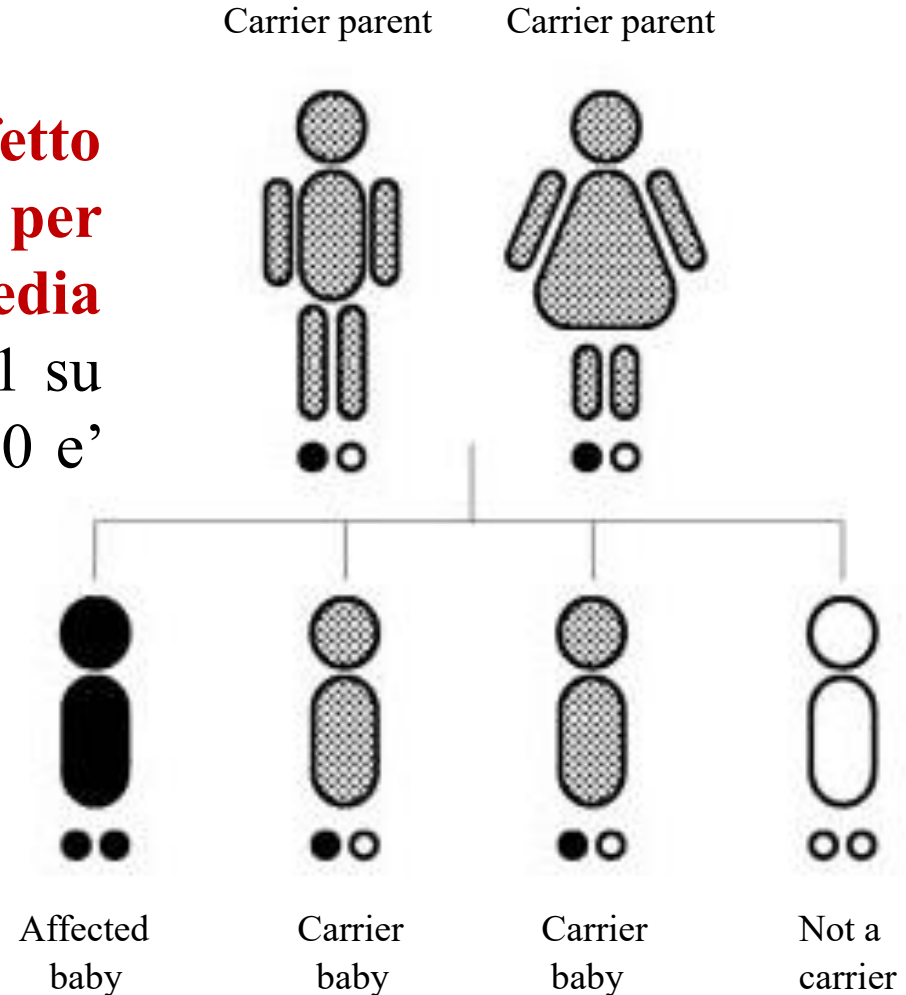
(b)

Le ultime 3 reazioni sono catalizzate da un complesso multienzimatico associato alla membrana interna (proteina trifunzionale TFP) fino a 12 atomi di carbonio.



# Ereditate come autosomiche recessive

La piu' comune e' **il difetto dell'acil-CoA deidrogenasi per acidi grassi a catena intermedia (MCAD)** di cui sono portatori 1 su 40 individui e circa 1 su 10 000 e' omozigote.



# Cosa sono i difetti della $\beta$ -ossidazione?

- Difetti di enzimi che catabolizzano i grassi di varia lunghezza
- I grassi sono una importante fonte di energia soprattutto nei periodi di digiuno.
- Si accumulano acidi grassi parzialmente digeriti nel sangue
- Aumentano gli acidi bicarbossilici nelle urine prodotti dalla  $\omega$  ossidazione.

## Complicanze

- **Ipoglicemia** fino al coma o alla morte improvvisa
- Sonnolenza
- Difetti neurologici
- La mortalità per l'MCADD varia dal 25% al 60%.



# Trattamento?

- Evitare periodi di digiuno – molti piccoli pasti
- Gestione di malattie febbrili o vomito che possono determinare scompenso metabolico
- In caso di emergenza – glucosio endovena



# A case of suspected VLCAD Very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency

## 1° SNE (> 48h):

C14:1= 0.95  $\mu\text{mol/L}$  (cut-off<0.35  $\mu\text{mol/L}$ )

C14:2= 0.08  $\mu\text{mol/L}$  (cut-off<0.05  $\mu\text{mol/L}$ )

C14= 0.96  $\mu\text{mol/L}$  (cut-off<0.46  $\mu\text{mol/L}$ )

C14:1/C2= 0.05 (cut-off< 0.02)

C14:1/C16= 0.22 (cut-off< 0.13)

(C12= 0.43  $\mu\text{mol/L}$  (cut-off<0.3  $\mu\text{mol/L}$ ))

## 2° SNE:

C14:1= 0.22  $\mu\text{mol/L}$  (cut-off<0.35  $\mu\text{mol/L}$ )

C14:2= 0.04  $\mu\text{mol/L}$  (cut-off<0.05  $\mu\text{mol/L}$ )

C14= 0.24  $\mu\text{mol/L}$  (cut-off<0.46  $\mu\text{mol/L}$ )

C14:1/C2= 0.03 (cut-off< 0.02)

C14:1/C16= 0.11 (cut-off< 0.13)

(C12= 0.13  $\mu\text{mol/L}$  (cut-off<0.3  $\mu\text{mol/L}$ ))

## 3° SNE:

C14:1= 0.40  $\mu\text{mol/L}$  (cut-off<0.35  $\mu\text{mol/L}$ )

C14:2= 0.12  $\mu\text{mol/L}$  (cut-off<0.05  $\mu\text{mol/L}$ )

C14:1/C2= 0.05 (cut-off< 0.02)

C14:1/C16= 0.5 (cut-off< 0.13)

Malattia	Acronimo	Gruppo	Denominazione del Gruppo Patologia	Marker Primari	ALTO RISCHIO
Deficit di acil-CoA deidrogenasi a catena molto lunga	VLCAD		SMO DELLE LI	C14:2 C14:1 C14	SI



Bambino Gesù  
OSPEDALE PEDIATRICO

## Diagnostic Confirmation

urinary organic acids and  
acylcarnitines DBS

**VLCAD with compound  
heterozygous pathogenic  
mutations in the ACADVL gene**

Attività enzimatica VLCAD 19% compatibile con fenotipo mild

Analisi genetica (ACADVL): c.[848T>C];[1500\_1502delCCT] p.[(Val283Ala)];[Leu502del]

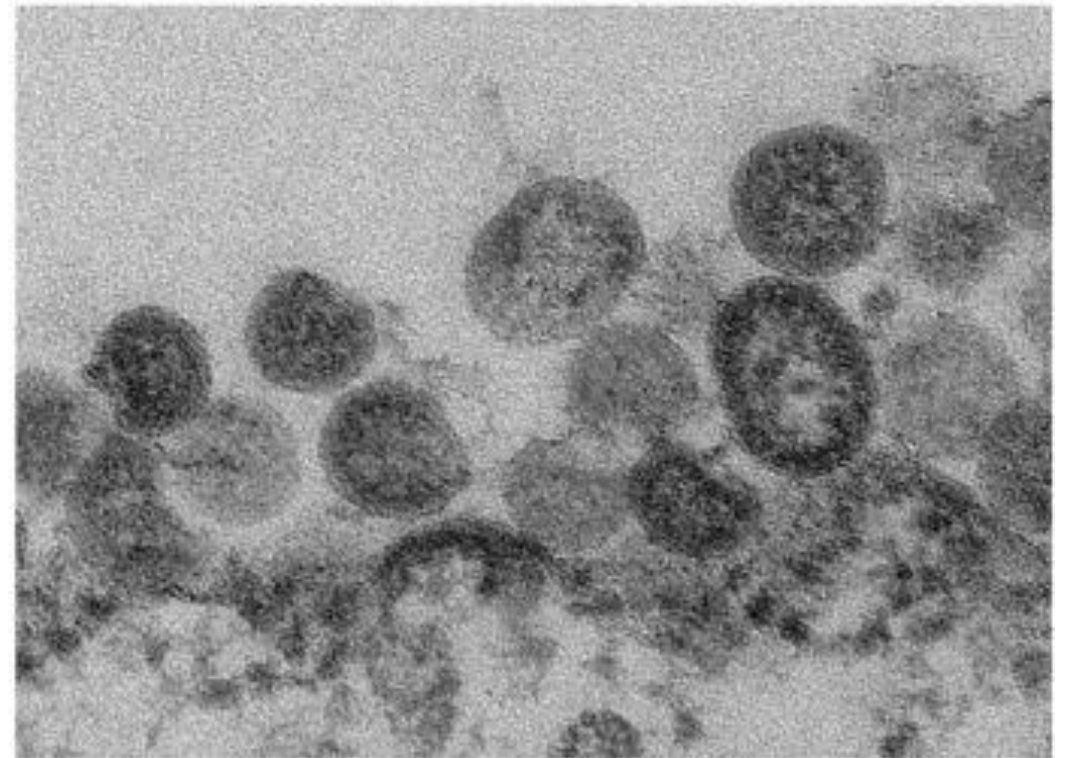
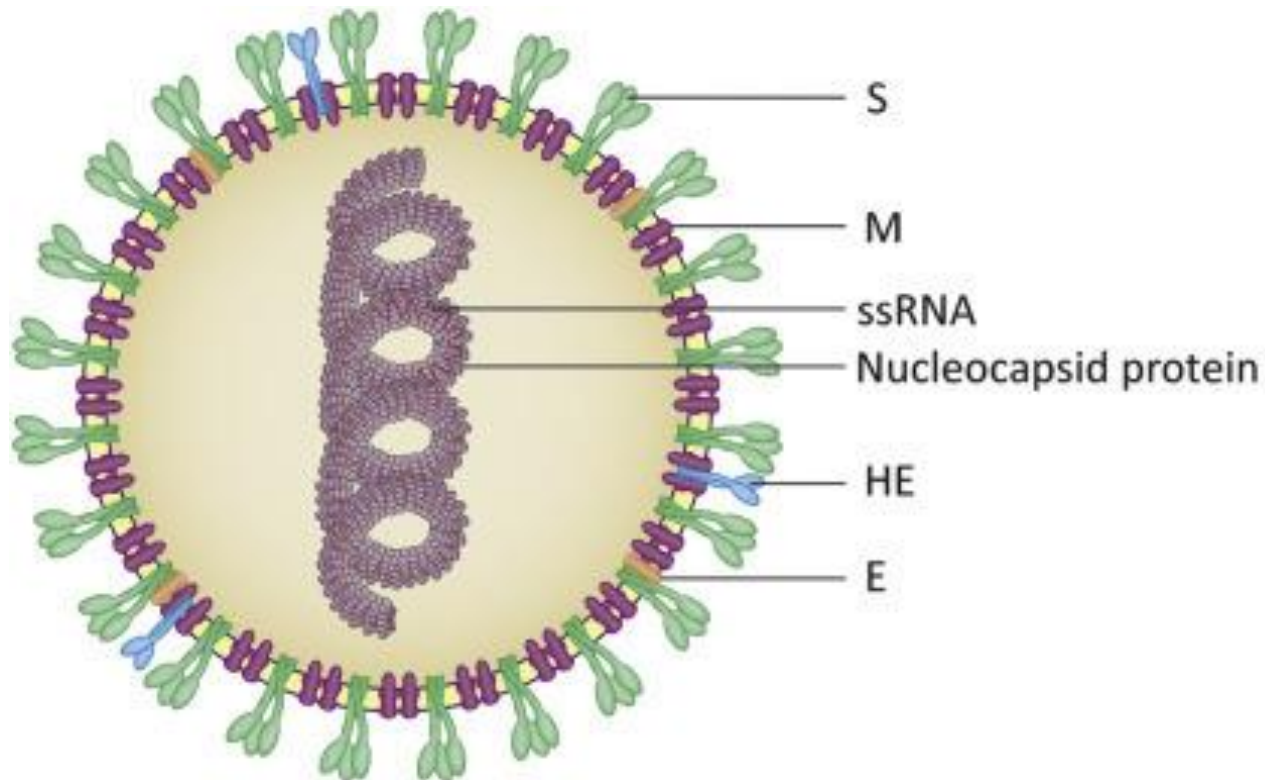


# ESAMI SIEROLOGICI SU DBS



- -"**CO**" - *Corona*, "**VI**" - *Virus* e "**D**" per *Disease*, mentre **19** sta ad indicare l'anno durante il quale il virus è stato identificato per la prima volta
- I coronavirus sono una vasta famiglia di virus noti per causare malattie che vanno dal comune raffreddore a malattie più gravi come la Sindrome respiratoria mediorientale (MERS, *Middle East respiratory syndrome*) e la Sindrome respiratoria acuta grave (SARS, *Severe acute respiratory syndrome*).
- Sono virus a RNA a filamento positivo, con aspetto simile a una corona al microscopio elettronico.




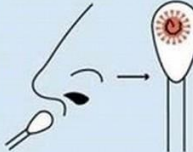

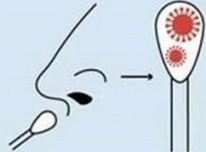
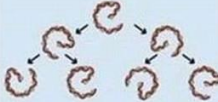
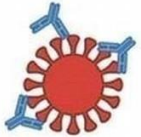
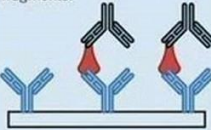
- SARS-CoV-2 presenta quattro proteine strutturali, note: come proteina S (*spike*), E (envelope), M (membrane) e N (nucleocapside).
- Inoltre il genoma del virus codifica per le proteine necessarie alla trascrizione e alla replicazione dell'RNA virale.





## Types of coronavirus testing

What they tell you, what they don't and why it matters.

Type of test	Molecular test	Antibody test	Antigen test
	<p>Molecular tests detect genetic material from the virus.</p> 	<p>These tests detect antibodies: Y-shaped molecules made by the immune response to disable a virus or mark it for destruction.</p> 	<p>This is the newest of the three testing types. These tests detect antigens: pieces of a virus that the immune system recognizes. A single virus has many antigens.</p> 
Sample collection	<p>A nasal or throat swab collects infected cells.</p> 	<p>A blood draw collects antibodies produced by immune cells.</p> 	<p>A nasal swab collects infected cells.</p> 
Detection	<p>A series of chemical reactions copies viral genetic material. If you're not infected there won't be any viral material to copy.</p> 	<p>The test measures whether these antibodies bind to the novel coronavirus.</p> 	<p>Chemicals fragment the virus, and then antibodies attached to a plate detect these fragments.</p> 
What the test tells you	<p>If you are infected now.</p>	<p>If you were infected in the past.</p>	<p>If you are infected now.</p>
Why it's helpful	<p>Used to isolate those infected so treatment can be provided and other potential cases of infection can be traced.</p>	<p>Identifies people who may have immunity and whose antibodies could be used to treat COVID-19 patients.</p>	<p>Provides the same information as a molecular test in 15 minutes and can be done in a doctor's office.</p>
Limitations	<p>A negative result doesn't guarantee immunity in the future.</p>	<p>Unclear if antibodies provide protection, how long immunity lasts, or what level and kind of antibody response is protective.</p>	<p>A negative result doesn't guarantee immunity in the future. Molecular tests are more accurate.</p>

## Allegato 1



*Il Presidente della Regione*

ORDINANZA DEL PRESIDENTE DELLA GIUNTA REGIONALE

n. 104 DEL 25 NOVEMBRE 2020

## Test utilizzabili per la diagnosi da infezione da SARS-COV-2

- **Analisi molecolare**
- Estrazione del RNA virale e amplificazione mediante QF-PCR
- **Test antigenici rapidi**
- Uso di anticorpi per la identificazione di antigeni virali nel campione

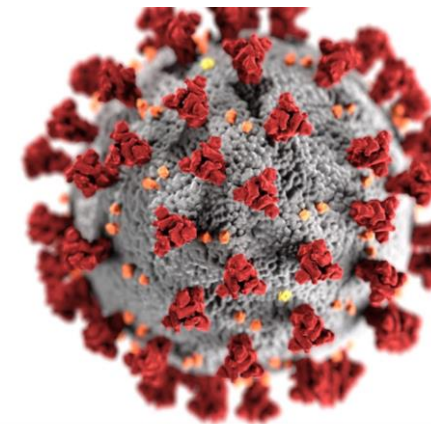
***Entrambe le metodiche al momento sono utilizzabili su tampone oro-e naso-faringeo fino a validazione definitiva di altre matrici biologiche***

# Test COVID: Quali informazioni?

- **Tampone rapido, il tampone molecolare e test salivare:** sono in grado di riconoscere diverse componenti del virus nell'organismo e ci dicono quindi se è in corso l'infezione al momento della loro somministrazione.



**Test POSITIVO:** Indica la presenza della malattia in atto



- **Test sierologico:** cerca eventuali anticorpi prodotti dal sistema immunitario in risposta all'infezione e possono determinare se una persona è entrata in contatto con il virus in passato.



**Test POSITIVO:** Indica la probabile infezione pregressa



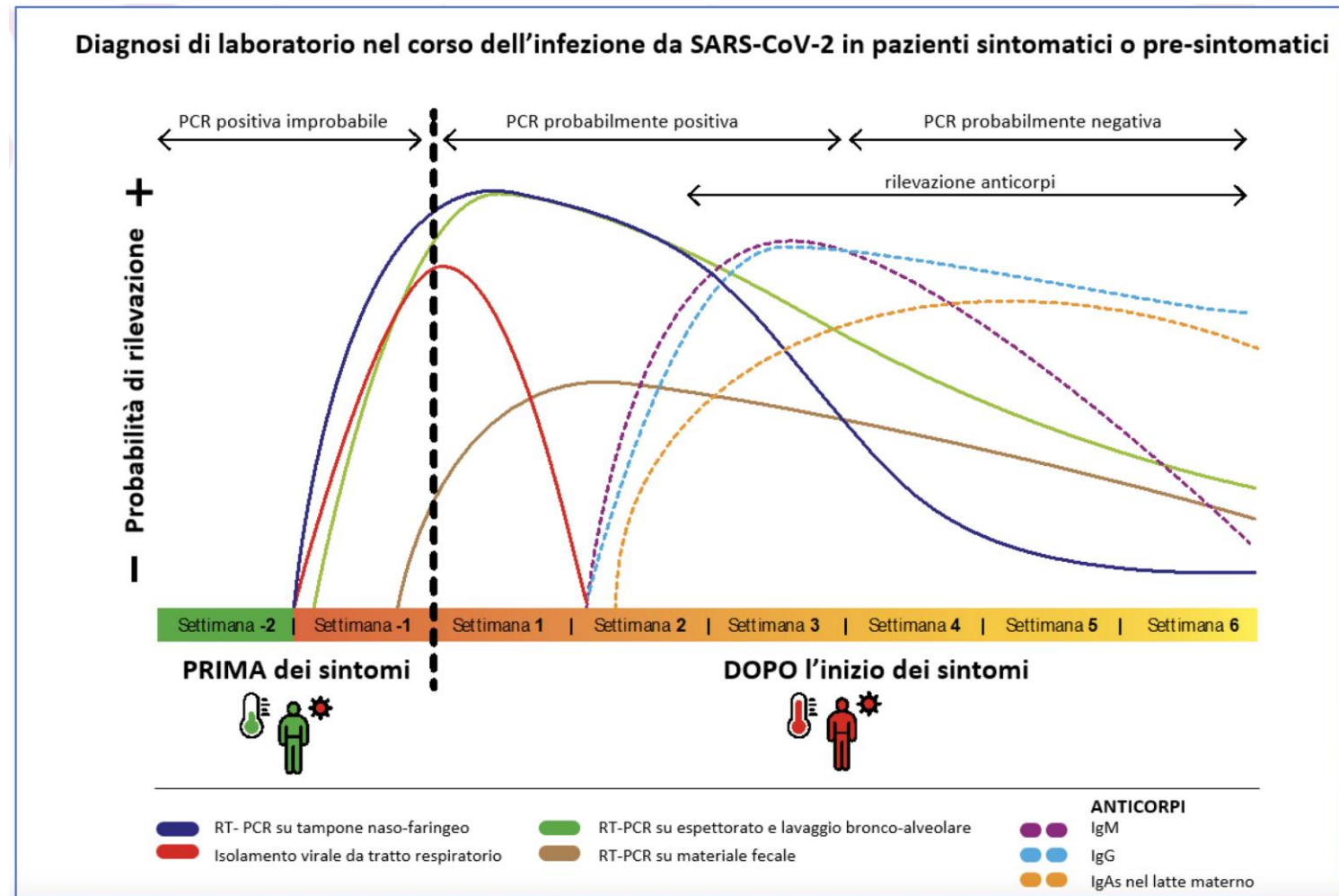


# Esami sierologici

- Servono a **valutare la presenza di anticorpi diretti contro il virus**. Una positività al test indica che il soggetto è stato in contatto con il virus ed ha sviluppato una risposta immune. La positività al test non indica se il soggetto è ancora contagioso. Infatti in teoria tutti i soggetti che si sono infettati e sono guariti dovrebbero essere positivi al test per le immunoglobuline.
- Si valutano due categorie di anticorpi le **IgM** e le **IGG** . Il soggetto può essere positivo a uno solo dei due tipi o entrambi. Le IgM vengono prodotte prima e indicano una infezione recente probabilmente ancora in corso, le IgG vengono prodotte dopo e indicano una infezione più lontana nel tempo e il soggetto molto probabilmente non è più infettivo. La presenza di entrambe indica una situazione di transizione.



# Esami sierologici



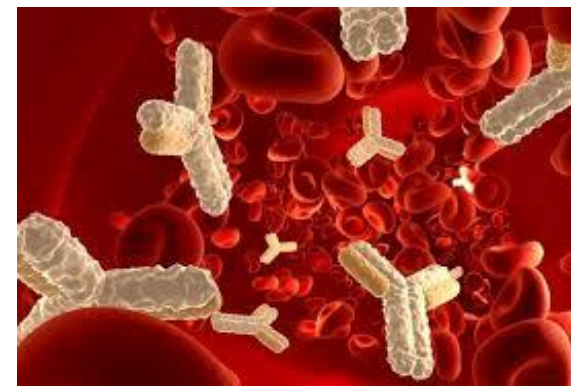
Molte regioni hanno introdotto una **normativa** che richiede a chi risulta positivo ai test sierologici (anche se solo positivo alle IgG) di eseguire un tampone per confermare l'assenza del virus nelle mucose e quindi la non contagiosità del soggetto.



# Esami sierologici

- Esistono tre tipologie di test sierologici: **qualitativi, semi-quantitativi, quantitativi**.
- La sostanziale differenza sta nella metodologia di analisi:
- nei **test qualitativi** si stabilisce solo se una persona ha sviluppato o meno degli anticorpi, secondo una logica positivo/negativo;
- nei **test quantitativi** vengono dosate le **quantità di anticorpi**.
  
- Anche la modalità di analisi cambia:
- **i test qualitativi sono test rapidi**, in cui è sufficiente **una goccia di sangue**, che viene esaminata in un kit portatile e si ottiene riscontro immediato, esattamente come avviene nel caso del test autodiagnostico di gravidanza che rileva l'ormone hCG nell'urina.
- **I test sierologici quantitativi**, invece, richiedono un **prelievo di sangue e uno specifico analizzatore** in dotazione alle strutture sanitarie.
- Esistono test semiquantitativi su goccia di sangue che richiedono qualche ora di analisi ma bassi costi e alti numeri analizzati, ma necessarie macchine molto costose. Solo 16 in Italia.

# Esami sierologici-Test Quantitativi e Semi-quantitativi



- I test quantitativi si effettuano con diverse tecniche e su diversi campioni biologici:
- **ELISA** o *enzyme-linked immunosorbent assay* (saggio immunosorbente legato ad un enzima).
- **CLIA** o **Chemi-Luminescence Immuno Assay**
- **DELFA** (**dissociation-enhanced lanthanide fluorescence immunoassay**)



- Il TEST ELISA è un saggio colorimetrico

- La lettura delle piastre viene effettuata attraverso uno spettrofotometro

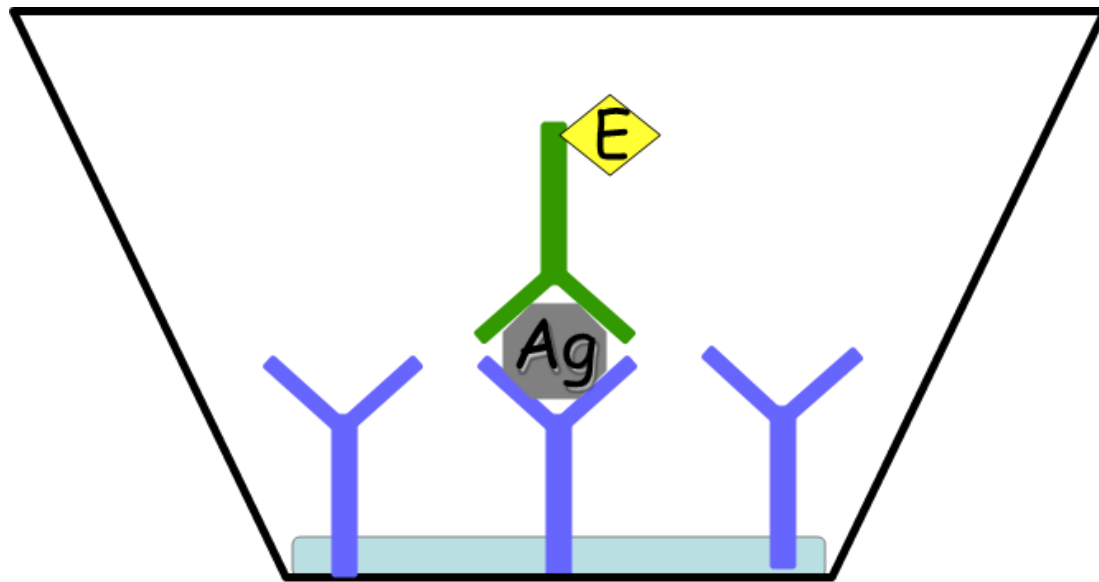
- La lunghezza d'onda utilizzata per la lettura dipende dall'enzima legato all'anticorpo usato per la detection



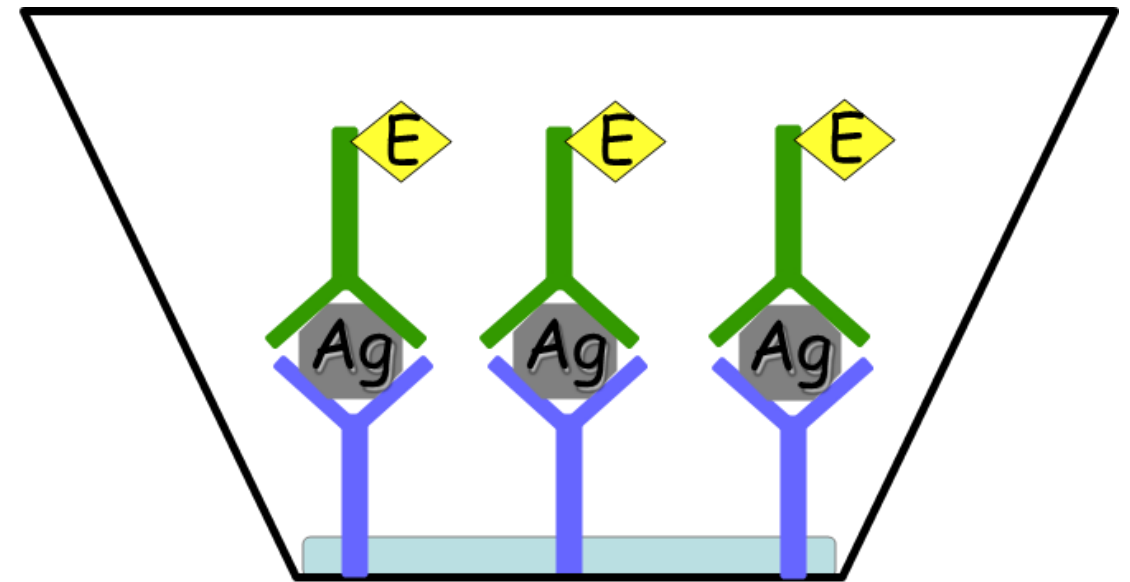
## ESAME QUANTITATIVO: PROPORZIONALITA' DEL COLORE

- L'intensità del colore è proporzionale al numero di complessi antigene-anticorpo formati e quindi alla **concentrazione dell'antigene** nel campione analizzato.

NB: Potrebbe essere usato per i Tamponi. Se l'antigene è presente il complesso si forma. Anche se ad oggi la lettura non è su piastre ma su sistemi point of care.



Caso A



Caso B

# Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay



**ELISA**  
**SANDWICH**  
Più  
comunemente  
usato per i  
sierologici da  
SARS-CoV-2




# CE-IVD SENSITIVE DETECTION OF THE SARS-COV-2 IgG ANTIBODIES

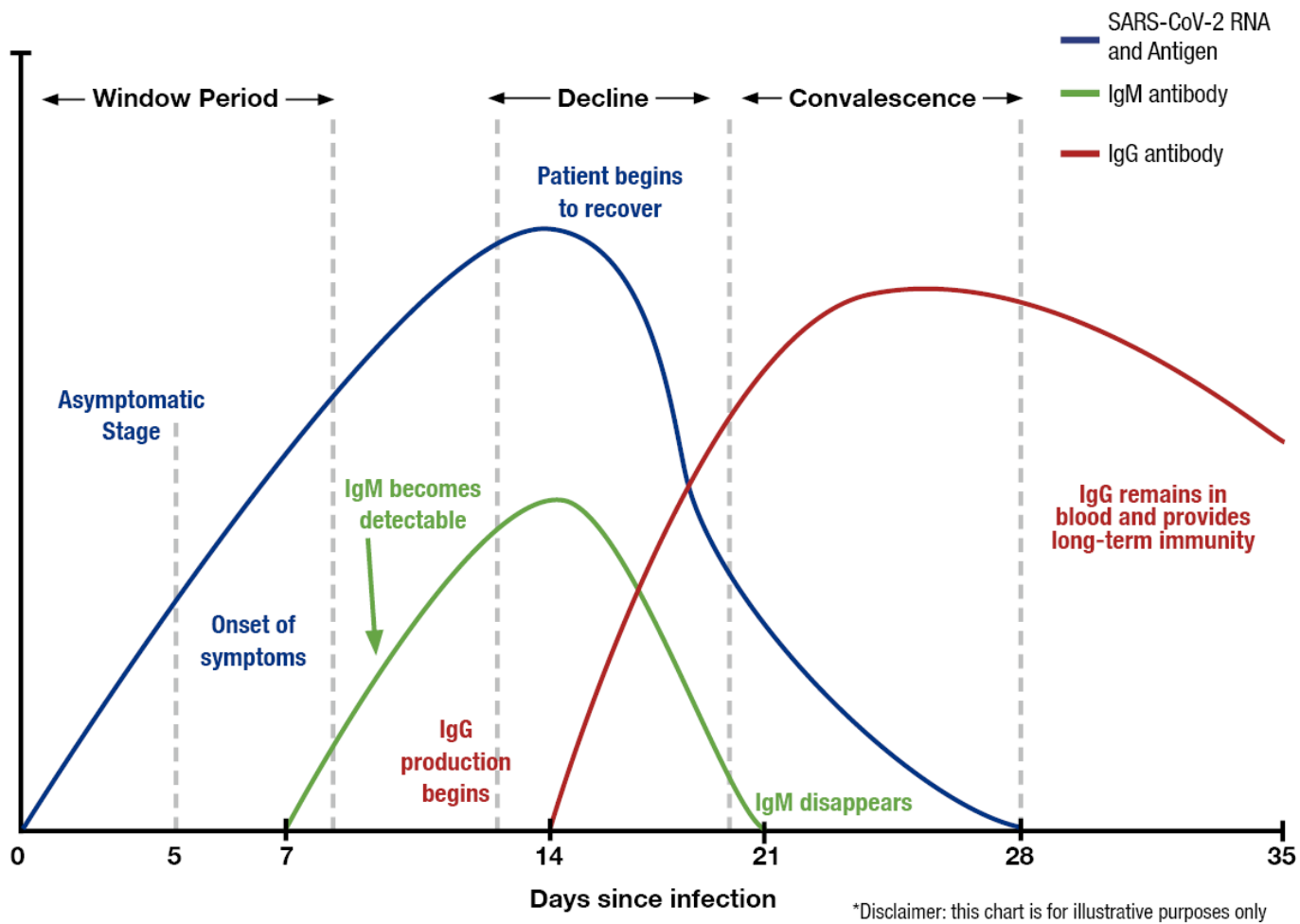
GSP®/DELFIAs® Anti-SARS-CoV-2 IgG Kit



## GSP® Instrument System Features

The GSP® system offers outstanding accuracy and reliability, coupled with high efficiency.

-  **Dried Blood Sample:** No need for venous blood draw, easy to transport
-  **High Throughput:** Run up to 200 samples an hour
-  **Fully Automated:** Reduced hands-on stages and reduced risk of error



## DRIED BLOOD SPOT (DBS) SAMPLE

Sampling from finger prick

Small volume of blood

Shippable in envelope

Stable at room temperature



### 3. SIEROLOGICO: quantitative e semi-quantitativi

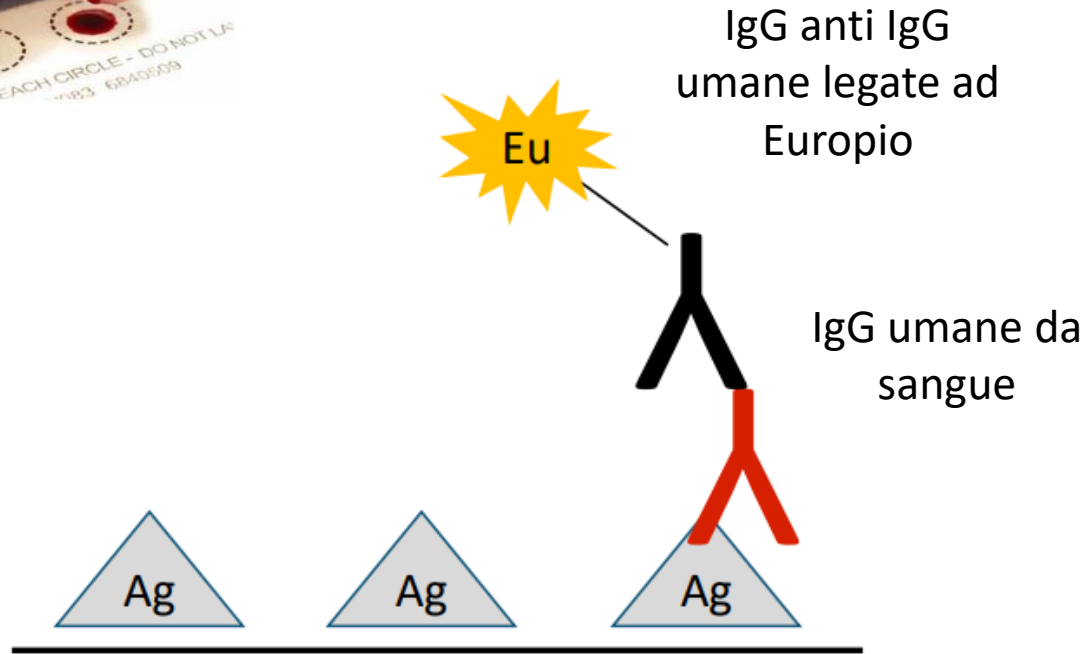
## VANTAGGI DEL METODO



Correct DBS sampling



MISURA DELLE IgG DA CAMPIONI DBS O DA SIERO/PLASMA



MISURA DI FLUORESCENZA A TEMPO RISOLTO

Excitation at 320 or 340 nm leads to detectable emission at 615 nm

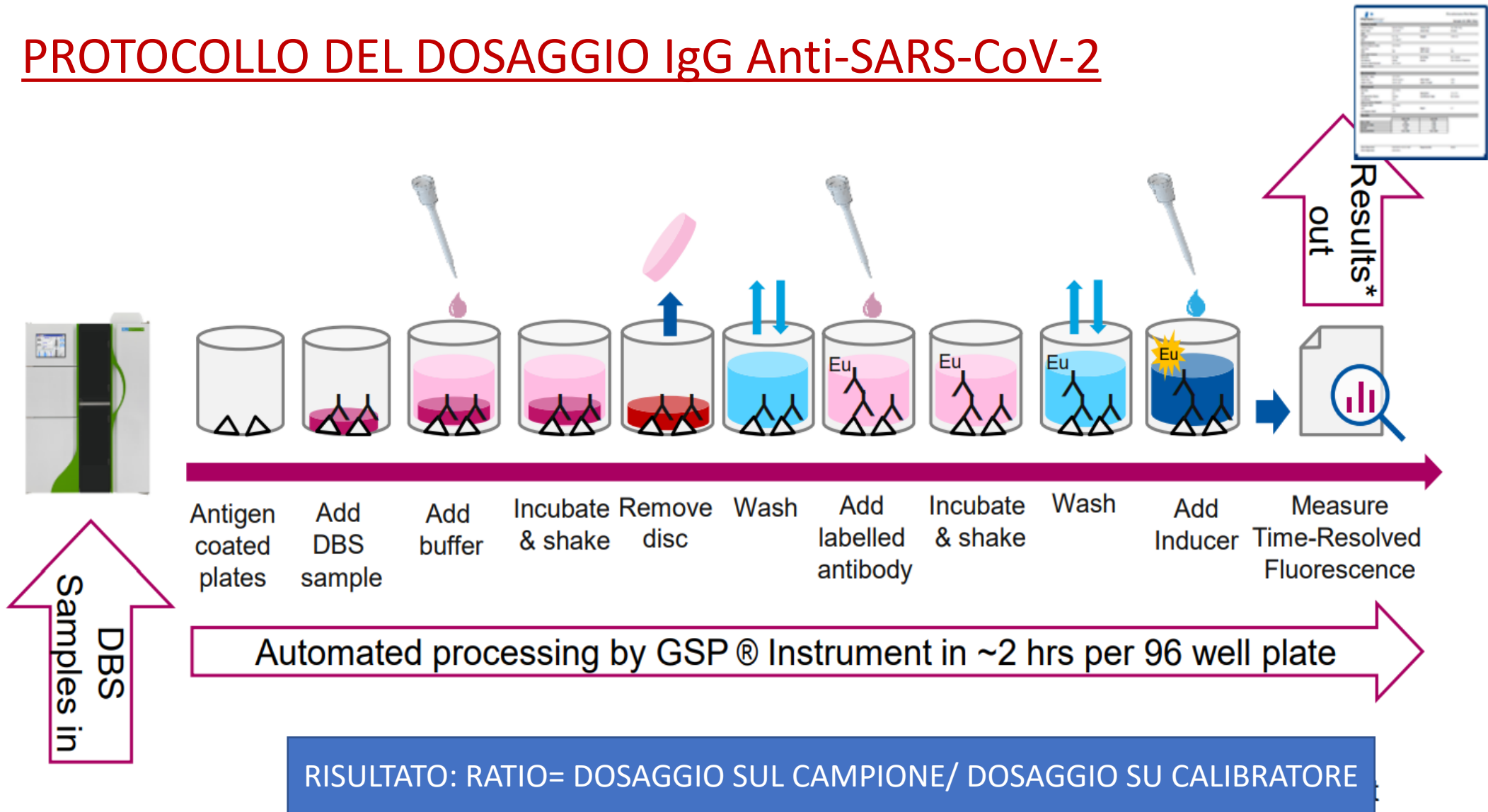
**DELFLIA su fase solida si basa su un principio di misura indiretta.**

**Per rivelare le IgG anti-SARS-CoV-2 su spot di sangue secco, siero e plasma.**

#### **USO PREVISTO**

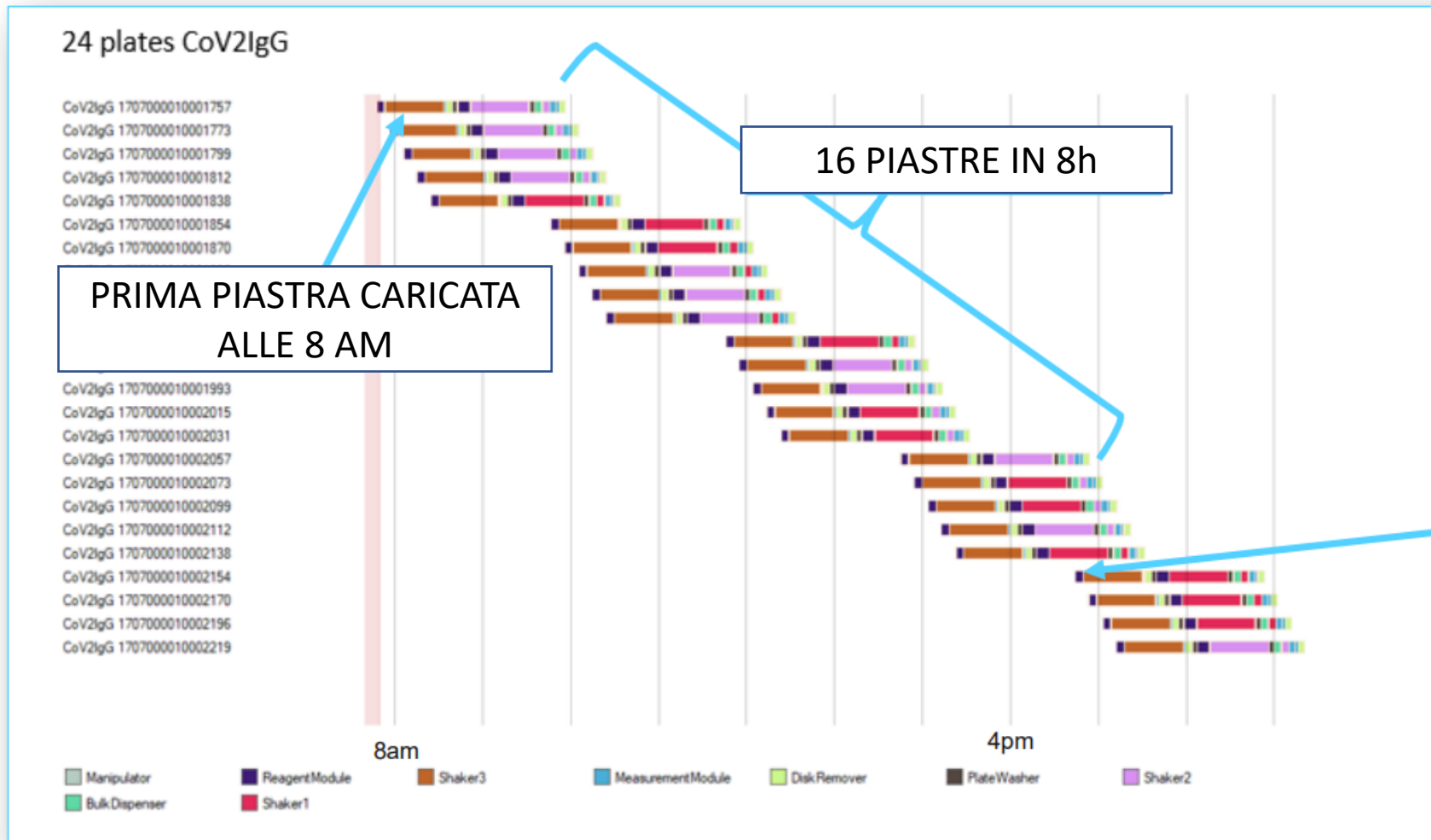
Il kit è destinato per la rivelazione **semiquantitative di anticorpi umani** della classe IgG contro SARS-CoV-2 in campioni umani di sangue secco assorbito su carta da filtro e su campioni umani di siero/plasma per mettere in luce individui con una risposta immune adattativa al SARS-CoV-2, **indicando una recente o una pregressa infezione**

# PROTOCOLLO DEL DOSAGGIO IgG Anti-SARS-CoV-2



## 3. SIEROLOGICO: quantitative e semi-quantitativi

# DOSAGGIO AD ALTA PORTATA CAMPIONARIA



PORTATA

2h 9 min per piastre  
24 piastre in 10.33 h  
90 campioni per piastra  
2.3 piastre/ore

24 PIASTRE ANALIZZATE ALLE  
4 PM

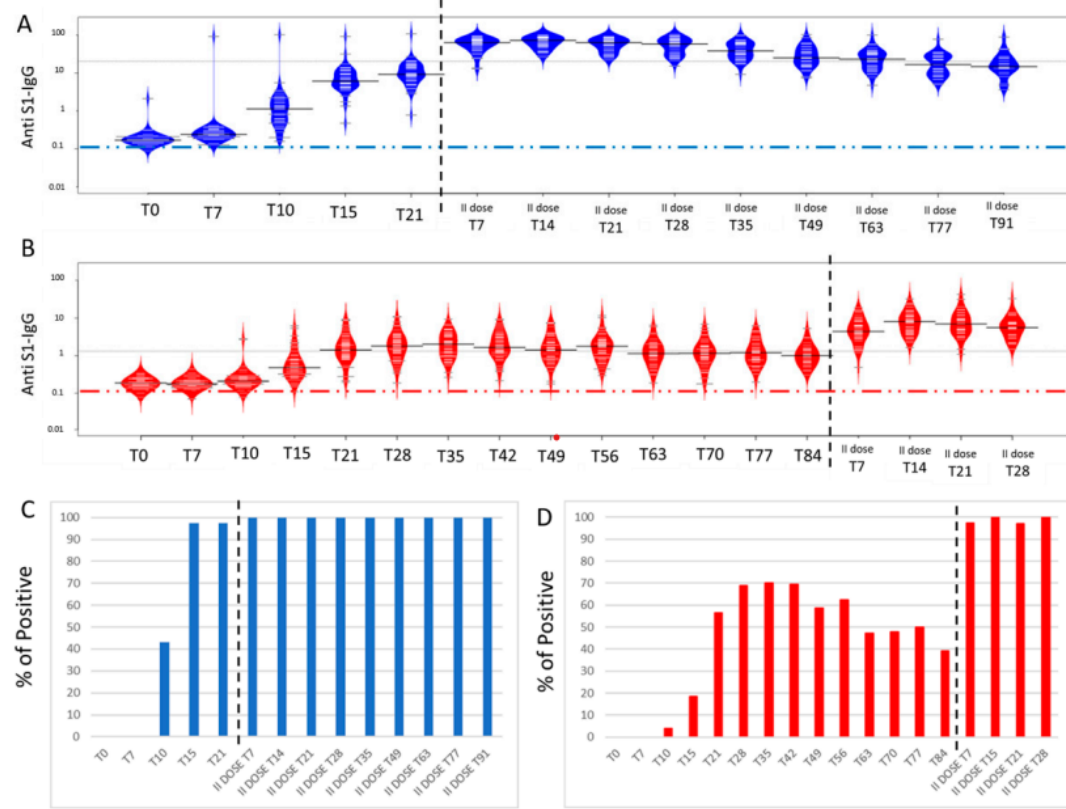
40 PIASTRE IN 24h (3600  
CAMPIONI AL GIORNO)



Article

## Picture of the Favourable Immune Profile Induced by Anti-SARS-CoV-2 Vaccination

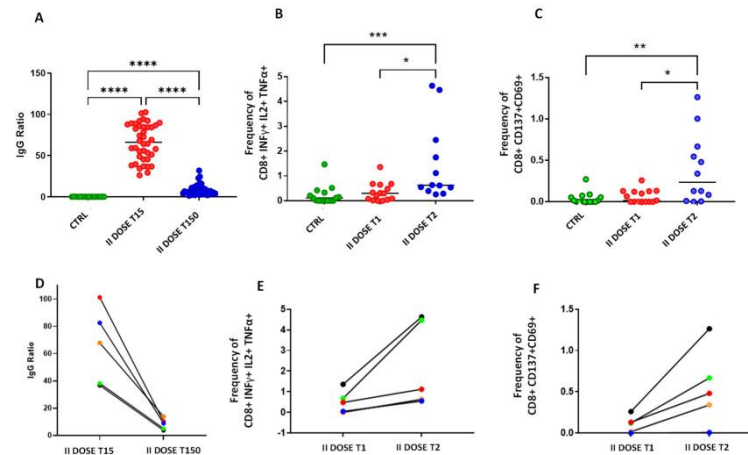
Paola Lanuti <sup>1,2,†</sup>, Claudia Rossi <sup>1,3,†</sup>, Iliaria Cicalini <sup>1</sup>, Laura Pierdomenico <sup>1,2</sup>, Verena Damiani <sup>1,4</sup>, Daniela Semeraro <sup>1</sup>, Sara Verrocchio <sup>1</sup>, Piero Del Boccio <sup>1,5</sup>, Adelia Evangelista <sup>6</sup>, Annalina Sarra <sup>6</sup>, Mirco Zucchelli <sup>1,4</sup>, Giuseppina Bologna <sup>1,2</sup>, Pasquale Simeone <sup>1,2</sup>, Giulia Catitti <sup>1,2</sup>, Federica Di Marco <sup>1</sup>, Simone Stefanetti <sup>1</sup>, Simone Vespa <sup>1,2</sup>, Bruna Sinjari <sup>4</sup>, Ines Buccì <sup>1,2</sup>, Vincenzo De Laurenzi <sup>1,4</sup>, Tonio Di Battista <sup>6</sup>, Liborio Stuppia <sup>1,3</sup> and Damiana Pieragostino <sup>1,4,\*</sup>



Communication

## BNT162b2 mRNA Vaccination Leads to Long-Term Protection from COVID-19 Disease

Claudia Rossi <sup>1,2</sup>, Paola Lanuti <sup>1,3</sup>, Iliaria Cicalini <sup>1,4</sup>, Domenico De Bellis <sup>1,4</sup>, Laura Pierdomenico <sup>1,3</sup>, Piero Del Boccio <sup>1,5</sup>, Mirco Zucchelli <sup>1,4</sup>, Luca Natale <sup>1</sup>, Bruna Sinjari <sup>4</sup>, Giulia Catitti <sup>1,3</sup>, Simone Vespa <sup>1,3</sup>, Pasquale Simeone <sup>1,3</sup>, Giuseppina Bologna <sup>1,3</sup>, Ines Buccì <sup>1,3</sup>, Katia Falasca <sup>3,6</sup>, Jacopo Vecchiet <sup>3,6</sup>, Liborio Stuppia <sup>1,2</sup>, Vincenzo De Laurenzi <sup>1,4</sup> and Damiana Pieragostino <sup>1,4,\*</sup>





Case Report

## Passive Immunity to SARS-CoV-2 at Birth Induced by Vaccination in the First Trimester of Pregnancy

Ilaria Cicalini <sup>1,2,\*</sup>, Claudia Rossi <sup>1,3</sup>, Luca Natale <sup>1</sup>, Maria Concetta Cufaro <sup>1,4</sup>, Giulia Catitti <sup>1,5</sup>, Simone Vespa <sup>1,5</sup>, Domenico De Bellis <sup>1,2</sup>, Giulia Iannetti <sup>1</sup>, Paola Lanuti <sup>1,5</sup>, Ines Bucci <sup>1,5</sup>, Liborio Stuppia <sup>1,3</sup>, Vincenzo De Laurenzi <sup>1,2</sup> and Damiana Pieragostino <sup>1,2</sup>

