



## Diagnóstico precoce: resultados preliminares do rastreio metabólico alargado

Laura Vilarinho<sup>1,2</sup>, Hugo Rocha<sup>1</sup>, Ana Marcão<sup>1</sup>, Carmen Sousa<sup>1</sup>, Helena Fonseca<sup>1</sup>, Mário Bogas<sup>1</sup>, Rui Vaz Osório<sup>2</sup>

1 - Laboratório Nacional de Rastreios, Instituto de Genética Médica Jacinto de Magalhães, Porto

2 - Comissão Nacional para o Diagnóstico Precoce

### Resumo

O Programa Nacional de Diagnóstico Precoce iniciou-se em 1979 com o rastreio da fenilcetonúria (PKU), passando em 1981 a incluir o rastreio do hipotiroidismo congénito (HC).

Em 2005 foi iniciado o rastreio neonatal alargado a mais 13 doenças hereditárias do metabolismo por espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS), num estudo piloto a realizar em 100.000 recém-nascidos. Até ao final do ano foram abrangidas as regiões Norte e Centro tendo sido rastreados 54.650 RN e detectados 12 casos positivos (1/4.554). Foram identificadas seis patologias diferentes, pertencentes aos vários grupos metabólicos estudados: aminoacidopatias (PKU/hiperfenilalaninemia, leucínose), acidúrias orgânicas (acidúria 3-hidroxi-3-metilglutárica), doenças do ciclo da ureia (citrulinemia) e doenças da  $\beta$ -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos (MCAD, LCHAD). Identificaram-se ainda mais quatro casos com três patologias distintas (homocistinúria, tirosinemia tipo I e 3-metilcrotonilglicinúria), não incluídas inicialmente no estudo piloto.

Em função da avaliação efectuada, este estudo vai prosseguir estendendo-se progressivamente a todo o país e incluindo no leque de doenças rastreadas a 3-metilcrotonilglicinúria e a tirosinemia tipo I. Deste modo, o estudo piloto passará a incluir 16 patologias diferentes.

**Palavras-chave:** Rastreio neonatal alargado; MS/MS; Portugal

*Acta Pediatr Port* 2006;37(5):186-91

### Expanded newborn screening in Portugal: preliminary results

#### Abstract

The Portuguese Neonatal Screening Program begun in 1979 with the screening for phenylketonuria (PKU) and since 1981 congenital hypothyroidism screening (CH) has also been included.

In 2005, a pilot study of 100,000 newborns was started, including 13 additional inborn errors of metabolism screened by tandem mass spectrometry (MS/MS). Until the end of the year 2005, 54.650 neonates from the Northern and Centre regions were screened and 12 positive cases (1/4,554) were detected. Six different diseases were identified from all the metabolic groups studied: amino acid disorders (PKU/hyperphenylalaninemia, MSUD), organic acidurias (3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria); urea cycle disorders (citrullinemia) and disorders of mitochondrial fatty acyl-CoA beta-oxidation (MCAD, LCHAD). Four more cases with three different diseases, not included in the pilot study for expanded newborn screening, were identified (homocystinuria, tyrosinemia type I and 3-methylcrotonylglycinuria).

After this evaluation, the study will be expanded to the whole of Portugal including also tyrosinemia type I and 3-methylcrotonylglycinuria. Thus, 16 different disorders will be screened in the pilot study.

**Key-words:** Expanded neonatal screening; MS/MS; Portugal.

*Acta Pediatr Port* 2006;37(5):186-91

#### Introdução

O rastreio neonatal é um programa sistemático destinado a todos os recém-nascidos (RN), tendo como objectivo evitar a evolução da patologia rastreada através do diagnóstico pré-sintomático e da instituição precoce de terapia adequada.

A incorporação de uma determinada doença nos Programas de detecção neonatal deve cumprir diversos critérios, dos quais destacamos <sup>1</sup>: (i) existência de um marcador bioquímico económico, sensível, e específico sem “falsos negativos” e com o menor número possível de “falsos positivos”, aplicável para a identificação da doença ou condição no período pré-sintomático, (ii) existência de possibilidades de tratamento eficaz para a doença que se deseja detectar, sendo a probabilidade de sucesso maior se o tratamento se iniciar no período pré-sinto-

**Recebido:** 02.02.2006

**Aceite:** 28.11.2006

#### Correspondência:

Laura Vilarinho  
Laboratório Nacional de Rastreios  
Instituto de Genética Médica Jacinto de Magalhães  
Praça Pedro Nunes, 88 – 4099-028 Porto  
Tel.: 226070327 / 226070399  
E-mail: laura.vilarinho@igm.min-saude.pt

mático, (iii) frequência e relação custos/benefícios aceitáveis em termos de saúde pública.

O Programa Nacional de Diagnóstico Precoce iniciou-se em 1979 com o rastreio da fenilcetonúria (PKU) <sup>2</sup> e em 1981 passou também a efectuar-se o rastreio do hipotiroidismo congénito (HC). Este Programa tem a sua base no Instituto de Genética Médica (IGM).

A colheita de sangue é actualmente efectuada nos Hospitais ou Centros de Saúde, entre o terceiro e o sexto dias de vida, sendo o sangue colhido para uma ficha com papel de filtro adequado (Schleicher and Schuell 903, S&S) e posteriormente enviado para o Laboratório Nacional de Rastreamentos. Este rastreio é voluntário e tem actualmente uma taxa de cobertura de 99,3% com um tempo médio de início de tratamento de 11,2 dias após o nascimento <sup>3</sup>.

Durante os 27 anos de existência deste Programa foram efectuados estudos piloto para a hiperplasia congénita das supra-renais e défice em biotinidase em 100.000 RN, e para a fibrose quística em 40.000 RN, com o objectivo de determinar o interesse da realização destes rastreios a nível nacional.

No rastreio experimental da hiperplasia congénita das supra-renais, efectuado entre 1986 e 1987, foram detectados sete casos com esta doença (prevalência 1/14.500), mas somente em dois casos o rastreio se antecipou ao diagnóstico clínico <sup>4</sup>. O tempo médio de início de tratamento era então de 20-25 dias, o que nos levou a concluir que o rastreio não deveria ser feito enquanto não fosse possível baixar esse tempo para os 8-10 dias <sup>5</sup>.

Entre 1990 e 1992 procedeu-se ao rastreio piloto da deficiência em biotinidase, tendo sido detectados dois casos de défice parcial (1/50.000) e dois de défice profundo (1/50.000). Dada a baixa prevalência desta afecção a opção foi não a incluir no rastreio sistemático <sup>6</sup>.

Entre 1992 e 1995, em colaboração com o Hospital de Crianças Maria Pia e o Hospital Pediátrico de Coimbra, procedeu-se ao rastreio experimental da fibrose quística tendo sido identificados quatro casos (prevalência 1/10.000) nos distritos do Porto e de Coimbra <sup>6</sup>. Este rastreio não foi implementado devido à inexistência de tratamento específico e à inespecificidade do marcador (IRT-tripsina imunoreactiva), com mais de 1% de resultados falsos positivos. Ao contrário do que se verifica noutros países, não é muito útil recorrer à pesquisa da mutação  $\Delta F508$  no sentido de diminuir a taxa de falsos positivos, uma vez que esta mutação apresenta comparativamente uma menor frequência na população portuguesa <sup>7</sup>.

Pelas razões anteriormente referidas, estes rastreios não prosseguiram de forma sistemática <sup>6</sup>. Até ao final do ano de 2005 foram rastreados 2.590.890 RN para a PKU e 2.558.645 RN para o HC e encontrados 1043 doentes (237 com PKU, prevalência de 1/10.932 e 806 com HC, prevalência de 1/3.174) <sup>3</sup>.

Nos últimos anos foi melhorada a taxa de cobertura, encurtado o tempo médio de início do tratamento, e alargada a gama de alimentos hipoproteicos, essenciais para o tratamento de algumas doenças hereditárias do metabolismo (DHM), dispo-

níveis em Portugal. Em 1992 foi criada a Associação Portuguesa de Fenilcetonúria - APOFEN - o que veio possibilitar o melhor relacionamento dos pais e doentes PKU portugueses entre si e com os dos outros países europeus (ESPKU). Posteriormente, a acção da APOFEN passou a abranger todas as outras DHM.

Recentemente, e devido aos novos desenvolvimentos tecnológicos, outras patologias passaram a ser passíveis de rastreio neonatal.

Os aminoácidos e as acilcarnitinas partilham semelhanças estruturais entre si que possibilitam a sua análise por espectrometria de massa, tendo sido a metodologia subjacente desenvolvida no início dos anos 90 <sup>8,9</sup>. A espectrometria de massa é uma metodologia altamente sensível que permite identificar compostos com base no seu padrão de fragmentação (espectro de massa), que é característico de cada substância em condições analíticas bem definidas.

A espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS) não substituiu os métodos clássicos de rastreio utilizados para o hipotiroidismo, hemoglobinopatias, hiperplasia congénita das supra-renais, fibrose quística ou galactosemia, mas permite que através de uma única amostra de sangue colhido sobre papel de filtro se possa fazer a determinação de vários metabolitos, possibilitando assim o rastreio simultâneo de mais de 30 DHM <sup>10</sup>.

As DHM constituem um grupo de doenças genéticas raras <sup>11</sup>, mas que têm uma considerável importância em saúde pública, não só devido à sua frequência conjunta, mas também devido às graves consequências que acarretam para os RN, lactentes ou crianças afectadas. Se estas doenças não forem diagnosticadas e tratadas atempadamente podem provocar atraso mental irreversível (moderado a grave), atraso motor, alterações neurológicas ou mesmo a morte.

## Objectivos

Este trabalho tem por objectivo avaliar os resultados preliminares do estudo piloto do rastreio neonatal de 14 DHM, por MS/MS, assim como conhecer melhor a prevalência destas doenças no nosso País.

## Metodologia

Em 2002, ao abrigo do projecto “Saúde XXI” e com o intuito de se proceder em Portugal ao alargamento do número de patologias rastreadas, foram adquiridos dois espectrómetros de massa em *tandem* para o Laboratório Nacional de Rastreamentos do IGM.

A introdução da tecnologia MS/MS nos Programas de Rastreio Neonatal que automatiza a detecção conjunta de grande número de patologias, obriga a encarar o conceito de frequência de uma forma mais global. De acordo com esta nova realidade e com os critérios já referidos, a Comissão Nacional para o Diagnóstico Precoce decidiu incluir no estudo piloto do rastreio neonatal alargado as 14 DHM referidas no Quadro I.

**Quadro I** – Marcadores utilizados na identificação das patologias rastreadas.

| Patologia  | Marcador Primário | Marcador Secundário                      |
|--|-------------------|--|
| Fenilcetonúria (PKU) MIM#261600  | Phe               | Phe / Tyr                                |
| Leucínose (MSUD) MIM#248600  | X-Leu             | Val<br>X-Leu / Phe<br>Val/ Phe           |
| Citrulinemia MIM#215700  | Cit               | Cit/ Arg                                 |
| Acidúria Arginino-succínica (ASA) MIM#215700   | ASA               | Cit<br>Cit/ Arg                          |
| Acidúria Propiónica (PA) MIM#606054  | C3                | C3 / C2<br>C3 / C16                      |
| Acidúria Metilmalónica (MMA) MIM#251000  | C3                | C3 / C2<br>C3 / C16                      |
| Acidúria Isovalérica (IVA) MIM#233500  | C5                | C5 / C2<br>C5 / C3                       |
| Acidúria 3-Hidroxi-3-Metilglutárica (3-HMG) MIM#246450                                       | C5OH              | C6DC                                     |
| Acidúria Glutárica Tipo I (GA I) MIM#231670  | C5DC              | C5DC / C8<br>C5DC / C16                  |
| Deficiência da Desidrogenase dos Ác. Gordos de Cadeia Média (MCAD) MIM#201460                | C8                | C6<br>C10<br>C10:1<br>C8 / C10           |
| Deficiência da Desidrogenase dos Ác. Gordos de Cadeia Muito Longa (VLCAD) MIM#201475         | C14:1             | C14:2<br>C14:1 / C12:1<br>C14:1 / C16    |
| Deficiência da Desidrogenase dos Ác. Gordos Hidroxilados de Cadeia Longa (LCHAD) MIM# 609016 | C16OH             | C14OH<br>C18:1OH<br>C18OH<br>C16OH / C16 |
| Deficiência em Carnitina-Palmitoil Transferase I (CPT I) MIM#255120                          | C0/(C16+C18)      | -  |
| Deficiência em Carnitina-Palmitoil Transferase II (CPT II) MIM#608836                        | ↓ C0/ (C16+C18)   | C16 / C14:1                              |

Legenda: MIM - Mendelian Inheritance in Man; Phe - fenilalanina; Tyr - tirosina; Val - valina; X-Leu (leucina + isoleucina + alloisoleucina); Cit - citrulina; Arg - arginina; ASA-ácido arginino-succínico; C0 - carnitina livre; C2 - acetilcarnitina; C3 - propionilcarnitina; C5 - isovalerilcarnitina; C5OH - 3-OH-isovalerilcarnitina; C5DC - glutarilcarnitina; C6 - hexanoilcarnitina; C6DC - adipoil/metilglutarilcarnitina; C8 - octanoilcarnitina; C10:1 - decenoilcarnitina; C10 - decanoilcarnitina; C12:1 - dodecenoilcarnitina; C14:2 - tetradecadienoilcarnitina; C14:1 - tetradecenoilcarnitina; C14OH - 3-OH-tetradecanoilcarnitina; C16 - hexadecanoilcarnitina; C16OH - 3-OH-hexadecanoilcarnitina; C18 - octadecanoilcarnitina; C18:1OH - 3-OH-oleoilcarnitina; C18OH - 3-OH-octadecanoilcarnitina; ↓ - marcador onde se considera uma diminuição do valor.

O rastreio alargado das DHM exige centros de tratamento especializados, com clínicos de adequada formação na área das doenças metabólicas e uma maior sensibilização dos pediatras para este tipo de patologias. Assim, foi constituída uma rede de “Hospitais de Referência” dotados de Serviço de Urgência, Unidade de Cuidados Intensivos e Unidade de Doenças Hereditárias do Metabolismo. Estes hospitais estão localizados em Lisboa (Hospital de Santa Maria e Hospital D. Estefânia), no Porto (Hospital de São João/Hospital Maria Pia e Centro Hospitalar de Gaia) e em Coimbra (Hospital Pediátrico de Coimbra) e actuam em estreita articulação com o Laboratório Nacional de Rastreamentos, no sentido de se iniciar a abordagem diagnóstica e terapêutica em tempo útil.

Antes de implementar o rastreio neonatal alargado, entendemos ser prudente e vantajoso proceder numa primeira fase a um estudo piloto em 100.000 RN, começando pelas regiões Norte e Centro. Este estudo iniciou-se em Março de 2005 e os resultados apresentados dizem respeito a 54.650 RN rastrea-

dos até Dezembro do mesmo ano, com base em protocolos já descritos<sup>12</sup>. Após o estudo dos 100.000 RN serão avaliadas as doenças que preenchem os critérios anteriormente definidos e que passarão a ser rastreadas de uma forma sistemática. Posteriormente, uma segunda fase do estudo piloto será iniciada para as patologias com uma menor prevalência ou cujos dados analíticos obtidos sejam inconclusivos.

O rastreio simultâneo das 14 DHM é efectuado pela identificação e quantificação por MS/MS de cerca de 28 metabolitos marcadores destas doenças e pelas razões entre determinados metabolitos<sup>13,14</sup>. O tempo de análise por MS/MS é reduzido (2-3 min) comparativamente com a cromatografia (30-60 min), e a quantidade de sangue necessária é exígua devido à alta sensibilidade desta metodologia (círculo de papel de filtro com 3.2mm, o que equivale a 3,2µL de sangue total).

A identificação das patologias por MS/MS tem por base a utilização de dois tipos de marcadores: marcadores primários e secundários<sup>15</sup>. Entende-se por marcador primário de uma

patologia, um marcador que está sempre alterado na presença dessa patologia. Os marcadores secundários são aqueles que estão frequentemente alterados e cuja alteração confirma a patologia, ajudando a excluir outras patologias com marcadores em comum ou situações de alteração do marcador primário devido a factores extrínsecos, como administração de suplementos (ex: MCT-oil) ou medicamentos. Muitos dos marcadores secundários utilizados são razões de metabolitos, sendo de realçar a existência de dois tipos de razões: as metabólicas, que relacionam metabolitos da mesma via metabólica (ex. Phe/Tyr, Cit/Arg, C8/C10, C14:1/C12:1) e as não-metabólicas que relacionam metabolitos de diferentes vias metabólicas (ex. C5DC/C8, C5DC/C16, C16OH/C16). Em ambos os casos o objectivo principal da sua utilização é evidenciar a alteração específica do marcador primário, contribuindo desta forma para a diminuição quer do número de falsos positivos, quer do número de falsos negativos.

No Quadro I encontram-se referidos os marcadores primários e secundários actualmente utilizados. Todas as análises consideradas como suspeitas são repetidas a partir da mesma amostra, sendo o rastreio considerado como positivo apenas se os dois doseamentos forem concordantes. No caso de isso não acontecer haverá lugar a uma nova repetição.

Nos casos em que uma situação de descompensação metabólica possa estar eminente, contactamos de imediato a Unidade de Doenças Metabólicas de referência da área do RN, que tomará as opções que entender como necessárias para o tratamento ser instituído o mais rapidamente possível. Em situações menos graves os pais são contactados pela Comissão Nacional para o Diagnóstico Precoce no sentido de se obterem amostras de confirmação.

## Resultados

Nos 54.650 RN rastreados no estudo piloto foram encontrados doze casos positivos, referentes a seis patologias diferentes (Quadro II).

**Quadro II** – Casos positivos referentes às patologias inicialmente incluídas no estudo piloto.

| Patologia                | Nº Casos positivos |
|--------------------------|--------------------|
| PKU/hiperfenilalaninemia | 3/1                |
| MSUD                     | 2                  |
| Citrulinemia             | 1                  |
| ASA                      | 0                  |
| PA                       | 0                  |
| MMA                      | 0                  |
| IVA                      | 0                  |
| 3-HMG                    | 1                  |
| GA I                     | 0                  |
| MCAD                     | 3                  |
| VLCAD                    | 0                  |
| LCHAD                    | 1                  |
| CPT I                    | 0                  |
| CPT II                   | 0                  |

Foram identificadas patologias pertencentes aos vários grupos metabólicos estudados: aminoacidopatias (PKU/hiperfenilalaninemia, leucinose), acidúrias orgânicas (3-HMG), doenças do ciclo da ureia (citrulinemia) e doenças da  $\beta$ -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos (MCAD, LCHAD).

No total, foram pedidas 53 novas amostras para confirmação de resultados o que representa uma taxa de chamada de 0,1%. Em 36 casos (0,07%) o resultado normalizou na segunda amostra e só um caso foi enviado para um Centro de Tratamento sem que a hipótese de diagnóstico se tenha confirmado. Esta percentagem (falsos positivos) está de acordo com o descrito na bibliografia referente ao rastreio por MS/MS noutros países<sup>16,17</sup>. Até à data não temos conhecimento de nenhum resultado falso negativo.

Foram sistematicamente observados 43 metabolitos por amostra. Paralelamente com os 28 marcadores patológicos das 14 DHM que fazem parte integrante deste estudo, foram avaliados outros metabolitos com o objectivo de considerar a possibilidade futura de inclusão de mais patologias neste rastreio.

Da análise conjunta dos 43 metabolitos resultou a identificação de mais quatro casos positivos com três patologias distintas: um caso de homocistinúria (marcador: metionina), dois casos de tirosinemia tipo I (marcador: tirosina) e um caso de 3-metilcrotonilglicinúria (marcador: C5OH). Embora estas patologias não tenham sido inicialmente incluídas no estudo piloto, os RN por elas afectados foram encaminhados para os hospitais de referência, confirmando-se a hipótese de diagnóstico e encontrando-se sob tratamento e avaliação médica.

## Discussão

A introdução de novas patologias no rastreio tornou necessário reorganizar todo o Programa Nacional de Diagnóstico Precoce. A colheita de sangue foi antecipada para o terceiro dia de vida, de acordo com o consenso internacional, o que se reveste de particular importância no rastreio das DHM de descompensação precoce. As fichas do rastreio foram modificadas, de modo a conter mais informação clínica, nomeadamente no que se refere à existência de icterícia, prematuridade ou qualquer terapêutica que eventualmente o RN esteja a efectuar, de forma a auxiliar na interpretação dos resultados obtidos no laboratório.

Desde o início do programa de rastreio que os pais só eram contactados em caso de rastreio positivo, uma vez que não era viável efectuar diariamente uma informação escrita dos resultados negativos para cerca de 500 famílias. Porém, com o código de barras anexado à ficha, este problema foi resolvido a partir de Março de 2005, com a informação via *Internet* destes resultados ([www.diagnosticoprecoce.org](http://www.diagnosticoprecoce.org)). Trata-se duma iniciativa pioneira, e pelo número de visitas diárias efectuadas a esta página, parece ter sido muito bem recebida pelos pais.

Os marcadores utilizados para a identificação das patologias foram inicialmente definidos com base no que estava descrito na bibliografia<sup>15</sup>. O estudo retrospectivo de amostras patoló-

gicas, a análise permanente dos resultados que têm vindo a ser obtidos neste estudo piloto e a revisão bibliográfica actualizada relativamente a esta matéria, conduziram no entanto, à exclusão de alguns, à introdução de outros e à actualização dos respectivos limiares de decisão.

Durante este estudo, foi ainda implementada a técnica para determinação do ácido arginino-succínico<sup>18</sup>, para rastreio da acidúria arginino-succínica. Anteriormente, este rastreio era efectuado indirectamente pelos valores moderadamente elevados de citrulina, o que originava um elevado número de falsos positivos.

A tirosinemia tipo I e a homocistinúria clássica, embora sejam aminoacidopatias tratáveis, não estavam incluídas neste estudo piloto porque os biomarcadores utilizados, tirosina e metionina respectivamente, aumentam também nos RN secundariamente a outras situações, originando assim falsos positivos.

No sentido de introduzir a tirosinemia tipo I no rastreio metabólico alargado, implementou-se a técnica para doseamento em sangue colhido sobre papel de filtro da succinilacetona<sup>18</sup>, que é o metabolito patognomónico desta doença.

No caso de homocistinúria, foi possível estabelecer um diagnóstico devido ao valor anormalmente elevado de metionina. Porém, só será possível incluir esta patologia no rastreio quando for implementado o método para doseamento de homocisteína, que é o marcador específico para esta doença.

É de referir que o diagnóstico de dois casos de leucínose e três de MCAD leva a pensar que a prevalência destas patologias no País poderá ser superior à descrita na literatura<sup>17</sup>.

Um rastreio neonatal deve constituir-se como um Programa de Saúde Pública com características dinâmicas, aberto a novas metodologias e terapêuticas e contemplando doenças endócrino-metabólicas ou genéticas. Vários estudos já publicados são concordantes quanto às vantagens deste tipo de rastreio por MS/MS e relativamente a outros rastreios como o do cancro da mama ou da próstata<sup>19</sup>.

### Conclusões

Em função da avaliação dos resultados do rastreio de 54.650 RN, do ajuste dos marcadores e correspondentes limiares de decisão, e das novas técnicas implementadas, o estudo piloto prosseguirá até ao número total de 100.000 RN, expandindo-se progressivamente a todo o País e incluindo no leque das doenças rastreadas a 3-metilcrotonilglicinúria e a tirosinemia tipo I. Deste modo, este estudo passará a incluir o rastreio sistemático de 16 doenças.

Com base nos resultados preliminares obtidos, a prevalência conjunta destas patologias parece justificar a realização do rastreio alargado em Portugal.

A utilização do *tandem mass* no rastreio neonatal sistemático abre novos horizontes para várias DHM, lança novos desafios à medicina preventiva e levanta novas questões no tratamento destas doenças.

Com o estabelecimento deste rastreio em todo o País, espera-

mos manter o Programa Nacional de Diagnóstico Precoce na primeira linha dos Programas de rastreio europeus e contribuir para uma melhor qualidade de vida das crianças portuguesas.

### Agradecimentos

Os autores agradecem a todos os clínicos envolvidos neste projecto, pela sua inteira disponibilidade em receber e acompanhar os RN diagnosticados. À Unidade de Biologia Clínica do IGM e à Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa pela disponibilidade na confirmação dos casos de rastreio positivo.

### Referências

- Sanjurjo C. Screening neonatal: debe ampliarse el número de enfermedades a detectar? *An Esp Pediatr* 1999;50:539-41.
- Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting PKU in large populations of newborn infants. *Pediatrics* 1963;32:338-43.
- Programa Nacional de Diagnóstico Precoce - Relatório de Actividades em 2005 ([www.diagnosticoprecoce.org](http://www.diagnosticoprecoce.org)).
- Vaz Osório R, Vilarinho L. Assessment of a Trial Screening Program for congenital adrenal hyperplasia in Portugal based on na antibody-coated tube RIA for 17-a-OH-progesterone. *Clin Chem* 1989;35:2338-9.
- Vaz Osório R, Vilarinho L, Pires Soares J. Rastreio nacional da fenilcetonúria, hipotireoidismo congénito e hiperplasia congénita das suprarrenais. *Acta Med Port* 1992;5:131-4.
- Vaz Osório R, Vilarinho L, Pires Soares J, Almeida M, Carmona C, Martins E. Programa Nacional de Diagnóstico Precoce-20 anos de rastreio neonatal. *Arq Med* 1999;13:163-8.
- Estivill X, Bancells C, Ramos C. Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. The Biomed CF Mutation Analysis Consortium. *Hum Mutat.* 1997;10:135-54.
- Millington DS, Norwood DL, Kodo N, Roe CR, Inoue F. Application of fast atom bombardment with tandem mass spectrometry and liquid chromatography/mass spectrometry to the analysis of acylcarnitines in human urine, blood, and tissue. *Anal Biochem* 1989;180:331-9.
- Millington DS, Norwood DL, Kodo N, Moore R, Green MD, Berman J. Biomedical applications of high-performance liquid chromatography-mass spectrometry with continuous-flow fast atom bombardment. *J Chromatogr.* 1991;562:47-58.
- Carpenter KH, Wiley V. Application of tandem mass spectrometry to biochemical genetics and newborn screening. *Clin Chim Acta.* 2002; 322:1-10.
- Saudubray JM, Charpentier C. Clinical Phenotypes: Diagnosis/Algorithms. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D eds. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease.* (8th ed). McGraw-Hill, New York, NY, 2001, Chap 66:1327-406.
- Zytkovicz TH, Fitzgerald EF, Marsden D, Larson CA, Shih VE, Johnson DM, et al. Tandem mass spectrometric analysis for amino, organic, and fatty acid disorders in newborn dried blood spots: a two-year summary from the New England Newborn Screening Program. *Clin Chem* 2001;47(11):1945-55.
- Chace D, Kalas TA, Naylor EW. Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns. *Clin Chem* 2003;(11):1797-817.
- Schulze A, Lindner M, Kohlmüller D, Olgemöller K, Mayatepek E, Hoffmann GF. Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism by electrospray ionization-tandem mass spectrometry:

- results, outcome, and implications. *Pediatrics* 2003;111:1399-406.
15. Chace D, Kalas T, Naylor E. The application of tandem mass spectrometry to neonatal screening for inherited disorders of intermediary metabolism. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2002;3:17-45.
  16. Chace D, Kalas T. A biochemical perspective on the use of tandem mass spectrometry for newborn screening and clinical testing. *Clin Biochem* 2005;38:296-309.
  17. Wilcken B, Wiley V, Hammond J, Carpenter K. Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. *N Eng J Med* 2003;348:2304-12.
  18. Stadler S, Gempl K, Bieger I, Pontz BF, Gerbitz KD, Bauer MF et al. Detection of neonatal argininosuccinate lyase deficiency by serum tandem mass spectrometry. *J Inherit Metab Dis* 2001; 24:370-8.
  19. Allard P, Grenier A, Korson MS, Zytkevich TH. Newborn screening for hepatorenal tyrosinemia by tandem mass spectrometry: analysis of succinylacetone extracted from dried blood spots. *Clin Biochem* 2004;37:1010-5.
  20. Schoen EJ, Baker JC, Colby CJ, To TT. Cost-benefit analysis of universal tandem mass spectrometry for newborn screening. *Pediatrics* 2002;110:781-6.