

A DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Új tömegspektrometriás megközelítések a veleszületett anyagcsere-
betegségek szűrésében és diagnosztikájában**



SZABÓ ESZTER

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar

Kémia Doktori Iskola

Vezető: Dr. Császár Attila, PhD, CSc, DSc

Analitikai kémia, anyagtudomány, elektrokémia,

kolloidkémia és környezetkémia

Programvezető: Dr. Kiss Éva, PhD, CSc, DSc

Témavezető: Dr. Takáts Zoltán, PhD

Semmelweis Egyetem, I. számú Gyermekgyógyászati Klinika

Anyagcsere Szűrő- és Diagnosztikai Központ

Budapest, 2018

1. Bevezető

A veleszületett anyagcsere-betegségek az intermedier anyagcsere folyamatokat katalizáló enzimek öröklődő, genetikai defektusai. Hazánkban a 70-es évek közepe óta folyik újszülöttkori tömegszűrés, melynek keretében jelenleg 26 veleszületett anyagcsere-betegség szűrése történik. Ezen betegségek jellemzője, hogy a korai, tünetmentes fázisban történő felismerésük és időben elkezdett kezelésük nagyban javítja a prognózist és akár a teljes tünetmentesség is elérhető. Az újszülöttkori szűrésben, mely adott esetben a diagnózis felállításában első lépcsőnek számít, metabolit szintű vizsgálatokat végzünk tömegspektrometriás (MS) módszerrel. A vizsgálat célja, hogy minden beteg kiszűrésre kerüljön, tehát minimális, lehetőleg zéró legyen a fals negatív esetek száma. Ebből adódik a módszer egyik hátránya, a magasabb fals pozitív esetek száma. A tradicionális szűrés nem vezet végső diagnózishoz. Bár ezek a betegségek konkrét enzim defektusából adódnak, ezek a folyamatok nem izoláltak, hanem egy láncolatban vesznek részt számos más enzimmel együtt. Az egyik enzim terméke egy másik reakció szubsztrátjaként szerepel. Így ha egy enzim nem működik megfelelően, számos folyamat sérülhet. Tehát az adott metabolit emelkedett szintje több betegségre is jellemző lehet, ezért mindenképpen valamilyen megerősítő vizsgálat szükséges. Ezek lehetnek „second-tier” tesztek, vagy egyéb másodlagos vizsgálatok, melyekkel a fals pozitív esetek száma minimalizálható. Ezen módszerek specifikusabbak a szűrésben használhoz képest, de további műszerek és személyzet alkalmazását igénylik, valamint az újabb minta kérése késlelteti a diagnózist [1-4]. A jelenleg alkalmazott megerősítő vizsgálatok többsége szérum és vizelet mintákból történő metabolit meghatározásokból áll, melyeket gázkromatográfiával (GC) és folyadékkromatográfiával (LC) kapcsolt tömegspektrometriás módszerrel végzünk. Ezek mindig újabb mintavételt igényelnek és időigényük miatt sokszor stresszt okoznak az érintett családnak [5, 6]. Megerősítő vizsgálat az érintett enzim aktivitásának meghatározása is, mely végső diagnózishoz vezet. A jelenleg használatos enzimaktivitás meghatározások hátránya, hogy az újszülöttkori szűrésben használt mintatípustól (száritott vércsepp, DBS) eltérő mintaigényűek (leukocita, szérum, fibroblaszt), a mintaelőkészítés munka- és időigényes, valamint az alkalmazott analitikai módszerek (kolorimetria, fluorimetria) alacsony szelektivitása és szenzitivitása magas fals pozitív rátát eredményeznek.

2. Célkitűzések

A doktori munka során a fő célunk olyan tömegspektrometriai alapú analitikai módszerek kidolgozása volt, amelyek kiküszöbölhetik a jelenleg használatos, diagnosztikailag elengedhetetlen megerősítő vizsgálatok, illetve enzimaktivitás meghatározások hátrányait, és alkalmazhatóak az újszülöttkori tömegszűrésben is használatos mintatípusnál.

A kutatómunka során célunk volt egy olyan nagy áteresztőképességű, nanospray ionizációt alkalmazó nagy felbontású tömegspektrometriás (nS-HR-MS) módszer kidolgozása, mellyel lehetővé válik a DBS minták metabolit profiljának meghatározása. A mintaelőkészítés alapjául az újszülöttkori szűrésben alkalmazott módszer szolgált. Az új módszer validálása során az eredményeket a hagyományos elektropray ionizációt alkalmazó tandem tömegspektrometriás (ESI-MS/MS) módszerrel kapott eredményekkel vetettük össze. A vizsgálatok alapjául a választás a fenilketonúria (PKU) és közepes szénláncú acil-koenzim-A-dehidrogenáz hiány (MCADD) betegségekre esett. Egyrészt ezek a legelterjedtebben szűrt betegségek világszerte, másrészt gyakoriságukból adódóan rendelkezésre állt elegendő beteg mintaszám az új módszer alkalmazhatóságának feltérképezésére. A kutatás során célunk volt a PKU és MCADD betegségekből érintett analitok mindegyikének HR-MS alapú azonosítása és mennyiségi meghatározása, mellyel várhatóan növelhető a szűrés szelektivitása, továbbá a diagnózis akár egy lépésben felállíthatóvá válna.

A kutatás másik iránya a veleszületett anyagcsere-betegségek diagnosztikája szempontjából elengedhetetlen enzimaktivitás vizsgálatok fejlesztése volt. Itt a célunk egy olyan HPLC-MS alapú, új analitikai megközelítéssel történő enzimaktivitás meghatározás kidolgozása volt, ahol az enzimreakció a mintavételt követően in situ valósul meg a frissen szűrőpapírra csöppentett biológiai fluidumban. Az új módszerrel célunk volt egyrészt a hagyományos módszerek hátrányainak kiküszöbölése, másrészt a DBS mintában tapasztalható enzim és szubsztrát instabilitásból fakadó fals eredmények csökkentése. A termék feltételezett stabilitása miatt a mintavétel pillanatában lejátszódó enzimreakció várhatóan egy sokkal robosztusabb és reprodukálhatóbb módszert eredményez, mint a hagyományos enzim assay technikákkal megvalósuló maradék enzimaktivitás meghatározások. A módszer alkalmazhatóságának feltérképezéséhez a biotinidáz enzimre esett a választásunk, mely aktivitásának meghatározása a biotinidáz defektus diagnosztikájában játszik szerepet. A választással megfelelő minta- és betegszám állt rendelkezésre, hiszen az enzim aktivitásának meghatározása szerepel az újszülöttkori tömegszűrésben, illetve laboratóriumunkban megerősítő vizsgálatot is végzünk szérumból LC-MS alapú módszerrel. A kutatómunka során

célunk volt a fejlesztett módszer validálása, az alkalmazott minta stabilitásának vizsgálata és az eredmények összevetése az újszülöttkori szűrésben és a szérumból kapott eredményekkel. További célunk volt az új módszernek az újszülöttkori szűrésbe történő integrálhatóságának vizsgálata.

3. Alkalmazott módszerek

3.1. Szárított vércsepp minta nanospray ionizációs nagyfelbontású tömegspektrometriai alapú metabolomikai vizsgálata

A metabolitok nagyfelbontású tömegspektrometriás detektálásához, azonosításához és a határértékek beállításához 500 egészséges minta analízisét végeztük el. A módszer diagnosztikai alkalmazhatóságának vizsgálatához 42 igazolt beteg (21 db PKU és 21 db MCADD) mintájának vizsgálatát végeztük el. Ezen felül 12 fals pozitív mintát vizsgáltunk, melyeknél az újszülöttkori szűrésben PKU betegség merült fel, azonban a további vizsgálatok során és a klinikai kép alapján negatívnak bizonyultak. A méréseket mind az 554 minta esetében párhuzamosan elvégeztük az újszülöttkori szűrésben jelenleg alkalmazott ESI-MS/MS módszerrel is.

A vizsgálat menete:

- 4,5 mm átmérőjű (~10 µl teljes vér) korongot lyukasztunk egy 96 lyukú 0,45 µm hidrofíll szűrős mikroplate-be,
- a DBS mintákat 100 µl stabil izotópjelzett belső sztenderdek ismert koncentrációjú metanolos oldatával extraháljuk (30 min, RT),
- a metanolos extraktumot átszűrjük 96 lyukú mikroplate-be,
- az nS-HR-MS meghatározás előtt a mintát vízzel hígítjuk (1:1).

A koncentráció értékek meghatározásának alapja az analit és a hozzá tartozó ismert koncentrációjú belső sztenderd intenzitásának aránya. Az így kapott koncentráció értékeket vetettük össze az újszülöttkori szűrésben nyert eredményekkel a Pearson-féle korrelációs együttható meghatározásával.

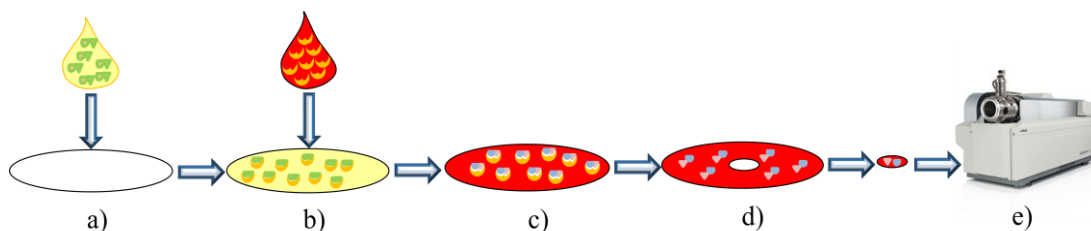
A nagyfelbontású tömegspektrometriás méréseket LTQ Orbitrap Discovery és Exactive készülékeken végeztük. A nagy áteresztőképesség biztosítására TriVersa NanoMate ionforrást alkalmaztunk. A chip alapú infúzió nanoelektrospray-t biztosító mikrochip-pel valósult meg.

3.2. Biotinidáz enzimaktivitás meghatározás „in-paper” enzim assay módszerrel

A módszer alapja a mesterséges N-biotinil-p-amino-benzoosav (B-PABA) enzim katalizálta hidrolízisében keletkező p-amino-benzoosav (PABA) LC-MS alapú mennyiségi meghatározása. Az in situ enzimreakció lejátszódása érdekében a mintavételi kártyát előzetesen átíttattuk a szubsztráttal, majd a mintavétel az így előkezelt kártyára történt. Az enzimaktivitás mértékét a termelődött PABA koncentráció/korong értékben adjuk meg.

Az optimalizált körülmények alapján az „in-paper” assay technika mintaelőkészítésének lépései:

- 10 mM szubsztrát oldattal előkezeli a mintavételi kártyát,
- a szűrőkártyára vételezett DBS mintából, kalibrációs pontokból, és vak mintából 6 mm-es korongot lyukasztunk 96 lyukú mikroplate-be,
- belső sztenderdet és a szubsztrát stabilitását biztosító adalékanyagot tartalmazó vizes oldattal extraháljuk az enzimreakcióban keletkezett terméket (30 min, RT),
- a felülúszóból 100-100 µl-t átpipettázunk egy 0,45 µm hidrofil szűrős plate-be,
- a zavaró mátrix komponenseket irreverzibilisen kicsapjuk 200 µl 3% TCA oldattal,
- az elegyet LC-MS meghatározás előtt átszűrjük egy tiszta 96 lyukú, V aljú polipropilén mikroplate-be. (1. ábra).



1. ábra: Az „in-paper” enzimaktivitás meghatározás sematikus lépései. a) A szűrőpapír átíttatása szubsztrátot tartalmazó oldattal. b) Mintavétel az előkezelt kártyára. c) Azonnali „in-paper” enzimreakció. d) Mintaelőkészítés. e) Az enzimreakcióban keletkezett termék LC-MS alapú meghatározása.

A validálást 46 beteg (13 alacsonyabb enzimaktivitás értékekkel rendelkező egészséges (30-50%), 25 parciális (10-30%) és 8 totális (<10%) biotinidáz defektusos) és 45 egészséges (>50%) egyén szérumból és DBS mintájának analizálásával végeztük el. Az összehasonlítás kivitelezhetőségének érdekében az átlag enzimaktivitás értékeket szérumból és DBS-ből egyaránt meghatároztuk, és a beteg minták eredményeit ezen normál átlag értékek százalékában adtuk meg.

- Számos metabolit – többek között a PKU-ra és MCADD-ra jellemző analitok – esetében meghatároztuk azok lineáris tartományát és detektálhatóságának alsó határát.

A kapott eredmények azt mutatják, hogy az LOD értékek minden esetben alacsonyabbak, mint az adott metabolit normál tartományának alsó határa, illetve amennyiben a betegséget a csökkent mennyiség jellemzi, úgy az LOD alacsonyabb a beteg tartomány alsó határértékénél. A kalibrációs egyenesek a lineáris tartományon felüli szakaszon minden esetben szaturációt mutattak, azonban egy esetben sem volt megfigyelhető azok letörése. Ebből arra következtethetünk, hogy a patológiás értékek minden esetben kiszűrésre kerülnek, akkor is, ha a koncentráció a lineáris tartományon kívül esne.

- Az új módszer alkalmazhatóságának feltérképezéséhez azokat az aminosavakat és acilkarnitineket használtuk, melyek ESI-MS/MS alapú meghatározása az újszülöttkori szűrésben is szerepel.

A korrelációs függvények minden vizsgált metabolit esetében lineáris kapcsolatot mutatnak a két módszer között, az eredmények viszonyát leíró Pearson-féle korrelációs együtthatók 0,4-0,95 között mozogtak. A PKU szűrésében alkalmazott fenilalanin és fenilalanin/tirozin arány esetében a Pearson-féle korrelációs együttható 0,87, illetve 0,95; az MCADD esetében meghatározott acetil-karnitin koncentrációk esetében pedig 0,93 volt. Diagnosztikai szempontból a normál és beteg tartományok mindkét kórkép esetében egyértelműen elkülönülnek egymástól.

- PKU esetében a hagyományos ESI-MS/MS módszerrel meghatározott fenilalanin és fenilalanin/tirozin mellett további metabolitokat azonosítottunk negatív ionmódban, melyek betegség esetében felhalmozódnak a szervezetben. Ezek közül diagnosztikus jelentőséggel bír a fenil-piroszölősav és fenil-tejsav, melyek közül a fenil-piroszölősav esetében egyértelműbb szeparáció tapasztalható a beteg és egészséges populációk között, mint a szűrésben szereplő fenilalanin szint meghatározása esetén. A kutatás során az 500 egészséges és 21 PKU-s minta mellett analizáltunk további 12 fals pozitív mintát is az új módszerrel. Ezen minták esetében az újszülöttkori szűrés során magasabb fenilalanin szinteket mértünk, azonban a további vizsgálatok során a betegség nem igazolódott. Az nS-HR-MS meghatározás esetében a 12 minta mindegyikében normális fenil-piroszölősav szintet mértünk. Az emelkedett fenilalanin szint eredetére 8 esetben derült fény: 5 esetben aminosav infúzió eredménye volt, míg 3 esetben a minta koraszülött babától származott.

A kevés mintaszám miatt természetesen nem lehet kijelenteni, hogy a fenil-piroszólósav szelektív biomarkere lehet ezen állapotok kiszűrésének emelkedett fenilalanin szint esetében, azonban alkalmazása a populáció szintű szűrésben mindenképpen előbbre vihet a PKU diagnosztikájában.

- MCADD esetében az acilkarnitinek mellett az nS-HR-MS módszerrel sikerült detektálni további metabolitokat is negatív ionmódban, melyek a tradicionális szűrésben nem szerepelnek, azok meghatározását megerősítő vizsgálatok során vizelet GC-MS alapú analizálásával végezzük a diagnózis felállítása érdekében. Meghatároztuk 500 egészséges és 21 beteg mintában a metabolit szinteket, továbbá analizáltunk 21 olyan mintát, ahol a szűrés során meghatározott paraméterek – C8, C6, C10:1, C10:1/C2 – közül legalább 3 szintje volt magasabb a meghatározott határértéknél, azonban a megerősítő vizsgálatok során a diagnózis nem nyert megerősítést. A fals pozitív minták nS-HR-MS analízise során a betegséget igazoló másodlagos metabolitok szintjei a beteg populációban mért értékek alsó 1%-a alatt maradtak. A fals pozitív mintákban mért érték C8:1 dikarbonsav esetében 3-44%-a, hexanoil-glicin esetében 65-89 %-a, míg szuberinsav esetén 40-51 %-a volt az egészséges kontrollcsoportban mért értékeknek. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a fals pozitív eredmények mindegyikét sikerült azonosítani ezekkel a másodlagos biomarkerekkel, mellyel így a mért minták esetében 100%-os szelektivitást és szenzitivitást sikerült elérni.

Az nS-HR-MS módszer alkalmazásával az MCADD diagnosztika szempontjából hasznos metabolitok meghatározása válik lehetővé, mellyel csökkenthető a másodlagos vizsgálatokra kért minták száma.

4.2. Biotinidáz enzimaktivitás meghatározás „in-paper” enzim assay módszerrel

- A budapesti szűrőközpontban a biotinidáz enzimaktivitás szemi-kvantitatív kolorimetriás meghatározása során kiszűrt pozitív esetekben jelenleg szérumból végzünk kvantitatív megerősítő vizsgálatot LC-MS alapú, klasszikus enzim assay módszerrel. Ezért az új módszer validálásához a kapott eredményeinket elsődlegesen a szérumból mért aktivitás értékekkel vetettük össze.

A Pearson-féle korrelációs együttható a szérumban és DBS-ben mért enzimaktivitások esetében 0,93 volt, tehát az új módszerrel nyert eredmények jól korrelálnak a megerősítő vizsgálat során kapott értékekkel.

- A diagnosztikai alkalmazhatóság megállapítása érdekében összevetettük az új módszerrel nyert eredményeket a szűrésben alkalmazott kolorimetriás meghatározás értékeivel egyaránt.

A mért értékek alapján az egészséges csoport egyértelműen elszeparálódik a betegcsoportoktól, illetve a betegek között is jól elkülönül a súlyosabb és enyhébb biotinidáz defektusos csoport egymástól az „in-paper” assay technikával meghatározva. A technika tehát alkalmas a biotinidáz defektus szelektív és szenzitív azonosítására.

- A stabilitás vizsgálatok során a mért enzimaktivitás értékek relatív standard deviációja a teljes időtartamot figyelembe véve szobahőmérsékleten 7,8 %, 4°C-on 5,8%, míg -20°C-on 7,5 % volt; tehát minden egyes esetben jóval a biológiai minták esetében megengedett 15%-on belül maradt. Az eredmények alapján elmondható, hogy a PABA DBS-ben -20, 4 és 25°C-on tárolva minimum 18 napig stabil. Az előkezelt kártya stabilitásának vizsgálata során a vérvételt követő PABA koncentrációk meghatározásából arra következtethetünk, hogy adott körülmények között, a vizsgált időintervallumban a szubsztrát is stabil. A hosszú távú stabilitás vizsgálat (30 és 120 nap) során szintén nem tapasztaltunk koncentráció csökkenést, a mért értékek szórása ebben az esetben is 10%-on belül (8,9 %) maradt.

A stabilitási vizsgálatok alapján kijelenthető, hogy az azonnali enzimreakciónak köszönhetően a módszer nem igényel különleges tárolási, vagy szállítási körülményeket, mely egy megbízható, robosztus technikát eredményez.

- A tandem tömegspektrometriát is alkalmazó újszülöttkori szűrésbe történő bevezethetőség szempontjából vizsgáltuk az előkezelt DBS mintában jelenlévő PABA esetleges befolyását az aminosav és acilkarnitin szintekre nézve. Ehhez meghatároztuk 20 db parciális biotinidáz defektusos beteg előkezelt DBS és hagyományos DBS mintájában az aminosav (6 db) és acilkarnitin (17 db) szinteket.

A mért értékek 15%-os hibahatáron belül mozogtak és egyetlen esetben sem okoztak fals eredményt. A vizsgálatból arra következtethetünk, hogy a szűrőpapírnak a biotinidáz enzimaktivitás meghatározáshoz szükséges szubsztráttal való előkezelése nem okoz számottevő eltérést az MS/MS alapú aminosav és acilkarnitin profil meghatározásban, ezért az újszülöttkori szűrésbe történő bevezetése elvileg lehetséges.

5. Következtetések

A kutatómunka során sikerült kidolgozni egy olyan nanospray ionizációt alkalmazó nagyfelbontású tömegspektrometriás módszert, mely a hagyományos ESI-MS/MS módszer ígéretes alternatívája lehet a veleszületett metabolikus betegségek populáció szintű újszülöttkori szűrésében. A módszerben alkalmazott chip bázisú nanospray rendszer számos előnnyel rendelkezik a tradicionális ESI mintabevitelével szemben, melyek közül az egyik legfontosabb a keresztszennyezés kiküszöbölése. Így egyrészt csökkenthető a fals eredmények száma, másrészt lerövidíthető az analízis idő is. A hagyományos szűrőmódszerrel szemben az itt bemutatott technika az aminosavak és acilkarnitinek detektálása mellett lehetővé teszi további, a metabolikus betegségek szempontjából specifikus metabolitok szemi-kvantitatív meghatározását egyaránt. A módszer rutin alkalmazása várhatóan csökkentené a második minta kérésének, illetve a különböző megerősítő vizsgálatokra kért minták számát is. Ez egyrészt tehermentesítené a laboratóriumot, másrészt az érintett családokat érő felesleges stressz is elkerülhetővé válna. A próbavizsgálatban analizált minták száma nem reprezentálja megfelelően az egészséges csoportok közötti statisztikai eltérést, vagy a vizsgált betegségek előfordulásának gyakoriságát, de az elvégzett vizsgálatok adatai alapján egyértelműen elkülöníthetővé válik az egészséges csoport az abnormálistól.

A doktori munka során a biotinidáz enzim aktivitásának meghatározására sikerült kifejleszteni egy olyan módszert, ami egy teljesen új analitikai megközelítéssel bír. Az új módszerben a vérvétel egy szubsztráttal előkezelt szűrőkártyán történik, így az enzimreakció *in situ* megy végbe. Az enzimreakcióban keletkezett termék HPLC-MS alapú meghatározásával kapott enzimaktivitás értékek jól korrelálnak az újszülöttkori szűrésben alkalmazott kolorimetriás módszerrel, illetve a HPLC-MS alapú szérumszintű enzim assay módszerrel mért értékekkel egyaránt. A dolgozatban bemutatott módszer gyorsabb és robosztusabb a hagyományos meghatározásoknál, ez az enzimreakció pillanatszerű lejátszódásából fakad. Az enzimreakcióban keletkező termék hosszú távon is stabilnak bizonyult DBS-ben, szemben az enzimmel, mely szállítás és tárolás közben már akár néhány nap alatt degradálódhat. A tömegspektrometriás detektálásnak köszönhetően a módszer szelektivitása és szenzitivitása jelentősen megnő a szűrésben jelenleg alkalmazott kolorimetriás módszerrel szemben. A fejlesztett módszer tehát összességében alacsonyabb fals pozitív és negatív rátát eredményez. A mintaelőkészítés – a szűrőkártya szubsztráttal történő előkezelésének szükségessége ellenére is – sokkal gyorsabb és könnyebben kivitelezhető, hiszen egy egyszerű extrakciós lépésből áll, ahol nincs szükség komplikált és

hosszadalmas enzim assay kondíciók megteremtésére. A DBS-ben az enzimreakció következtében jelenlévő termék nem befolyásolja az újszülöttkori szűrésben meghatározásra kerülő aminosav és acilkarnitin koncentrációkat, ezért a szűrésbe történő bevezethetősége elvileg lehetséges. A fejlesztett módszerben további lehetőségek is rejlenek, hiszen számos betegség diagnosztikájában szerepet játszik a betegségben érintett enzim aktivitásának meghatározása, melyre a módszer feltehetően egyszerűen alkalmazható.

A kutatómunka során fejlesztett módszerek nagyobb, statisztikailag relevánsabb mintaszámmal történő vizsgálatával akár a populáció szintű szűrésbe is beilleszthetőek.

6. A kutatás témájában megjelent saját közlemények

Szabó E, Balogh L, Szabó A, Szatmári I. *Ritka örökletes anyagcsere-betegségek diagnosztikája: laboratóriumi vizsgálati megközelítések.* **Orv Hetil.** 2017; 158(48): 1903–1907. (Impact Factor: 0.349)

Szabó E, Szatmári I, Szőnyi L, Takáts Z. *Quantitative Analytical Method for the Determination of Biotinidase Activity in Dried Blood Spot Samples.* **Anal Chem.** 2015 Oct 20;87(20):10573-8. doi: 10.1021/acs.analchem.5b02996. Epub 2015 Oct 9. (Impact Factor: 5.64)

Dénes J, Szabó E, Robinette SL, Szatmári I, Szőnyi L, Kreuder JG, Rauterberg EW, Takáts Z. *Metabonomics of newborn screening dried blood spot samples: a novel approach in the screening and diagnostics of inborn errors of metabolism* **Anal Chem.** 2012 Nov 20;84(22):10113-20. (Impact Factor: 5.64)

7. Irodalomjegyzék

1. Chace, D.H., *Mass spectrometry in newborn and metabolic screening: historical perspective and future directions.* **J Mass Spectrom**, 2009. 44(2): p. 163-70.
2. Matern, D., et al., *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): p. 585-92.
3. Oglesbee, D., 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): p. 542-9.
4. Forni, S., et al., *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): p. 25-32.
5. Waisbren, S.E., et al., *Effect of expanded newborn screening for biochemical genetic disorders on child outcomes and parental stress.* **Jama**, 2003. 290(19): p. 2564-72.
6. Hewlett, J. and S.E. Waisbren, *A review of the psychosocial effects of false-positive results on parents and current communication practices in newborn screening.* **J Inherit Metab Dis**, 2006. 29(5): p. 677-82.
7. Wolf, B., *Clinical issues and frequent questions about biotinidase deficiency.* **Mol Genet Metab**, 2010. 100(1): p. 6-13.