

Vinte anos de rastreio neonatal alargado de doenças metabólicas em Portugal (2004-2024)

Twenty years of expanded newborn screening for metabolic diseases in Portugal (2004-2024)

Hugo Rocha, Carmen Sousa, Helena Fonseca, Ana Marcão, Laura Vilarinho

hugo.rocha@insa.min-saude.pt

Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto, Portugal

_Resumo

O Programa Nacional de Rastreio Neonatal (PNRN) identifica doentes com doenças raras através de um rastreio de âmbito nacional. Atualmente, são identificadas 28 doenças, das quais 24 são doenças metabólicas, abrangendo aproximadamente 100% dos recém-nascidos, nascidos em Portugal.

Em 2004, o PNRN implementou um novo método de rastreio, a espectrometria de massa em tandem (MS/MS) que possibilitou a deteção simultânea de 24 doenças metabólicas através da análise de aminoácidos e acilcarnitinas, dando origem ao que se designa por rastreio neonatal alargado.

De forma a melhorar a eficácia da deteção laboratorial das patologias rastreadas foi implementado um grupo de provas de segundo nível (doseamento da succinilacetona, homocisteína total, ácido metilmalónico, deteção da propionilglicina e separação dos isómeros de C5-carnitina), e a sua incorporação nos fluxogramas de deteção, com ganhos significativos em sensibilidade e especificidade. Esta estratégia foi fundamental para o PNRN apresentar taxas de falsos positivos e falsos negativos, para o rastreio de doenças metabólicas, muito baixas aumentando, desta forma, o valor que aporta em saúde pública.

Desde a sua implementação, em 2004, foram analisados 1 755 043 recém-nascidos por MS/MS o que permitiu a identificação de várias centenas de recém-nascidos afetados, resultando em intervenções clínicas precoces e melhoria clara nos resultados clínicos.

_Abstract

The Portuguese Neonatal Screening Program (PNRN) identifies patients with rare diseases through nationwide screening. At present, 28 conditions are included, of which 24 are inborn errors of metabolism, covering approximately 100% of newborns.

In 2004, the PNRN introduced tandem mass spectrometry (MS/MS), enabling the simultaneous detection of 24 metabolic disorders by measuring amino acids and acylcarnitines, thus establishing expanded neonatal screening in Portugal.

To enhance diagnostic accuracy, a panel of second-tier tests was subsequently incorporated, including quantification of succinylacetone, total homocysteine, and methylmalonic acid, detection of propionylglycine, and separation of C5-carnitine isomers. Integration of these assays into disease-specific diagnostic algorithms significantly improved both sensitivity and specificity. This approach has been crucial for maintaining very low false-positive and false-negative rates in the screening of metabolic diseases, thereby increasing the program's public health impact.

Since the implementation of MS/MS in 2004, a total of 1,755,043 newborns have been screened, leading to the identification of several hundred affected infants. This has enabled timely clinical interventions and contributed to markedly improved health outcomes.

_Introdução

As doenças metabólicas são um grupo de doenças genéticas raras, onde o correto funcionamento do metabolismo celular está comprometido. Estima-se que, atualmente, sejam conhecidas aproximadamente 1450 doenças metabólicas ⁽¹⁾ que afetam as mais variadas vias metabólicas, incluindo defeitos em proteínas, transportadores, cofatores, etc. Desde a sua origem, que o rastreio neonatal está invariavelmente associado às doenças metabólicas. O Rastreio Neonatal teve o seu início com os trabalhos pioneiros de Robert Guthrie ⁽²⁾, nos anos sessenta do século passado, que desenvolveu um método simples e económico para realizar uma avaliação semi-quantitativa dos níveis de fenilalanina em sangue de recém-nascidos, colhido em papel de filtro, de forma a rastrear a fenilcetonúria. Foram as vantagens da utilização deste tipo de amostra, a simplicidade, eficiência e baixo custo do teste, associados aos excelentes resultados clínicos de um tratamento precoce da fenilcetonúria, que foram os grandes impulsionadores da expansão dos Programas de Rastreio Neonatal por todo o mundo ⁽³⁾. A seguinte grande revolução dos Programas de Rastreio Neonatal esteve, também ela, relacionada com as doenças metabólicas e foi a adaptação e introdução da espectrometria de massa em tandem nos laboratórios de rastreio neonatal. A adaptação desta metodologia ocorreu em meados dos anos noventa do século passado e ficou fundamentalmente a dever-se aos trabalhos de David Millington ⁽⁴⁾ e Don Chace ⁽⁵⁾. Sendo uma tecnologia multianalítica, veio possibilitar o rastreio de mais de 20 doenças metabólicas simultaneamente, numa única análise, através da quantificação de aminoácidos e conjugados de carnitina, dando origem ao que se passou a chamar de Rastreio Neonatal Alargado.

O Programa Nacional de Rastreio Neonatal (PNRN) é um programa de saúde pública que teve o seu início em 1979, com o rastreio da fenilcetonúria. O Programa sempre se caracterizou por uma forte dinâmica na procura de aumentar os ganhos em saúde que aporta à população, o que se traduziu na realização de vários estudos piloto para avaliação de exequibilidade e benefícios de novos rastreios (6,7). Em 2004 deu-se início a um estudo piloto para o rastreio alargado de doenças metabólicas por espectrometria de massa (8) que, após avaliação positiva, resultou na incorporação de mais 23 doenças metabólicas no painel do PNRN (tabela 1), em 2006 (9). O PNRN é um programa público de participação voluntária e que apresenta uma taxa de cobertura superior a 99,5%, o que é um reflexo da sua forte implementação e aceitação pela sociedade. Todas as análises laboratoriais de suporte ao funcionamento do PNRN são efetuadas num único laboratório, a Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética do Departamento de Genética Humana do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, onde são processadas aproximadamente 88 000 amostras por ano (± 350 amostras por dia). As colheitas das amostras são realizadas maioritariamente em centros de

saúde ou unidades hospitalares e enviadas para o laboratório, fundamentalmente, por correio postal (7).

_Objetivo

Neste trabalho apresenta-se os resultados de 20 anos (2004-2024) do rastreio neonatal alargado a doenças metabólicas na população portuguesa.

_Material e métodos

Este estudo inclui 1 755 043 amostras de sangue em papel de filtro de recém-nascidos nascidos em Portugal colhidas, maioritariamente, entre o 3º e o 6º dia de vida (garantindo 48 horas de alimentação ajustada ao peso do recém-nascido), entre 2004 e 2024. As análises de aminoácidos e acilcarnitinas foram efetuadas por espectrometria de massa em tandem (MS/MS) (9), sendo rastreadas as 24 doenças metabólicas indicadas na tabela 1, pertencentes ao grupo das aminoacidopatias, défices do ciclo da ureia, acidúrias orgânicas e défices da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos.

Tabela 1: 📄 Painel de doenças metabólicas rastreadas no âmbito da atividade do PNRN.

Aminoacidopatias	Fenilcetonúria / Hiperfenilalaninémias Tirosinemia tipo I Tirosinemia tipo II/III Leucínose (MSUD) Homocistinúria clássica Hipermetioninemia (déf. MATI/III)
Doenças do Ciclo da Ureia	Citrulinemia tipo I Acidúria Arginino-succínica Hiperargininemia
Acidúrias Orgânicas	Acidúria Propiónica (PA) Acidúria Metilmalónica (déf. em metilmalonil CoA mutase/cobalaminas) Acidúria Isovalérica (IVA) Acidúria 3-Hidroxi-3-Metilglutárica (3-HMG) Acidúria Glutárica tipo I (GA I) 3-Metilcrotonilglucínúria (3-MCC) Acidúria Malónica
Doenças da β -Oxidação Mitocondrial dos Ácidos Gordos	Défice da desidrogenase de 3-hidroxi-acil CoA de cadeia curta (SCHAD) Défice da desidrogenase dos ácidos gordos de cadeia média (MCAD) Défice da desidrogenase de 3-hidroxi-acil CoA de cadeia longa (LCHAD/TFP) Défice da desidrogenase dos ácidos gordos de cadeia muito longa (VLCAD) Défice da carnitina-palmitoil transferase I (CPT I) Défice da carnitina-palmitoil transferase II (CPT II / CACT) Défice múltiplo das desidrogenases dos ácidos gordos (MADD / Acidúria glutárica tipo II) Défice primário em carnitina (CUD)

_Resultados

Desde 1979, já foram rastreados 4 309 181 recém-nascidos para a fenilcetonúria e 1 755 043 para as restantes 23 doenças metabólicas (desde 2004), tendo sido identificados mais de

1000 recém-nascidos afetados, em que foi possível intervir, alterando positivamente o curso clínico da doença.

Tabela 2:  Resultados cumulativos do rastreio neonatal de doenças metabólicas em Portugal.

Doenças hereditárias do metabolismo	Positivos	Prevalência
Aminoacidopatias	509	1: 6.134
Fenilcetonúria (PKU)*	376	1: 11.461
Hiperfenilalaninemia/DHPR **	45	1: 37.964
Leucínose (MSUD) **	22	1: 79.775
Tirosinemia tipo I (Tyr I) **	6	1: 292.507
Tirosinemia tipo II/III (Tyr II/III) **	9	1: 195.005
Homocistinúria clássica (Hcy) **	7	1: 250.720
Deficiência em Metionina Adenosiltransferase II/III (MAT II/III) **	44	1: 39.887
Doenças do Ciclo da Ureia	29	1: 60.519
Citrulinemia tipo I (Cit I) **	12	1: 146.254
Acidúria Argininosuccínica (AAS) **	9	1: 195.005
Argininemia (Arg) **	8	1: 219.380
Acidúrias Orgânicas	127	1: 13.819
3-Metilcrotonilglicínúria (3-MCC) / Deficiência em Holocarboxilase Sintetase (Def. HCS) **	43	1: 40.815
Acidúria Isovalérica (IVA) **	9	1: 195.005
Acidúria Propiónica (PA) **	5	1: 351.009
Acidúria Metilmalónica tipo mut- (MMA mut-) / Défices do Metabolismo das Cobalaminas **	35	1: 50.144
Acidúria Glutárica tipo I (GA1) **	21	1: 83.573
Acidúria 3-Hidroxi-3-Metilglutárica (3-HMG) **	11	1: 159.549
Acidúria Malónica (MA) **	3	1: 585.014
Défices da β-Oxidação Mitocondrial dos Ácidos Gordos	344	1: 5.102
Deficiência da Desidrogenase dos Ácidos Gordos de Cadeia Média (MCAD) **	273	1: 6.429
Deficiência da Desidrogenase de 3- Hidroxi-Acil-CoA de Cadeia Longa (LCHAD) / Deficiência da Proteína Tifuncional Mitocondrial (TFP) **	18	1: 97.502
Deficiência Múltipla das Acil-CoA Desidrogenases dos Ácidos Gordos (MADD) **	13	1: 135.003
Deficiência primária em carnitina (CUD) **	15	1: 117.003
Deficiência da Desidrogenase dos Ácidos Gordos de Cadeia Muito Longa (VLCAD) **	14	1: 125.360
Deficiência da Carnitina-Palmitoil Transferase I (CPT I) **	4	1: 438.761
Deficiência da Carnitina-Palmitoil Transferase I (CPT II) / Deficiência da Carnitina-acilcarnitina translocase (CACT) **	5	1: 351.009
Deficiência da Desidrogenase de 3- Hidroxi-Acil-CoA de Cadeia Curta (SCHAD) **	2	1: 877.522
Total	1.009	1: 2.232

Recém-nascidos rastreados: *4309181; **1755043

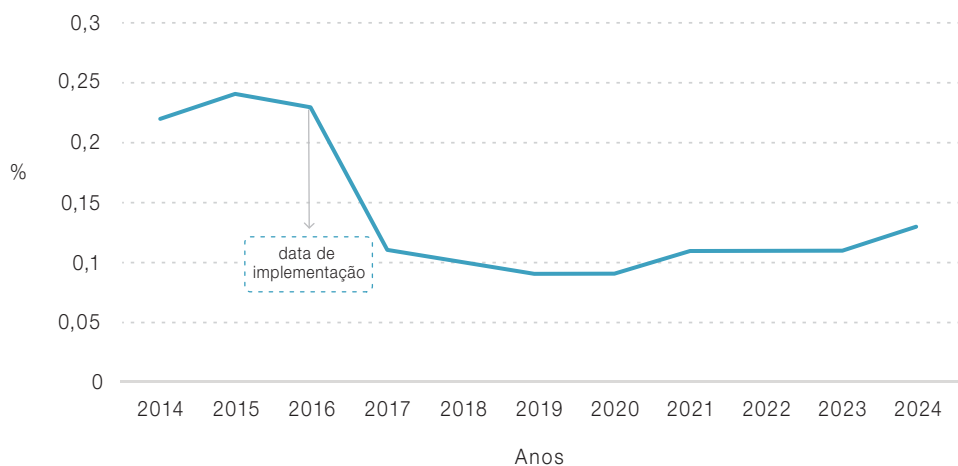
Das doenças metabólicas rastreadas, a que apresenta uma maior prevalência em Portugal é a deficiência na desidrogenase dos ácidos gordos de cadeia média (MCAD), com uma prevalência de 1:6429 recém-nascidos, uma das mais elevada reportada em todo o mundo (10). Isto deve-se ao facto da maioria dos doentes (mais de 95%) ser de etnia cigana, uma comunidade com um elevado grau de consanguinidade e prevalência de doenças genéticas (11). Globalmente, as doenças metabólicas rastreadas (considerando os dados do rastreio da fenilcetonúria desde 1979) apresentam uma prevalência ao nascimento de 1: 2232 recém-nascidos, tendo sido identificados mais de 1000 crianças afetadas onde foi possível instituir uma intervenção terapêutica precoce. Para além das doenças incluídas no painel de rastreio, foram igualmente detetados doentes com outras patologias, através de diagnósticos diferenciais das rastreadas, nomeadamente deficiência em holocarboxilase sintetase, deficiência em β -cetotiolase, síndrome de Brown-Vialetto-Van-Laere, deficiência total da proteína trifuncional mitocondrial e deficiência na translocase da carnitina/acilcarnitina. Durante este período foram igualmente identificadas situações de doenças/condições maternas que tiveram efeito no resultado do rastreio neonatal dos seus filhos. Foram identificadas, através de alterações no rastreio neonatal dos filhos, mães com MCAD (n=1), com acidúria glutárica tipo I (n=5), com deficiência primária em carnitina (n=9), 3-metilcrotonilglicinúria (n=18) e deficiências maternas em vitamina B₁₂ (n=35). Embora a deteção de doenças/condições maternas não seja um dos objetivos primários do rastreio neonatal, a verdade é que ela aporta vantagens em saúde, não apenas para as mães como também, em algumas situações, para os recém-nascidos. O melhor exemplo são as deficiências maternas em vitamina B₁₂, muitas vezes associadas a desequilíbrios alimentares, e que podem comprometer de forma significativa o desenvolvimento dos recém-nascidos, sendo importante uma deteção e correção precoces nos recém-nascidos (12).

Os Programas de Rastreio Neonatal devem garantir o máximo de ganhos em saúde para a população a que se dirigem. De forma a atingir este objetivo é necessário, do

ponto de vista laboratorial, que estejam implementados sistemas de melhoria contínua e de controlo de indicadores relevantes, como é o caso da sensibilidade, especificidade, falsos positivos ou falsos negativos. Após, em 2004, se ter procedido ao maior alargamento da sua história, no que a doenças rastreadas diz respeito, verificou-se que para algumas das patologias então rastreadas a sensibilidade e/ou especificidade eram melhoráveis, nomeadamente no caso da tirosinemia tipo I, acidúria isovalérica, homocistinúria clássica, acidúria propiónica, acidúria metilmalónica e défices do metabolismo das cobalaminas. De forma a colmatar essas situações, a abordagem definida passou por implementar provas de segundo nível (testes mais específicos, realizados sobre a amostra inicial de rastreio, quando se detetam alterações no rastreio inicial), nomeadamente o doseamento da succinilacetona, homocisteína total, ácido metilmalónico, deteção da propionilglicina e separação dos isómeros de C5-carnitina, e a sua incorporação nos fluxogramas de deteção das patologias (13,14). Esta estratégia traduziu-se na melhoria dos indicadores do PNRN para o rastreio de doenças metabólicas, nomeadamente no valor preditivo positivo e na taxa de falsos positivos. Efetuando-se a comparação dos indicadores do ano de 2016 com o ano de 2017 (ano em que foram adotadas as provas de segundo nível, com exceção do doseamento da succinilacetona, que o havia sido em 2006), o valor preditivo positivo passou de 21% para 31% (um aumento de 48%) e a taxa de falsos positivos diminuiu de 0,17% para 0,10% (uma diminuição de 41%) (gráfico 1). Estas melhorias não refletem o impacto do doseamento da succinilacetona, o que faria com que a melhoria nos indicadores tivesse uma magnitude ainda mais expressiva. No entanto, as vantagens da adoção destas provas de segundo nível não se esgotam na redução dos falsos positivos, manifestando-se também num aumento de sensibilidade na identificação das patologias. Neste contexto, é relevante salientar que foi a implementação destas provas que possibilitou a identificação de deficiências de vitamina B₁₂ que resultam em fenótipo bioquímico detetável nos recém-nascidos, cuja intervenção precoce é reconhecidamente vantajosa e importante para o normal desenvolvimento do indivíduo.

De forma a garantir a qualidade analítica, o laboratório tem implementado um sistema de qualidade com procedimentos de controlo interno, participando também em vários programas de avaliação externa de qualidade, no âmbito do rastreio de doenças metabólicas, nomeadamente do CDC – *Center for Disease Control and Prevention*, UKNEQAS - *external quality assessment laboratories* e SIMMESN - *Italian Society for the Study of Inherited Metabolic Diseases and Neonatal Screening*, sempre com ótimos resultados.

Gráfico 1: ↘ Variação da taxa de falsos positivos no rastreio de doenças metabólicas, antes e depois da implementação das provas de segundo nível.



_Discussão e conclusão

Ao longo de toda a sua existência, o PNRN sempre se caracterizou por uma dinâmica contínua em busca de aumentar o impacto positivo que aporta à população portuguesa. Esta dinâmica inclui, não apenas a procura permanente de melhores e mais eficazes abordagens ao rastreio das patologias, mas também a realização de estudos piloto para avaliar a possibilidade de rastrear mais doenças, a melhoria da informação prestada aos pais e profissionais de saúde e a otimização da comunicação/articulação entre todos os envolvidos no processo de rastreio neonatal, desde a realização da colheita até à disponibilização do melhor tratamento e acompanhamento possíveis.

Pese embora algumas dúvidas iniciais, o rastreio neonatal alargado de doenças metabólicas revelou-se extremamente vantajoso e permitiu a intervenção clínica precoce em centenas de recém-nascidos em Portugal, com uma influência muito positiva no seu curso clínico e uma diminuição significativa das morbidade e mortalidade associadas às patologias rastreadas. A incorporação deste rastreio num programa solidamente implementado e integrado nas políticas de saúde pública do país, traduz-se em diagnósticos atempados, intervenções clínicas precoces e de acordo com as melhores práticas internacionais, culminando num melhor prognóstico e qualidade de vida dos recém-nascidos e das suas famílias.

Referências bibliográficas:

- (1) Ferreira CR, Rahman S, Keller M, et al ; ICIMD Advisory Group. An international classification of inherited metabolic disorders (ICIMD). *J Inherit Metab Dis.* 2021 Jan;44(1):164-17. <https://doi.org/10.1002/jimd.12348>
- (2) Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics.* 1963 sep;32:338-43. <https://doi.org/10.1542/peds.32.3.338>
- (3) Castiñeras DE, Couce ML, Marín JL, et al. Newborn screening for metabolic disorders in Spain and worldwide. *An Pediatr (Engl Ed).* 2019 Aug;91(2):128e1-128e14. <https://doi.org/10.1016/j.anpede.2019.05.005>
- (4) Millington DS, Kodo N, Norwood DL, et al. 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(3):321-4. <https://doi.org/10.1007/BF01799385>
- (5) Chace DH, Millington DS, Terada, et al. Rapid diagnosis of phenylketonuria by quantitative analysis for phenylalanine and tyrosine in neonatal blood spots by tandem mass spectrometry. *Clin Chem.* 1993 Jan;39(1):66-71. <https://doi.org/10.1093/clinchem/39.1.66>
- (6) Vilarinho L, Rocha H, Sousa C, et al. Programa Nacional de Diagnóstico Precoce: 35 anos de atividade (1979-2014). *Boletim Epidemiológico Observações.* 2015;14:3-6. <http://hdl.handle.net/10400.18/3222>
- (7) Rocha H, Marcão A, Sousa C, et al. Programa Português de Cribado Neonatal. *Rev Esp Salud Pública.* 2021;95:e1-7. <https://ojs.sanidad.gob.es/index.php/resp/article/view/484>
- (8) Vilarinho L, Rocha H, Marcão A, et al. Diagnóstico precoce: resultados preliminares do rastreio metabólico alargado. *Acta Pediatr Port.* 2006;37(5):6. <https://ojs.pjp.spp.pt/article/view/4805?articlesBySameAuthorPage=1>
- (9) Vilarinho L, Rocha H, Sousa C, et al. Four years of expanded newborn screening in Portugal with tandem mass spectrometry. *J Inherit Metab Dis.* 2010 Dec;33(Suppl 3):S133-8. Epub 2010 Feb 23. <https://doi.org/10.1007/s10545-010-9048-z>
- (10) Rocha H, Castiñeras D, Delgado C, et al. Birth Prevalence of Fatty Acid β -Oxidation Disorders in Iberia. *JIMD Rep.* 2014;16:89-94. Epub 2014 Jul 11. https://doi.org/10.1007/8904_2014_324
- (11) Ventura FV, Leandro P, Luz A, Rivera IA, et al. Retrospective study of the medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in Portugal. *Clin Genet.* 2014 Jun;85(6):555-61. Epub 2013 Jul 28. <https://doi.org/10.1111/cge.12227>
- (12) Lipari Pinto P, Florindo C, Janeiro P, et al. Acquired Vitamin B12 Deficiency in Newborns: Positive Impact on Newborn Health through Early Detection. *Nutrients.* 2022 Oct 20;14(20):4397. <https://doi.org/10.3390/nu14204397>
- (13) Rocha H. ¿Qué hay de nuevo en el cribado neonatal de enfermedades metabólicas? *Acta Pediatr Esp.* 2015;73 (suppl):S12-3. https://www.actapediatrica.com/index.php/suplementos/download/1733_7902c06bd928c7f07ba75232a4ff7f5b
- (14) Gonçalves MM, Marcão A, Sousa C, et al. Portuguese Neonatal Screening Program: A Cohort Study of 18 Years Using MS/MS. *Int J Neonatal Screen.* 2024 Mar 20;10(1):25. <https://doi.org/10.3390/ijns10010025>