



**ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA**  
**CURSO DE MEDICINA**

**PEDRO HENRIQUE MASSI**

**REVISÃO SISTEMÁTICA: COMPARAÇÃO ENTRE IRT/IRT E IRT/PAP/IRT NA  
TRIAGEM NEONATAL PARA FIBROSE CÍSTICA**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**SALVADOR**

**2024**

**PEDRO HENRIQUE MASSI**

**REVISÃO SISTEMÁTICA: COMPARAÇÃO ENTRE IRT/IRT E IRT/PAP/IRT NA  
TRIAGEM NEONATAL PARA FIBROSE CÍSTICA**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado ao Curso de Graduação em Medicina da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, para aprovação parcial do 4º ano do curso de Medicina.

Orientadora: Professora Doutora Carolina de Godoy Almeida.

Coorientador: Professor Doutor Ney Cristian Amaral Boa-Sorte.

**SALVADOR**

**2024**

Dedico este trabalho ao Dr. Odair Stopiglia, que me deu uma segunda chance para viver e exercer a Medicina.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu pai, à minha madrasta e à minha companheira, que acreditam e apoiam meu sonho.

À minha orientadora profa. Dr<sup>a</sup> Carolina de Godoy Almeida e ao meu coorientador prof. Dr. Ney Christian Amaral Boa-Sorte que me assistiram ao longo da confecção deste estudo.

À EBMSP que possibilitou a realização deste trabalho.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A fibrose cística (FC) é uma doença rara autossômica recessiva causada por variantes no gene CFTR com impacto nos pulmões, no pâncreas e nos intestinos. A fim de minimizar os desfechos clínicos graves, a FC pode ser diagnosticada pela triagem neonatal (TN) por diversas estratégias, como o IRT/IRT. Embora o teste genético melhore a performance, apresenta barreiras legais, éticas e étnicas que envolvem o acesso e disponibilidade de tecnologias. Uma alternativa estudada é a mensuração da proteína associada à pancreatite (PAP) na TNFC, como o protocolo IRT/PAP/IRT, que pode melhorar a sensibilidade e o valor preditivo positivo (VPP). **OBJETIVOS:** Comparar a performance entre o protocolo IRT/IRT e o IRT/PAP/IRT para diagnóstico de FC na TN em recém-nascidos (RN). **MÉTODOS:** Revisão sistemática buscou estudos que comparassem simultaneamente o protocolo IRT/IRT e IRT/PAP/IRT nas bases de dados eletrônicas. Após exclusão de 207 artigos, restaram 2 estudos observacionais. **RESULTADOS:** Em ambos os estudos se observou, para o protocolo IRT/PAP/IRT uma melhora do VPP, sem perdas da sensibilidade nem da especificidade quando comparado com o IRT/IRT. No estudo de Sadik *et al.* (2019), esse aumento foi de 145,7%, enquanto, no de Pecellín *et al.* (2022), de 79,1%. A sensibilidade (IC95%) obtida por Sadik *et al.* (2019) foi de 100% (96,4-100) para o IRT/IRT e de 92,9% (75,7-100) para o IRT/PAP/IRT. Por sua vez, Pecellín *et al.* (2022) registraram a mesma sensibilidade para o protocolo IRT/IRT e IRT/PAP/IRT de 88,9% (85,4-92,3). **CONCLUSÃO:** A realização de novos estudos pilotos, como a avaliação do protocolo IRT/PAP/IRT em regiões com alta frequência alélica do CFTR e com recursos limitados em saúde pública, como o Brasil, é de muita valia como ferramenta de aprimoramento dos programas de triagem. Dessa forma, o Ministério da Saúde pode reavaliar a estratégia IRT/IRT e direcionar novas estratégias para o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN).

**Palavras-chave:** fibrose cística; triagem neonatal; tripsinogênio imunorreativo; proteína associada à pancreatite.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Cystic fibrosis (CF) is a rare autosomal recessive disease caused by variants in the CFTR gene with impacts on the lungs, pancreas, and intestines. In order to prevent severe clinical outcomes, CF can be diagnosed through newborn screening (NBS) using various strategies, such as IRT/IRT. Although genetic testing improves performance, it faces legal, ethical, and ethnic barriers involving access and availability of technologies. An alternative studied is the measurement of pancreatitis-associated protein (PAP) in CFNBS, like the IRT/PAP/IRT protocol, which may improve sensitivity and positive predictive value (PPV). **OBJECTIVES:** To compare the performance between the IRT/IRT and the IRT/PAP/IRT protocols for CF diagnosis in NBS. **METHODS:** A systematic review sought studies that simultaneously compared the IRT/IRT and the IRT/PAP/IRT strategies in electronic databases. After excluding 207 articles, 2 observational studies remained. **RESULTS:** In both studies, the IRT/PAP/IRT protocol showed an improvement in PPV without loss of sensitivity or specificity compared to IRT/IRT. In the study by Sadik *et al.* (2019), this increase was 145,7%, while in Pecellín *et al.* (2022), it was 79,1%. The sensitivity (95%CI) obtained by Sadik *et al.* (2019) was 100% (96,4) for IRT/IRT and 92,9% (75,7-100) for IRT/PAP/IRT. Meanwhile, Pecellín *et al.* (2022) recorded the same sensitivity for both IRT/IRT and IRT/PAP/IRT protocols of 88,9% (85,4-92,3). **CONCLUSION:** Conducting new pilot studies, such as evaluating the IRT/PAP/IRT protocol in regions with high allelic frequency of CFTR and limited resources in public health, similar to Brazil, is a highly valuable tool for improving screening programs. Therefore, the Ministry of Health can reassess the current IRT/IRT protocol and direct new strategies for the national newborn screening program.

**Keywords:** cystic fibrosis; newborn screening; immunoreactive trypsinogen; pancreatitis associated protein.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>7</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>9</b>
<b>3. RACIONAL TEÓRICO</b>	<b>10</b>
<b>4. MÉTODOS</b>	<b>22</b>
4.1 Desenho de estudo	22
4.2 Critérios de Elegibilidade	22
4.3 Estratégia de Busca	22
4.4 Seleção de estudos	24
4.5 Extração de dados	24
4.6 Análise de risco de viés	24
4.7 Síntese de dados	24
4.8 Protocolo PROSPERO	25
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>26</b>
5.1 Busca e seleção de artigos	26
5.2 Características dos estudos incluídos	29
5.3 Avaliação do risco de viés dos estudos incluídos	32
5.4 Síntese dos resultados	33
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>36</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b>	<b>42</b>
<b>8. REFERÊNCIAS</b>	<b>43</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A fibrose cística (FC) é uma doença genética rara (*i.e.* incidência inferior a 1:2.000) autossômica recessiva causada por variantes no gene que codifica a proteína transmembrana reguladora da condutância da fibrose cística (CFTR).<sup>1,2</sup> Contudo, em países como o Brasil, a FC é subdiagnosticada, em decorrência da miscigenação e da disparidade com que a triagem neonatal (TN) para FC é realizada nos estados brasileiros, sendo visivelmente pior, ou ausente, nos locais com piores condições socioeconômicas.<sup>3</sup>

A doença também pode ser denominada Mucoviscidose, referência ao aumento da viscosidade do muco, responsável pelos processos obstrutivos encontrados nos indivíduos afetados.<sup>4</sup> Nos pulmões, a obstrução favorece a reprodução de bactérias, de forma que haja infecção crônica, lesão tecidual e insuficiência respiratória, enquanto no pâncreas, devido à oclusão dos ductos pancreáticos, há redução da secreção de enzimas digestivas pancreáticas e, conseqüentemente, insuficiência pancreática com diminuição da absorção de nutrientes.<sup>4</sup> A confluência fisiopatológica resulta em morbidade, mortalidade prematura e um prognóstico desfavorável, que pode ser amenizada pela triagem neonatal para fibrose cística (TNFC).<sup>4</sup>

Incorporada no Brasil pela Portaria GM/MS nº 822 em 2001, a TNFC é baseada na matriz biológica e consiste na identificação, por meio de dosagens do tripsinogênio imunorreativo (IRT) em sangue seco, de indivíduos entre 0 e 30 dias de vida com maior risco de desenvolver a doença em uma população de recém-nascidos (RN) assintomática.<sup>5</sup> Nesse cenário silencioso, a triagem deve ser capaz de mudar o curso natural da doença e melhorar o prognóstico, visto que possibilita intervenções que reduzem complicações nos indivíduos corretamente detectados.<sup>4</sup>

Preconizado pelo Ministério da Saúde (MS) do Brasil, o protocolo de duas etapas IRT/IRT é usado para diagnóstico presuntivo a partir de duas dosagens distintas de IRT, que são coletadas em momentos diferentes. A partir das duas dosagens alteradas, é feito um teste confirmatório: a análise genética e/ou teste do suor.<sup>5,6</sup> Caso os níveis do primeiro IRT coletado (IRT1)  $\geq 70$  ng/mL, uma nova amostra de IRT (IRT2) em papel filtro deve ser feita em até trinta dias, visto que se

observa um declínio das concentrações dessa substância após este período.<sup>5,6</sup> O valor de corte é fixo em 70 ng/mL para ambas as dosagens, conforme protocolo definido pelo MS e Grupo Brasileiro de Estudos de Fibrose Cística (GBEFC).<sup>6</sup> Apesar de amplamente usado no Sistema Único de Saúde (SUS), este protocolo revelou taxas de falso negativo de 20,4% entre 2013 e 2017 no Nordeste brasileiro.<sup>6</sup>

No que tange a análise genética, o teste busca variantes patogênicas na proteína CFTR.<sup>3</sup> O painel genético não detecta somente a forma clássica da doença, mas também a forma atípica a partir da identificação de heterozigotos.<sup>3,7</sup> Todavia, existem questões legais, éticas e, sobretudo, étnicas envolvendo o teste de DNA, como a diversidade entre as populações e a diferença de acesso e disponibilidade de tecnologias em cada país.<sup>3</sup>

Dado os obstáculos do teste de DNA, entre 1994 e 2003 na França, uma nova substância tornou-se alvo de estudos na TN para FC: a proteína associada à pancreatite (PAP).<sup>8</sup> É uma proteína secretória não mensurável em condições fisiológicas, mas, em casos de pancreatite, pode ser detectada por anticorpos monoclonais (ELISA).<sup>8</sup> Ainda que não seja específico para a FC, foram estabelecidos vários protocolos com uso do PAP na TNFC, com o objetivo de reduzir o número de falsos positivos e de diagnóstico inconclusivo para FC (CFSPID).<sup>8</sup> Ao longo dos anos, as comparações das performances das estratégias de TN para FC baseadas no PAP publicadas se mostraram complexas, já que existem diferentes valores de corte do PAP dependendo das diretrizes locais.<sup>8</sup>

Devido à essa lacuna, esta revisão sistemática analisa o IRT/IRT e IRT/PAP/IRT como testes diagnósticos utilizados em outras localidades a partir do agrupamento dos dados da literatura. As informações dessa comparação, se positivas, permitirão a orientação e realização de novos estudos pilotos em outras regiões com o uso de um protocolo de TNFC que possua melhor eficácia e custo-efetividade.

Também possibilitará a avaliação e reformulação de políticas públicas em países em desenvolvimento, como a substituição de um método de triagem, caso seja identificada superioridade, por outro mais eficaz, de preferência que solucione alguns dos problemas identificados ao longo dos anos na TNFC.

## **2. OBJETIVOS**

O objetivo primário consiste em comparar a performance entre o protocolo vigente de duas etapas, IRT/IRT, e um protocolo alternativo de três etapas, IRT/PAP/IRT, para diagnóstico de fibrose cística na TN em RN a partir dos resultados dos testes.

Os objetivos secundários consistem em avaliar a perda de amostras durante o processo de TN, o tempo da primeira coleta de IRT e o tempo necessário para realização do PAP, bem como, se possível, comparar o custo efetividade entre os protocolos para fibrose cística.

### 3. RACIONAL TEÓRICO

A FC é uma doença genética rara autossômica recessiva que resulta em variantes patogênicas com impacto na proteína CFTR, afetando mais indivíduos caucasianos.<sup>1</sup> A variante mais comum é p.F508del no NBF1.<sup>3</sup> A CFTR é descrita como um polipeptídeo composto por 140 aminoácidos de 168,138 daltons de massa molecular presente em diversos órgãos, como pulmões, pâncreas, sistema reprodutor, intestinos, fígado e glândulas sudoríparas.<sup>1,9</sup>

A CFTR é decodificada na região q31 do cromossomo humano 7 e apresenta dois domínios semelhantes.<sup>10,11</sup> Fisiologicamente, a CFTR é responsável pelo transporte de cloreto e pela regulação do fluxo iônico celular de sódio e bicarbonato, de forma que sua disfunção secundária à variante repercute nas trocas destes íons entre o meio intra e extracelular.<sup>1,9,12</sup>

A tradução clínica dessa disfunção varia de acordo com a classe das variantes que afeta a superfície epitelial e o muco das glândulas exócrinas.<sup>1</sup> Para variantes patogênicas mais graves, nos pulmões, por exemplo, a menor secreção de cloreto no lúmen alveolar associada à maior absorção de sódio pelas células cria um potencial osmótico e provoca redução da depuração mucociliar, visto que a camada aquosa do líquido alveolar se tornou mais delgada.<sup>1,9</sup> A progressão da destruição permanente dos pulmões, bem como a maior vulnerabilidade a infecções respiratórias por *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* é responsável pela maioria dos óbitos.<sup>1,12</sup>

No pâncreas, mais de 85% dos pacientes desenvolvem falência pancreática exócrina, caracterizando-se como uma das manifestações clínicas mais conhecidas da doença no primeiro ano de vida.<sup>1,13</sup> No manejo clínico da insuficiência pancreática é peremptório a avaliação do crescimento e da eficácia das enzimas pancreáticas, uma vez que a falta da alcalinização do lúmen intestinal pode desencadear mal absorção dos macronutrientes e vitaminas da dieta.<sup>13</sup>

Nas glândulas sudoríparas, a disfunção eletrolítica decorrente da reabsorção inadequada de cloreto de sódio pode ocorrer em qualquer idade.<sup>1</sup> A ampla

sintomatologia justifica-se pelo grau do distúrbio eletrolítico, envolvendo sintomas leves, como náusea, vômito e inapetência, ou graves, como convulsões e choque.<sup>1,14</sup>

A partir da descoberta do gene da CFTR em 1989, novos estudos associaram o comportamento da disfunção proteica com a fisiopatologia e ao tratamento dos diferentes fenótipos da FC.<sup>1,15</sup> De acordo com a figura 1, as variantes são classificadas em seis classes funcionais, o que guia a individualização do tratamento, seja, por exemplo, pelo resgate da síntese proteica, seja pela promoção de sua estabilidade.<sup>1,15,16</sup>



**Figura 1.** Classificação funcional das variantes CFTR e abordagens terapêuticas.

**Fonte:** adaptado de Bareil *et al.* (2020).<sup>16</sup>

A classe I inclui variantes com defeitos na síntese da CFTR, enquanto a classe II contém aquelas que sintetizam a proteína, a exemplo da p.F508del, mais comum, porém os canais não completam a migração à superfície epitelial.<sup>1,16</sup> A classe III e classe IV estão relacionadas com a ausência de função e função reduzida, respectivamente, embora a CFTR esteja localizada na membrana celular.<sup>1,16</sup> A classe V é

caracterizada pela menor quantidade da proteína na superfície epitelial, e, por fim, classe VI, por instabilidade proteica.<sup>1,16</sup>

Aliado aos avanços no tratamento, o diagnóstico precoce proporcionado pela TN para FC modificou o perfil dos pacientes que convivem com a doença, ou seja, o prognóstico foi melhorado significativamente.<sup>15</sup> Por exemplo, na década de 1930, os indivíduos com FC não sobreviviam ao primeiro ano de vida, enquanto os pacientes adultos vivem aproximadamente até os 50 anos em países desenvolvidos atualmente; ratifica-se a importância deste teste.<sup>15,17</sup> Devido às diferenças étnicas e à disponibilidade desigual das tecnologias de diagnóstico ao redor do mundo, a incidência da FC varia enormemente.<sup>3,15</sup>

A incidência média da FC é estimada entre 1:4.500 nascidos vivos na Europa Ocidental e, tanto na porção Setentrional quanto Central, 1:6.000.<sup>15</sup> Esse indicador epidemiológico varia entre 1:1.353 na Irlanda e 1:25.000 na Finlândia, confirmando as maiores taxas na população caucasiana.<sup>1,15</sup> Nos EUA e no Canadá são observadas muitas variações étnicas, e a incidência de 1:4000 e 1:3330, respectivamente, é um reflexo desta heterogeneidade.<sup>15</sup> Os EUA ainda apresentam a mediana da idade de sobrevivência é de 46.2 anos.<sup>18</sup>

Em outras regiões do mundo, a incidência é ainda menor.<sup>3,15</sup> Na América Central e do Sul, por exemplo, a Argentina identifica 1 paciente com FC a cada 6.100 nascidos vivos, e a Costa Rica, 1 a cada 15.000.<sup>15</sup> A Ásia, cuja incidência varia entre 1:2560 na Jordânia e 1:350.000 no Japão, apresenta maior registro de novos casos no Oriente Médio decorrente da consanguinidade em relação à região Leste.<sup>15</sup>

O Brasil, cuja população é de 213,2 milhões de habitantes, apresenta incidência nacional da FC entre 1:7.500 nascidos vivos e 1:15.000 nascidos vivos; porém, há subdiagnóstico, visto que apenas 6.427 pacientes são representados no Registro Brasileiro de FC (REBRAFC).<sup>18-20</sup> No período entre 2009 e 2021, de 3.596 diagnósticos, 1.803 foram realizados a partir da TN para FC (53,2%). A importância da triagem no Brasil também é reforçada a partir da participação da TNFC no diagnóstico. Em 2010, a TNFC correspondeu à 36% dos diagnósticos, enquanto, em 2021, à 60,8%.<sup>20</sup>

Em relação à conduta para os pacientes diagnosticados com FC, 93% apresentaram seguimento, o qual cai ao longo dos anos.<sup>20</sup> Por exemplo, 70% dos indivíduos foram acompanhados por pelo menos 3 anos, enquanto apenas 50% foram acompanhados por 5 anos ou mais.<sup>20</sup> O período histórico entre 2009 e 2021 revela aumento absoluto tanto no total de registros quanto no seguimento anual.<sup>20</sup> Em 2009, 1252 pacientes possuíam registro, e 1044 eram acompanhados.<sup>20</sup> Em 2019, havia 5773 registros e 3348 seguimentos. Os números de 2020 foram impactados pela pandemia de COVID-19, marcado por 6112 registros, sendo 14 estrangeiros, e uma queda no seguimento para 3152.<sup>20</sup>

Também há variações entre as regiões brasileiras não apenas em decorrência do histórico de povoamento europeu e africano, mas, principalmente, pelas inequidades regionais em saúde, de modo que a incidência seja maior no Sul e Sudeste.<sup>3,18</sup> Em virtude do impacto do variado *pool* genético no custo-benefício e na avaliação de risco, não seria adequado o uso de uma política de triagem com painel genético uniforme para pacientes com FC no país.<sup>3</sup>

A palavra triagem possui origem francesa e denota seleção de indivíduos específicos e, quando aplicada no contexto da saúde pública, permite a identificação de um determinado grupo com maior probabilidade de apresentar certas patologias.<sup>5</sup> A TN, portanto, visa o reconhecimento de doenças pré-definidas pelo Estado na população assintomática cuja idade varia entre 0 e 28 dias.<sup>4,5</sup> Essa ação anseia alterar o curso natural da doença, reduzir o tempo de diagnóstico, preconizar o tratamento, melhorar o prognóstico e evitar danos irreversíveis.<sup>4,5</sup>

A partir de década de 1960, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu critérios para realização da TN, incentivada, sobretudo, em países não desenvolvidos.<sup>5</sup> Uma nova doença metabólica pode ser incluída na política de TN caso apresente os seguintes critérios: 1) ausência de manifestações clínicas precoces; 2) detecção fácil; 3) disponibilidade de um teste de identificação confiável, com alta sensibilidade e especificidade; 4) desenvolvimento de um programa de detecção viável economicamente. 5) criação de um algoritmo para acompanhamento até o diagnóstico final; 6) associação com outra(s) doença(s) cujos sintomas possam ser amenizados ou até eliminados por meio do tratamento; e 7) estabelecimento de um programa para acompanhamento clínico com recursos mínimos necessários para

que o tratamento seja bem-sucedido.<sup>5</sup> Na década de 1970, as primeiras triagens neonatais detectavam fenilcetonúria e hipotireoidismo congênito.<sup>21</sup>

No Brasil, inicialmente, em 1976, a Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE) localizada na cidade de SP foi pioneira na implementação da TN para a fenilcetonúria.<sup>5</sup> Em 1980, a APAE submeteu uma nova doença à TN: o hipotireoidismo congênito.<sup>5,6</sup> Já em 1983, o estado de SP promulgou a Lei Estadual nº 3.914, que auxiliou na concretização dos programas de triagem no estado.<sup>5</sup>

Inspirado na legislação paulista, o governo brasileiro sancionou o Estatuto da Criança e do Adolescente, que ampliou a obrigatoriedade da triagem para âmbito nacional, conforme inciso III, do Art.10, da Lei n.º 8.069, de 13 de Julho de 1990.<sup>4,5</sup> O Ministério da Saúde criou o Programa Nacional de TN (PNTN) a partir da Portaria GM/MS nº 822 em 6 de Junho de 2001, que incluiu a detecção, além da fenilcetonúria e do hipotireoidismo congênito, de doenças falciformes, de hemoglobinopatias e da FC.<sup>5</sup>

Em seguida, a Portaria GM/MS nº 2.829, de 14 de Dezembro de 2012, instituiu a Fase IV do PNTN, que incluiu a hiperplasia adrenal congênita e a deficiência de biotinidase.<sup>22</sup> Por sua vez, a Portaria GM/MS nº 1.369, de 6 de Junho de 2022, incluiu na tabela de procedimentos, medicamentos, órteses, próteses e materiais especiais (OPM) a pesquisa de IgM anti *Toxoplasma gondii* em sangue seco oriundo da matriz biológica.<sup>23</sup> Para a dosagem de fenilalanina, TSH, T4, IRT, 17-hidroxi-progesterona e biotinidase, o documento também alterou a idade máxima para 1 ano.<sup>23</sup>

Entre 2008 e 2017, a mediana de cobertura da TN para FC no Brasil, em ordem crescente, inicia pela região Norte (10,9%), Nordeste (12,3%), Centro-oeste (47,3%), Sudeste (71,4%) e Sul (84,1%).<sup>24</sup> Essa discrepância entre as coberturas regionais é um reflexo das inequidades socioeconômicas que permeiam o país.<sup>24</sup> Embora o MS tenha universalizado a TN para FC em 2013, os estados do Rio Grande do Norte (12,1%), Amazonas (16,8%) e Paraíba (27,5%) não haviam incluído a dosagem de IRT no sistema de informação dos pacientes.<sup>24</sup>

O processo de triagem para FC usado no Brasil envolve um protocolo de duas etapas para mensuração, por meio da fluorescência tempo resolvida, do IRT

presente no sangue periférico seco.<sup>5</sup> O valor de corte para a estratégia IRT/IRT foi definido em 70 ng/mL; caso IRT1  $\geq$  70 ng/mL, o IRT2 é feito até os 28 dias de vida, valendo-se do mesmo valor de corte.<sup>4,6</sup> Conforme orientações do PNTN, as amostras devem ser coletadas em até 5 dias, porém, apenas 58,1% dos RN atendem a este critério.<sup>5</sup>

Após este período, fisiologicamente, observa-se uma queda nos valores de IRT mesmo em portadores da doença, o que contribui para a taxa de falso-negativo deste protocolo de TN para FC.<sup>5</sup> Além da queda fisiológica, a concentração do IRT pode reduzir, sobretudo, devido à qualidade da amostra coletada, tempo e condições de armazenamento.<sup>25</sup> Também afetam a mensuração dessa substância o kit usado e as características do RN, como a idade, o peso e o quadro clínico.<sup>25</sup>

Se ambas as amostras de IRT forem positivas, o teste do suor, que avalia a concentração de eletrólitos no suor e/ou análise genética devem ser executadas para confirmação diagnóstica.<sup>4-6</sup> O primeiro exame confirmatório baseia-se no acúmulo de cloreto e sódio no lúmen das glândulas sudoríparas.<sup>4-6</sup> A dosagem pode ter três classificações: 1) FC positiva, se  $[Cl^-] \geq 60$  mmol/L (valor anormal); 2) FC possível, se  $[Cl^-]$  estiver entre 30 e 60 mmol/L (valor intermediário); e 3) FC improvável, se  $[Cl^-] \leq 30$  mmol/L (valor normal).<sup>7</sup> Considerando o último resultado, não é possível rejeitar a suspeita de FC, de forma que o paciente pode ser classificado como um recém-nascido cujo resultado da triagem foi positivo, mas o diagnóstico é inconclusivo (CFSPID), um falso-positivo.<sup>8</sup>

Outro exame confirmatório, a análise genética, identifica variantes que codificam a proteína CFTR.<sup>3</sup> Este método possibilita o reconhecimento de duas variantes patogênicas do gene CFTR, vantajoso no contexto da TN, mas também de portadores, desvantajoso.<sup>3,6,26</sup> Caso o painel genético seja muito heterogêneo, devido às limitações do exame, estratégias alternativas devem ser consideradas para diagnóstico da FC na TN.<sup>3,8</sup>

Especificamente, a triagem neonatal para a FC deve possuir certas características para atingir as vantagens clínicas e epidemiológicas.<sup>27</sup> É necessário um sistema universal de coleta de amostras de sangue seco e de análise em centros laboratoriais com ênfase na maior sensibilidade possível, além da colaboração

entre os centros laboratoriais e os de acompanhamento clínico.<sup>27</sup> Outro sistema essencial é o de acompanhamento de RN diagnosticados com FC separadamente de pacientes mais velhos com o intuito de evitar exposição a patógenos respiratórios.<sup>27</sup>

A operacionalização dessa triagem neonatal deve ser organizada e eficiente, de modo que evite atrasos preveníveis e forneça assiduidade consistente do diagnóstico, sobretudo em relação à oferta do teste do suor para confirmação e o acompanhamento por equipe multidisciplinar, com nutricionistas, gastroenterologistas, fisioterapeuta.<sup>27</sup> A estratégia da triagem para FC deve maximizar a sensibilidade e otimizar a especificidade; de acordo com os avanços científicos, é categórico que sejam aprimoradas as tecnologias e metodologias laboratoriais.<sup>27,28</sup>

A triagem neonatal adotada para FC deve oferecer mais benefícios do que riscos, como a mitigação de danos psicossociais em potencial considerando um resultado falso-positivo.<sup>27</sup> As diretrizes da triagem neonatal para FC devem ser conhecidas e seguidas na sequência das etapas integradas.<sup>27</sup> Por fim, no que tange a distribuição da doença na população, a incidência de FC deve ser alta o suficiente para justificar a presença de centros de cuidado para FC.<sup>27</sup>

Em 2018, a Sociedade Europeia de FC (ESCF) sugeriu que, caso o valor de incidência seja inferior a 1 indivíduo afetado a cada 7.000 nascidos vivos, a implementação da triagem neonatal para FC deve ser avaliada de forma cautelosa.<sup>2</sup> Porém, outros distúrbios metabólicos hereditários são incluídos na triagem neonatal mesmo com número inferior, como hiperplasia adrenal congênita cuja prevalência é de 1:14.000.<sup>2</sup> A ESCF também preconiza uma sensibilidade mínima de 95% e VPP mínimo de 30% para a estratégia usada.<sup>8</sup> Apesar de não haver exigências mínimas em relação à performance do protocolo especificamente para FC no Brasil, o Ministério da Saúde considera satisfatório quando pelo menos a cobertura da TN atinge 80% dos RN.<sup>6</sup>

O histórico da triagem neonatal para FC inicia na década de 1970 com o teste de Boehringer Mannheim (BM), que se baseava na dosagem semiquantitativa da albumina contida no mecônio.<sup>21</sup> Porém, apresentou alta taxa de falso-negativo e falso-positivo, bem como baixa sensibilidade e especificidade.<sup>21</sup> Em 1979, o

relatório de Croosley revelou, além da estabilidade para armazenamento em amostras de sangue seco, a possibilidade de uso do IRT para distinguir 23 amostras de RN com FC de outras duas controles selecionadas aleatoriamente.<sup>21</sup>

Na metade da década de 80, um estudo desenvolvido em Wales, no Reino Unido, e outro em Wisconsin, nos EUA, testaram um protocolo de duas etapas em série pela primeira vez, o IRT/IRT, visto que o IRT1 apresenta baixa sensibilidade para discernir isoladamente a população com FC.<sup>21,27</sup> Gradativamente, outros países incorporaram esse método de detecção de FC, o que permitiu comparação de dados ao longo da década.<sup>21</sup>

Em 1987, foi criado um programa de qualidade internacional para o IRT que, embora os laboratórios integrantes do projeto não tivessem padronizado a metodologia de mensuração, indicou tendências da performance e dos valores de corte usados para distinguir um RN com FC com pouca proporção de falso-positivo. O IRT é usado mundialmente como primeira etapa nos protocolos de triagem neonatal para FC até os dias atuais, embora apresente baixa sensibilidade.<sup>8,27</sup> Para aumentar a sensibilidade do teste, é possível reduzir o valor de corte em detrimento da especificidade.

Para definição de um ponto de corte é necessário compreender a importância clínica e epidemiológica dada aos falsos positivos e falsos negativos para uma determinada doença.<sup>29</sup> Para a FC, a família de um RN falso positivo pode sofrer danos psicossociais, sobretudo o luto de uma projeção de vida saudável para o RN; o custo em saúde também se eleva pelo aumento de testes confirmatórios realizados em indivíduos sem a doença. Por sua vez, um falso negativo não receberá o tratamento necessário para melhora da qualidade de vida e sobrevivência, e haverá custos futuros para manejo das complicações.<sup>5</sup>

Para balancear a relação geralmente antagônica entre sensibilidade e especificidade de um teste quantitativo, a curva ROC é utilizada.<sup>29</sup> Esse gráfico revela a sensibilidade em função da quantidade de falsos positivos (1-especificidade), sendo cada ponto um comportamento do teste de acordo com o valor de corte pré-estabelecido.<sup>29</sup> Adicionalmente, a área sob a curva ROC representa o quão exato é um teste; quanto maior a área, maior a exatidão. A curva ROC, portanto, traduz

a capacidade de um teste diagnóstico diferenciar doentes de não doentes para um determinado ponto de corte, o que auxilia na definição deste.<sup>29</sup>

Nesse contexto, a concentração de IRT, uma variável contínua, é transformada em dicotômica a partir de um valor de corte que distingue RN com FC daqueles sem a doença.<sup>29</sup> O ponto de corte varia desde o percentil 95 até o percentil 99, de acordo com as preferências do centro de triagem.<sup>30</sup>

A partir das limitações do teste de DNA e do IRT, a partir de 1994, o PAP se tornou alvo de estudos franceses na TN para FC.<sup>8</sup> Ainda que seja secretada fisiologicamente, não é detectável nessas condições.<sup>8</sup> Em contrapartida, na pancreatite, um quadro recorrente na FC, o PAP é passível de mensuração por anticorpos monoclonais.<sup>8</sup> No cenário da TN, essa substância foi associada ao IRT, de forma que novos protocolos foram criados com o intuito de reduzir a quantidade de falsos positivos e maximizar a sensibilidade.<sup>8</sup>

Sarles *et al* (2005) propuseram um protocolo de duas etapas em série, o IRT/PAP.<sup>8</sup> A fim de garantir sensibilidade o suficiente, o ponto de corte para o IRT foi estabelecido em 50 ug/L.<sup>8</sup> O PAP, por sua vez, vale-se de dois valores de corte, sendo a escolha baseada na concentração prévia do IRT.<sup>8</sup> Se a concentração de IRT estiver entre 50 ug/L e 99.9 ug/L, o ponto de corte do PAP será de 1.8 ug/L, enquanto, caso IRT > 100 ug/L, o valor de corte para PAP será de 1.0 ug/L.<sup>8</sup>

Os dois valores de corte de PAP dependentes de IRT têm como objetivo reduzir a quantidade de CFSPID e aumentar o VPP.<sup>8</sup> Embora tenha sido propostos esses dois pontos de corte, Sommerburg *et al.* (2010) utilizaram um único valor de PAP  $\geq$  1.0 ng/mL em um estudo piloto alemão, visto que não havia evidências de que as concentrações de PAP refletiam a gravidade da FC.<sup>31</sup> Outros estudos, como de Dresden e de Praga, também indicaram que o uso de um único ponto de corte apresenta melhor sensibilidade.<sup>8</sup>

As maiores vantagens do protocolo IRT/PAP são a obliteração de métodos genéticos e a dispensabilidade da coleta de uma nova amostra, o que reduz custos e questões éticas, além de sua melhor aplicabilidade em populações com maior frequência alélica.<sup>8,31</sup> Em contrapartida, embora não detecte heterozigotos, apresenta como desvantagem um baixo valor preditivo e uma alta taxa de falsos

positivos, a qual pode ser amenizada em virtude do menor custo em relação ao IRT/DNA.<sup>8,31</sup> Apesar disso, a estratégia IRT/PAP abriu precedentes para o aprimoramento de outros protocolos de TNFC que contém uma etapa com o PAP, como o IRT/PAP/IRT.<sup>8</sup>

Há outro obstáculo na utilização do PAP na TNFC na atualidade devido à evolução do kit de mensuração desta substância.<sup>8</sup> Em 2005, foi criado o kit MucoPAP pela Dynabio que, posteriormente, descobriu-se um erro cuja correção deveria ser feita a partir de um fator de multiplicação de 1,67.<sup>8</sup> Em 2013, foi disponibilizado no mercado o kit MucoPAP-F e, um ano depois, valores de corte próprios foram criados.<sup>8</sup> Por fim, em 2016, o kit MucoPAP II introduz a detecção fotométrica, também com os próprios valores de corte.<sup>8</sup> Sommerburg *et al.* (2010) atribuem aos diferentes valores de corte do PAP propostos ao longo dos anos a dificuldade em se comparar os protocolos de TN para FC baseados no PAP.<sup>8</sup>

A taxa de falso-positivo nos protocolos IRT/IRT e IRT/PAP/IRT é influenciada por RN com IRT/PAP/IRT ou IRT/IRT positivos com teste do suor improvável para FC devido à hipóxia, apgar baixo, órgão danificado, trissomia 13, 18 ou 21, hipoglicemia, baixo peso ao nascer, estresse fisiológico ou respiratório, RN heterozigoto para FC, disfunção renal, TN precoce, ou coleta de sangue seco após 168 horas.<sup>4,32</sup> Já a taxa de falso-negativo pode ser afetada por valores abaixo do corte para IRT, variante não contemplada no painel genético CFTR, suporte de vida extracorpóreo, suficiência pancreática, íleo meconial ou outra condição intestinal obstrutiva, eluição da amostra de sangue no papel filtro ou aparecimento tardio da FC.<sup>4,32</sup>

Na atualidade, algumas regiões na Europa incorporaram o PAP na TN para FC após a condução de estudos pilotos que justificassem seu uso.<sup>8</sup> Em 2011, a Holanda foi pioneira na implementação nacional a partir da estratégia IRT/PAP/DNA(35)/EGA, e, após 2016, reduziu o menor ponto de corte de PAP, além de adotar uma rede de segurança.<sup>8</sup> O reconhecimento de pelo menos uma variante no painel genético que contempla 35 variantes classifica como resultado positivo na triagem.<sup>8</sup> Obtiveram 90% de sensibilidade e 63% de VPP.<sup>8</sup>

Na Alemanha, é usado o protocolo IRT/PAP/DNA(31) desde 2014, de modo que haja um valor de corte flutuante de IRT no percentil 99 e somente um ponto de

corte para o PAP, também flutuante, no percentil 87,5.<sup>8</sup> Foi calculado, para o estudo piloto iniciado em 2010 (IRT/PAP-SN), uma sensibilidade de 96%.<sup>8</sup>

Em 2017, a Áustria também adotou o protocolo IRT/PAP/IRT segundo as recomendações de Sarles *et al.* (2014), ou seja, dois valores de corte de PAP dependentes do IRT; houve acréscimo de uma rede de segurança associada à mensuração do PAP (IRT/PAP-SN/IRT), em que a triagem é positiva se  $IRT1 \geq 130\mu\text{g/L}$ .<sup>8,33</sup> O valor de corte de IRT também foi estabelecido em 65 ng/L, e os pontos de corte de PAP se dividem em: 1) Se IRT1 estiver entre 65 e 100 ug/L, vale-se de um valor de corte para o PAP  $\geq 2.5\mu\text{g/L}$ ; e 2) Se IRT1 maior ou igual a 100 ug/L, PAP  $\geq 1.33\mu\text{g/L}$ .<sup>8</sup>

A partir de 2018, a Catalunha implementou a estratégia de quatro etapas IRT/PAP-SN/IRT/DNA.<sup>8</sup> O valor de corte do IRT1  $\geq 50$  ng/L.<sup>8</sup> Embora seja utilizado dois valores de corte para o PAP dependentes do IRT1, não foram os propostos por Sarles *et al.* (2014).<sup>8</sup> Por um lado, se  $50 < IRT1 < 80$  ug/L, o valor de corte para o PAP é de 1,95 ug/L.<sup>8</sup> Por outro, caso  $IRT1 \geq 80$  ug/L, o ponto de corte para o PAP aplicado é de 1,0 ug/L.<sup>8</sup>

Visto que a FC é uma doença com baixa incidência nas populações, os protocolos de TN não possuem VPP elevado, de modo que sejam executadas etapas subsequentes de um protocolo eleito pelo centro de triagem em questão.<sup>29</sup> Sommerburg e Hammermann (2020) sugeriram que, mesmo em detrimento do VPP, o protocolo IRT/PAP pode atingir maior sensibilidade a partir de: 1) uma rede de segurança para o IRT; 2) renúncia dos dois valores de corte do PAP dependentes do IRT1; 3) redução dos valores de corte do PAP; e 4) mensuração paralela do IRT e do PAP, e não em série.<sup>8</sup>

Ao submeter os dados a uma análise do custo-benefício no Canadá, as diferentes sensibilidades alcançadas a partir dos valores de corte estabelecidos para o IRT refletiram nos custos.<sup>34</sup> Definido pelo percentil 96, o IRT/IRT custaria C\$ 4.705.353 e detectaria 164 RN com FC (C\$ 28.691/diagnóstico) em 5 anos; o IRT/PAP, para o mesmo período, exigiria C\$ 4.606.040 para identificar 162 casos (C\$ 28.432/diagnóstico).<sup>34</sup> Já de acordo com o percentil 99,5 para o mesmo intervalo temporal, para detectar 157 RN com FC, o IRT/IRT custaria C\$ 4.846.455 (C\$

30.869/diagnóstico).<sup>34</sup> O IRT/PAP, por sua vez, custaria C\$ 5.017.831 para detectar 155 pacientes com FC (C\$ 32.373/diagnóstico).<sup>34</sup>

A estratégia IRT/PAP mostrou-se mais custo efetiva em relação ao IRT/IRT.<sup>34</sup> Também foi identificado que protocolos cuja terceira etapa é a análise genética, como IRT/IRT/DNA e IRT/PAP/DNA, são menos favoráveis em virtude dos custos adicionais associados ao reconhecimento do portador.<sup>34</sup> Neste contexto, um protocolo integralmente bioquímico se mostra mais vantajoso.<sup>34</sup>

Por fim, o Nshimyumukiza *et al.* (2013) revelou que, no mesmo período, seriam reconhecidos 152 casos de FC na ausência de TN, totalizando C\$ 8.646.422 (C\$ 56.884/diagnóstico).<sup>34</sup> A TN para FC, portanto, não somente melhora a qualidade de vida do paciente, mas otimiza os gastos públicos em saúde.<sup>34</sup>

## 4. MÉTODOS

### 4.1 Desenho de estudo

Este trabalho consiste numa revisão sistemática que compara o protocolo IRT/IRT com o IRT/PAP/IRT. Integra outra revisão sistemática que adiciona o protocolo de duas etapas IRT/PAP na comparação.

### 4.2 Critérios de Elegibilidade

Os critérios de inclusão correspondem a:

- 1) População de recém-nascidos triados para fibrose cística;
- 2) Estudos com dados descritivos do IRT/IRT e IRT/PAP/IRT que possibilitem a comparação da performance de dois ou mais protocolos, como taxa de falso-positivo, taxa de falso-negativo, tempo de coleta de amostra, sensibilidade, especificidade e acurácia.

Os critérios de exclusão são:

- 1) População de recém-nascidos que não foi submetida à TN ou à triagem para fibrose cística;
- 2) População que não foi triada para FC entre o 1º e 28º dia de vida;
- 3) Estudos cujos dados não sejam suficientes para comparar protocolos.

### 4.3 Estratégia de Busca

Em 2023, as plataformas PubMed, Scielo, Cochrane, Lilacs, Bireme e Embase foram consultadas para selecionar artigos publicados entre 2000 e 2023, conforme a tabela 1, já que o PAP foi incrementado a partir do protocolo de Sarles *et al.* (2005).<sup>35</sup>

Tabela 1. Estratégias de busca dos artigos científicos.

Plataforma	Dicionário	Estratégia de Busca
<b>PUBMED</b> <b>COCHRANE</b> <b>SCIELO</b>	<b>MESH</b>	(Cystic Fibrosis OR Mucoviscidosis OR Pancreatic Cystic Fibrosis OR Pancreatic Cystic Fibrosis OR Cystic Fibrosis, Pancreatic OR Fibrocystic Disease of Pancreas OR Pancreas Fibrocystic Disease OR Pancreas Fibrocystic Diseases OR Cystic Fibrosis of Pancreas OR Pulmonary Cystic Fibrosis OR Cystic Fibrosis, Pulmonary) AND (PAP OR Pancreatitis Associated Proteins OR Regenerating Islet-Derived Protein OR Islet-Derived Protein, Regenerating OR Protein, Regenerating Islet-Derived OR Regenerating Islet Derived Protein OR Regenerating Islet-Derived Proteins OR Regenerating Islet Derived Proteins OR Pancreatitis-Associated Protein-1 OR Pancreatitis Associated Protein 1 OR Pancreatitis-Associated Protein OR Pancreatitis Associated Protein OR Protein, Pancreatitis-Associated OR Regenerating Islet-Derived Protein 3 OR Regenerating Islet Derived Protein 3) AND (IRT OR Immunoreactive trypsinogen OR Trypsinogen) AND ('protein'/exp OR protein)) AND (irt OR 'immunoreactive trypsinogen'/exp OR 'immunoreactive trypsinogen' OR (immunoreactive AND ('trypsinogen'/exp OR trypsinogen)) OR 'immunoreactive trypsin'/exp OR 'immunoreactive trypsin' OR (immunoreactive AND ('trypsin'/exp OR trypsin))) AND [2000-2023]/py
<b>EMBASE</b>	<b>EMTREE</b>	AND ('protein'/exp OR protein)) AND (irt OR 'immunoreactive trypsinogen'/exp OR 'immunoreactive trypsinogen' OR (immunoreactive AND ('trypsinogen'/exp OR trypsinogen)) OR 'immunoreactive trypsin'/exp OR 'immunoreactive trypsin' OR (immunoreactive AND ('trypsin'/exp OR trypsin))) AND [2000-2023] AND ('protein'/exp OR protein)) AND (irt OR 'immunoreactive trypsinogen'/exp OR 'immunoreactive trypsinogen' OR (immunoreactive AND ('trypsinogen'/exp OR trypsinogen)) OR 'immunoreactive trypsin'/exp OR 'immunoreactive trypsin' OR (immunoreactive AND ('trypsin'/exp OR trypsin))) AND [2000-2023]/p
<b>LILACS</b> <b>BIREME</b>	<b>DECS</b>	("Fibrose Cística" OR "Mucoviscidose" OR "Fibrosis Quística" OR "Mucoviscidosis" OR "Cystic Fibrosis" OR "Cystic Fibrosis of Pancreas" OR "Cystic Fibrosis, Pancreatic" OR "Cystic Fibrosis, Pulmonary" OR "Fibrocystic Disease of Pancreas" OR "Fibrosis, Cystic" OR "Mucoviscidosis" OR "Pancreas Fibrocystic Disease" OR "Pancreas Fibrocystic Diseases" OR "Pancreatic Cystic Fibrosis" OR "Pulmonary Cystic Fibrosi") AND ("Proteínas Associadas a Pancreatite" OR "Proteína 1 Associada a Pancreatite" OR "Proteína 3 Derivada de Ilhotas em Regeneração" OR "Proteína Associada a Pancreatite" OR "Proteína Derivada de Ilhotas em Regeneração" OR "Proteínas Derivadas de Ilhotas em Regeneração" OR "Proteínas Asociadas a Pancreatitis" OR "Pancreatitis-Associated Proteins") AND ("Tripsinogênio imunorreativo" OR "Tripsina Imunorreativa" OR "Tripsinogênio" OR "Trypsin" OR "Tripsinógeno")

Fonte: próprio autor.

#### **4.4 Seleção de estudos**

Todos os artigos encontrados foram inseridos na plataforma Rayyan<sup>©</sup>. Em forma duplo-cego, uma dupla de revisores categorizou esses artigos como incluídos ou excluídos. Em caso de impasses, um terceiro revisor realizou o desempate.

No que tange a linguagem, não houve restrições de idioma. Já no tipo de estudo, foram incluídos estudos de coorte, ecológicos, transversais e análises de custo-benefício. Revisões sistemáticas foram usadas apenas para busca de referências, isto é, não foram selecionadas para análise.

Foram excluídos artigos duplicados ou aqueles em que um avaliador especialista não cego considere que fuja ao tema do projeto.

#### **4.5 Extração de dados**

Para a extração de dados, a dupla de revisores valeu-se de um formulário eletrônico feito no software Microsoft Excel. Os dados coletados foram divididos em: 1) identificação do estudo; 2) dado elegível; 3) população; 4) metodologia; 5) métodos de TN comparados; 6) resultados; e 7) dados para futura análise do risco de viés.

#### **4.6 Análise de risco de viés**

A análise de risco de viés foi realizada pelo QUADAS-2 no RevMan Web.<sup>36</sup> Essa ferramenta utiliza os critérios de seleção, teste índice, teste de referência, fluxo e temporalidade. Uma dupla de revisores cegos analisou com auxílio de um terceiro revisor, que mediou impasses.

#### **4.7 Síntese de dados**

Trata-se de uma análise qualitativa a partir da descrição das similaridades, diferenças, classificações e padrões dos artigos incluídos. Os dados de performance incluídos foram sensibilidade, especificidade, valor preditivo negativo (VPN) e valor preditivo positivo (VPP), além dos seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%).

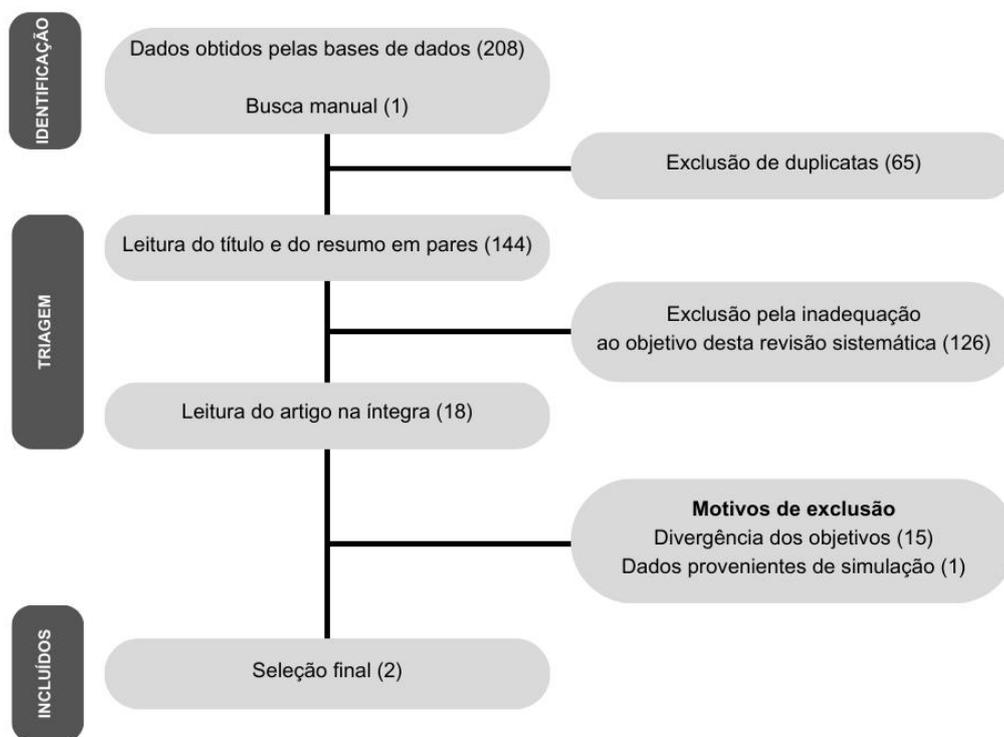
#### 4.8 Protocolo PROSPERO

Este trabalho compõe outra revisão sistemática, que compara o protocolo IRT/IRT com IRT/PAP e IRT/PAP/IRT. Um protocolo para esta revisão sistemática foi registrado dia 31 de janeiro de 2023 na plataforma *International prospective register of systematic reviews* (PROSPERO) cujo acesso se dá pelo código CRD42023395880. O título da revisão consta como *Systematic Review: A comparison of newborn screening protocol for cystic fibrosis by IRT/IRT, IRT/PAP and IRT/PAP/IRT*. Até o presente momento, o protocolo foi modificado duas vezes. A primeira desconsiderou a possibilidade de um protocolo do estudo na instituição Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. A segunda atualização substituiu o *odds ratio* como medida de efeito pelo *hierarchical summary receiver operating characteristic curve* (HSROC) nos desfechos primários e pelo risco relativo (perda de amostra e custo-efetividade) e diferença de média (tempo para primeira coleta do IRT e tempo de coleta do PAP) nos desfechos secundários.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Busca e seleção de artigos

As estratégias de busca da revisão sistemática ampliada revelaram um total de duzentos e oito artigos, somados a um estudo encontrado de forma manual. Dos duzentos e nove artigos, dezoito foram selecionados após leitura do título e do resumo de forma duplo cego na plataforma *Rayyan*®. Ao concluir a leitura e avaliação da extração de dados, dezesseis estudos foram excluídos, de modo que fossem mantidos dois, conforme a figura 2.



**Figura 2.** Fluxograma com a síntese da busca e seleção de artigos

**Fonte:** próprio autor.

Esta revisão sistemática, por incluir somente as estratégias IRT/IRT e IRT/PAP/IRT, excluiu os estudos com protocolos alternativos, como o IRT/DNA, IRT/PAP e IRT/PAP/DNA. A tabela 2 unifica os motivos de exclusão de cada trabalho científico no decorrer da leitura integral.

**Tabela 2.** Estudos excluídos após seleção para leitura na íntegra.

AUTORIA	LOCAL	TÍTULO DO ESTUDO	MOTIVO DA EXCLUSÃO
Sommerburg, 2010 <sup>31</sup>	Alemanha	<i>Initial evaluation of a biochemical cystic fibrosis newborn screening by sequential analysis of immunoreactive trypsinogen and pancreatitis-associated protein (IRT/PAP) as a strategy that does not involve DNA testing in a Northern European population</i>	Objetivo divergente com o desta revisão: Avaliação do IRT/PAP
Seror, 2010 <sup>37</sup>	França	<i>PAP assays in newborn screening for cystic fibrosis: a population-based cost-effectiveness study</i>	Objetivo divergente com o desta revisão: Avaliação do IRT/DNA, IRT/PAP e IRT/PAP/DNA
Krulišová, 2012 <sup>38</sup>	Praga	<i>Prospective and parallel assessments of cystic fibrosis newborn screening protocols in the Czech Republic: IRT/DNA/IRT versus IRT/PAP and IRT/PAP/DNA</i>	Objetivo divergente com o desta revisão: Avaliação do IRT/DNA/IRT, IRT/PAP e IRT/PAP/DNA
Calvin, 2012 <sup>39</sup>	Norfolk, Suffolk e Cambridgeshire	<i>Thirty-years of screening for cystic fibrosis in East Anglia</i>	Objetivo divergente com o desta revisão: Ausência de IRT/PAP/IRT para comparar com IRT/IRT
Langen, 2013 <sup>32</sup>	Holanda	<i>The influence of sex, gestational age, birth weight, blood transfusion, and timing of the heel prick on the pancreatitis-associated protein concentration in newborn screening for cystic fibrosis</i>	Objetivo divergente com o desta revisão: Análise qualitativa das variáveis do PAP
Nshimyumukiza, 2013 <sup>34</sup>	Quebec	<i>Cost effectiveness of newborn screening for cystic fibrosis: a simulation study</i>	Dados provenientes de simulação
Van der Ploeg, 2014 <sup>40</sup>	Países Baixos	<i>Cost-effectiveness of newborn screening for cystic fibrosis determined with real-life data</i>	Objetivo divergente com o desta revisão: Avaliação do IRT/PAP, IRT/DNA/Seq, IRT/PAP/DNA/Seq e IRT/DNA
Weidler, 2016 <sup>41</sup>	Alemanha	<i>A product of immunoreactive trypsinogen and pancreatitis-associated protein as second-tier strategy in cystic fibrosis newborn screening</i>	Objetivo discrepante com o desta revisão: Descrição do IRTxPAP
Sommerburg, 2017 <sup>42</sup>	Alemanha	<i>Newborn Screening on Cystic Fibrosis in Germany: Comparison of the new Screening Protocol with an Alternative Protocol</i>	Objetivo divergente com o desta revisão: Avaliação do IRT/PAP/DNA
Marcão, 2018 <sup>39</sup>	Portugal	<i>Cystic Fibrosis Newborns Screening in Portugal: PAP Value in Populations with Stringent Rules for Genetic Studies</i>	Objetivo divergente com o desta revisão: Ausência de IRT/IRT para comparar com IRT/PAP/IRT
Schmidt, 2019 <sup>43</sup>	Bélgica	<i>A model-based economic evaluation of four newborn screening strategies for cystic fibrosis in Flanders, Belgium</i>	Objetivo divergente com o desta revisão: Avaliação do IRT/DNA, IRT/PAP, IRT/PAP/DNA e IRT/PAP/DNA/EGA
Teper, 2020 <sup>44</sup>	Buenos Aires	<i>Comparison between two newborn screening strategies for cystic fibrosis in Argentina: IRT/IRT versus IRT/PAP</i>	Objetivo divergente com o desta revisão: Ausência de IRT/PAP/IRT para comparar com IRT/IRT
Zeyda, 2021 <sup>45</sup>	Áustria	<i>Cystic fibrosis newborn screening in Austria using PAP and the numeric product of PAP and IRT concentrations as second-tier parameters</i>	Objetivo divergente com o desta revisão: Ausência de IRT/IRT para comparar com IRT/PAP/IRT
Bianchimani, 2022 <sup>46</sup>	Toscana	<i>Impact of Pancreatitis-Associated Protein on Newborn Screening Outcomes and Detection of CFTR-Related Metabolic Syndrome (CRMS)/Cystic Fibrosis Screen Positive, Inconclusive Diagnosis (CFSPID): A Monocentric Prospective Pilot Experience</i>	Objetivo divergente com o desta revisão: Avaliação do IRT/PAP/DNA
Munck, 2022 <sup>47</sup>	Europa	<i>European survey of newborn bloodspot screening for CF: opportunity to address challenges and improve performance</i>	Objetivo divergente com o desta revisão: Ausência de comparação entre IRT/IRT e IRT/PAP/IRT do mesmo centro de triagem
Palmieri* <sup>48</sup>	Calabria	<i>A study encouraging the use of IRT/PAP strategy for neonatal screening of cystic fibrosis</i>	Objetivo divergente com o desta revisão: Avaliação do IRT/PAP

**Legenda:** \*Ano de publicação não encontrado.

**Fonte:** próprio autor.

A principal justificativa para exclusão de artigos foi a incongruência dos objetivos entre os propostos por esta revisão e o estudo analisado. Sommerburg *et al.* (2010) avaliaram o protocolo IRT/PAP, enquanto Krulišová *et al.* (2012) descreveram IRT/DNA/IRT, IRT/PAP e IRT/PAP/DNA.<sup>31,38</sup> Langen *et al.* (2013) analisaram de forma qualitativa as variáveis do PAP, como idade gestacional, peso ao nascer e sexo biológico do RN e não a performance diagnóstica dos protocolos atrelados à mensuração do PAP.<sup>32</sup>

Weidler *et al.* (2016) descreveram o produto das concentrações de IRT e PAP (IRTxPAP) na TNFC, que consiste em uma etapa, e não na estratégia IRT/PAP tampouco IRT/PAP/IRT, por exemplo.<sup>41</sup> Bianchimani *et al.* (2022) e Sommerburg *et al.* (2017) avaliaram o protocolo IRT/PAP/DNA.<sup>42,46</sup> Palmieri *et al.* foi excluído, dado que avaliaram somente IRT/PAP, além de ser um resumo de congresso cujo artigo original não fora encontrado manualmente.<sup>48</sup> Os dados, por conseguinte, foram também considerados insuficientes.<sup>48</sup>

Os estudos que avaliaram apenas IRT/IRT, como Calvin *et al.* (2012), Teper *et al.* (2020) e Zeyda *et al.* (2021), ou IRT/PAP/IRT, a exemplo de Marcão *et al.* (2018) também foram excluídos.<sup>39,44,45,49</sup> Ademais, Munck *et al.* (2022), que expuseram a performance do protocolo adotado por cada centro de TNFC na Europa, também foram removidos.<sup>47</sup> Visto que cada um destes artigos usou apenas um dos protocolos avaliados nesta revisão sistemática, não seria possível comparar a performance entre os dois protocolos, pois constituem populações distintas.<sup>39,44,45,47,49</sup>

Dados de inferência estatística provenientes dos estudos de custo-efetividade também foram excluídos devido à análise de outros protocolos que não IRT/IRT ou IRT/PAP/IRT.<sup>34,37,40,43</sup> Seror *et al.* (2010) avaliaram IRT/DNA, IRT/PAP e IRT/PAP/DNA. Van der Ploeg *et al.* (2014) extrapolaram para coortes fictícias de 145.499 RN nos Países Baixos, cuja incidência de FC é de 1:5500, o uso dos protocolos IRT/PAP, IRT/DNA/Seq, IRT/PAP/DNA/Seq e IRT/DNA.<sup>37,40</sup> De forma semelhante, Schmidt *et al.* (2019) avaliaram a custo-efetividade das estratégias IRT/DNA, IRT/PAP, IRT/PAP/DNA e IRT/PAP/DNA/EGA em uma coorte fictícia de 65.606 nascidos vivos em Flanders, que possui incidência de 1:2850.<sup>43</sup>

O estudo de custo efetividade de Nshimyumukiza *et al.* (2013) em sua metodologia, parte de coorte fictícia de 432.034 nascidos vivos em Quebec, onde a incidência é de 1:2500.<sup>34</sup> Embora os custos do IRT/IRT sejam quantificados, os dados originaram-se de uma simulação.<sup>34</sup>

## 5.2 Características dos estudos incluídos

Publicados entre 2019 e 2022, dois estudos foram incluídos nesta revisão sistemática, como indica a tabela 3.

**Tabela 3.** Caracterização geral dos estudos incluídos

Estudo	Local	Tipo de Estudo	Período de Coleta	Objetivo Primário
Sadik, 2019 <sup>26</sup>	Málaga	Observacional	06/2017 a	Avaliar performance do IRT/PAP/IRT em relação ao IRT/IRT
		Prospectivo	05/2019	
Pecellín, 2022 <sup>50</sup>	Cádiz	Observacional	12/2017 a	Comparar a eficácia entre dois métodos de TNFC pela mensuração de IRT e PAP
	Córdoba			
	Huelva	Prospectivo	06/2020	
	Sevilla			

**Legenda:** IRT: tripsinogênio imunorreativo. PAP: proteína associada à pancreatite. TNFC: triagem neonatal para fibrose cística.

**Fonte:** próprio autor.

Cada estudo submeteu a mesma população tanto à estratégia IRT/IRT quanto à IRT/PAP/IRT. Sadik *et al.* (2019) triaram todos os 68.502 RN, com idade até 7 dias de vida, entre junho de 2017 e maio de 2019 em Málaga.<sup>26</sup>

Pecellín *et al.* (2022) incluíram 60.399 RN com idade superior a 24 horas entre dezembro de 2017 e junho de 2020 nas regiões de Cádiz, Córdoba, Huelva e Sevilla.<sup>50</sup> Houve exclusão daqueles RN com outras síndromes que pudessem interferir nos resultados ou cujos responsáveis legais negaram participar do estudo.<sup>50</sup>

O número de nascidos vivos nas regiões não foi citado em nenhum dos estudos, somente a quantidade de triados, o que impediu o cálculo da cobertura da TNFC nessas localizadas.<sup>26,50</sup> Todos os pacientes com triagem positiva foram

submetidos ao teste do suor para confirmação diagnóstica. Todavia, Pecellín *et al.* (2022) não descreveram de forma pormenorizada as técnicas usadas para mensuração do cloreto no teste do suor.<sup>50</sup> Ademais, o caso 9 não foi submetido ao teste do suor e apresentou a mutação c.1521\_1523delCTT/c.1853\_1863del pela análise genética.<sup>50</sup> Sadik *et al.* (2019) seguiram a técnica padronizada de iontoforese por pilocarpina da Macroduct®.<sup>26</sup> Também foi utilizada testes moleculares para detecção de duas variantes patológicas do gene CFTR.<sup>26</sup> Foram considerados falsos positivos os RN com teste do suor positivo para FC e que portavam uma ou nenhuma variante.<sup>26</sup> A tabela 4 apresenta as metodologias e os valores de corte das estratégias incluídas.<sup>26,50</sup>

Sadik *et al.* (2019) em relação aos pontos de corte adotados, observa-se que na estratégia IRT/IRT, para o IRT1, foi usado o percentil 99 da população do estudo, enquanto, para o IRT2, o valor fixo de 40 ng/mL foi instituído.<sup>26</sup> Esses valores foram considerados a fim de reduzir o número de falsos positivos.<sup>26</sup> Já no protocolo IRT/PAP/IRT, o valor de corte do IRT1 foi de 50 ng/mL, visando melhorar a detecção de verdadeiros positivos pelo PAP nos intervalos entre 50 e 61 ng/mL de IRT1.<sup>26</sup> Para a segunda etapa (PAP), o valor de corte fixo do PAP foi de 2,1 ng/mL.<sup>26</sup> Por sua vez, na terceira etapa, o ponto de corte do IRT2 variou a depender do valor anterior do PAP, sendo: 1)  $IRT2 \geq 40$  ng/mL, independentemente do PAP, ou 2)  $35 < IRT2 < 40$  ng/ml, para valores de PAP  $\geq 3,8$  ng/mL.<sup>26</sup> Para o IRT2 positivo, o indivíduo foi classificado como TNFC positiva.<sup>26</sup>

Os pontos de corte aplicados por Pecellín *et al.* (2022) na estratégia IRT/IRT foram de 50 e 35 ng/mL, respectivamente, para o IRT1 e IRT2.<sup>50</sup> No que tange ao protocolo IRT/PAP/IRT, esses valores basearam-se nas recomendações de Garcia *et al.* (2020) e Sarles *et al.* (2005), em que o ponto de corte do IRT1 é de 50 ng/mL e o de PAP é variável a depender do valor do IRT1, ou seja, de 1,95 ng/mL para níveis de IRT1 entre 50 e 80 ng/mL, ou 1 ng/mL, se IRT1 entre 80 e 150 ng/mL.<sup>35,50,51</sup> A adoção desses dois pontos de corte dependentes dos níveis do IRT1 busca evitar a detecção de CFSPID e, conseqüentemente, aumentar a sensibilidade.<sup>35</sup> Para níveis de PAP alterados, o valor do IRT2 foi fixado em 35 ng/mL.<sup>50</sup> Também foi incluída uma rede de segurança, de modo que casos em que o IRT1 esteve acima de 150 ng/mL, o RN foi submetido diretamente à segunda coleta e à avaliação do IRT2, sem quantificação do PAP.<sup>50</sup>

**Tabela 4.** Metodologia dos protocolos incluídos.

Estudo	Local	Protocolo TNFC	Corte Etapa 1 (ng/mL)	Corte Etapa 2 (ng/mL)	Corte Etapa 3 (ng/mL)	Rede de Segurança (ng/mL)
Sadik, 2019 <sup>26</sup>	Málaga	IRT/IRT	IRT AutoDELFIA p99 ( $\geq 61$ )	IRT AutoDELFIA $\geq 40$	NA	NA
		IRT/PAP/IRT	IRT AutoDELFIA $\geq 50$	PAP MucopAP-F $\geq 2,1$	IRT AutoDELFIA $\geq 40$ (PAP: 2,1 – 3,8) $\geq 35$ (PAP $\geq 3,8$ )	NA
Pecellín, 2022 <sup>50</sup>	Cádiz Córdoba Huelva Sevilla	IRT/IRT	IRT AutoDELFIA $\geq 50$	IRT AutoDELFIA $\geq 35$	NA	NA
		IRT/PAP/IRT	IRT AutoDELFIA $\geq 50$	PAP MucopAP $\geq 1,95$ (IRT1: 50-80) $\geq 1,0$ (IRT1: 80-150)	IRT AutoDELFIA $\geq 35$	IRT1 > 150

**Legenda:** IRT: tripsinogénio imunorreativo. PAP: proteína associada à pancreatite. p99: percentil 99. NA.: não se aplica.

**Fonte:** dados extraídos dos estudos incluídos.

### 5.3 Avaliação do risco de viés dos estudos incluídos

O risco de viés dos estudos incluídos foi avaliado por meio do QUADAS-2, conforme os domínios da ferramenta. Embora tenham descrito os protocolos, nenhum artigo detalhou as perdas de seguimento, tampouco dificuldades nas etapas das estratégias e no manuseio das amostras.<sup>26,50</sup>

O fluxo temporal são as ações feitas entre o início e fim do protocolo, e não foram pontuadas nos artigos.<sup>26,50</sup> A falta de cuidado com o controle desses dados pode ter produzido vieses nos resultados encontrados em ambos os estudos.<sup>26,50</sup> Também não foi possível categorizar se o tempo do protocolo foi apropriado, como indica a figura 3.<sup>26,50</sup>

	Descreve os métodos de seleção dos pacientes?	+	?	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	?	+	+	-
Sadik, 2019	Descreve os pacientes incluídos?	-	?	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	?	+	+	-
	Descreve as perdas no seguimento?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Descreve dificuldades nas etapas do protocolo?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Descreve as dificuldades com as amostras?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Descreve de maneira pormenorizada o protocolo?	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Os pontos de corte utilizados foram justificados?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	O protocolo pode ter induzido a vieses?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Descreve o Teste do Suor ou DNA?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pontua falhas no Teste do Suor ou DNA?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Acrescentou um tempo de observação de FN?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Existe algum risco de o padrão ouro não responder a pergunta da RS?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Descreve os pacientes que não foram incluídos?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Descreve o espaço de tempo (fluxo) e ações executadas entre o início e fim do protocolo?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	O tempo do protocolo foi apropriado?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	O teste de referência foi o mesmo?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Todos os pacientes foram incluídos na análise?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	O fluxo de pacientes pode ter introduzido viés?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pecellín, 2022		+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-

Figura 3. Tabela com análise de risco de viés pelo QUADAS-2.

Fonte: próprio autor.

#### 5.4 Síntese dos resultados

A tabela 5 dispõe dos dados de performance de todos os protocolos incluídos nesta revisão sistemática. Os estudos incluídos expuseram o número de pacientes triados no período e local delimitados, quantidade de IRT1 acima do valor de corte, número de RN elegíveis e submetidos à segunda etapa do protocolo, bem como os referenciados para o teste do suor e os casos confirmados de FC.<sup>26,50</sup>

Nenhum dos dois estudos discriminou a presença ou ausência do íleo meconial entre os falsos negativos.<sup>26,50</sup> Também não foram registrados dados referentes à perda de amostras, ao tempo de coleta do IRT1 e do PAP, tampouco ao custo-efetividade<sup>26,50</sup>

No que tange à rede de segurança usada pelo protocolo IRT/PAP/IRT de Pecellín *et al.* (2022), 15 RN foram detectados com IRT1  $\geq 150$  ng/mL.<sup>50</sup> Destes, 4 (26,67%) foram diagnosticados com FC a partir do teste do suor seguido do perfil genético, enquanto 1 apresentou cisto mesentérico, um falso positivo.<sup>50</sup>

Observa-se também a presença de 1 RN falso negativo em cada estudo, sendo que, no caso de Sadik *et al.* (2019), esse lactente não conseguiu ser identificado pela estratégia IRT/PAP/IRT após apresentar PAP de 0,99 ng/mL.<sup>26</sup> Também foram identificadas variáveis que influenciaram o aumento da concentração do PAP como o sexo biológico e peso inferior a 2500g.<sup>26</sup> Já no caso de Pecellín *et al.* (2022), o caso falso negativo foi identificado nas duas estratégias adotadas.<sup>50</sup>

Os resultados sobre a performance de cada protocolo foram obtidos através da sensibilidade, especificidade, VPP e VPN.<sup>26,50</sup> Em relação ao VPP, comparando as duas estratégias, observa-se um aumento de 145,7% no estudo de Sadik *et al.* (2019) e de 79,1% no estudo de Pecellín *et al.* (2022) no protocolo IRT/PAP/IRT.<sup>26,50</sup> Esse aumento está associado a uma manutenção de uma boa sensibilidade e especificidade.<sup>26,50</sup>

Ainda que a sensibilidade tenha sido a mesma entre os dois protocolos, Pecellín *et al.* (2022) obtiveram um VPP para o IRT/PAP/IRT (IC95% = 36,6-47,5) cujos intervalos de confiança não se sobrepuseram ao VPP do protocolo

IRT/IRT (IC95% = 18,8-28,2).<sup>50</sup> Este achado significativo mostra que a estratégia IRT/PAP/IRT também é superior.<sup>50</sup>

Nota-se também que no estudo de Sadik *et al.* (2019) os valores do IC 95% do VPP das estratégias se sobrepõem.<sup>26</sup> Assim, existem valores do VPP que podem ser atribuídos para ambos os protocolos, o que sugere um dado inconsistente.<sup>26</sup>

**Tabela 5.** Performance das estratégias IRT/IRT e IRT/PAP/IRT utilizadas nos estudos incluídos com os intervalos de confiança de 95%.

Estudo	Local	Triados para FC	Protocolo TNFC	TNFC Positiva	Falso Positivo N (%)	FC confirmada pela TN N (I)	Falso Negativo (I)	Total FC N (I)	Perda de Seguimento N (%)	Sensibilidade (%) IC95%	Especificidade (%) IC95%	VPP (%) IC95%	VPN (%) IC95%	Incidência da FC
Sadik, 2019 <sup>26</sup>	Málaga	68.502	IRT/IRT	93	79 (84,9)	14 (1:4.893)	0	14 (1:4.893)	NI	100 (96,4-100)	99,9 (99,8-99,9)	15,1 (7,2-22,8)	100 (99,9-100)	1:4893
		68.502	IRT/PAP/IRT	35	22 (62,8)	13 (1:5.270)	1 (1:68.467)	14 (1:4.893)	0	92,9 (75,7-100)	100 (99,9-100)	37,1 (19,7-54,5)	100 (99,9-100)	1:4893
Pecellín, 2022 <sup>50</sup>	Cádiz Córdoba Huelva Sevilla	60.399	IRT/IRT	34	25 (73,5)	9 (1:6.711)	1 (1:60.365)	10 (1.6.039)	524 (0,867)	88,9 (85,4-92,3)	91,5 (88,5-94,6)	23,5 (18,8-28,2)	99,6 (98,9-100)	1:6039
		60.399	IRT/PAP/IRT	19	10 (52,6)	9 (1:6.711)	1 (1:60.380)	10 (1:60.380)	524 (0,867)	88,9 (85,4-92,3)	96,4 (94,4-98,5)	42,1 (36,6-47,5)	99,6 (99-100)	1:6039

**Legenda:** TNFC: triagem neonatal para fibrose cística. IC95%: intervalo de confiança de 95%. VPP: valor preditivo positivo. VPN: valor preditivo negativo. FC: fibrose cística. NA: não se aplica. NI: não informado.

**Fonte:** dados extraídos dos estudos incluídos.

## 6. DISCUSSÃO

Esta revisão sistemática buscou comparar a performance das estratégias IRT/IRT e IRT/PAP/IRT aplicadas simultaneamente na triagem neonatal para a Fibrose Cística. O protocolo IRT/PAP/IRT apresentou um melhor VPP, sem perdas da sensibilidade nem da especificidade quando comparado com o IRT/IRT.

Após uma revisão ampla da literatura, somente dois artigos foram incluídos na amostra final, dado que não foram encontrados outros estudos que compararam a performance da estratégia de TNFC utilizando o protocolo IRT/IRT com o IRT/PAP/IRT. Nos países desenvolvidos e com baixa miscigenação populacional, o uso de estratégias de triagem com uso da análise genética estendida (EGA) em uma das etapas tem sido predominante, para potencializar ainda mais a sensibilidade e o VPP.<sup>8</sup> De fato, Sommerburg e Hammermann (2020) identificaram que apenas Portugal utiliza a estratégia IRT/PAP/IRT dentre amostras populacionais contemplando alguns países europeus e os EUA.<sup>8</sup> Esses autores relataram que a Noruega faz uso do IRT/DNA/EGA, a Dinamarca, do IRT/DNA(1)/EGA, e a Holanda, do IRT/PAP/DNA(35)/EGA.<sup>8</sup>

Ademais, os estudos observacionais, modelo usado para avaliação da TNFC, apresentam limitações intrínsecas ao desenho que comprometem a qualidade do estudo.<sup>26,50,52</sup> A seleção inadequada da amostra, ausência de cegamento na avaliação dos desfechos, falhas para amenizar os fatores de confusão e perda de seguimento são exemplos deste gargalo.<sup>52</sup> Ainda, Sadik *et al.* (2019) e Pecellín *et al.* (2022) não descreveram pontos fundamentais pela perspectiva operacional da TNFC, como o tempo de coleta do IRT1 e do PAP, o tempo para chegada da amostra ao laboratório, o tempo entre a chegada e o resultado do teste, as intervenções realizadas entre o diagnóstico presuntivo e confirmatório, a cobertura regional da TNFC e o tempo para primeira consulta.<sup>26,50</sup> Ambos apresentaram, portanto, uma baixa qualidade de evidências.<sup>26,50</sup>

Embora ambos os estudos tenham concluído que a estratégia IRT/PAP/IRT seja superior à IRT/IRT, Sadik *et al.* (2019) apresentaram uma performance melhor.<sup>26,50</sup> Uma hipótese que pode explicar tal discrepância é a diferença metodológica atribuída aos estudos, como a ausência de rede de segurança e o uso de

um valor fixo para o PAP (2,1 ng/mL).<sup>26,50</sup> Além dessas divergências, o VPP de Pecellín *et al.* (2022) pode ter sido comprometido em decorrência dos baixos pontos de corte para o IRT1 (50 ng/mL) e IRT2 (35 ng/mL).<sup>50</sup> Em contrapartida, o amplo intervalo de confiança do VPP encontrado por Sadik *et al.* (2019) sugere imprecisão na confirmação diagnóstica pela dosagem de cloreto no suor.<sup>26</sup>

A princípio, o uso da rede de segurança para o IRT/PAP/IRT ainda é controverso. Por um lado, Marcão *et al.* (2018) estabeleceram uma rede de segurança para valores de IRT1 acima de 150 ng/mL e afirmaram que todos os RN com FC seriam identificados mesmo sem seu uso.<sup>39</sup> Por outro lado, a rede de segurança correspondeu a 4 (40%) casos confirmados de FC no estudo de Pecellín *et al.* (2022).<sup>50</sup> Do mesmo modo, Sommerburg e Hammermann (2020) defendem sua implementação a partir do percentil 99.9, a fim de amenizar o impacto de protocolos puramente bioquímicos (e.g. IRT/IRT e IRT/PAP/IRT) sobre a sensibilidade.<sup>8</sup> O uso da rede de segurança, portanto, mostrou-se vantajoso na TNFC.<sup>8,50</sup>

Em relação ao PAP, Sarles *et al.* (2005) propuseram dois valores de corte dependentes do IRT1, a fim de evitar a detecção de CFSPID e otimizar a sensibilidade.<sup>35</sup> Em contrapartida, Sommerburg e Hammermann (2020) sugeriram, após avaliação de protocolos com PAP, que a sensibilidade de pontos de corte dependentes do IRT1 é limitada quando comparada com um ponto de corte fixo para o PAP.<sup>8</sup> Marcão *et al.* (2018) também haviam adotado dois valores de corte para o PAP (1,6 ng/mL ou 0,5 ng/mL associado à IRT1 entre 100 e 150 ng/mL) no estudo piloto com IRT/PAP/IRT e relataram 161 reconvocações a mais, que poderiam ser evitadas se o corte fosse superior a 1,6 ng/mL.<sup>39</sup> Os achados deste estudo confirmam essas hipóteses, uma vez que o uso de um ponto de corte fixo de PAP em 2,1 ng/mL obteve um melhor VPP para o protocolo IRT/PAP/IRT.<sup>26,50</sup>

Além disso, entre 2002 e 2006 na Argentina, Teper *et al.* (2021) descreveram uma coorte prospectiva submetida ao protocolo IRT/IRT. Dos 918 RN com IRT1 elevado (60 ng/mL), 207 (22,54%) não realizaram a segunda coleta (IRT2), evidenciando outra desvantagem do IRT/IRT: a perda de seguimento.<sup>44</sup> Em vista deste problema, García *et al.* (2020) propuseram exames de segundo nível, como a segunda etapa baseada na dosagem de PAP da primeira amostra, a fim de reduzir a perda de seguimento, a necessidade de novas coletas e os custos

operacionais.<sup>51</sup> Analogamente aos resultados desta revisão sistemática, os autores também encontraram uma redução de 75% na taxa de falsos positivos e um aumento do VPP de 147,33% a partir do uso do PAP como segunda etapa.<sup>51</sup>

Ainda sobre a redução dos custos em Saúde Pública, a TNFC também pode ser otimizada a partir da definição de pontos de corte adaptados para o contexto genético e populacional, de acordo com Kloosterboer *et al.* (2009).<sup>53</sup> No que diz respeito ao ponto de corte do IRT1, Farrell e Sommerburg (2017) e Castellani *et al.* (2018) recomendam que seja variável de acordo com o percentil das amostras, com o intuito de maximizar a sensibilidade e VPP para a população.<sup>54,55</sup> Nesse contexto, os valores mínimos de sensibilidade e VPP definidos pela ECFS para a TNFC são de, respectivamente, 95% e 30%, o que foi atingido pelo protocolo IRT/PAP/IRT de Sadik *et al.* (2019).<sup>26,55</sup>

Contudo, ainda há lacunas na literatura quanto à precisão do uso do percentil para definir o ponto de corte do IRT1. Por exemplo, na Hungria, Xue *et al.* (2023) valeram-se do percentil 95 de 10.000 amostras para atingir o corte de 65 ng/mL, obtendo uma sensibilidade de 88% e um VPP de 5,9%, considerados insuficientes para a TNFC.<sup>56</sup> Em Portugal, o mesmo valor de corte (65 ng/mL) foi atingido por Marcão *et al.* (2018) a partir do percentil 99 de 20.000 amostras, que atingiu sensibilidade de 94,44% (IC 95% = 81,85 - 98,47) e VPP de 41,03% (IC 95% = 30,78 - 52,11).<sup>39</sup> Essas informações revelam que o uso do percentil exige uma análise de um número de amostras extenso e que valores mais altos de percentil podem reduzir o número de falsos positivos e, conseqüentemente, otimizar a sensibilidade e o VPP adequadamente.

Ademais, na Península Ibérica, Marcão *et al.* (2018) e Sadik *et al.* (2019) fizeram uso do percentil 99 e obtiveram valores de corte de, respectivamente, 65 ng/mL e 61 ng/mL.<sup>26,39</sup> Embora ambos os estudos tenham atingido uma performance adequada pelas recomendações da ECFS, as populações são geograficamente limitadas e possuem histórico de povoamento pelos mouros entre 711 e 1492.<sup>26,39,55</sup> Há, logo, impacto direto da similaridade genética na validade externa da adição do PAP nas estratégias bioquímicas de TNFC.

Na Argentina, Teper *et al.* (2020) encontraram uma sensibilidade de 100% para o IRT/PAP (IC 95% = 64,6-100) e de 80% para o IRT/IRT (IC 95% = 38-

99).<sup>44</sup> Apesar de concluírem que o IRT/PAP tenha sido superior, os intervalos de confiança são amplos e se sobrepõem, o que sugere uma inconsistência dos dados.<sup>44</sup> Na Áustria, Zeyda *et al.* (2021) apresentaram menor taxa de reconvocação com IRT/PAP (0,20%) em relação ao IRT/IRT (0,88%).<sup>45</sup> Além da segunda amostra, o VPP do IRT/PAP (29,2%) foi superior quando comparado ao IRT/IRT (14%).<sup>45</sup> Contudo, não são apresentados os IC 95% para melhor análise da validade externa do PAP.<sup>45</sup>

Na Sérvia, Munck *et al.* (2022) identificaram 4 casos de FC pela TNFC, atingindo uma sensibilidade de 100% e um VPP de 40% com o protocolo IRT/PAP/IRT na região da Voivodina.<sup>48</sup> Não foram reportados falsos negativos.<sup>48</sup> Na Hungria, Xue *et al.* (2023) utilizaram a estratégia IRT/IRTxPAP/IRT com rede de segurança e, dos 256 RN com triagem positiva, 238 (92,97%) eram falsos positivos.<sup>56</sup> De fato, a sensibilidade e o VPP baixos indicam que a estratégia deve ser reavaliada para alteração dos pontos de corte ou para substituição por outro protocolo mais sensível de TNFC, como o IRT/DNA.<sup>57</sup> Ainda que a adição do PAP possua menor sensibilidade e VPP em relação aos protocolos com DNA ou EGA usados por países desenvolvidos, ela é indicada para países com restrições éticas e legais para análise genética e com alta miscigenação populacional, e, obviamente, nos países com limitações de recursos.<sup>8,39</sup>

Outrossim, a idade durante a coleta é uma variável que influencia nas concentrações do IRT e do PAP.<sup>8,25</sup> Por um lado, Therrell *et al.* (2012) identificaram que nas primeiras 24 horas de vida, a concentração do IRT reduz.<sup>25</sup> Após este período, há uma estabilização em 20 ng/mL, com posterior declínio a partir do décimo dia.<sup>25</sup> De fato, coletas tardias do IRT1 podem culminar no aumento da taxa de falsos negativos.<sup>25</sup>

Por outro lado, o tempo de coleta do PAP acima de 168 horas após o nascimento foi apontado como uma causa significativa de falso positivo por Langen *et al.* (2013).<sup>32</sup> Nas coletas realizadas após 7 dias, o odds ratio (OR) encontrado para o ponto de corte de 1,6 ng/ml foi de 8,54 (IC95% = 6,95-10,48), enquanto, para o valor de 3 ng/ml, o OR foi de 14.23 (IC 95% = 10.38-19.50). Estes dados também indicam, em decorrência da coleta tardia, uma queda da sensibilidade de protocolos que contêm o PAP.<sup>32,39</sup>

Todavia, nenhum dos artigos incluídos descreveram o intervalo temporal entre as ações da TNFC, o que impossibilitou a avaliação por este estudo do impacto da coleta acima de 7 dias.<sup>26,50</sup> No entanto, Zybert *et al.* (2022) descreveram as manifestações clínicas, como infecções respiratórias, baixo peso, tosse, diarreia e insuficiência pancreática, em função da idade ao diagnóstico tardio, que variou entre 2 e 180 meses de vida.<sup>58</sup> Sabe-se, pois, que o manejo adequado e um desfecho clínico favorável dependem de uma coleta realizada no tempo preconizado pela TN, entre o terceiro e quinto dia de vida.<sup>5,58</sup>

No que se refere aos falsos negativos, deve existir uma diferenciação entre falsos negativos com ou sem íleo meconial, uma vez que as concentrações de IRT podem estar reduzidas nesses indivíduos, de acordo com Munck *et al.* (2021).<sup>59</sup> Nesse cenário, o PAP é vantajoso por ser sensível na presença de íleo meconial, o que reduz a taxa de falso negativo na TNFC.<sup>55,59</sup> Para que não haja interferências de ampla magnitude na TNFC, a ECFS recomenda que a identificação seja feita de forma clínica, e que a sensibilidade seja calculada considerando tanto a presença quanto a ausência do íleo meconial.<sup>55</sup>

Ao avaliar os resultados da TNFC, Dankert-Roelse *et al.* (2019) descreveram que a sensibilidade aumentou de 88% (IC 95% = 81-83) para 90% (IC 95% = 82-94) ao desconsiderar os casos de íleo meconial.<sup>60</sup> Desse modo, se fosse apontado a presença ou ausência desta condição, a sensibilidade de Sadik *et al.* (2019) e Pecellín *et al.* (2022) poderiam ser mais precisas e possibilitaria uma melhor avaliação da precisão da estratégia na Andaluzia.<sup>26,50</sup> Ao informar os falsos negativos com íleo meconial, também é possível submeter o RN diretamente ao teste do suor ou estudo genético para FC.<sup>57</sup> Ressalta-se a importância, pois, do cálculo da sensibilidade a partir da natureza dos falsos negativos.<sup>54</sup>

Todavia, esta revisão sistemática apresentou limitações. Devido à impossibilidade de uniformização dos pontos de corte e à seleção dos indivíduos de cada estudo, a meta-análise não foi realizada, comprometendo a comparação entre os protocolos IRT/IRT e IRT/PAP/IRT.<sup>26,50</sup> Também avaliou somente estudos científicos oriundos de países desenvolvidos, revelando não só a escassez de dados em regiões com poucos recursos em saúde pública, mas também o comportamento dos protocolos nessas populações em específico.<sup>26,50</sup> Ademais, são estudos de baixa qualidade metodológica, com presença de vieses e pouco

esclarecimento operacional da TNFC.<sup>26,50,52</sup> Por conseguinte, a deliberação para adoção do protocolo IRT/PAP/IRT para países em desenvolvimento, como o Brasil, deve ser feita cautelosamente.

## 7. CONCLUSÃO

Os dados desta revisão sistemática apontam que a estratégia IRT/PAP/IRT é superior à IRT/IRT na TNFC. É necessária a realização de novos estudos pilotos com o protocolo IRT/PAP/IRT em regiões com alta frequência alélica do CFTR, com recursos escassos em Saúde Pública e/ou com restrições do uso da análise genética. Como o Brasil se encaixa nesses critérios, o Ministério da Saúde pode reavaliar e orientar novos rumos do PNTN com diligência.

Em virtude da escassez de informações operacionais dos estudos observacionais que envolvem a TNFC, faz-se necessário, nos futuros estudos pilotos, o registro dos indicadores da triagem, como o tempo de coleta do IRT1, o tempo entre a coleta e a chegada ao laboratório, o tempo entre a chegada e o resultado e o tempo para primeira consulta. Será possível, portanto, identificar gargalos e, conseqüentemente, aprimorar a análise dos protocolos de TNFC.

## 8. REFERÊNCIAS

1. Goldman L, Schafer AI. Cecil Medicine. In: GOLDMAN L, SCHAFFER AI, editors. 25<sup>a</sup>. Filadélfia: Elsevier; 2016.
2. David J, Chrastina P, Pešková K, Kožich V, Friedecký D, Adam T, et al. Epidemiology of rare diseases detected by newborn screening in the Czech Republic. *Cent Eur J Public Health*. 2019 Jun 1;27(2):153–9.
3. Raskin S, Pereira-Ferrari L, Caldeira Reis F, Abreu F, Marostica P, Rozov T, et al. Incidence of cystic fibrosis in five different states of Brazil as determined by screening of p.F508del mutation at the CFTR gene in newborns and patients. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2008;7(1):15–22.
4. Ministério da Saúde. *Triagem Neonatal Biológica: Manual Técnico*. Brasília-DF; 2016.
5. Ministério da Saúde. *Manual de Normas Técnicas e Rotinas Operacionais do Programa Nacional de Triagem Neonatal*. Brasília-DF; 2002.
6. Godoy C, Paixão DC, Boa-Sorte NCA, Amorim T, da Silva Filho LVR, Souza EL. Five-year performance analysis of a cystic fibrosis newborn screening program in northeastern Brazil. *Jornal de Pediatria (Rio J)*. 2023; 99(1):23–30.
7. Sommerburg O, Krulisova V, Hammermann J, Lindner M, Stahl M, Muckenthaler M, et al. Comparison of different IRT-PAP protocols to screen newborns for cystic fibrosis in three central European populations. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2014;13(1):15–23.
8. Sommerburg O, Hammermann J. Pancreatitis-associated protein in neonatal screening for cystic fibrosis: strengths and weaknesses. Vol. 6, *International Journal of Neonatal Screening*. MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2020.
9. Bergeron C, Cantin AM. Cystic Fibrosis: Pathophysiology of Lung Disease. *Semin Respir Crit Care Med*. 2019; 40(6):715–26.
10. Kerem BS, M RJ, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the Cystic Fibrosis Gene: genetic analysis. *Science*; 1989; 245:1073–80.
11. Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Cloning and Characterization of Complementary DNA. *Science*; 1989; 245:1066–73.
12. Boucher RC. Airway surface dehydration in cystic fibrosis: Pathogenesis and therapy. Vol. 58, *Annual Review of Medicine*; 2007. p. 157–70.
13. Sellers ZM. Pancreatic complications in children with cystic fibrosis. Vol. 32, *Current Opinion in Pediatrics*. Lippincott Williams and Wilkins; 2020. p. 661–7.
14. Quinton PM. Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature*. 1983; 301:421–2.
15. Scotet V, L’hostis C, Férec C. The changing epidemiology of cystic fibrosis: Incidence, survival and impact of the CFTR Gene discovery. Vol. 11, *Genes*. MDPI AG; 2020.
16. Bareil C, Bergougnoux A. CFTR gene variants, epidemiology and molecular pathology. *Archives de Pédiatrie*. 2020. p. 8-12.
17. Quinton PM. Physiological Basis of Cystic Fibrosis: A Historical Perspective. *Physiol Rev*. 1999; 79(1).

18. Vendresculo FM, Donadio MVF, Pinto LA. Cystic fibrosis in Brazil: achievements in survival. *Jornal Brasileiro de Pneumologia e Tisiologia*. 2021.
19. da Silva Filho LVRF, Zampoli M, Cohen-Cyberknoh M, Kabra SK. Cystic fibrosis in low and middle-income countries (LMIC): A view from four different regions of the world. Vol. 38, *Paediatric Respiratory Reviews*. W.B. Saunders Ltd; 2021. p. 37–44.
20. Registro Brasileiro de Fibrose Cística (REBRAFC) [Internet]. Disponível em: [www.gbefc.org.br](http://www.gbefc.org.br)
21. Travert G, Heeley M, Heeley A. History of newborn screening for cystic fibrosis - The early years. Vol. 6, *International Journal of Neonatal Screening*. MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2020.
22. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria GM MS 2829/2012.
23. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria GM MS 1369/2022.
24. Sadigurschi G, Vaz Micherino B, Assunção Mendes da Cunha MB, Antão Paiva CL, da Silva e Sá GR. Analysis of national coverage of neonatal cystic fibrosis screening in Brazil from 2008 to 2017. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*. 2022;35(25):5204–9.
25. Therrell BL, Hannon WH, Hoffman G, Ojodu J, Farrell PM. Immunoreactive trypsinogen (IRT) as a biomarker for cystic fibrosis: Challenges in newborn dried blood spot screening. In: *Molecular Genetics and Metabolism*. 2012. p. 1–6.
26. Sadik I, Pérez de Algaba I, Jiménez R, Benito C, Blasco-Alonso J, Caro P, et al. Initial Evaluation of Prospective and Parallel Assessments of Cystic Fibrosis Newborn Screening Protocols in Eastern Andalusia: IRT/IRT versus IRT/PAP/IRT. *Int J Neonatal Screen*. 2019;5(3):32.
27. Scotet V, Gutierrez H, Farrell PM. Newborn screening for CF across the globe-where is it worthwhile? Vol. 6, *International Journal of Neonatal Screening*. MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2020.
28. Castellani C, Southern KW, Brownlee K, Dankert Roelse J, Duff A, Farrell M, et al. European best practice guidelines for cystic fibrosis neonatal screening. Vol. 8, *Journal of Cystic Fibrosis*. 2009. p. 153–73.
29. Fletcher GS. *Epidemiologia Clínica: Elementos Essenciais*. 6th ed. Porto Alegre: Grupo A; 2021.
30. Arrudi-Moreno M, García-Romero R, Samper-Villagrasa P, Sánchez-Malo MJ, Martín-de-Vicente C. Neonatal cystic fibrosis screening: Analysis and differences in immunoreactive trypsin levels in newborns with a positive screen. *Anales de Pediatría (English Edition)*. 2021 Jul;95(1):11–7.
31. Sommerburg O, Lindner M, Muckenthaler M, Kohlmüller D, Leible S, Feneberg R, et al. Initial evaluation of a biochemical cystic fibrosis newborn screening by sequential analysis of immunoreactive trypsinogen and pancreatitis-associated protein (IRT/PAP) as a strategy that does not involve DNA testing in a Northern European population. *J Inherit Metab Dis*. 2010;33(SUPPL. 2).
32. Vernooij-Van Langen AMM, Loeber JG, Elvers B, Triepels RH, Roefs J, Gille JJ, et al. The influence of sex, gestational age, birth weight, blood transfusion, and timing of the heel prick on the pancreatitis-associated protein concentration in newborn screening for cystic fibrosis. *J Inherit Metab Dis*. 2013;36(1):147–54.

33. Sarles J, Giorgi R, Berthézène P, Munck A, Cheillan D, Dagorn JC, et al. Neonatal screening for cystic fibrosis: Comparing the performances of IRT/DNA and IRT/PAP. *Journal of Cystic Fibrosis* [Internet]. 13(4):384–90. Disponible em: <https://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&id=L52996829&from=export>
34. Nshimyumukiza L, Bois A, Daigneault P, Lands L, Laberge AM, Fournier D, et al. Cost effectiveness of newborn screening for cystic fibrosis: A simulation study. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2014;13(3):267–74.
35. Sarles J, Berthézène P, Louarn C Le, Somma C, Perini JM, Catheline M, et al. Combining immunoreactive trypsinogen and pancreatitis-associated protein assays, a method of newborn screening for cystic fibrosis that avoids DNA analysis. *Journal of Pediatrics* [Internet]. 147(3):302–5. Disponible em: <https://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&id=L41345757&from=export>
36. RevMan Web. Disponible em: <https://revman.cochrane.org/info>.
37. Seror V, Cao C, Roussey M, Giorgi R. PAP assays in newborn screening for cystic fibrosis: a population-based cost-effectiveness study. *J Med Screen* [Internet]. 23(2):62–9. Disponible em: <https://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&id=L619172424&from=export>
38. Krulišová V, Balašèaková M, Skalická V, Piskàèková T, Holubová A, Paděrová J, et al. Prospective and parallel assessments of cystic fibrosis newborn screening protocols in the Czech Republic: IRT/DNA/IRT versus IRT/PAP and IRT/PAP/DNA. Vol. 171, *European Journal of Pediatrics*. 2012. p. 1223–9.
39. Marcão A, Barreto C, Pereira L, Vaz LG, Cavaco J, Casimiro A, et al. Cystic Fibrosis Newborn Screening in Portugal: PAP Value in Populations with Stringent Rules for Genetic Studies. *Int J Neonatal Screen* [Internet]. 2018;4(3):22. Disponible em: <http://dx.doi.org/10.3390/ijns4030022>
40. Ploeg CPB van der, Marle ME van den A van, Langen AMMV van, Elvers LH, Gille JJP, Verkerk PH, et al. Cost-effectiveness of newborn screening for cystic fibrosis determined with real-life data. *Journal of Cystic Fibrosis* [Internet]. 2015;14(2):194–202. Disponible em: <https://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&id=L602517232&from=export>
41. Weidler S, Stopsack KH, Hammermann J, Sommerburg O, Mall MA, Hoffmann GF, et al. A product of immunoreactive trypsinogen and pancreatitis-associated protein as second-tier strategy in cystic fibrosis newborn screening. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2016 Nov 1;15(6):752–8.
42. Sommerburg O, Stahl M, Hammermann J, Okun JG, Kulozik A, Hoffmann G, et al. Newborn Screening on Cystic Fibrosis in Germany: Comparison of the new Screening Protocol with an Alternative Protocol. *Klin Padiatr* [Internet]. 229(2):59–60. Disponible em: <https://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&id=L615647418&from=export>
43. Schmidt M, Werbrouck A, Verhaeghe N, Wachter E De, Simoens S, Annemans L, et al. A model-based economic evaluation of four newborn screening strategies for cystic fibrosis in Flanders, Belgium. *Acta Clin Belg* [Internet]. 75(3):212–20. Disponible em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31007159/>

44. Teper A, Smithuis F, Rodríguez V, Salvaggio O, Maccallini G, Aranda C, et al. Comparison between two newborn screening strategies for cystic fibrosis in Argentina: IRT/IRT versus IRT/PAP. *Pediatr Pulmonol*. 2021 Jan 1;56(1):113–9.
45. Zeyda M, Schanzer A, Basek P, Bauer V, Eber E, Ellemunter H, et al. Cystic fibrosis newborn screening in Austria using PAP and the numeric product of PAP and IRT concentrations as second-tier parameters. *Diagnostics* [Internet]. 2021;11(2):299. Disponível em: <https://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&id=L2007617727&from=export>
46. Bianchimani C, Dolce D, Centrone C, Campana S, Ravenni N, Orioli T, et al. Impact of Pancreatitis-Associated Protein on Newborn Screening Outcomes and Detection of CFTR-Related Metabolic Syndrome (CRMS)/Cystic Fibrosis Screen Positive, Inconclusive Diagnosis (CFSPID): A Monocentric Prospective Pilot Experience. *Int J Neonatal Screen* [Internet]. 2022;8(3):46. Disponível em: <https://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&id=L2019208156&from=export>
47. Munck A, Berger DO, Southern KW, Carducci C, Groot KM de W de, Gartner S, et al. European survey of newborn bloodspot screening for CF: opportunity to address challenges and improve performance. *Journal of Cystic Fibrosis* [Internet]. 2022. Disponível em: <https://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&id=L2021160061&from=export>
48. Palmieri C, Timpano R, Marasco O, Scozzafava G, Martucci M, Tuccio G, et al. A study encouraging the use of IRT/PAP strategy for neonatal screening of cystic fibrosis. *J Inherit Metab Dis* [Internet]. 34:S24–S24. Disponível em: <https://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&id=L70499998&from=export>
49. Calvin J, Hogg SL, McShane D, McAuley SA, Iles R, Ross-Russell R, et al. Thirty-years of screening for cystic fibrosis in East Anglia. *Arch Dis Child*. 2012 Dec;97(12):1043–7.
50. Pecellín ID, Gallego MEQ, Vallellano JM, Bodineau JLLC, Ríos AIÁ, Valera MJM, et al. Papel de la proteína asociada a pancreatitis en el cribado neonatal de la fibrosis quística. *Rev esp patol torac* [Internet]. 34(2):98–104. Disponível em: [https://www.rev-esp-patol-torac.com/resumen\\_articulo.php?id=292&idarticulo=1724](https://www.rev-esp-patol-torac.com/resumen_articulo.php?id=292&idarticulo=1724)
51. García S, Galera R, Soria L, Ramírez A, Aledo-Castillo M, Rubió R, et al. Impacto de La Inclusión de Pruebas de Segundo Nivel en el Programa de Cribado Neonatal de Cataluña y en Otros Programas Internacionales [Internet]. Vol. 94, *Rev Esp Salud Pública*. Barcelona; 2020. Disponível em: [www.msbs.es/respCorrespondencia](http://www.msbs.es/respCorrespondencia):
52. Brasil. Ministério da Saúde. Diretrizes Metodológicas: Sistema GRADE - manual de gradação da qualidade da evidência e força de recomendação para tomada de decisão em saúde. Brasília-DF. 2014.
53. Kloosterboer M, Hoffman G, Rock M, Gershan W, Laxova A, Li Z, et al. Clarification of laboratory and clinical variables that influence cystic fibrosis newborn screening with initial analysis of immunoreactive trypsinogen. *Pediatrics*. 2009 Feb;123(2).
54. Farrell P, White T, Ren C, Hempstead S, Accurso F, Derichs N, et al. Diagnostic of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation. *The Journal of Pediatrics*; 2017.
55. Castellani C, Duff AJA, Bell SC, Heijerman HGM, Munck A, Ratjen F, et al. ECFS best practice guidelines: the 2018 revision. Vol. 17, *Journal of Cystic Fibrosis*. Elsevier B.V.; 2018. p. 153–78.

56. Xue A, Lénárt I, Kincs J, Szabó H, Párniczky A, Balogh I, et al. Neonatal Screening for Cystic Fibrosis in Hungary—First-Year Experiences. *Int J Neonatal Screen*. 2023 Sep 1;9(3).
57. Pecellín ID, Ruiz EP, Ríos AIÁ, Pecellín CD, Macías RY, Hernández LC, et al. Results of the Andalusian Cystic Fibrosis Neonatal Screening Program, 5 Years After Implementation. *Arch Bronconeumol (Engl Ed) [Internet]*. 54(11):551–8. Disponible em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arbres.2018.03.013>
58. Zybert K, Borawska-Kowalczyk U, Wozniacki L, Dawidziuk M, Ołtarzewski M, Sands D. Clinical complications in children with false-negative results in cystic fibrosis newborn screening. *J Pediatr (Rio J)*. 2022 Jul 1;98(4):419–24.
59. Munck A, Southern KW, Castellani C, de Winter-de Groot KM, Gartner S, Kashirskaya N, et al. Defining key outcomes to evaluate performance of newborn screening programmes for cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2021 Sep 1;20(5):820–3.
60. Darkert-Roelse et al 2019 - Newborn bloodspot screening for CF with a four-step screening strategy in the Netherlands.