

Diagnóstico de los errores innatos del metabolismo mediante secuenciación masiva de ADN: beneficios y limitaciones

Vianey Ordóñez-Labastida^{1,2,3}  y Juan C. Zenteno^{1,2,4*} 

¹Departamento de Genética, Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana, Ciudad de México; ²Unidad de Diagnóstico de Enfermedades Raras, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México; ³Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos; ⁴Facultad de Medicina, Departamento de Bioquímica, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México. México

Resumen

Los errores innatos del metabolismo (EIM) son enfermedades hereditarias causadas por alteraciones en genes involucrados en vías metabólicas de ácidos grasos, carbohidratos y proteínas. Aun cuando los programas de tamizaje neonatal han sido aplicados exitosamente desde hace varias décadas para identificar de manera oportuna a recién nacidos con EIM tratables y así disminuir la morbilidad y mortalidad asociada, la mayoría de los EIM no pueden ser identificados mediante cribado bioquímico. En años recientes, las tecnologías de secuenciación de ADN de nueva generación (NGS, también conocida como secuenciación masiva en paralelo) han revolucionado el diagnóstico de las enfermedades monogénicas, incluidos los EIM, mediante la aplicación de secuenciación de paneles de genes, secuenciación de exoma y secuenciación de genoma. En esta revisión narrativa, se presenta bibliografía seleccionada para mostrar un panorama general del estado actual del diagnóstico genético de los EIM con base en NGS, así como las limitaciones inherentes de esta tecnología. La NGS ha demostrado la capacidad de identificar a recién nacidos con enfermedades metabólicas que no podrían ser reconocidas sino hasta después del inicio de los síntomas. De manera importante, un subgrupo de estos pacientes recibe el beneficio de tratamientos individualizados oportunos.

PALABRAS CLAVE: Errores innatos del metabolismo. Mutación. Secuenciación de exoma. Secuenciación masiva del ADN.

Diagnosis of inborn errors of metabolism through massive DNA sequencing: benefits and limitations

Abstract

Inborn errors of metabolism (IEM) are inherited disorders resulting from genetic defects in proteins involved in breakdown or storage of fatty acids, carbohydrates and proteins. Collectively, IEM encompasses approximately 1000 different disorders and can affect up to 1 in 2000 births. While biochemical newborn screening programs have been successfully applied to early identify newborns with treatable IEM conditions and to reduce their associated morbidity and mortality, the great majority of known IEM are not recognizable through biochemical screening. In recent years, next generation DNA sequencing technologies (including sequencing of gene panels, exome sequencing, and genome sequencing) has revolutionized the genetic diagnosis of monogenic diseases, including IEM. Here, we present a narrative review with selected bibliography to show a general landscape about the status of NGS-based IEM diagnosis as well as its intrinsic limitations. NGS can detect newborns with metabolic diseases that may otherwise be clinically unrecognized until symptoms start. Importantly, a subgroup of these newborns will benefit from individualized medical management.

KEYWORDS: Inborn errors of metabolism. Mutation. Exome sequencing. Massive DNA sequencing.

Correspondencia:

Juan C. Zenteno

E-mail: jzenteno@institutooftalmologia.org

Fecha de recepción: 29-10-2024

Fecha de aceptación: 28-01-2025

DOI: 10.24875/GMM.M25000957

Gac Med Mex. 2025;161:29-34

Disponible en PubMed

www.gacetamedicademexico.com

0016-3813/© 2025 Academia Nacional de Medicina de México, A.C. Publicado por Permanyer. Este es un artículo open access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

Los errores innatos del metabolismo (EIM) son un grupo de aproximadamente 1000 trastornos genéticos raros causados por mutaciones en genes que codifican productos implicados en vías metabólicas asociadas a la descomposición o almacenamiento de ácidos grasos, carbohidratos y proteínas. Aunque la mayoría de los EIM se heredan como trastornos autosómicos recesivos, ocasionalmente pueden ser transmitidos como rasgos autosómicos dominantes o ligados al cromosoma X.¹ Individualmente, la incidencia de EIM es baja, pero de manera colectiva pueden ocurrir con una frecuencia de hasta uno por cada 2000 nacimientos en todo el mundo.² Este grupo de trastornos puede manifestarse a cualquier edad, desde el período neonatal hasta la edad adulta, y afectar a diferentes tipos de células y sistemas. En este sentido, las manifestaciones clínicas pueden variar desde retraso en el desarrollo hasta una descompensación aguda con acidosis metabólica grave y muerte prematura súbita. Los EIM se pueden dividir en dos categorías clínicas con base en el sistema afectado o en su naturaleza bioquímica:

- Categoría 1, incluye trastornos que afectan solo a un sistema (por ejemplo, sistema inmune, sistema endocrino) o a un solo tipo de célula u órgano (por ejemplo, túbulo renales, eritrocitos); o cuyos síntomas son específicos del órgano afectado (por ejemplo, tendencia a hemorragias en defectos de factores de coagulación).
- Categoría 2, incluye trastornos en los que la anomalía bioquímica afecta a una vía metabólica común a numerosas células u órganos (por ejemplo, deficiencia energética en trastornos mitocondriales) o está limitada a un órgano, pero tiene consecuencias sistémicas (por ejemplo, hipera-monemia en defectos del ciclo de la urea).^{3,4}

El flujo del trabajo diagnóstico actual de los EIM consiste en una evaluación clínica exhaustiva y un historial familiar integral, lo cual puede llevar a proponer posibles diagnósticos clínicos. A continuación, se lleva a cabo un análisis bioquímico que puede incluir la cuantificación de productos de almacenamiento acumulados o la determinación de actividades enzimáticas en leucocitos, fibroblastos, orina o manchas de sangre seca rehidratada de los recién nacidos.⁴

En la actualidad, se emplean técnicas basadas en espectrometría de masas en tándem (MS/MS) para el cribado de metabolitos en EIM utilizando una sola

muestra, ya que esta técnica permite el análisis simultáneo de una variedad de metabolitos asociados a múltiples enfermedades. No obstante, aunque la evaluación clínica exhaustiva y las pruebas bioquímicas son clave para el diagnóstico de EIM, la confirmación diagnóstica definitiva depende de las pruebas genéticas.⁵ En los EIM, la confirmación genética es crucial, ya que permite establecer terapias específicas, incluidas las de vanguardia como la terapia génica, el reemplazo enzimático o las terapias de reducción de sustrato.⁶⁻⁸ Como ocurre en muchas otras enfermedades, cuanto más pronto se inicie el manejo específico en pacientes con EIM, mejor será el pronóstico.⁹

Cribado bioquímico neonatal

El cribado bioquímico neonatal (CBN) es una de las iniciativas de salud pública más exitosas para prevenir discapacidades crónicas. Se inició en la década de 1960 con el trabajo de Robert Guthrie y la “prueba de Guthrie”, destinada a detectar fenilcetonuria en una muestra de sangre. En la década de 1990, con la llegada de las técnicas MS/MS fue posible el cribado simultáneo de múltiples EIM mediante una única prueba.¹⁰ La constante incorporación de enfermedades a los programas de CBN ha permitido el incremento de los métodos analíticos empleados. En este sentido, a pesar del notable desarrollo de posibilidades técnicas, la mayoría de los trastornos humanos no califican para ser incluidos en el programa de CBN.¹¹

Secuenciación de ADN de nueva generación

Los métodos de diagnóstico genético han experimentado un rápido avance tecnológico en los últimos años. En particular, la secuenciación de nueva generación (NGS, *next-generation sequencing*), también conocida como secuenciación masiva paralela, es un método que permite el análisis simultáneo de millones de fragmentos de ADN; por lo tanto, es posible el análisis simultáneo de docenas de genes o, incluso, de genomas humanos completos con una sola prueba.¹² La NGS es altamente eficiente para el diagnóstico de EIM, ya que las mutaciones en más de 750 genes pueden provocar estos trastornos.¹ En la actualidad, se utilizan principalmente tres tipos de NGS para el diagnóstico genético de EIM:¹³

- Secuenciación de paneles de genes.
- Secuenciación del exoma.
- Secuenciación del genoma.

La secuenciación de paneles permite el estudio simultáneo de genes asociados a un fenotipo o diagnóstico clínico específico;¹⁴ la secuenciación del exoma examina las regiones exónicas de los aproximadamente 23 000 genes humanos conocidos codificantes de proteínas (que representan solo de 1 a 2 % del genoma completo);¹² la secuenciación del genoma analiza el genoma completo de un individuo, compuesto por alrededor de tres mil millones de pares de bases.¹⁵

En la actualidad, la secuenciación del exoma se considera la prueba de elección para el diagnóstico genético de una gran variedad de trastornos monogénicos, incluidos EIM, enfermedades cardiovasculares, mitocondriales, del neurodesarrollo y neuromusculares, entre otros.¹⁶⁻¹⁸ La secuenciación del exoma tiene tasas de diagnóstico que van de 40 a 70 %, dependiendo del tipo de trastorno monogénico de que se trate.¹⁸⁻²⁰

EIM y NGS

Los programas de salud pública de CBN proporcionan la identificación a escala poblacional de EIM raros que requieren intervención urgente. En la actualidad, se utiliza MS/MS para examinar a los recién nacidos en busca de EIM; normalmente un panel incluye entre siete y 50 enfermedades.²¹ Desde su establecimiento en 1963, el CBN se ha convertido en una prueba esencial para el reconocimiento temprano y el abordaje médico de estos trastornos genéticos.

Tanto el CBN convencional como el ampliado con MS/MS se están utilizando en todo el mundo por sus numerosas ventajas: se trata de intervenciones rápidas y sencillas, incrementan significativamente la detección de EIM, el diagnóstico temprano y el reconocimiento de riesgo de muerte; así como por su rentabilidad económica.²²⁻²⁴ No obstante, el CBN también tiene importantes limitaciones, principalmente porque cubre solo a una minoría de los EIM conocidos, así como por la falta de disponibilidad de marcadores bioquímicos confiables para numerosas enfermedades metabólicas humanas.²⁵

En la eficiencia de los programas de CBN también influyen factores logísticos como las diferencias en el tiempo de recolección de muestras tras el nacimiento y las intervenciones de transporte a los centros de referencia.²⁶ Por si esto fuera poco, circunstancias como la nutrición parenteral, las transfusiones, la prematurez, el bajo peso al nacer y la descompensación metabólica también influyen en los resultados del CBN.²⁷

Otras limitaciones del CBN incluyen la falta de homogeneidad en el número de enfermedades cribadas, que suelen variar incluso entre regiones de un mismo país.²⁸ En este sentido, el valor predictivo positivo del CBN es bajo y los resultados pueden ser inespecíficos, con más falsos positivos; también ha mostrado poca sensibilidad, con más resultados falsos negativos.²⁹ Se debe mencionar que cuando se criban múltiples enfermedades mediante un único marcador bioquímico, la espectrometría de masas no es capaz de distinguir entre ellas ni sus subtipos, lo cual influye negativamente en el diagnóstico y tratamiento oportunos.³⁰

Como los resultados falsos positivos y falsos negativos siguen siendo comunes en el CBN, el desarrollo de técnicas de NGS de ADN ofrece nuevas oportunidades para ampliar y mejorar los procedimientos de cribado neonatal disponibles en la actualidad. La incorporación de la genómica promete extender el alcance del CBN estándar, incluida la posible integración de herramientas genómicas en el cribado primario.³¹ En los últimos años, numerosos estudios han aplicado con éxito NGS como prueba de segunda o primera línea para la identificación temprana de EIM. Por ejemplo, en un estudio de 2020,³² la secuenciación del exoma tuvo una tasa de sensibilidad general de 88 % y una especificidad de 98.4 % *versus* 99.0 y 99.8 %, respectivamente, de la MS/MS, lo cual sugiere que la secuenciación del exoma por sí sola no es lo bastante sensible ni específica para la mayoría de los EIM considerados en el CBN. No obstante, en neonatos con lecturas de MS/MS anormales, se encontraron menos resultados falsos positivos con la secuenciación del exoma como prueba secundaria, lo que facilitó la resolución oportuna de los casos, y en algunos fue posible sugerir un diagnóstico más adecuado o específico que el inicialmente obtenido.³²

En otro estudio⁵ con un panel de secuenciación genética neonatal basado en PCR múltiple y NGS, se analizaron 134 genes de 74 EIM, los cuales fueron validados en 287 muestras con mutaciones ya conocidas. Se cribaron retrospectivamente 4986 recién nacidos y se llevó a cabo la comparación con los resultados bioquímicos para valorar el rendimiento del panel. La precisión del panel fue de 99.65 % con todas las muestras, y 154 mutaciones de las 287 muestras fueron detectadas con una precisión de 100 %. En los 4986 recién nacidos se identificaron 113 con mutaciones bialélicas o hemicigotas, de los cuales 36 dieron positivo para el mismo trastorno tanto en la secuenciación genética neonatal como en el CBN convencional;

en 77, los resultados fueron positivos en la secuenciación genética neonatal y negativos en el CBN convencional. Es importante destacar que cuatro de los 77 recién nacidos fueron diagnosticados en ese momento, incluido uno con acidemia metilmalónica, otro con déficit primario de carnitina sistémica y dos con enfermedad de Wilson.⁵

En una investigación de 2024,³³ se analizó un panel genético que incluyó 601 genes de EIM relevantes en la población china. De los 200 neonatos que fueron positivos en el CBN convencional, 118 también lo fueron a NGS; 58.5 % (69/118) arrojó resultados coincidentes con la NGS. De los 3049 neonatos restantes que dieron negativo en el CBN convencional, 271 (8.9 %) fueron positivos en la NGS y nueve de ellos fueron clínicamente diagnosticados de enfermedades durante el seguimiento. El panel demostró un alto rendimiento en la población china, particularmente para la detección temprana de EIM sin marcadores bioquímicos.³³

En otro estudio multicéntrico reciente que utilizó NGS + MS/MS como prueba de cribado de primera línea en 29 601 recién nacidos, se aplicó la secuenciación de un panel de 142 genes de 128 EIM; en forma simultánea se llevó a cabo la realización de CBN bioquímico + MS/MS.³⁴ Se diagnosticaron 23 EIM mediante NGS + MS/MS. Al efectuar el análisis de las técnicas por separado, el valor predictivo positivo y la sensibilidad de MS/MS fueron de 5.29 y 91.3 %, respectivamente, *versus* 70.83 y 73.91 % para solo el NGS. Estos resultados indican que la combinación de NGS y MS/MS mejora el rendimiento del CBN, optimiza el proceso y proporciona diagnósticos precisos.³⁴

Limitaciones de la NGS y perspectivas futuras

Aunque la NGS ofrece la oportunidad de detectar trastornos genéticos mediante una única prueba, aún existen desafíos en términos de costos generales y accesibilidad a equipos complejos y apropiados. De hecho, la actual Clasificación Internacional de EIM incluye cualquier enfermedad genética primaria en la que la alteración de una vía bioquímica sea intrínseca a características bioquímicas, clínicas y fisiopatológicas específicas, independientemente de si las pruebas bioquímicas de laboratorio están disponibles.¹

A pesar de la mayor disponibilidad de NGS, particularmente por secuenciación del exoma y el genoma,

los costos de esta prueba siguen siendo uno de los factores limitantes para una aplicación más extendida. Otro desafío importante es la interpretación precisa de la patogenicidad de las variantes, debido a la gran cantidad de experiencia y tiempo que se requieren para llevar a cabo esta tarea. De hecho, aunque existen guías detalladas para la interpretación de variantes genéticas, especialmente las establecidas por el *American College of Medical Genetics and Genomics*,³⁵ a menudo no se implementan de manera consistente por los laboratorios de pruebas ni por los médicos derivadores.

La NGS tiene una utilidad clínica significativa para el diagnóstico de EIM;³¹ sin embargo, el acceso global a las pruebas genómicas y los problemas éticos son aspectos que deben considerarse. Tradicionalmente, los obstáculos para acceder a la atención médica afectan de forma más importante a las minorías raciales y étnicas, personas con discapacidades, poblaciones rurales o con ingresos bajos. De tal forma, el acceso y la utilización de servicios genéticos se ven limitados entre estos grupos, lo cual a su vez resulta en menores tasas de diagnóstico, en una atención subóptima y en peores resultados de salud.³⁶ En este sentido, un desafío adicional para la adopción del diagnóstico genómico de EIM es poder garantizar el acceso de todos los sectores sociales a las NGS.

Además, se deben tener en cuenta los aspectos éticos, incluida la explicación apropiada del consentimiento informado y el respeto por la decisión de los padres sobre cuánta información desean recibir; así como la garantía de la confidencialidad de los datos genómicos (evitar que terceros hagan un mal uso de esta información), sobre todo cuando un diagnóstico genético pudiese llevar a discriminación o estigmatización; o el manejo de la información genética que podría ser relevante para la planificación familiar de los padres del niño o la salud de este en la adultez.³⁷

Tanto las pruebas bioquímicas como el análisis mediante NGS desempeñan papeles complementarios en el diagnóstico de EIM. Incorporar la NGS al algoritmo diagnóstico de EIM puede mejorar la precisión diagnóstica (Figura 1). Cada vez más estudios en el mundo indican que la NGS es capaz de detectar a recién nacidos con enfermedades metabólicas, que de otro modo no se reconocerían clínicamente hasta el inicio de los síntomas, y que un subgrupo de estos recién nacidos se beneficiará de un manejo médico coherente como resultado del cribado genético.³⁸

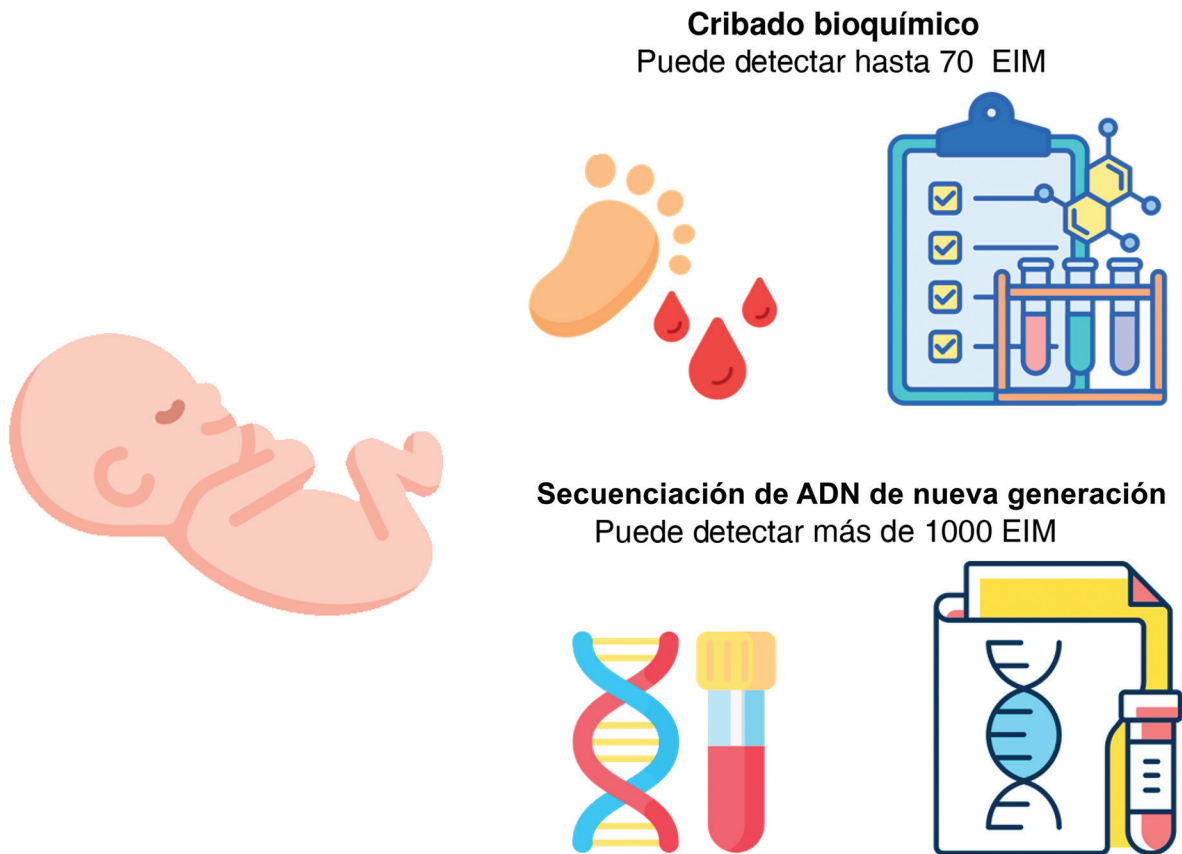


Figura 1. En la actualidad, el cribado bioquímico neonatal es capaz de detectar hasta 70 enfermedades metabólicas innatas. Comparativamente, la NGS (secuenciación de nueva generación) de ADN llega a detectar más de 1000 de estos trastornos.

Financiamiento

Ninguno.

Conflicto de intereses

Ninguno.

Consideraciones éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no realizaron experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad, consentimiento informado y aprobación ética. Los autores obtuvieron la aprobación del Comité de Ética para el análisis de datos clínicos recopilados de forma rutinaria y anónima, por lo que no fue necesario el consentimiento informado. Se siguieron las recomendaciones pertinentes.

Declaración sobre el uso de inteligencia artificial. Los autores declaran que no utilizaron ningún

tipo de inteligencia artificial generativa para la redacción de este manuscrito.

Bibliografía

1. Ferreira CR, Rahman S, Keller M, Zschocke J; ICIMD Advisory Group. An international classification of inherited metabolic disorders (ICIMD). *J Inher Metab Dis* 2021;44(1):164-177. DOI: 10.1002/jimd.12348
2. Waters D, Adeloye D, Woolham D, Wastnedge E, Patel S, Rudan I. Global birth prevalence and mortality from inborn errors of metabolism: a systematic analysis of the evidence. *J Glob Health*. 2018;8(2):021102. DOI: 10.7189/jogh.08.021102
3. Saudubray JM, García-Cazorla Á. Inborn errors of metabolism overview: pathophysiology, manifestations, evaluation, and management. *Pediatr Clin North Am*. 2018;65(2):179-208. DOI: 10.1016/j.pcl.2017.11.002
4. Elmonem MA, van den Heuvel LP. Editorial: Newborn screening for inborn errors of metabolism: Is it time for a globalized perspective based on genetic screening? *Front Genet*. 2021;12:758142. DOI: 10.3389/fgene.2021.758142
5. Huang X, Wu D, Zhu L, Wang W, Yang R, Yang J, et al. Application of a next-generation sequencing (NGS) panel in newborn screening efficiently identifies inborn disorders of neonates. *Orphanet J Rare Dis*. 2022;17(1):66. DOI: 10.1186/s13023-022-02231-x
6. Coughlan KA, Eybye M, Henderson N, DeAntonis CM, Frassetto A, Hanahoe E, et al. Improved therapeutic efficacy in two mouse models of methylmalonic acidemia (MMA) using a second-generation mRNA therapy. *Mol Genet Metab*. 2024;143(1-2):108560. DOI: 10.1016/j.ymgme.2024.108560
7. Toskov V, Bali P, Hershfield MS, Ehl S, Speckmann C. Successful long-term enzyme replacement therapy in a patient with delayed-onset ADA deficiency. *J Clin Immunol*. 2024;45(1):8. DOI: 10.1007/s10875-024-01794-7

8. Babcock M, Zheng J, Gail Shurr J, Li L, Wang B, Huertas P, et al. Phase 1 healthy volunteer study of AL01211, an oral, non-brain penetrant glucosylceramide synthase inhibitor, to treat Fabry disease and type 1 Gaucher disease. *Clin Pharmacol Drug Dev.* 2024;13(6):696-709. DOI: 10.1002/cpdd.1375
9. Gall K, Izzo E, Seppälä EH, Alakurtti K, Koskinen L, Saarinen I, et al. Next-generation sequencing in childhood-onset epilepsies: diagnostic yield and impact on neuronal ceroid lipofuscinosis type 2 (CLN2) disease diagnosis. *PLoS One.* 2021;16(9):e0255933. DOI: 10.1371/journal.pone.0255933
10. Woerner AC, Gallagher RC, Vockley J, Adhikari AN. The use of whole genome and exome sequencing for newborn screening: challenges and opportunities for population health. *Front Pediatr.* 2021;9:663752. DOI: 10.3389/fped.2021.663752
11. Remec ZI, Trebusak Podkrajsek K, Repic Lampret B, Kovac J, Groselj U, Tesovnik T, et al. Next-generation sequencing in newborn screening: a review of current state. *Front Genet.* 2021;12:662254. DOI: 10.3389/fgene.2021.662254
12. van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet.* 2014;30(9):418-426. DOI: 10.1016/j.tig.2014.07.001
13. Stenton SL, Kremer LS, Kopajtich R, Ludwig C, Prokisch H. The diagnosis of inborn errors of metabolism by an integrative "multi-omics" approach: a perspective encompassing genomics, transcriptomics, and proteomics. *J Inher Metab Dis.* 2020;43(1):25-35. DOI: 10.1002/jimd.12130
14. Bean LJH, Funke B, Carlston CM, Gannon JL, Kantarci S, Krock BL, et al. ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Diagnostic gene sequencing panels: from design to report-a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med.* 2020;22(3):453-461. DOI: 10.1038/s41436-019-0666-z
15. Shieh JT, Penon-Portmann M, Wong KHY, Levy-Sakin M, Verghese M, Slavotinek A, et al. Application of full-genome analysis to diagnose rare monogenic disorders. *NPJ Genom Med.* 2021;6(1):77. DOI: 10.1038/s41525-021-00241-5. Erratum in: *NPJ Genom Med.* 2021;6(1):88. DOI: 10.1038/s41525-021-00251-3
16. Ramchand J, Wallis M, Macciocca I, Lynch E, Farouque O, Martyn M. Prospective evaluation of the utility of whole exome sequencing in dilated cardiomyopathy. *J Am Heart Assoc.* 2020;9(2):e013346. DOI: 10.1161/JAHA.119.013346
17. Ngo KJ, Rexach JE, Lee H, Petty LE, Perlman S, Valera JM, et al. A diagnostic ceiling for exome sequencing in cerebellar ataxia and related neurological disorders. *Hum Mutat.* 2020;41(2):487-501. DOI: 10.1002/humu.23946
18. Olimpio C, Paramonov I, Matalonga L, Laurie S, Schon K, Polavarapu K, et al. Increased diagnostic yield by reanalysis of whole exome sequencing data in mitochondrial disease. *J Neuromuscul Dis.* 2024;11(4):767-775. DOI: 10.3233/JND-240020
19. Ordoñez-Labastida V, Montes-Almanza L, García-Martínez F, Zenteno JC. Effectiveness of whole-exome sequencing for the identification of causal mutations in patients with suspected inherited ocular diseases. *Rev Invest Clin.* 2022;74(4):219-226. DOI: 10.24875/RIC.22000107
20. Marinakis NM, Svingou M, Veltra D, Kekou K, Sofocleous C, Tilemis FN, et al. Phenotype-driven variant filtration strategy in exome sequencing toward a high diagnostic yield and identification of 85 novel variants in 400 patients with rare Mendelian disorders. *Am J Med Genet A.* 2021;185(8):2561-2571. DOI: 10.1002/ajmg.a.62338
21. Millington DS. How mass spectrometry revolutionized newborn screening. *J Mass Spectrom Adv Clin Lab.* 2024;32:1-10. DOI: 10.1016/j.jmsacl.2024.01.006
22. Ombrone D, Gicaliere E, Forni G, Malvagias S, la Marca G. Expanded newborn screening by mass spectrometry: new tests, future perspectives. *Mass Spectrom Rev.* 2016;35(1):71-84. DOI: 10.1002/mas.214
23. Shibata N, Hasegawa Y, Yamada K, Kobayashi H, Purevsuren J, Yang Y, et al. Diversity in the incidence and spectrum of organic acidemias, fatty acid oxidation disorders, and amino acid disorders in Asian countries: selective screening vs. expanded newborn screening. *Mol Genet Metab Rep.* 2018;16:5-10. DOI: 10.1016/j.ymgmr.2018.05.003
24. Dunne E, O'Reilly D, Murphy CA, Howard C, Kelleher G, Suttie T, et al. Biochemical testing for inborn errors of metabolism: experience from a large tertiary neonatal center. *Eur J Pediatr.* 2022;181(10):3725-3732. DOI: 10.1007/s00431-022-04588-4
25. Siri B, Olivieri G, Angeloni A, Cairoli S, Carducci C, Cotugno G, et al. The diagnostic challenge of mild citrulline elevation at newborn screening. *Mol Genet Metab.* 2022;135(4):327-332. DOI: 10.1016/j.ymgme.2022.02.008
26. Saxena A. Issues in newborn screening. *Genet Test.* 2003;7(2):131-134. DOI: 10.1089/109065703322146812
27. Auray-Blais C, Boutin M, Lavoie P, Maranda B. Neonatal urine screening program in the province of Quebec: technological upgrade from thin layer chromatography to tandem mass spectrometry. *Int J Neonatal Screen.* 2021;7(1):18. DOI: 10.3390/ijns7010018
28. Jansen ME, Metternick-Jones SC, Lister KJ. International differences in the evaluation of conditions for newborn bloodspot screening: a review of scientific literature and policy documents. *Eur J Hum Genet.* 2016;25(1):10-16. DOI: 10.1038/ejhg.2016.126
29. Tarini BA, Christakis DA, Welch HG. State newborn screening in the tandem mass spectrometry era: more tests, more false-positive results. *Pediatrics.* 2006;118(2):448-456. DOI: 10.1542/peds.2005-2026
30. Younesi S, Yazdani B, Taheri Amin MM, Saadati P, Jamali S, Modarresi MH, et al. Incorporation of second-tier tests and secondary biomarkers to improve positive predictive value (PPV) rate in newborn metabolic screening program. *J Clin Lab Anal.* 2022;36(7):e24471. DOI: 10.1002/jcla.24471
31. Pintos-Morell G, lascone M, Casari G, Yahyaoui R, Tătaru EA, van Karnebeek CDM, et al. Analysis of genomics implementation in newborn screening for inherited metabolic disorders: an IRDiRC initiative. *Rare Dis Orphan Drugs J.* 2024;3:12. DOI: 10.20517/rdodj.2023.52
32. Adhikari AN, Gallagher RC, Wang Y, Currier RJ, Amatuni G, Bassaganyas L, et al. The role of exome sequencing in newborn screening for inborn errors of metabolism. *Nat Med.* 2020;26(9):1392-1397. DOI: 10.1038/s41591-020-0966-5
33. Cao Z, He X, Wang D, Gu M, Suo F, Qiang R, et al. Targeted exome sequencing strategy (NeoEXOME) for Chinese newborns using a pilot study with 3423 neonates. *Mol Genet Genomic Med.* 2024;12(1):e2357. DOI: 10.1002/mgg3.2357
34. Tang C, Li L, Chen T, Li Y, Zhu B, Zhang Y, et al. Newborn screening for inborn errors of metabolism by next-generation sequencing combined with tandem mass spectrometry. *Int J Neonatal Screen.* 2024;10(2):28. DOI: 10.3390/ijns10020028
35. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al.; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405-424. DOI: 10.1038/gim.2015.30
36. Khoury MJ, Bowen S, Dotson WD, Drzymalla E, Green RF, Goldstein R, et al. Health equity in the implementation of genomics and precision medicine: a public health imperative. *Genet Med.* 2022;24(8):1630-1639. DOI: 10.1016/j.gim.2022.04.009
37. Spiekerkoetter U, Bick D, Scott R, Hopkins H, Kronen T, Gross ES, et al. Genomic newborn screening: are we entering a new era of screening? *J Inher Metab Dis.* 2023;46(5):778-795. DOI: 10.1002/jimd.12650
38. Ziegler A, Koval-Burt C, Kay DM, Suchy SF, Begtrup A, Langley KG, et al. Expanded newborn screening using genome sequencing for early actionable conditions. *JAMA.* 2025;333(3):232-240. DOI: 10.1001/jama.2024.19662