

**IV Congresso de AECNE
Barcelona, 28-29 Noviembre 2014**

**Experiencia del Programa de Cribado neonatal de
Portugal en la detección de la Fibrosis Quística
mediante la medición de TIR/PAP**

Ana Marcão

**Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética
Departamento de Genética Humana
Instituto Nacional de Saúde Dr Ricardo Jorge - Porto**

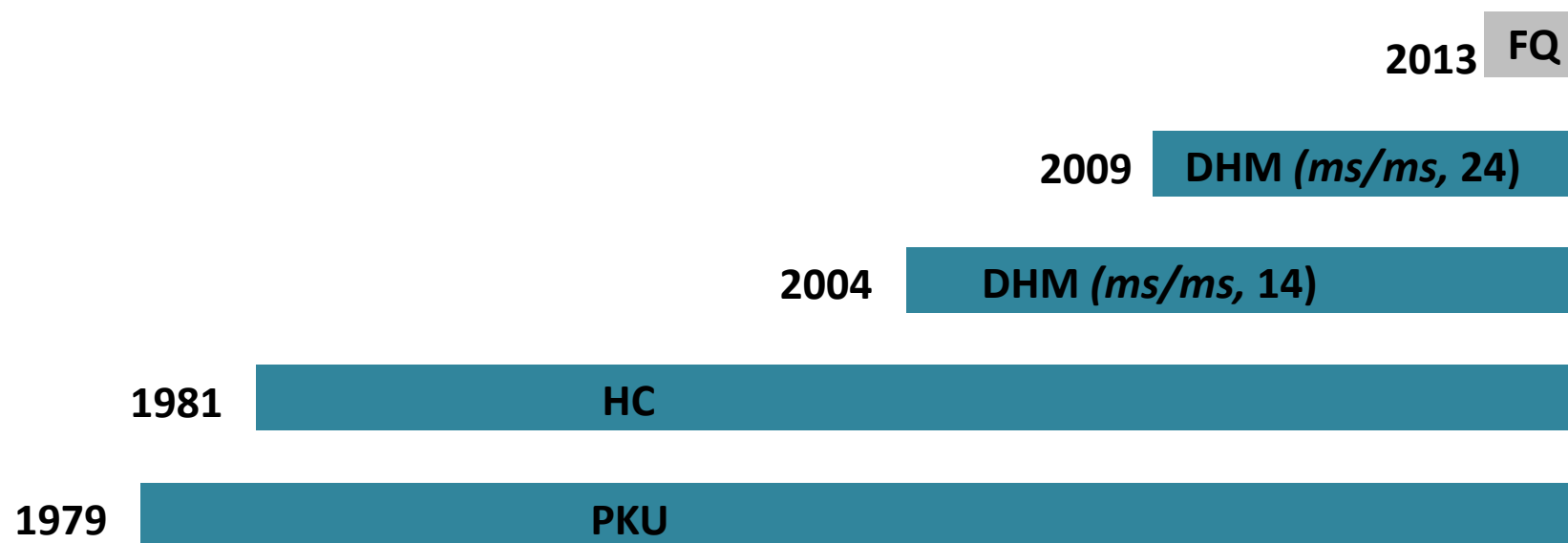
Rastreio Neonatal em Portugal

- Hipotiroidismo Congénito (HC)
- *ms/ms* (24 DHM, PKU incluído)
- Fibrose Quística (FQ, estudo piloto)


2014



Jacinto de Magalhães (1938-1987)



Rastreio Neonatal em Portugal

- Assegurado pelo Programa Nacional para o Diagnóstico Precoce 
- Não obrigatório, com consentimento implícito.
- Taxa de cobertura: 99.8%
- Colheita da amostra entre o 3º e 6º dia de vida
- 1 laboratório nacional (400 amostras/dia)
- Idade média de início do tratamento: 10.1 dias
- Comunicação de resultados:
 - Resultados normais– www.diagnosticoprecoce.org

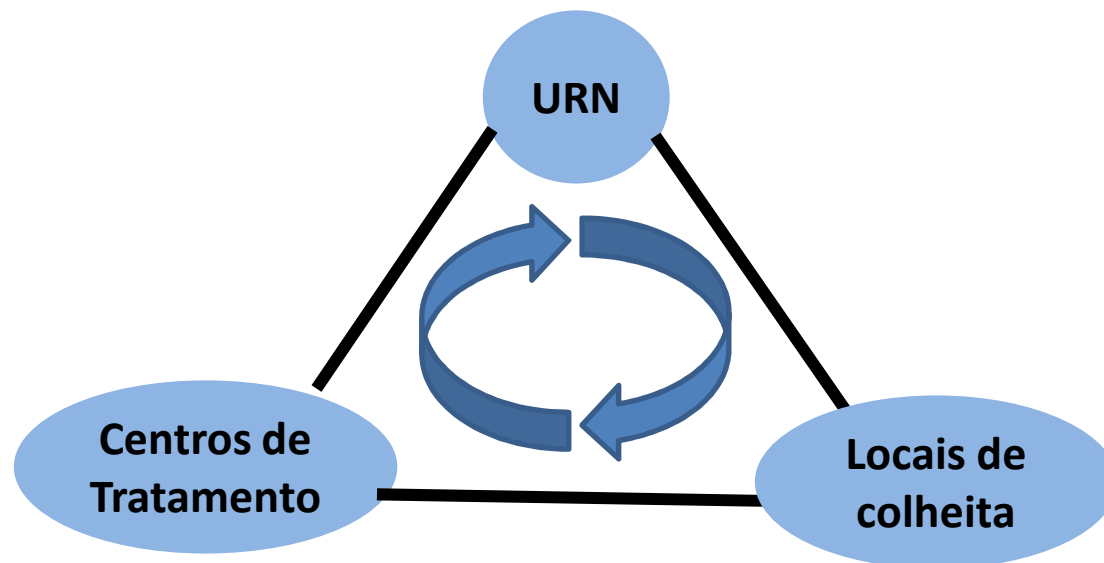
Rastreio Neonatal em Portugal

Programa Nacional para o Diagnóstico Precoce (PNDP)

Definido pelo Ministério da Saúde (Despacho n.º 752/2010)

• Programa integrado, sediado no INSA

1. **Componente Laboratorial (Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética)**
2. **Componente Clínica (Centros de tratamento especializados, distribuídos pelo continente (5) e ilhas (3))**



Estudo Piloto para o Rastreio Neonatal da FQ

- Integrado no Programa Nacional para o Diagnóstico Precoce (PNDP)
- Efetuado em todos os RN nascidos em Portugal
- Outubro de 2013 a outubro de 2014 (80.000 RN)

Participação no Estudo Piloto para a FQ é facultativo

Fibrose Quística

Final séc. IXX: RN com fezes abundantes, fétidas e gordurosas ou/e com suor salgado (morte precoce)

1935- Fibrose Quística (Fanconi)

1953- Teste do suor ($\text{Cl}^- > 60.0 \text{ mEq/L}$, Paul di Saint Agnese)

1979- IRT aumentado nos RN com FQ (Crossley)
IRT-Tripsinogénio imunoreativo

1981- Rastreamento Neonatal (Nova Zelândia...Austrália, Europa, USA)

Fibrose Quística

1989- Identificação do **gene CFTR** (7q31.2; 180Kb; 27 exões) e da **proteína CFTR** (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*, 1480 aa)



2005- PAP aumentado nos RN com FQ (Sarles)
PAP-Proteína associada à pancreatite

Rastreo Neonatal

- IRT
- DNA
- PAP

Proteína CFTR



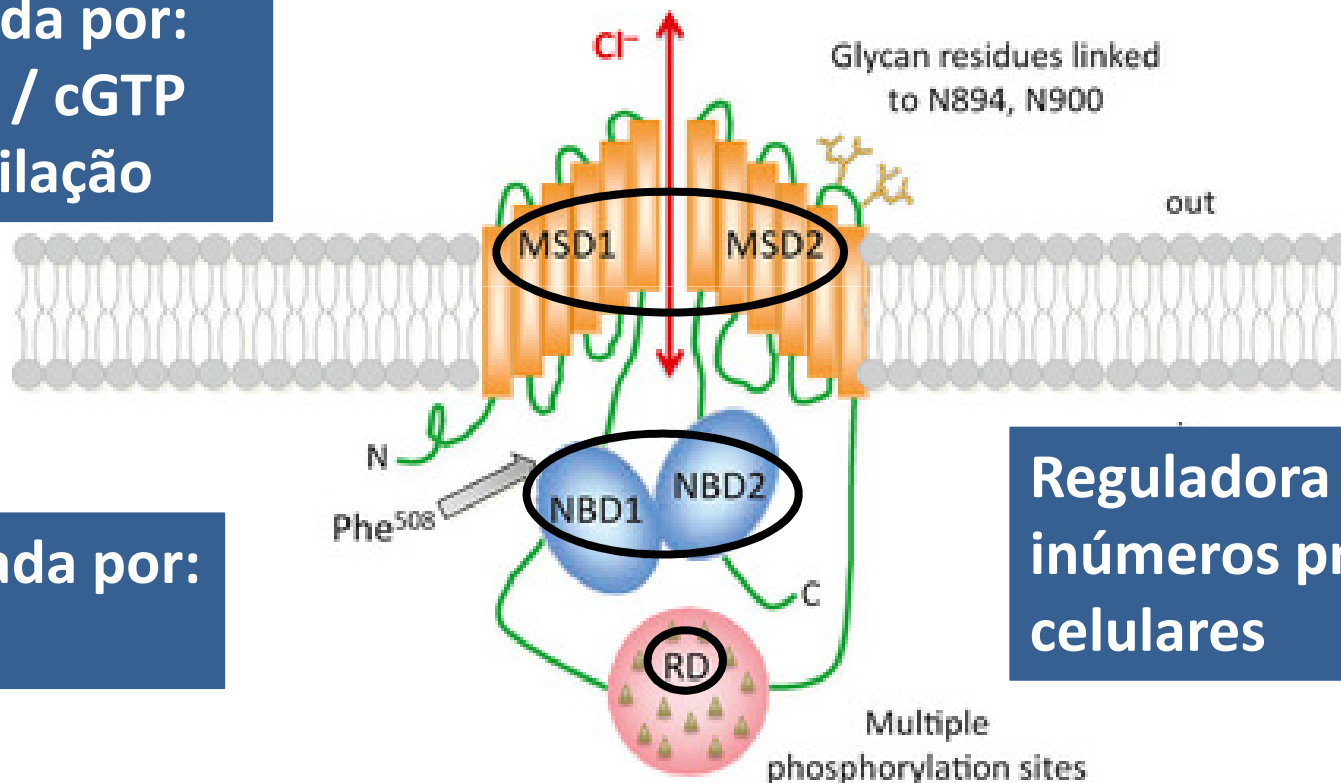
Canal iónico responsável pelo transporte de Cl^- , com funções reguladoras no transporte de Na^+ e H_2O

Regulada por:

- cAMP / cGTP
- fosforilação

Ativada por:

- ATP



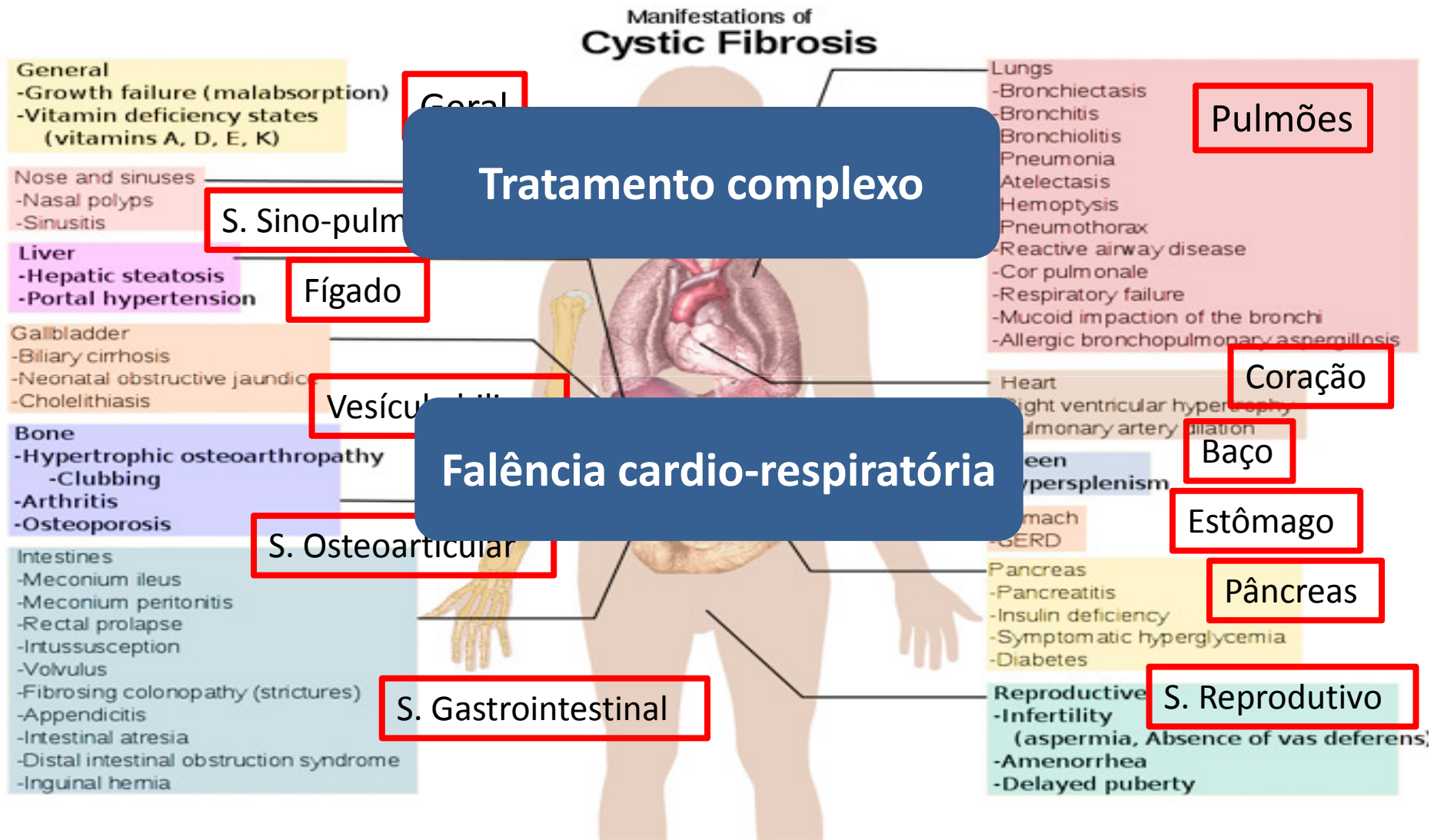
Reguladora de inúmeros processos celulares

Glicoproteína integral da membrana apical das células epiteliais (superfamília dos transportadores tipo ATP-binding cassette).

Fibrose Quística

- **Doença genética hereditária letal mais frequente na população caucasiana (prevalência média ao nascimento ~1: 3.000 RN).**
- **Transmissão autossômica recessiva**
- **Expressão clínica heterogénea, com evolução progressiva e irreversível**
- **Manifestações clínicas multissistémicas, com deterioração estrutural e funcional de vários órgãos e sistemas**

Fibrose Quística



Genética da Fibrose Quística

- Elevada variabilidade genética (> 2000 mutações)
- Fraca correlação genótipo-fenótipo
 - ✓ Não existente para sintomas pulmonares
- Mutação $\Delta F508$: 70% alelos FQ na população caucasiana
 - Norte da Europa >90%
 - Zona mediterrânica <50%
- Outras mutações individualmente < 5%

↑ variabilidade genética de nordeste para sudoeste



Rastreo Neonatal da FQ

- Vantagem evidente para o RN

Novas terapias

- Natureza e prevalência da doença

Doença genética letal mais frequente na população caucasiana

- Boa relação custo-benefício

Que estratégia?

Rastreo Neonatal da FQ – Que estratégia?

- IRT / IRT (↑ sensibilidade / ↓ especificidade)

1º estudo piloto em Portugal (1990)

- IRT + DNA (consentimento informado, portadores e variantes genéticas sem significado clínico)
- IRT + PAP (↑ especificidade / ↑ sensibilidade)
- IRT + PAP + DNA (↑↑ especificidade / ↑ sensibilidade)

Rastreio Neonatal da FQ em Portugal

IRT+PAP/IRT

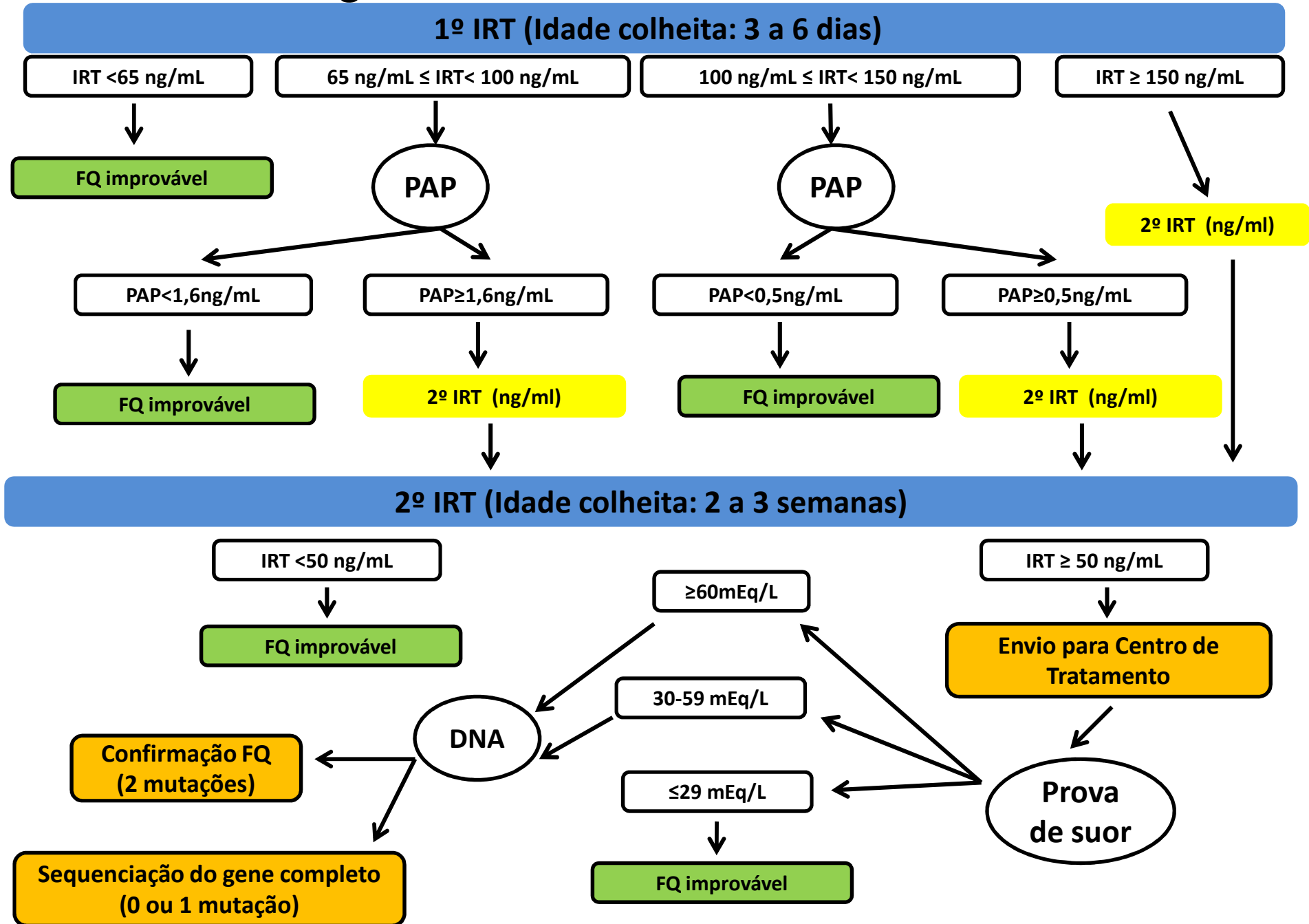
- Boa sensibilidade e especificidade
- Evita consentimento informado ao rastreio
- Evita identificação de portadores e de variantes genéticas de significado clínico desconhecido

DNA

**Consentimento
informado**

- Esclarecer casos com “Teste de suor” duvidoso
- Conhecer melhor a epidemiologia genética da FQ em Portugal

Algoritmo do Rastreio Neonatal da FQ



Rastreio Neonatal da FQ

Quantificação do IRT

AutoDELFLIA® Neonatal IRT kit - PerkinElmer

Quantificação do PAP

Kit MucoPAP-F - Dynabio

(adaptação para sistema DELFLIA® da Perkin Elmer)

Estudo Molecular

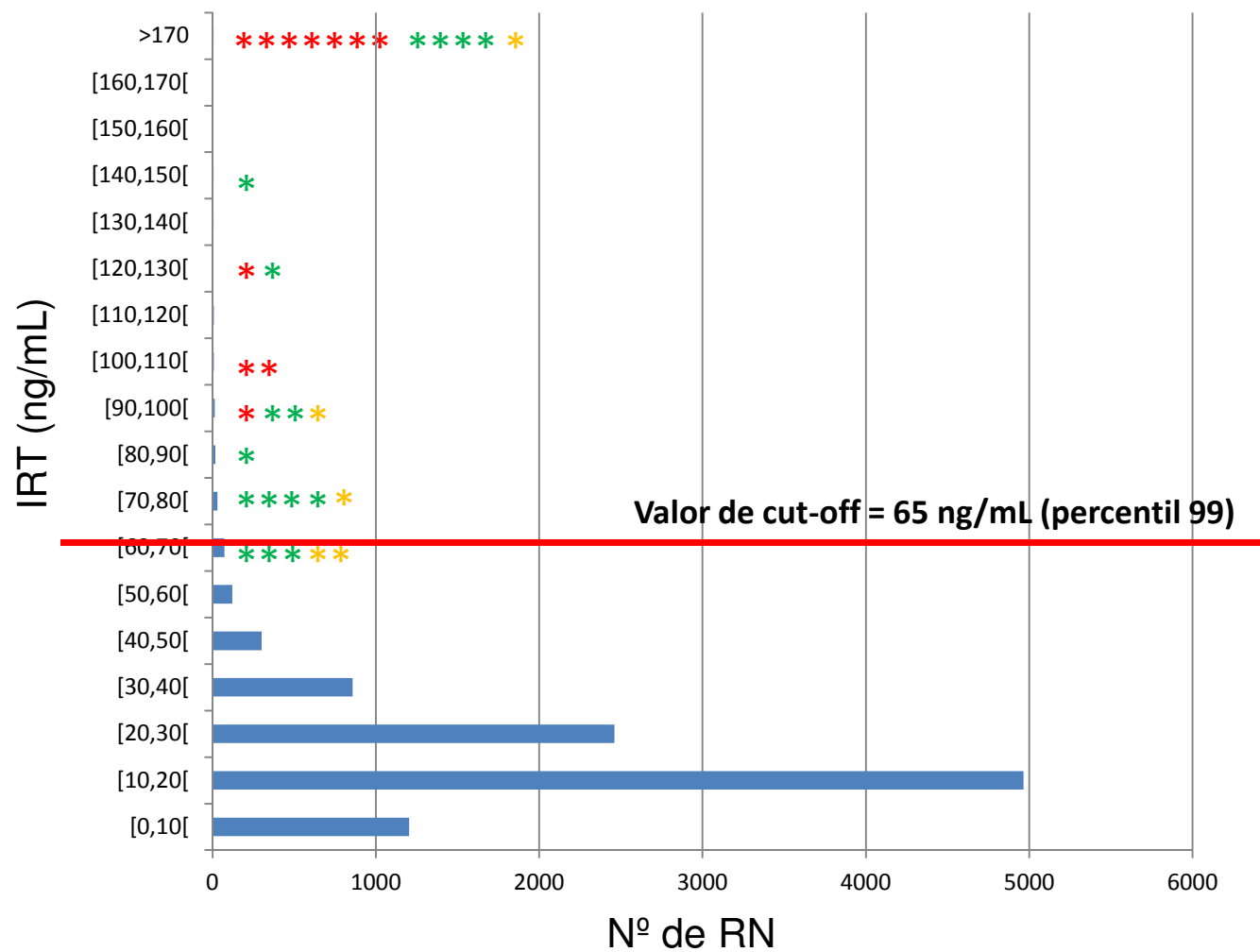
Elucigene CF-EU2v1 (50 mutações)

Rastreo Neonatal da FQ

Elucigene CF-EU2v1 kit detected mutations

CFTRdele2,3	I507del	2789+5G>A
E60X	F508del	Q890X
P67L	1677delTA	3120+1G>A
G85E	V520F	3272-26A>G
394delTT	1717-1G>A	R1066C
444delA	G542X	Y1092X(C>A)
R117C	S549R(T>G)	M1101K
R117H	S549N	D1152H
Y122X	G551D	R1158X
621+1G>T	R553X	R1162X
711+1G>T	R560T	3659delC
L206W	1811+1.6kbA>G	3849+10kbC>T
1078delT	1898+1G>A	S1251N
R334W	2143delT	3905insT
R347P	2184delA	W1282X
R347H	2347delG	N1303K
A455E	W846X	

Valores do 1º IRT (10,000 RN)

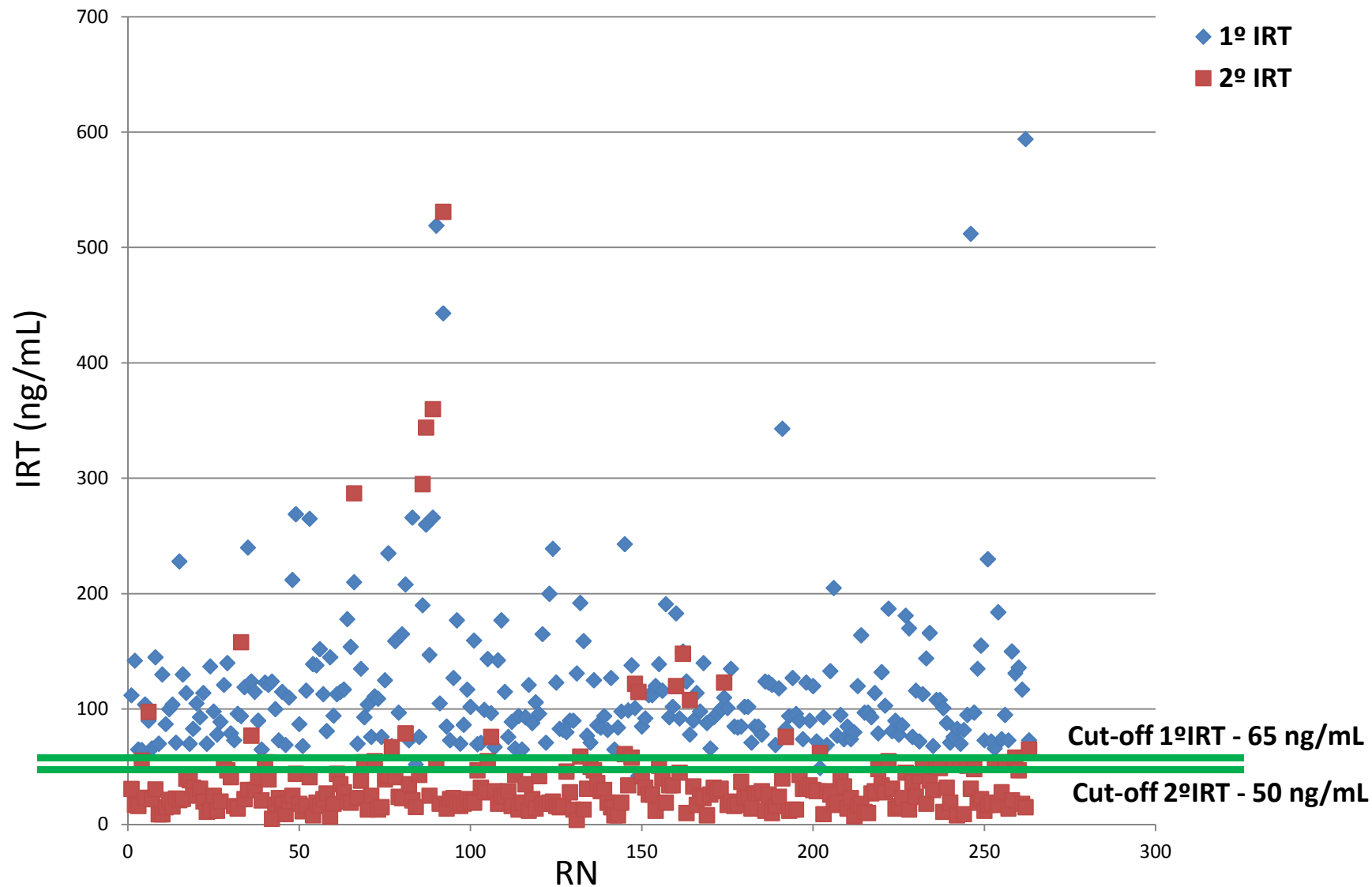


*Doentes

*Falsos Positivos

*Em estudo

Comparação dos valores de IRT (1ª amostra/ 2ª amostra)



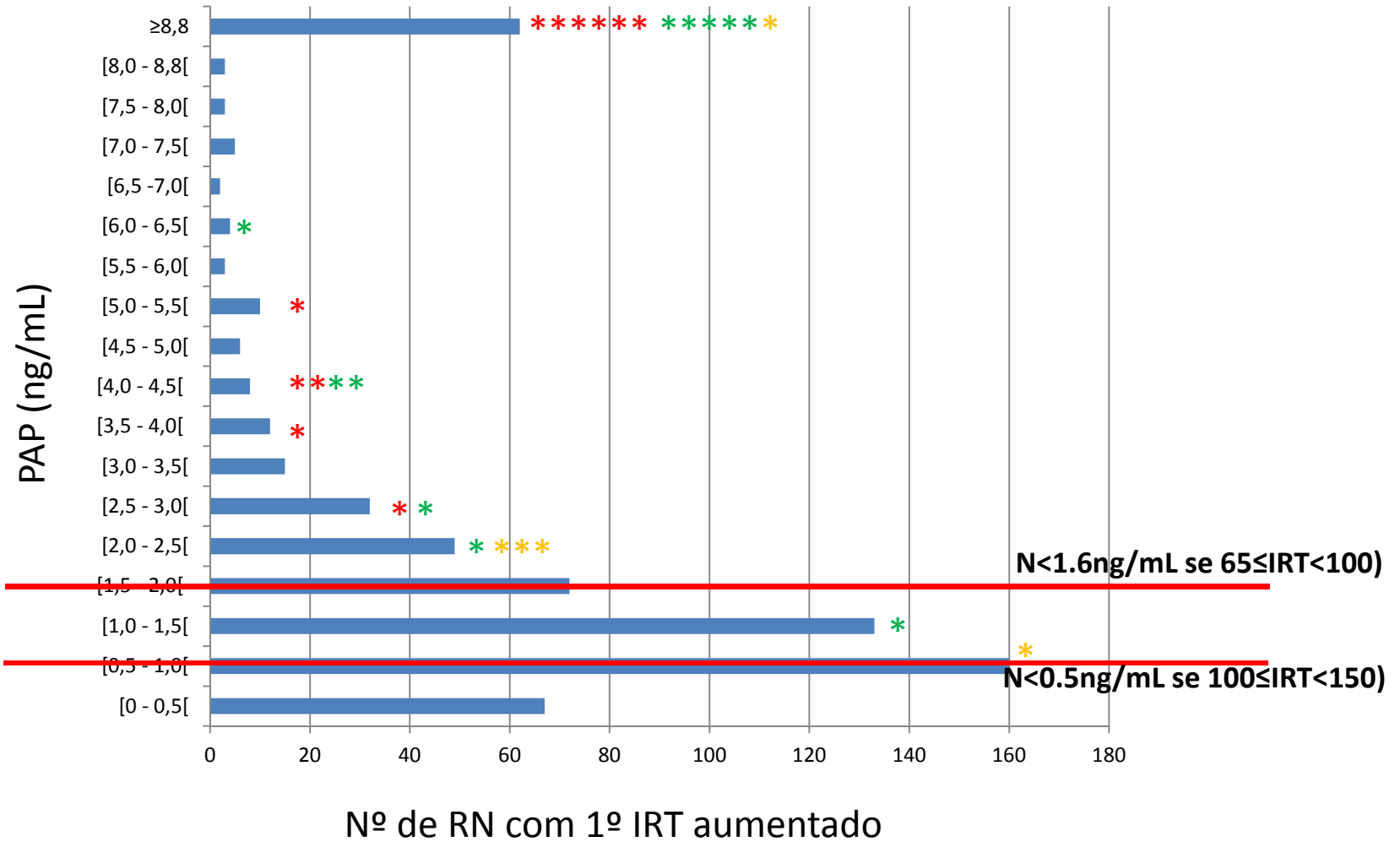
Idade média de colheita da amostra: 1º IRT – 6d; 2º IRT – 22d

Variabilidade do IRT na amostra de rastreio

1º IRT ng/mL	PAP (ng/mL)
103/44/43	n.d.
83/38/38	n.d.
112/116/46/101/137/53	1,6
97/24/27	0,54
165/86/39/55/45/58/59	n.d.
66/81/32/228/51	0,41
82/19/28	n.d.
108/72/37/38/213	0,35
270/359/40/43/115	0,52
80/141/164/91	0,71
135/139/128/28/41/110/13	n.d.
135/139/128/28/41/110/13	n.d.
92/91/55/108/49	n.d.
92/91/55/108/49	n.d.
80/111/39/34/26/42	0,55
112/135/52	1,2
89/54/17/30/	n.d.
99/36/26/56/28	n.d.
120/52/31	n.d.
85/52/38/	1,1
149/32/28/179	1,5
433/55/38/61/51	n.d.
68/15/101/12	n.d.
80/104/14	0,42
84/10	1,3
96/39/77/40	n.d.
100/32/20/51/59	n.d.
139/104/43/36/90	0,4
80/81/31	0,5
83/54/91/24/124	2,0
67/72/996/890	n.d.
65/98/89/39	n.d.
105/64/31	0,47
66/37/19	1,4

1º IRT ng/mL	PAP (ng/mL)
142/25	n.d.
63/28	n.d.
88/33/57/22	2,0
148/41/168	0,42
77/17/14/66/35	0,99
130/137/43	n.d.
84/39/113/61	0,52
100/30/72/	0,47
110/98/19/22	0,38
87/29/15	0,53
66/24/62/24	n.d.
116/37/37/36	n.d.
101/55/46/63	1,4
330/212/116/57/36	1,7
84/18/18	0,23
84/93/12	0,25
129/137	3,2
155/172/161	n.d.
163/63/73	0,64
152/55	0,89
81/42/36/55	5,3
67/56/127/159/56	2,8
163/103/28/31/59	0,4
146/60/11/92	1,2
99/40/28/27	0,96
76/54/117/42/81	1,22
75/61/70/76/20/23	0,95
85/24/28/50/71/26/73	1,27
130/74/58/	0,63
92/94/452/302/138	0,56
91/155/52/25	1,1
103/44/43	n.d.

Valores de PAP dos RN com 1º IRT aumentado (N=628)



* Doentes * Falsos Positivos * Em estudo

Rastreio Neonatal da FQ

RN rastreados	80 000
Doentes confirmados	11
Prevalência ao nascimento	1: 7 273

IRT > 65 ng/mL	665 (0,83%)
PNA (IRT+PAP ↑)	277 (0,35%)
2º IRT < 50 ng/mL	250 ((0,31% FP)

Max prevalência = 1:5 000 se os 5 casos em avaliação forem +

RN referenciados para teste do suor	27
Doentes	11
Em avaliação	5
Falsos Positivos	1 1 (0,014%)

Max FP ref para teste suor = 0,2% se os 5 casos em avaliação forem negativos

Rastreo Neonatal da FQ

Doentes (IC)	1º IRT (N<65ng/mL)	PAP (N<0,5ng/mL)*	2º IRT (N<50ng/mL)	Genótipo
D1 (5d, 18d)	94	5,4	158	F508del/F508del
D2 (21d, --)	129	3,9	n.d.	F508del/F508del
D3 (6d, 14d)	210	>8,8	287	F508del/?
D4 (23d, 28d)	190	>8,8	195	F508del/F508del
D5 (3d, 13d)	260	4,3	344	F508del/F508del
D6 (4d, 27d)	266	>8,8	360	F508del/F508del
D7 (5d, 15d)	443	>8,8	480	F508del/F508del
D8 (4d, --)	202	2,7	n.d.	F508del/N1303K
D9 (2d, 5d)	101	>8,8	85	F508del/F508del
D10 (4d, 30d)	110	4,6	123	F508del/F508del
D11 (3d, 16d)	414	>8,8	265	F508del/F508del

* Se IRT<100ng/mL, PAP<1,6 ng/mL

Rastreo Neonatal da FQ

Falsos Positivos	1º IRT (N<65ng/mL)	PAP (N<0,5ng/mL)*	2º IRT (N<50ng/mL)
1 (4d, 24d)	65	2.8	56
2 (4d, 18d)	68	2.3	67
3 (8d, 21d)	243	>8.8	61
4 (6d, 27d)	180	>8.8	61
5 (6d, 16d)	150	>8.8	148
6 (9d, 26d)	78	6.7	108
7 (4d, 18d)	77	4.3	65
8 (4d, 22d)	83	4.1	76
9 (4d, 19d)	187	>8.8	54
10 (5d, 16d)	124	1.3	89
11 (6d, 23d)	95	>8.8	54

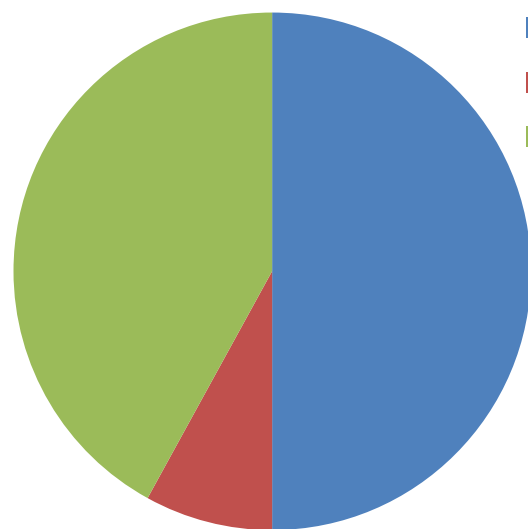
* Se IRT<100ng/mL, PAP: N<1,6 ng/mL

Rastreio Neonatal da FQ

Em confirmação	1º IRT (N<65ng/mL)	PAP (N<1,6ng/mL)*	2º IRT (N<50ng/mL)
1 (5d, 24d)	70	2.3	52
2 (6d, 18d)	95	2.1	51
3 (3d, 10d)	594	0.8	15 (íleo meconial)
4 (3d, 37d)	67	2.5	52
5 (20d, 43d)	73	>8.8	65

* Se $100 \leq \text{IRT} < 150 \text{ng/mL}$, PAP: $N < 0,5 \text{ng/mL}$

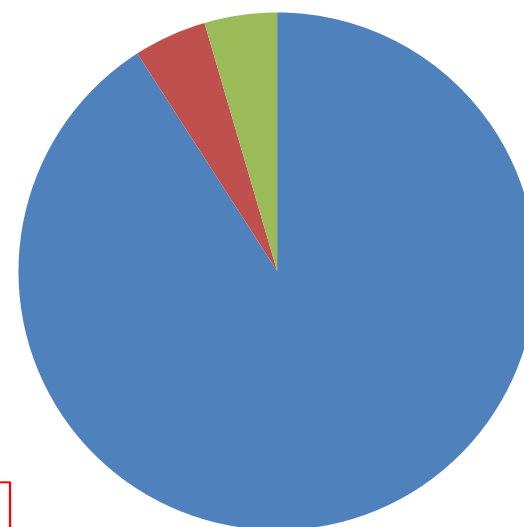
Genética da Fibrose Quística em Portugal



- $\Delta F508$ - 50%
- [5 mutações] - 8%
- [N mutações] - 42%

Antes do estudo piloto

?



- $\Delta F508$ - 91%
- N1303K - 4,5%
- ? - 4,5%

Estudo piloto

Genética da Fibrose Quística em Portugal

Porquê a diferença?

Pequeno nº de RN rastreados?

RN com outras mutações não estão a ser identificados no rastreio neonatal?

Integração do Rastreio Neonatal da FQ no painel de doenças rastreadas no PNDP em 2015



Estudo Piloto para o rastreio neonatal da Fibrose Quística

Laura Vilarinho
Ana Marcão
Lurdes Lopes

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