

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO EM FARMÁCIA

Marina Bernardes Acosta

Projeto-piloto de ampliação da triagem neonatal no município de Porto Alegre: estudo longitudinal dos casos alterados

Porto Alegre

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO EM FARMÁCIA

Marina Bernardes Acosta

Projeto-piloto de ampliação da triagem neonatal no município de Porto Alegre: estudo longitudinal dos casos alterados

Trabalho apresentado como exigência para aprovação na atividade de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Profa. Simone Martins de Castro
Coorientador: Profa. Ida Vanessa Doederlein Schwartz

Porto Alegre
2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha orientadora e professora, Simone Martins de Castro, que ao longo dos últimos anos se tornou inspiração e exemplo de profissional para mim. Agradeço por todo aprendizado transmitido, pelo apoio, orientação, dedicação e paciência durante a elaboração deste trabalho.

Agradeço à minha coorientadora, Ida Vanessa Doederlein Schwartz, e todos integrantes do Projeto de Pesquisa, pelas oportunidades e conhecimentos adquiridos.

Agradeço à toda equipe do SRTN-RS, em especial, Alexandra, Carol, Júnior, Paloma e Vivian, por todo apoio e acolhimento durante o último ano.

Agradeço a todos familiares e amigos, pela torcida e carinho durante toda jornada da graduação. Ao meu melhor amigo, Carlos, por sempre se fazer presente independente da fase de nossas vidas.

Agradeço ao grupo de amigas que ganhei nessa jornada e que me acompanharam durante todos os momentos bons e principalmente os difíceis, Luana, Kimberly, Natália, Thaís e Yasmin, irei levar nossa amizade para o resto da vida. Às minhas companheiras de finalização de curso, Ágata e Duda, por serem capazes de tornar essa experiência mais leve e divertida ao lado de vocês.

E, por fim, agradeço aos meus pais, Cristina e Leonardo, e minha irmã, Manuela, por serem capazes de fazer o possível e o impossível para me darem sempre as melhores oportunidades. Eu jamais serei capaz de retribuir todo carinho, amor e incentivo que recebi e recebo de vocês todos os dias. Vocês são a razão de todas minhas conquistas.

APRESENTAÇÃO

Esse Trabalho de Conclusão de Curso foi redigido sob a forma de artigo ao qual foi elaborado segundo as normas da revista *Journal of INBORN ERRORS of METABOLISM and SCREENING*, apresentadas em anexo.

**PROJETO-PILOTO DE AMPLIAÇÃO DA TRIAGEM NEONATAL NO MUNICÍPIO
DE PORTO ALEGRE: ESTUDO LONGITUDINAL DOS CASOS ALTERADOS.**

Marina Bernardes Acosta¹, Ida Vanessa Doederlein Schwartz^{1,2}, Simone Martins de Castro¹

¹Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

²Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil.

RESUMO

A triagem neonatal (TN) tem como objetivo principal identificar doenças metabólicas e genéticas no recém-nascido, em tempo oportuno, garantindo tratamento e acompanhamento contínuo, com vistas a reduzir a morbimortalidade e melhorar a qualidade de vida do RN. O uso da espectrometria de massas em tandem para o diagnóstico dos EIM tem o potencial de expandir os painéis da TN. Os EIM englobam um grupo fenotípico e geneticamente heterogêneo de distúrbios, resultando em disfunção metabólica e/ou acúmulo de metabólitos intermediários tóxicos. A maioria dos distúrbios são tratáveis se diagnosticados e tratados precocemente. Muitos dos metabólitos intermediários detectados por essa tecnologia são elevados em vários distúrbios diferentes, dessa forma, a proficiência na interpretação é obrigatória. Objetivo: validar clinicamente resultados da TN a partir de um estudo-piloto de ampliação para EIM. Para a quantificação de novos 22 analitos na detecção de aminoácidos, carnitina e acilcarnitinas, as amostras de sangue seco foram processadas pelo sistema de espectrometria de massas em tandem (MS/MS). Resultados: De junho a dezembro de 2021, 3.154 RN realizaram a triagem expandida. Destas, 52 (1,65%) amostras apresentaram resultado alterado na primeira coleta. Dentre os 14 (26,9%) casos em investigação, suspeitos de doença, 10 foram identificados com alterações transitórias e receberam alta e 3 permaneceram em acompanhamento. A introdução do MS/MS representa grandes desafios para a TN, entre eles podemos citar o estabelecimento de pontos de cortes de analitos que minimizem os casos falsos positivos e os interferentes encontrados nas análises. Avanços na tecnologia e necessidade de validações desta inovação para um correto diagnóstico, são necessários na expansão de programas de triagem em diferentes regiões .

Palavras-chaves: triagem neonatal; EIM; MS/MS.

ABSTRACT

Neonatal screening (NS) has as main objective to identify metabolic and genetic diseases in the newborn, in a timely manner, ensuring treatment and continuous monitoring, in order to reduce morbidity and mortality and improving the quality of life of the newborn. The use of tandem mass spectrometry for the diagnosis of IEM has the potential to expand NS panels. IEMs encompass a phenotypic and genetically heterogeneous group of disorders, resulting in metabolic dysfunction and/or accumulation of toxic intermediate metabolites. Most of these disorders are treatable if diagnosed and treated early. Many of the intermediate metabolites detected by this technology are elevated in several different disorders, therefore proficiency in interpretation is mandatory. Objective: to clinically validate NS results from a pilot scale-up study for IEM. For the quantification of new 22 analytes in the detection of amino acids, carnitine and acylcarnitines, the dried blood samples were processed by the tandem mass spectrometry system (MS/MS). Results: From June to December 2021, 3,154 newborns underwent expanded screening. of the whole samples, 52 (1.65%) of them showed altered results in the first collection. Among the 14 (26.9%) cases under investigation, suspected of disease, 10 were identified with transient changes and were discharged and 3 remained under observation. The introduction of MS/MS represents major challenges for NS, among them we can mention the establishment of analyte cut-off points that minimize false positive cases and interference found in the analyses. Advances in technology and the necessity of validations of this innovation for a correct diagnosis are required to expand screening programs in different regions.

Keywords: neonatal screening; IEM; MS/MS.

INTRODUÇÃO

Em saúde pública, triar significa identificar, dentro de uma população assintomática, aqueles indivíduos em risco de desenvolver determinada doença ou distúrbio e que se beneficiariam de investigação adicional, ação preventiva ou terapêutica imediata. O procedimento de triagem deve ser capaz de alterar a história natural da doença em uma parcela significativa da população elegível. [1]

A triagem neonatal (TN) , também conhecida como “Teste do Pezinho”, pode ser definida como um conjunto de exames laboratoriais, realizados por meio da análise de amostras de sangue seco em papel filtro, coletadas no calcanhar do bebê. [2] Tem como objetivo principal identificar doenças metabólicas e genéticas no recém-nascido (RN), em tempo oportuno, garantindo tratamento e acompanhamento contínuo àqueles com diagnóstico positivo, com vistas a reduzir a morbimortalidade e melhorar a qualidade de vida do RN. [3]

No Brasil, a TN é obrigatória para as doenças abrangidas pelo Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) do Ministério da Saúde. O PNTN é um programa de rastreamento populacional, com a missão de promover, implantar e implementar a TN no âmbito do SUS, visando ao acesso universal, integral e equânime, com enfoque na prevenção, intervenção precoce e acompanhamento permanente dos indivíduos com as doenças incluídas no PNTN. [3]

Atualmente, o PNTN já implantou seis doenças em todo o território nacional e o programa está em fase de ampliação a nível nacional. Na rede pública, seis doenças estão com suas rotinas e protocolos estabelecidos: fenilcetonúria, hipotireoidismo congênito primário, anemia falciforme e outras hemoglobinopatias, fibrose cística, hiperplasia adrenal congênita e deficiência de biotinidase. [4] Uma exceção à regra é o Distrito Federal, que através de uma legislação própria [5], ampliou o número de doenças desde 2008. Além das seis doenças

abrangentes no PNTN, no Distrito Federal também são triadas no período neonatal: deficiência de G6PD, toxoplasmose congênita, galactosemia, alterações em aminoácidos e acilcarnitinas (aminoacidopatias, distúrbios do ciclo da ureia, defeitos na beta-oxidação dos ácidos graxos, acidemias orgânicas). No setor privado, há mais tempo é possível acesso a um menu de exames expandido, de acordo com a cobertura assegurada pelo plano de saúde ou pela quantia que a família está disposta a desembolsar.

No estado do Rio Grande do Sul, o Serviço de Referência em Triagem Neonatal (SRTN-RS) está localizado no Hospital Materno Infantil Presidente Vargas (HMIPV) e se encontra na fase IV do PNTN, sendo responsável pela triagem, confirmação diagnóstica, tratamento e acompanhamento das 6 doenças orientadas pelo Ministério da Saúde. [4] A Lei Estadual Ordinária nº 15.470/2020 e a Lei Federal nº 14.154/2021 [6-7] ampliam o número de doenças rastreadas pelo “teste do pezinho” oferecido pelo SUS, incluindo também as seguintes doenças: outras aminoacidopatias, acilcarnitinas e acidemias orgânicas; galactosemia; toxoplasmose congênita; doenças lisossômicas; e imunodeficiência combinada grave (SCID); deficiência de G6PD e atrofia muscular espinhal (AME). A inclusão de novas doenças, garantindo a triagem, confirmação diagnóstica e tratamento é um processo altamente complexo e de custo elevado.

Estudos-piloto, como o projeto de pesquisa “Triagem neonatal expandida por espectrometria de massas em tandem no município de Porto Alegre: um estudo-piloto” são fundamentais para a organização dos processos de ampliação. Os dados obtidos no estudo permitirão a avaliação e estruturação para futura implementação no serviço. A ampliação do painel de doenças triadas no projeto piloto é capaz de diagnosticar mais 22 doenças dos erros inatos do metabolismo (EIM) intermediário, entre doenças do metabolismo de ácidos graxos e corpos cetônicos, acidúrias orgânicas, aminoacidopatias e distúrbios do ciclo da uréia.

Os EIM englobam um grupo fenotípico e geneticamente heterogêneo de distúrbios causados por uma enzima, cofator ou transportador defeituoso em uma via metabólica, resultando em disfunção metabólica e/ou acúmulo de metabólitos intermediários tóxicos. Os EIM podem se apresentar em qualquer idade, desde o estágio fetal até a idade avançada, podendo afetar qualquer tipo de célula ou órgão. Apresentam-se clinicamente de formas variadas e frequentemente inespecíficas. [8,9]

EIM individualmente são raros, mas quando agrupados tornam-se frequentes. [9] A maioria dos distúrbios são tratáveis, se diagnosticados precocemente. Com diagnóstico e tratamento adequados, alguns podem ser evitados. [10] Muitos são passíveis de intervenção dietética e respondem à suplementação de metabólitos deficientes, à prevenção do estresse metabólico e à remoção de metabólitos tóxicos. Porém, doenças não tratadas podem ser altamente prejudiciais, levando a deficiências graves e até mesmo a morte. [8,9]

O uso da espectrometria de massas em tandem (MS/MS) para o diagnóstico dos EIM tem o potencial de expandir os painéis de triagem neonatal, incluindo uma ampla gama de distúrbios. Essa tecnologia permite a detecção de diferentes doenças metabólicas a partir de um único picote de amostra de sangue seco em papel filtro e durante uma única corrida analítica. [11,12,13]

A espectrometria de massa em tandem está substituindo rapidamente a abordagem das técnicas clássicas de triagem, onde cada doença detectada depende de análises individuais. O MS/MS tem a capacidade de quantificação simultânea de vários metabólitos como marcadores de muitas doenças, como as acilcarnitinas e os aminoácidos. Um único metabólito pode ser um biomarcador para várias doenças, assim, a abordagem multiplex do uso da espectrometria de massas em tandem aumenta, em média, a sensibilidade e especificidade do rastreamento. [13] A introdução de MS/MS, baseada na quantificação rápida e simultânea de diversos metabólitos,

é capaz de aumentar significativamente o diagnóstico precoce de EIM. [14] O uso da espectrometria de massas, atualmente, é considerado um dos avanços mais importantes na triagem neonatal. [11]

Como a maioria das novas tecnologias, o custo inicial do sistema de MS/MS é elevado devido à necessidade de aquisição do equipamento e de treinamento de pessoal. [8] A perícia necessária para gerenciar e interpretar os resultados é escassa e leva tempo para ser alcançada sem treinamento prévio. [11] É necessária experiência para preparar amostras, operar o sistema e interpretar os dados. Muitos dos metabólitos intermediários detectados por essa tecnologia são elevados em vários distúrbios diferentes, dessa forma, a proficiência na interpretação é obrigatória. E assim como acontece com qualquer teste de triagem, são necessários testes diagnósticos complementares para confirmação do resultado positivo. [8]

Outro grande desafio encontrado na TN expandida por MS/MS é o estabelecimento de pontos de corte de analitos que minimizem os casos falso-positivos e evitem os falso-negativos. Embora, para a maioria das condições rastreadas, a sensibilidade e especificidade de MS/MS seja superior a 99%, o valor preditivo positivo é de apenas 10%. [15]

Nesse sentido, o presente estudo tem como objetivo validar clinicamente resultados da TN a partir de um estudo piloto de ampliação para EIM, a fim de estabelecer a implementação da TN por espectrometria de massas em tandem e de testes confirmatórios de RN para EIM de aminoácidos, ácidos orgânicos e ácidos graxos.

METODOLOGIA

Amostras

Foram incluídas no estudo as amostras coletadas de todos os RN que compareceram às Unidades Básicas de Saúde (UBS) no município de Porto Alegre, no período de junho a dezembro de 2021, para realizar a TN obrigatória e que os pais concordaram em participar do projeto. Na rotina da TN, as amostras de sangue seco em papel-filtro, a partir da punção no calcanhar do RN, são coletadas preferencialmente entre o terceiro e o quinto dia de vida e encaminhadas para análise no SRTN-RS.

Foram excluídas as amostras com problemas técnicos, tais como hemólise, diluição ou ressecamento, com quantidade insuficiente de sangue para realização da pesquisa ou não concordância dos responsáveis.

Triagem neonatal expandida

A Tabela 1, apresenta as 22 doenças genéticas dos EIM acrescentadas na TN da rede pública no município de Porto Alegre de junho a dezembro de 2021. A Tabela 2 relaciona o distúrbio triado com os analitos identificados no MS/MS.

Tabela 1 - Doenças acrescentadas na TN básica no município de Porto Alegre no período de junho a dezembro de 2021.

DOENÇAS PESQUISADAS NO PROJETO DE PESQUISA	
Metabolismo de ácidos graxos e corpos cetônicos	<ol style="list-style-type: none"> 1. Deficiência de Acil-CoA desidrogenase de cadeia muito longa (VLCAD) 2. Deficiência de Acil-CoA desidrogenase de cadeia longa (LCHAD) 3. Deficiência de proteína trifuncional mitocondrial (TFP) 4. Deficiência de carnitina palmitoiltransferase I (CPT I) 5. Deficiência de carnitina palmitoiltransferase II (CPT II) 6. Deficiência de carnitina-acilcarnitina translocase (CACT) 7. Deficiência de Acil-CoA desidrogenase de cadeia média (MCAD) 8. Deficiência primária de carnitina (CUD)
Acidúrias Orgânicas	<ol style="list-style-type: none"> 9. Acidúria glutárica tipo I (GAI) 10. Acidúria metilmalônica (MMA) 11. Acidúria isovalérica (IA) 12. Acidúria propiônica (PA) 13. Acidúria hidroximetilglutárica (HMG-CoA) 14. Deficiência de 3-metilcrotonil-CoA carboxilase (3-MCC) 15. Deficiência múltipla de carboxilases (MCD) 16. Deficiência de cobalamina A e B (CblA, B) 17. Deficiência de beta-cetotiolase (BKT)
Aminoacidopatias	<ol style="list-style-type: none"> 18. Homocistinúria Clássica (HCU) 19. Doença da Urina do Xarope do Bordo (MSUD) 20. Tirosinemia tipo I (TYR I)
Distúrbios do Ciclo da Uréia	<ol style="list-style-type: none"> 21. Citrulinemia tipo I (CIT I) 22. Acidúria argininosuccínica (ASA)

Tabela 2 - Relação do distúrbio triado com os analitos identificados no MS/MS.

Condição	Analitos identificados no MS/MS
Deficiência de Acil-CoA desidrogenase de cadeia muito longa (VLCAD)	C14:1, C14, C14:2, C12:1, C12
Deficiência de Acil-CoA desidrogenase de cadeia longa (LCHAD)	C16-OH, C18:1-OH
Deficiência de proteína trifuncional mitocondrial (TFP)	C16-OH, C18:1-OH
Deficiência de carnitina palmitoiltransferase I (CPT I)	C0/C16+C18
Deficiência de carnitina palmitoiltransferase II (CPT II)	C14, C16, C18, C16:1, C18:2, C18:1
Deficiência de carnitina-acilcarnitina translocase (CACT)	C14, C16, C18, C16:1, C18:2, C18:1
Deficiência de Acil-CoA desidrogenase de cadeia média (MCAD)	C8, C10, C6
Deficiência primária de carnitina (CUD)	C0
Acidúria glutárica tipo I (GAI)	C5DC
Acidúria metilmalônica (MMA)	C3
Acidúria isovalérica (IA)	C5
Acidúria propiônica (PA)	C3
Acidúria hidroximetilglutárica (HMG-CoA)	C5OH
Deficiência de 3-metilcrotonil-CoA carboxilase (3-MCC)	C5OH
Deficiência múltipla de carboxilases (MCD)	C5-OH, C3
Deficiência de cobalamina A e B (CblA, B)	C3
Deficiência de beta-cetotiolase (BKT)	C5:1, C5OH
Homocistinúria Clássica (HCU)	Metionina
Doença da Urina do Xarope do Bordo (MSUD)	Leucina e Valina
Tirosinemia tipo I (TYR I)	Tirosina
Citrulinemia tipo I (CIT I)	Citrulina
Acidúria argininosuccínica (ASA)	Citrulina

Espectrometria de massas

Para a quantificação de aminoácidos, carnitina e acilcarnitinas, as amostras de sangue seco foram processadas pelo sistema de espectrometria de massas em tandem (MS/MS). Foi usado o kit MS/MS não derivatizado NeoBase™ (PerkinElmer, Turku, Finlândia), contendo controles para 11 aminoácidos e 31 espécies de acilcarnitinas (incluindo carnitina livre), e padrões internos marcados com isótopos estáveis. As amostras foram perfuradas em discos de 3,2 mm, extraídas com solução de padrão interno e incubadas por 45 min, 700 rpm a 45°C.

Após a extração, as amostras foram analisadas por espectrometria de massa em tandem de análise de injeção em fluxo, utilizando um espectrômetro de massa em tandem quadrupolo ACQUITY UPLC H-Class acoplado a Waters TQS-micro (Waters Corporation, Milford, MA, EUA). Dez microlitros de amostra foram injetadas na fonte de íons com um tempo de execução de 1,5 min à temperatura ambiente, com a fase móvel fornecida pelo kit de diagnóstico a uma taxa de fluxo variável.

Os dados foram processados por meio dos aplicativos MassLynx™ e NeoLynx™ Software. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/L}$ para cada analito. Para medidas de tendência central, foi aplicado o módulo de estatística do Excel e os intervalos de referência foram definidos com os valores dentro do percentil 99 ou 99.5. Cada um dos limites foi considerado um ponto de corte. Os valores de limites utilizados para cada analito estão representados na tabela 3.

Tabela 3 - Aminoácidos e acilcarnitinas analisados por MS/MS e seus valores de referência.

Abreviação	Analito	Valor de referência
ALA	Alanina	< 1016 µmol/L
ARG	Arginina	1,39 a 52 µmol/L
CIT	Citrulina	6,47 a 47,96 µmol/L
GLY	Glicina	< 987,51 µmol/L
LEU	Leucina	< 359,58 µmol/L
MET	Metionina	4,09 a 44,03 µmol/L
ORN	Ornitina	31,91 a 243,24 µmol/L
PHE	Fenilalanina	< 99,13 µmol/L
PHE:TYR	Relação fenilalanina/tirosina	< 2,04 µmol/L
PRO	Prolina	< 738,55 µmol/L
TYR	Tirosina	< 507,70 µmol/L
VAL	Valina	< 396,17 µmol/L
C0	Carnitina livre	13,62 a 98,73 µmol/L
C10	Decanoilcarnitina	< 0,40 µmol/L
C10:1	Decenoilcarnitina	< 0,22 µmol/L
C10:2	Decadienoilcarnitina	< 0,06 µmol/L
C12	Dodecanoilcarnitina	< 0,46 µmol/L
C12:1	Dodecenoilcarnitina	< 0,33 µmol/L
C14-OH	3-Hidroxi-tetradecanoilcarnitina	< 0,06 µmol/L
C14	Tetradecanoilcarnitina (Miristoil)	< 0,62 µmol/L
C14:1	Tetradecenoilcarnitina	< 0,66 µmol/L
C14:2	Tetradecadienoilcarnitina	< 0,14 µmol/L
C16-OH	3-Hidroxi-hexadecanoilcarnitina	< 0,07 µmol/L
C16	Hexadecanoilcarnitina (Palmitoil)	< 9,96 µmol/L
C16:1-OH	3-Hidroxi-hexadecenoilcarnitina	< 0,35 µmol/L
C16:1	Hexadecenoilcarnitina	< 0,65 µmol/L
C18-OH	3-Hidroxi-octadecanoilcarnitina	< 0,14 µmol/L
C18	Octadecanoilcarnitina (Estearoil)	< 3,11 µmol/L
C18:1-OH	3-Hidroxi-octadecenoilcarnitina	< 0,10 µmol/L
C18:1	Octadecenoilcarnitina (Oleil)	< 5,63 µmol/L
C18:2	Octadecadienoilcarnitina (Linoleil)	< 0,99 µmol/L
C2	Acetilcarnitina	< 51,03 µmol/L
C3	Propionilcarnitina	< 5,11 µmol/L
C3DC/C4-OH	Malonilcarnitina , 3-Hidroxi- Butirilcarnitina	< 0,38 µmol/L
C4	Butirilcarnitina	< 0,85 µmol/L
C4DC/C5-OH	Metilmalonilcarnitina, 3-Hidroxi- Isovalerilcarnitina	< 1,19 µmol/L
C5	Isovalerilcarnitina	< 0,59 µmol/L
C5:1	Tigililcarnitina	< 0,24 µmol/L
C5DC/C6-OH	Glutarilcarnitina, 3-Hidroxi- hexanoilcarnitina	< 0,30 µmol/L
C6	Hexanoilcarnitina	< 0,14 µmol/L

C6DC	Adipilcarnitina	< 0,65 µmol/L
C8	Octanoilcarnitina	< 0,55 µmol/L
C8:1	Octanoilcarnitina	< 0,34 µmol/L
C8:C10	Relação C8/C10	< 3,36 µmol/L

Logística/fluxograma do estudo

Para o projeto, adotou-se a definição de triagem neonatal alterada como “a presença de dois resultados anormais consecutivos do mesmo metabólito, em duas amostras de papel-filtro coletadas de forma sequencial (primeira e segunda amostras), em datas distintas”. O paciente com dois resultados alterados foi considerado suspeito de doença para aquele analito. O RN em investigação foi encaminhado para consulta no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM-HCPA), onde realizou consulta e exames complementares para confirmação diagnóstica. O RN permaneceu em acompanhamento até a resolução do quadro ou início do tratamento.

O fluxo de trabalho está resumido na Figura 1. As amostras coletadas nas Unidades Básicas de Saúde foram encaminhadas para o SRTN-RS para triagem neonatal padrão. Uma quantidade de material foi separada e enviada para o SGM-HCPA para as análises complementares por MS/MS. Após análise no MS/MS, da primeira amostra, os resultados normais foram liberados e os resultados que apresentaram alterações significativas foram comunicados ao SRTN-RS para realização de busca ativa e solicitação de nova coleta. A recoleta foi encaminhada ao SRTN-RS, e posteriormente ao SGM-HCPA, conforme fluxo para a primeira amostra.

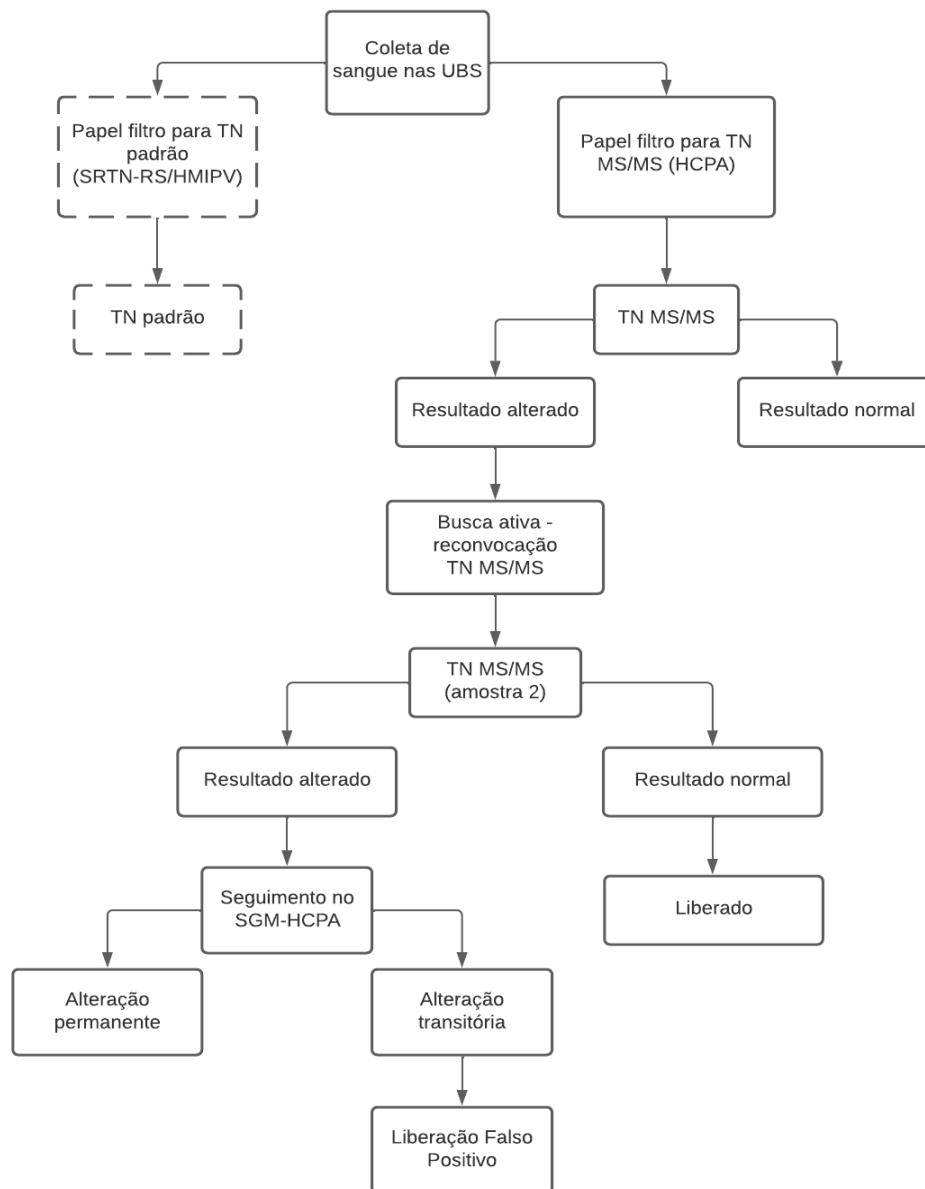


Figura 1 - Ilustração do fluxo de trabalho da triagem neonatal expandida durante o estudo-piloto.

Caso o resultado do segundo exame for negativo, se encerra a investigação, e o resultado é considerado normal. Entretanto, se o segundo exame for alterado novamente, o RN é encaminhado para consulta no serviço de referência do HCPA para coleta de exames complementares e seguimento. O RN será acompanhado pelo tempo de seis meses e, se as alterações forem transitórias, ele será liberado e o resultado do MS/MS será considerado como falso-positivo. Quando os exames complementares forem confirmatórios de diagnóstico, o

paciente segue em acompanhamento no serviço e inicia tratamento específico para a condição diagnosticada.

Os exames complementares solicitados na consulta de pesquisa variam de acordo com a suspeita da doença. Para aminoacidopatias, foram realizadas análises de aminoácidos plasmáticos através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Para acidemias orgânicas, o teste confirmatório incluiu ácidos orgânicos urinários e perfil de acilcarnitina no plasma realizado em tandem.

RESULTADOS

De junho a dezembro de 2021, 3.154 RN participaram do estudo e foram recebidas 18 negativas de participação. Deste total, 52 (1,65%) amostras apresentaram resultado alterado na primeira coleta e foram reconvocados para realizar uma segunda coleta ou consulta urgente.. Do total de RN reconvocados, 46 (90,2%) recoletaram a segunda amostra nas UBS. Destes, 13 (28,3%) permaneceram alterados na segunda coleta . Dentre os 14 (26,9%) casos em investigação, suspeitos de doença, 10 foram identificados com alterações transitórias e receberam alta e 1 deles não compareceu à consulta. Três RN permaneceram em acompanhamento no ambulatório para confirmação diagnóstica.

Entre os 52 RN que apresentaram resultado alterado na primeira coleta, 34 (65,4%) tiveram alteração em somente um analito, e 18 (34,6%) em dois analitos ou mais. Dos 44 analitos bioquímicos analisados, 24 (54,5%) apresentaram alterações significativas nas análises das primeiras amostras de RN. Porém, após recoleta e análise da segunda amostra, foram encontradas alterações em somente 8 metabólitos. Os metabólitos e as frequências das alterações observadas na primeira amostra são apresentados na tabela 4.

As alterações mais prevalentes encontradas, após análise de duas amostras alteradas, foram diminuição de carnitina livre, aumento de metilmalonilcarnitina, 3- hidroxisovalerilcarnitina e aumento dos aminoácidos glicina e ornitina. Os analitos alterados estavam associados a suspeita de deficiência primária de carnitina, acidemia metilmalônica, acidemia propiônica, acidemia isovalérica e outras aminoacidopatias. O perfil dos RN convocados para consulta após as duas amostras alteradas, o metabólito alterado e seu valor, a suspeita clínica, o teste diagnóstico e o desfecho clínico são demonstrados na tabela 5.

Segundo os dados informados no momento da coleta, todos os 14 recém-nascidos convocados para consulta não eram prematuros e todos recebiam alimentação através de leite materno.

Tabela 4 - Analitos e frequências das alterações encontradas na amostra 1.

Analito	Frequência absoluta	Frequência relativa	Menor valor observado (µmol/L)	Maior valor observado (µmol/L)	Média (µmol/L)	Valor de referência (µmol/L)
ALA	0	-	-	-	-	< 1016
ARG	3	3,45%	0,99	1,19	1,06	1,39 a 52
ARG	1	1,15%	61,44	61,44	61,44	1,39 a 52
CIT	2	2,30%	4,84	5,21	5,02	6,47 a 47,96
GLY	5	5,75%	1.076,15	1.724,76	1.335,25	< 987,51
LEU	0	-	-	-	-	< 359,58
MET	0	-	-	-	-	4,09 a 44,03
ORN	9	10,34%	281,66	510,33	396,32	31,91 a 243,24
PHE	2	2,30%	135,15	331,46	233,30	< 99,13
PHE:TYR	0	-	-	-	-	< 2,04
PRO	0	-	-	-	-	< 738,55
TYR	3	3,45%	800,68	1.617,66	1.077,38	< 507,70
VAL	1	1,15%	545,39	545,39	545,39	< 396,17
C0	15	17,24%	4,65	10,13	6,87	13,62 a 98,73
C10	1	1,15%	0,87	0,87	0,87	< 0,40
C10:1	0	-	-	-	-	< 0,22
C10:2	2	2,30%	0,08	0,17	0,125	< 0,06
C12	2	2,30%	0,47	0,49	0,48	< 0,46
C12:1	1	1,15%	0,34	0,34	0,34	< 0,33
C14-OH	2	2,30%	0,09	0,1	0,09	< 0,06
C14	2	2,30%	0,64	0,65	0,64	< 0,62
C14:1	0	-	-	-	-	< 0,66
C14:2	0	-	-	-	-	< 0,14
C16-OH	2	2,30%	0,1	0,11	0,10	< 0,07
C16	0	-	-	-	-	< 9,96
C16:1-OH	2	2,30%	0,37	0,5	0,43	< 0,35
C16:1	0	-	-	-	-	< 0,65
C18-OH	0	-	-	-	-	< 0,14
C18	0	-	-	-	-	< 3,11
C18:1-OH	0	-	-	-	-	< 0,10
C18:1	0	-	-	-	-	< 5,63
C18:2	0	-	-	-	-	< 0,99
C2	0	-	-	-	-	< 51,03
C3	0	-	-	-	-	< 5,11
C3DC/C4-OH	2	2,30%	0,44	0,47	0,45	< 0,38
C4	0	-	-	-	-	< 0,85
C4DC/C5-OH	14	16,09%	1,37	4,26	1,92	< 1,19
C5	5	5,75%	0,72	0,99	0,88	< 0,59
C5:1	0	-	-	-	-	< 0,24
C5DC/C6-OH	1	1,15%	0,54	0,54	0,54	< 0,30
C6	3	3,45%	0,18	0,39	0,26	< 0,14
C6DC	6	6,90%	0,66	1,01	0,75	< 0,65
C8	1	1,15%	3,17	3,17	3,17	< 0,55
C8:1	1	1,15%	0,37	0,37	0,37	< 0,34
C8:C10	1	1,15%	3,64	3,64	3,64	< 3,36

Tabela 5 - Perfil dos RN com duas amostras alteradas e encaminhados para consulta e exames confirmatórios.

RN/Sexo	Idade 1ª coleta (em dias)	Peso (g)	Analitos alterados MS/MS na 1ª coleta (µmol/L)	Analitos alterados MS/MS na 2ª coleta (µmol/L)	Valores de Referência (µmol/L)	Suspeita Clínica	Teste Diagnóstico	Desfecho Clínico
1 (M)	4	3005	C4DC/C5-OH 2,68	C4DC/C5-OH 2,07	C4DC/C5-OH <1,19	Acidemia metilmalônica	AO e Tandem de acilcarnitinas	Acompanhamento SGM
2 (M)	3	2920	C4DC/C5-OH 1,52 C0 9,34	C4DC/C5-OH 1,6 C0 9,25	C4DC/C5-OH <1,19 C0: 13,62 a 98,73	Acidemia metilmalônica/ Deficiência primária de carnitina	AO e Tandem de acilcarnitinas	Alta
3 (M)	8	3872	C4DC/C5-OH 2,22	C4DC/C5-OH 2,15	C4DC/C5-OH <1,19	Acidemia metilmalônica	AO e Tandem de acilcarnitinas	Acompanhamento SGM
4 (F)	4	2645	C0 4,65	C0 7,33	C0 13,62 a 98,73	Deficiência primária de carnitina	*Não compareceu na consulta	-
5 (M)	3	3195	C0 6,35	C0 8,37	C0 13,62 a 98,73	Deficiência primária de carnitina	AO e Tandem de acilcarnitinas	Alta
6 (F)	6	3875	GLY 1076,15 ORN 471,65	GLY 1042,97 ORN 772,57	GLY <987,51 ORN: 31,91 a 243,24	Acidemia propiônica e metilmalônica	AO e Tandem de acilcarnitinas	Acompanhamento SGM
7 (F)	5	3068	C4DC/C5-OH 1,47	C4DC/C5-OH 1,33	C4DC/C5-OH <1,19	Acidemia metilmalônica	AO e Tandem de acilcarnitinas	Alta
8 (F)	7	3360	C5 0,99	*	C5 <0,59	Acidemia isovalérica	AO e Tandem de acilcarnitinas	Alta
9 (M)	5	3885	ORN 459,04	ORN 513,43	ORN 31,91 a 243,24	Outras aminoacidopatias	HPLC Aminoácidos	Alta

10 (M)	6	2835	C4DC/C5-OH 1,84	C4DC/C5-OH 1,84 2,13	C4DC/C5-OH <1,19	Acidemia metilmalônica	AO e Tandem de acilcarnitinas	Alta
11 (M)	4	3095	C0 6,55 ORN 465,51 GLY 1262,9	C0 6,99	C0 13,62 a 98,73 ORN: 31,91 a 243,24 GLY <987,51	Deficiência primária de carnitina	AO e Tandem de acilcarnitinas	Alta
12 (F)	4	3142	C4DC/C5-OH 2,29	C4DC/C5-OH 1,51	C4DC/C5-OH <1,19	Acidemia metilmalônica	AO e Tandem de acilcarnitinas	Alta
13 (M)	5	3165	GLY 1366,29 ORN 354,68;	ORN 437,03	GLY <987,51 ORN: 31,91 a 243,24	Outras aminoacidopatias	HPLC Aminoácidos	Alta
14 (M)	7	3000	ARG 61,44 GLY 1724,76 ORN 510,33 PHE 135,15 TYR 800,68	ARG 66,89 PHE 287,7 TYR 1563,59	ARG: 1,39 a 52 ORN: 31,91 a 243,24 GLY <987,51 PHE <99,13 TYR: <507,70	Tirosinemia e outras aminoacidopatias	3ª coleta em papel-filtro**	Alta

Legenda: M= Masculino; F=Feminino; C4DC/C5-OH= metilmalonilcarnitina, 3-hidroxi-isovalerilcarnitina; C0= carnitina livre; GLY= glicina; ORN= ornitina; C5= isovalerilcarnitina; C16:1-OH= 3-hidroxi-hexadecenoilcarnitina; ARG= arginina; PHE=fenilalina; TYR= tirosina. AO - ácidos orgânicos urinários; SGM= Serviço de Genética Médica. *RN convocada para consulta após análise da primeira amostra em papel-filtro, sem recoleta. **RN não compareceu à consulta no SGM. Resultados normalizados na terceira amostra em papel-filtro.

Após os testes confirmatórios, 3 RN permaneceram em acompanhamento no SGM-HCPA. Os RN não apresentavam sintomas clínicos e as alterações observadas nos testes confirmatórios eram suspeitas de alterações transitórias. Após 6 meses, através de novas consultas e repetições de exames, esses RN foram liberados e considerados como falso-positivos. Até o momento, não foi diagnosticado nenhum RN verdadeiramente doente, no período de seis meses, nas amostras da rede básica de saúde do município de Porto Alegre.

DISCUSSÃO

Embora individualmente rara, a incidência cumulativa de EIM é alta. Um estudo realizado na China, demonstrou a incidência de cerca de 1 em 800 nascidos vivos. [16] Já em estudo realizado na Arábia Saudita, a incidência demonstrada foi de 1:1.043. [17]. Os Estados Unidos levantam uma incidência global de 1:4.300 e apontam os resultados como comparáveis aos dados de incidência relatados em outros estudos. [18] A incidência de distúrbios metabólicos congênitos varia substancialmente entre e dentro dos países, dependendo dos distúrbios rastreados, programas de TN utilizados, abordagens diagnósticas adotadas e serviços de acompanhamento clínico disponíveis. Além disso, a heterogeneidade genética entre as populações também contribui para a variação na incidência de EIM. [16] Até o presente momento, nosso estudo não apresentou nenhum RN com triagem positiva para os analitos testados, sendo necessário um aumento amostral para um melhor entendimento em nosso meio.

O número e a distribuição de subtipos de EIM rastreados por MS/MS variam entre os países. Compreender a incidência específica de EIM em uma região ou país é importante para a implementação de programas de triagem neonatal expandidos eficazes por MS/MS, particularmente em regiões ou países em desenvolvimento. No entanto, há uma falta de dados sobre a frequência e incidência específica da doença de EIM em muitas populações. [16]

A introdução do MS/MS representa grandes desafios para a TN. O painel de distúrbios metabólicos rastreados, os pontos de corte dos analitos e os limites de tomada de decisão adicionam um nível de complexidade aos testes nos RN. [15] O estabelecimento de pontos de cortes de analitos que minimizem os casos falso-positivos e evitem os falso-negativos é de grande relevância, uma vez que resultados falso-positivos são situações críticas na TN. [19]

Estudos demonstram aspectos sobre a variabilidade dos fenótipos bioquímicos dos distúrbios metabólicos em RN assintomáticos, e destacam a importância de se utilizar uma abordagem baseada em evidências, ao invés de estatísticas para a seleção do valor de ponto de corte. Ao se considerar um valor de corte muito alto, deve-se considerar que um pequeno número de casos pode ser indetectável, apenas com base em seu fenótipo bioquímico. Apesar disso não ser desejável, a busca pela sensibilidade perfeita não pode definir valores de corte, tão próximos da população normal, que acabam desencadeando um grande número de eventos falsos positivos. [20] Embora a sensibilidade seja de importância crítica, a maior oportunidade de melhoria do desempenho na TN, especialmente em um ambiente de teste multiplex, é encontrada no domínio da especificidade. [21] É preciso estabelecer padrões que mantenham a taxa de falso-positivos o mais baixo possível e, ao mesmo tempo, garantam que as pessoas afetadas não sejam perdidas. [20]

Existe uma enorme variabilidade na incidência de resultados falso-positivos entre os vários laboratórios de triagem. [19,21] Em nosso estudo, 1,05% dos RN triados, apresentaram resultados falso-positivos na primeira análise. Deve-se ter o cuidado com casos frequentes de resultados falso-positivos, pois os cuidadores primários podem mostrar menos interesse na informação de um resultado verdadeiro positivo, o que pode ter consequências graves e até fatais quando uma situação de risco de vida é ignorada. [19] Além disso, RN que recebem resultados falso-positivos podem ser falsamente rotulados como portadores da doença. Estudos

sugerem que alguns pais permaneçam ansiosos com a saúde do filho, percebam a criança como insalubre e, como consequência, acabam tratando-a de forma diferente, mesmo após a confirmação de um resultado falso-positivo. [12]

Uma questão importante que pode impulsionar altas taxas de falso-positivos é o encaminhamento para acompanhamento de RN com resultados anormais devido à heterozigose, situação não incomum para alguns distúrbios triados. Em algumas condições, a depleção de energia devido ao trabalho de parto, e partos prolongados podem desencadear o aparecimento transitório de um fenótipo bioquímico que mimetiza o estado afetado. Embora muitos dos distúrbios detectados surjam de mutações em um único gene, a variabilidade das mutações e a extensão da variação fenotípica são desconhecidas. [21] Outra questão-chave a ser abordada envolvendo os resultados falso-positivos é a necessidade de laboratórios especializados e o custo financeiro para diagnósticos confirmatórios e tratamentos de acompanhamento. A TN não é somente um teste laboratorial, mas sim um sistema. [19] Evitar resultados falso-positivos, além de reduzir o ônus emocional, pode reduzir o ônus financeiro dos testes de acompanhamento. [22] Evitando assim os custos de exames desnecessários e uma variedade de resultados desfavoráveis. [21] Neste trabalho, não foi avaliado o custo-efetividade da triagem neonatal expandida, mas sabe-se do impacto no custo dos falso-positivos não desejados e da importância de uma análise futura. [8]

Outro desafio no diagnóstico está associado aos interferentes. Diversos fatores podem afetar os resultados obtidos nos ensaios de amostras de sangue seco em papel filtro. As concentrações da maioria dos aminoácidos e acilcarnitinas variam consideravelmente entre a população de RN normais, dependendo da ingestão alimentar, tempo de coleta de sangue, hematócrito e posição do picote dentro da amostra de sangue seco. A concentração de alguns metabólitos pode ser afetada pela sobreposição de espectros com outros metabólitos. [23] O

tipo de alimentação do RN pode estar associada a numerosas variáveis de interferências. [24] No nosso estudo, foi constatado que o RN que apresentou alterações em diversos metabólitos, tinha grandes erros alimentares em sua dieta, podendo ser a justificativa para as diversas alterações na análise por MS/MS.

Uma amostra coletada inadequadamente pode interferir em todo processo de triagem de um RN. Uma amostra coletada adequadamente requer vários elementos, incluindo tempo de coleta adequado, aplicação apropriada de sangue no papel-filtro, secagem suficiente antes da embalagem e envio urgente para o laboratório de triagem. Uma alteração em qualquer etapa desta sequência pode levar a uma análise de amostra deficiente ou insuficiente. A idade no momento da coleta evita a possibilidade de resultados duvidosos pela idade. [11] Sabe-se que um fator complicador adicional para análise por MS/MS é a idade em relação ao estado da doença. As características de interpretação podem ser distintamente diferentes para bebês mais velhos versus recém-nascidos. [11]

Estudos também mostram que a prematuridade pode ser um fator interferente. [24] Porém, em nosso estudo, todas as amostras com alterações nas duas coletas foram de RN a termo. Isso se deve ao fato da inclusão de somente amostras coletadas nas Unidades Básicas de Saúde do município, e as amostras coletadas em Unidades Hospitalares Neonatais, onde devem estar a maior concentração de RN prematuros, não foram incluídas no estudo. Caterino, 2021 demonstrou que os RN de sexo feminino, a termo, normalmente apresentam maiores concentrações de aminoácidos, enquanto os RN de sexo masculino apresentam maiores concentrações de acilcarnitinas. No nosso estudo, essa distribuição não ficou evidente, mostrando as alterações encontradas bastante igualitárias no que se refere ao sexo dos RN.

Também, já foram relatados problemas de interferências de fontes exógenas. Alguns antibióticos liberam ácido pivalico, que é posteriormente metabolizado em pivaloilcarnitina. A

pivaloilcarnitina é isomérica com a isovalerilcarnitina (C5) e pode levar a resultados falsos positivos de acidemia isovalérica. [25] O MS/MS não consegue distinguir compostos isoméricos. Assim, já foi relatado caso de falso positivo de acidemia isovalérica em criança amamentada, em que a mãe estava recebendo antibiótico contendo um derivado do ácido pivalico. [15] Em nosso estudo, um dos RN foi convocado diretamente para consulta após apresentar elevação de C5 na primeira amostra coletada, com quadro sugestivo de acidemia isovalérica. Porém, após resultados negativos nos testes confirmatórios, o RN foi classificado como um resultado falso-positivo. Não se tem informação se a mãe estava em uso de antibióticos ou não.

Uma alteração frequentemente observada no estudo foi a diminuição de carnitina livre (C0). Perfis MS/MS que não mostram aumentos em acilcarnitinas, mas C0 muito baixa indicam um possível defeito no transportador de carnitina. [11] A deficiência primária de carnitina é um distúrbio autossômico recessivo da oxidação de ácidos graxos. É causada por mutações no gene SLC22A5 que codifica o transportador de carnitina de alta afinidade (OCTN2). A deficiência deste transportador aumenta as perdas urinárias de carnitina e produz deficiência tecidual de carnitina. Como a carnitina é necessária para a entrada de ácidos graxos de cadeia longa nas mitocôndrias e tecidos, a deficiência de carnitina prejudica a beta-oxidação de ácidos graxos mitocondriais, com produção de energia defeituosa durante o jejum. Os pacientes afetados, geralmente, apresentam hipoglicemia hipocetótica, encefalopatia hepática, hipotonia, cardiomiopatia ou morte súbita. [26] A deficiência primária de carnitina pode ser suspeitada a partir da apresentação clínica ou identificada por níveis de C0 na triagem neonatal. [27]

Os casos suspeitos que apresentavam carnitina livre diminuída no estudo, após realização de testes confirmatórios, foram considerados como falso-positivos. Os pontos de cortes utilizados podem ser questionáveis quando comparados com outros estudos. Alguns

estabelecem como valores ideais de ponto de corte os valores entre 11 a 59 $\mu\text{mol/L}$, [20] enquanto nosso estudo utiliza os pontos entre 13,62 a 98,73 $\mu\text{mol/L}$. Outros ainda apresentam valores de ponto baixo de $<10 \mu\text{mol/L}$ e discutem valores ainda mais baixos, como 5 e 7 $\mu\text{mol/L}$. [28] O nível de corte aumentado, melhora a chance de identificar todos os bebês com defeito de transporte de carnitina, ao custo de se ter mais casos falsos positivos. [28] Com o ponto de corte adotado, a taxa de reconvocados somente para suspeita desse distúrbio fica em torno de 0,47%, enquanto que se adotasse um nível de corte de 7 $\mu\text{mol/L}$ essa taxa diminuiria para 0,22%. Porém, sem um paciente clinicamente diagnosticado é difícil prever se esse nível identificaria um paciente doente ou se perderíamos um diagnóstico. Outros estudos também levantam que a utilização de um valor de corte mais baixo, de 5 $\mu\text{mol/L}$, seria apropriado para encontrar todos os homocigotos para deficiência primária de carnitina, enquanto um valor de corte mais alto pode levar ao diagnóstico de indivíduos com genótipos mais leves. [29]

Nenhum metabólito único irá fornecer inteiramente as informações necessárias para diagnosticar ou rastrear um defeito metabólico. Quase todos os distúrbios metabólicos apresentam padrões de metabólitos, e são esses padrões que tornam um perfil altamente presuntivo para um distúrbio específico. E, mais importantes, testes confirmatórios utilizando outros métodos são absolutamente necessários para fornecer informações adequadas para um diagnóstico. [11]

A acidemia metilmalônica é um distúrbio metabólico inato associado à descompensação metabólica intermitente e muitas vezes grave. [22] É decorrente de deficiências enzimáticas na metilmalônica CoA mutase, e pode se apresentar no período neonatal com acidose e hiperamonemia ou mais tarde na vida com descompensações metabólicas e/ou lesão de órgãos-alvo, incluindo cardiomiopatia e doença renal. [30] Os RN que apresentaram no estudo elevação de metilmalonilcarnitina, 3- hidroxí-isovalerilcarnitina

(C4DC/C5-OH) apresentaram suspeitas de acidemia metilmalônica. Porém, esse fluxo de reconvocação para RNs com aumento somente de metilmalonilcarnitina é bastante questionável. Estudos sobre a doença demonstram que o marcador primário para doença é a elevação de propionilcarnitina (C3). [22,31,30] Em nosso estudo, nenhum dos RN encaminhados para consulta após elevação de C4DC/C5-OH apresentaram valores alterados de C3. Alguns estudos relatam valores de metilmalonilcarnitina fora dos intervalos de referência, o que não justifica a reconvocação para C4DC alterado isoladamente. [32] E em casos confirmados de acidemia metilmalônica, muitas vezes não se observa aumento de metilmalonilcarnitina. Esse aumento é frequentemente observado em RN saudáveis. [11]

Outra alteração frequentemente observada, foi o aumento do aminoácido glicina. A glicina elevada pode estar associada a distúrbios como acidemia propiônica (PA). [33] A acidemia propiônica é uma doença autossômica recessiva causada por deficiência de propionil-CoA carboxilase levando ao acúmulo de propionato e seus metabólitos em fluidos corporais. Os distúrbios bioquímicos de acidemia propiônica incluem cetoacidose metabólica, hiperamonemia e hiperglicinemia. [34] Como as elevações de glicina e cetose na PA são frequentemente observadas, a doença foi inicialmente chamada de hiperglicinemia cetótica. [35] Assim como na acidemia propiônica, níveis elevados de glicina são também observados na acidemia metilmalônica e acidemia isovalérica. [33] Um dos RN com duas amostras alteradas, apresentou níveis elevados de glicina. O RN ficou em acompanhamento no SGM-HCPA, mas após novas consultas e repetições de exames foi liberado.

Além das alterações já citadas, alguns RN apresentaram elevação do aminoácido ornitina. A ornitina alterada isoladamente, não é representativa de nenhum dos distúrbios triados no estudo. Porém, ela pode estar alterada em outras aminoacidopatias, como na deficiência de ornitina transcarbamilase, cistinúria e síndrome hiperornitinemia-

hiperamonemia-homocitrulinúria (HHH). [36,37,38] Nenhum dos RN apresentou alterações nos testes confirmatórios realizados e os mesmos foram liberados e considerados como falso-positivos. Ainda, estudos apontam que entre alguns aminoácidos medidos rotineiramente por MS/MS, como glicina e ornitina, poucos têm sido úteis na identificação de distúrbios na TN de rotina. [11]

O MS/MS pode ser uma ferramenta eficaz na triagem de vários distúrbios metabólicos em uma única análise. Avanços na tecnologia e necessidade de validações desta inovação são necessários. O MS/MS é abrangente, versátil e eficaz quando usado para triagem em massa. [11] A TN expandida é ideal para estudos de validação clínica porque envolve muitos marcadores que requerem reconhecimento de padrões e interpretação de perfis. Sua complexidade é agravada pela raridade da maioria das condições-alvo. [21]

Embora muitos distúrbios metabólicos possam ser diagnosticados por meio desse procedimento, o uso rotineiro e universal de MS/MS ainda é considerado controverso devido à raridade desses distúrbios, questões sobre tratamento, resultados e preocupação com custo-efetividade. [8] Contudo, sabe-se que o diagnóstico precoce e o acompanhamento adequado de EIM são importantes para reduzir a mortalidade e/ou gravidade e retardar ou prevenir o aparecimento de sintomas incapacitantes causados por esses distúrbios. A TN para esses distúrbios é capaz de aliviar a carga social associada aos efeitos irreversíveis dessas doenças. [39]

CONCLUSÃO

A ampliação da TN voltada para identificação precoce e tratamento/manejo de RN afetados por EIM é capaz de reduzir a morbimortalidade e melhorar a qualidade de vida dos indivíduos com esses distúrbios. O MS/MS além de seus benefícios em termos de sensibilidade e especificidade, permite que vários compostos sejam analisados de uma só vez. Apesar de ainda ser considerado controverso o uso rotineiro e universal de MS/MS na TN, a introdução dessa técnica é capaz de aumentar consideravelmente o diagnóstico precoce de EIM.

Grandes são os desafios para a ampliação do "teste do pezinho" dentro de um Programa de Triagem Neonatal . Além do conhecimento técnico torna-se fundamental que cada serviço conheça a sua própria realidade, a frequência dos EIM e defina o próprio painel de rastreio neonatal, utilizando abordagem responsável, focada em redução de danos, melhoria da qualidade de vida de pacientes e famílias, e baseando-se em custo-efetividade.

REFERÊNCIAS

1. Botler J, Camacho LAB, da Cruz MM, George P. Triagem neonatal: o desafio de uma cobertura universal e efetiva. *Ciência & Saúde Coletiva*. 2010, 15(2), 492-508.
2. Mendes IC, Pinheiro DS, Rebelo ACS, Carneiro LC, Jesuino RSA. Aspectos Gerais da Triagem Neonatal no Brasil: Uma Revisão. *Revista Médica de Minas Gerais*. 2019; vol. 30, e-3008.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção a Saúde. Departamento de Atenção Especializada e Temática. *Triagem neonatal biológica: manual técnico*. Brasília: Ministério da Saúde; 2016.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria GM/MS nº 2.829, de 14 de dezembro de 2012. Inclui na Fase IV no Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) instituído pela Portaria nº822/GM/MS, de 6 de junho de 2001. Diário Oficial da União. 2012.
5. Distrito Federal. Lei nº 4.190, de 06 de agosto de 2008. Assegura a todas as crianças nascidas nos hospitais e demais estabelecimentos de atenção à saúde de gestantes da rede pública de saúde do Distrito Federal o direito ao teste de triagem neonatal, na sua modalidade ampliada. Brasília. 2008
6. Rio Grande do Sul. Lei nº 15.470 de 26 de março de 2020. Dispõe sobre a realização de teste de triagem neonatal para todas as crianças nascidas nos hospitais e demais estabelecimentos de atenção à saúde da rede pública no Estado do Rio Grande do Sul e dá outras providências. Porto Alegre. 2020.
7. Brasil. Lei nº 14.154 de 26 de maio de 2021. Altera a Lei nº 8.069, de 13 de julho de 1990 (Estatuto da Criança e do Adolescente), para aperfeiçoar o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), por meio do estabelecimento de rol mínimo de doenças a serem rastreadas pelo teste do pezinho; e dá outras providências. Diário Oficial da União. 2021.
8. Bishop Hubbard H. Policy Issues Related to Expanded Newborn Screening: A Review of Three Genetic/Metabolic Disorders. *Policy, Politics, & Nursing Practice*. 2007, 8(3), 201-209.
9. Mak CM, Lee H-CH, Chan A Y-W, Lam C-W. Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: review and update. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 2013, 50(6).
10. Wilcken B, Wiley V, Hammond J, Carpenter K. Screening Newborns for Inborn Errors of Metabolism by Tandem Mass Spectrometry. *New England Journal of Medicine*. 2003, 348(23), 2304-2312.
11. Chace DH. Use of Tandem Mass Spectrometry for Multianalyte Screening of Dried Blood Specimens from Newborns. *Clinical Chemistry*. 2003, 49(11), 1797–1817
12. Tarini BA, Christakis DA, Welch HG. State Newborn Screening in the Tandem Mass Spectrometry Era: More Tests, More False-Positive Results. *PEDIATRICS*. 2006, 118(2), 448-456.

13. Campos HD. Tamiz de Los errores innatos del metabolismo por espectrometria de masas en tandem: principales biomarcadores. *Revista Médica de Chile*. 2011, 139(10), 1356-1364.
14. Rizzo C, Boenzi S, Inglese R, La Marca G, Muraca M, Martinez TB., Dionisi-Vici C. Measurement of succinyl-carnitine and methylmalonyl-carnitine on dried blood spot by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*. 2014, 429, 30-33.
15. Garg U, Dasouki M. Expanded newborn screening of inherited metabolic disorders by tandem mass spectrometry: Clinical and laboratory aspects. *Clinical Biochemistry*. 2006, 39(4), 315–332.
16. Deng K, Zhu J, Yu E, et al. Incidence of inborn errors of metabolism detected by tandem mass spectrometry in China: A census of over seven million newborns between 2016 and 2017. *Journal of Medical Screening*. 2020.
17. Alfadhel M, Al Othaim A, Al Saif S, et al. Expanded Newborn Screening Program in Saudi Arabia: Incidence of screened disorders. *Journal of Paediatrics and Child Health*. 2017, 53(6), 585–591.
18. Frazier DM, Millington DS, McCandless SE, et al. The tandem mass spectrometry newborn screening experience in North Carolina: 1997–2005. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2006, 29(1), 76–85.
19. Howell, RR. The high price of false positives. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2006, 87(3), 180-183.
20. McHugh DMS, Cameron CA, Abdenur JE, et al. Clinical validation of cutoff target ranges in newborn screening of metabolic disorders by tandem mass spectrometry: A worldwide collaborative project. *Genetics in Medicine*. 2011, 13(3), 230–254.
21. Marquardt G, Currier R, McHugh DMS, et al. Enhanced interpretation of newborn screening results without analyte cutoff values. *Genetics in Medicine*. 2012, 14(7), 648–655.
22. Peng G, de Fontnouvelle CA, Enns GM, et al. Elevated methylmalonic acidemia (MMA) screening markers in Hispanic and preterm newborns. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2018.
23. Strnadova KA, Holub M, Muhl A, et al. Long-Term Stability of Amino Acids and Acylcarnitines in Dried Blood Spots. *Clinical Chemistry*. 2007, 53(4), 717–722.
24. Caterino M, Ruoppolo M, Costanzo M, et al. Sex Affects Human Premature Neonates' Blood Metabolome According to Gestational Age, Parenteral Nutrition, and Caffeine Treatment. *Metabolites*. 2021; 11(3):158.
25. Wagner M, Tonoli D, Varesio E, Hopfgartner G. The use of mass spectrometry to analyze dried blood spots. *Mass Spectrometry Reviews*. 2014, 35(3), 361–438.
26. Schimmenti LA, Crombez EA, Schwahn, BC, et al. Expanded newborn screening identifies maternal primary carnitine deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2007, 90(4), 441–445.

27. Longo N, Frigeni M, Pasquali M. Carnitine transport and fatty acid oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2016, 1863(10), 2422–2435.
28. Wilcken B, Wiley V, Sim KG, Carpenter K. Carnitine transporter defect diagnosed by newborn screening with electrospray tandem mass spectrometry. *The Journal of Pediatrics*. 2001, 138(4), 581–584.
29. Rasmussen J, Nielsen OW, Janzen N, et al. Carnitine levels in 26,462 individuals from the nationwide screening program for primary carnitine deficiency in the Faroe Islands. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2013, 37(2), 215–222.
30. Held PK, Singh E, Scott Schwoerer J. Screening for Methylmalonic and Propionic Acidemia: Clinical Outcomes and Follow-Up Recommendations. *International Journal of Neonatal Screening*. 2022; 8(1):13.
31. Kagawa R, Tajima G, Maeda T, et al. Pilot Study on Neonatal Screening for Methylmalonic Acidemia Caused by Defects in the Adenosylcobalamin Synthesis Pathway and Homocystinuria Caused by Defects in Homocysteine Remethylation. *International Journal of Neonatal Screening*. 2021, 7(3), 39
32. La Marca G, Malvagia S, Pasquini E, et al. Rapid 2nd-Tier Test for Measurement of 3-OH-Propionic and Methylmalonic Acids on Dried Blood Spots: Reducing the False-Positive Rate for Propionylcarnitine during Expanded Newborn Screening by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry*. 2007, 53(7), 1364–1369.
33. Scholl-Bürgi S, Korman SH, Applegarth DA, et al. The relation of cerebrospinal fluid and plasma glycine levels in propionic acidaemia, a “ketotic hyperglycinaemia.” *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2008, 31(3), 395–398.
34. Al-Hassnan ZN, Boyadjiev SA, Praphanphoj V, et al. The relationship of plasma glutamine to ammonium and of glycine to acid-base balance in propionic acidaemia. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2003, 26(1), 89–91.
35. Scholl-Bürgi S, Sass JO, Heinz-Erian P, et al. Changes in plasma amino acid concentrations with increasing age in patients with propionic acidemia. *Amino Acids*. 2009, 38(5), 1473–1481.
36. Al-Dirbashi OY, Abu-Amro KK, Alswaid AF, et al. LC-MS/MS determination of dibasic amino acids for the diagnosis of cystinuria. Application in a family affected by a novel splice-acceptor site mutation in the SLC7A9 gene. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2007, 30(4), 611–611.
37. Wasim M, Awan FR, Khan HN, et al. Aminoacidopathies: Prevalence, Etiology, Screening, and Treatment Options. *Biochemical Genetics*. 2017, 56(1-2), 7–21.
38. Manta-Vogli PD, Schulpis KH, Loukas YL, Dotsikas Y. Birth weight related essential, non-essential and conditionally essential amino acid blood concentrations in 12,000 breastfed full-term infants perinatally. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 2020, 1–9.

39. Khneisser I, Adib S, Assaad S, et al. Cost-benefit analysis: Newborn screening for inborn errors of metabolism in Lebanon. *Journal of Medical Screening*. 2015, 22(4), 182–186.

ANEXOS

Normas da revista “*Journal of INBORN ERRORS of METABOLISM and SCREENING*”

Scope and Policy

Original research articles published in JIEMS range from basic research with findings that have implications for disease pathogenesis and therapy, through diagnosis and screening of genetic/metabolic diseases, therapy development and evaluation of outcomes. Original articles, reviews on specific topics, brief communications and case reports are welcome.

JIEMS is an Open Access publication; all articles are freely available online immediately upon publication. All articles are rigorously peer-reviewed, and brought to publication as rapidly as possible. Production costs are covered by Article Processing Charges (APC) paid by the author/institution/funder upon acceptance of their manuscript (more information below).

There is no charge for submitting a paper to JIEMS. The journal's policy is that manuscript are reviewed by at least two expert reviewers. JIEMS utilizes a single-blind peer review process in which the reviewer's name and information is withheld from the author. All manuscripts are reviewed as rapidly as possible, while maintaining rigor. Reviewers make comments to the author's and recommendations to the Editor-in-Chief who then makes his final decision.

Form and preparation of manuscripts

Article Types

JIEMS will consider Original Articles, Reviews on specific topics, Short Communications, Case Reports, Letters to the Editor and Technical Notes. Editorials will also be published, by invitation-only.

Original Articles should contain the following sections: Introduction, Aims, Methods, Results, Conclusions, Acknowledgements and References or similar.

Review articles should contain a summary, an introduction to the topic, a careful review of the relevant literature, conclusions of the reviewed literature and recommendations, if applicable.

Short Communications, Case Reports, and Technical Notes should not exceed 2,500 words. The word count does not apply to figures, tables, references or supplemental material and should be stated in the title page. There is a limit of two figures, or two tables, or one figure plus one table.

Letters to the Editor should refer to a content previously published by JIEMS and should have no more than five authors. They have no abstract, are limited to a maximum of 500 words and should contain no more than two (if any) references. Additional material can be added as supplementary material online

In compliance with SciELO policy, the adoption of ORCID as an identifier of the authors is mandatory. Therefore, JIEMS encourages authors to create their ORCID.

Publication Fees

Upon acceptance of your manuscript, you will be charged a one-time Article Processing Charge (APC). This fee covers the cost of publication and ensures that your article will be open access. Once the APC has been processed, your article will be prepared for publication and can appear online within an average of 25 working days.

An APC of USD 400,00 (USD 200,00 the first or corresponding author is a SLEIMPN member) will be charged upon acceptance of the manuscript.

This APC may be waived by SLEIMPN, in specific circumstances (main author or corresponding author who is member of SLEIMPN for 3 or more years), and by the Editor-in-Chief for invited papers.

Short communications, Case Reports, and Technical Notes submitted until December 31st, 2021, will be granted with a promotional discount of 50 % in the APC.

Authorship

Papers should only be submitted for consideration once the authorization of all contributing authors has been provided. Those submitting papers should carefully check that all those whose work contributed to the paper are acknowledged as contributing authors.

The list of authors should include all those who can legitimately claim authorship. This is all those who have:

- Made a substantial contribution to the concept and design, acquisition of data or analysis and interpretation of data;
- Drafted the article or revised it critically for important intellectual content; and
- Approved the final version to be published.

Authors should meet the conditions of all of the points above. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content.

When a large, multicenter group has conducted the work, the group should identify the individuals who accept direct responsibility for the manuscript. These individuals should fully meet the criteria for authorship.

Acquisition of funding, collection of data, or general supervision of the research group alone does not constitute authorship, although all contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in the Acknowledgments section.

Please refer to the ICMJE Authorship guidelines at <http://www.icmje.org/icmje-recommendations.pdf>.

Submission

Before submitting your manuscript, please ensure you carefully read and adhere to all the guidelines and instructions to the authors provided below. Manuscripts that do not follow the guidelines and journal's requirements will be returned.

Manuscripts submitted to JIEMS may not be under consideration for publication at any other journal at the time of submission and, following submission to JIEMS, may not be submitted for publication to ANY other source pending official, written notification of the final decision by JIEMS. Submission to JIEMS indicates that this is your primary choice for publication and JIEMS retains sole publication rights until a final publication decision is made.

Submissions to JIEMS should be made via ScholarOne™ Manuscripts, a web based online submission and peer review system. Please read the Manuscript Submission guidelines below, and then simply access the ScholarOne™ platform through <https://mc04.manuscriptcentral.com/jiems-scielo>, or www.sleimpn.org to login and submit your article online.

IMPORTANT: Please check whether you already have an account in the system before trying to create a new one. If you have reviewed or authored for the journal recently it is likely that you will have had an account created. For further guidance on submitting your manuscript online please visit ScholarOne™.

All papers must be submitted via the online system. If you would like to discuss any subject related to your paper prior to submission, please refer to the contact details below.

Contributor's Publishing Agreement

Before publication, SciELO requires the author as the rights holder to sign a Journal Contributor's Publishing Agreement. JIEMS publishes manuscripts under [Creative Commons licenses](#). The standard JIEMS license is [Creative Commons by Attribution \(CC-BY\)](#), which allows others to re-use the work without permission as long as the work is properly referenced.

JIEMS and SciELO take issues of copyright infringement, plagiarism or other breaches of best practice in publication very seriously. We seek to protect the rights of our authors and we always investigate claims of plagiarism or misuse of articles published in the journal. Equally, we seek to protect the reputation of the journal against malpractice. Submitted articles may be checked using duplication-checking software. Where an article is found to have plagiarized other work or included third-party copyright material without permission or with insufficient acknowledgement, or where authorship of the article is contested, we reserve the right to take action including, but not limited to: publishing an erratum or corrigendum (correction); retracting the article (removing it from the journal); taking up the matter with the head of department or dean of the author's institution and/or relevant academic bodies or societies; or appropriate legal action.

Statements and Conventions

At the end of your article the following sections should appear: Acknowledgements, followed by your Declaration of Conflict of Interests, funding acknowledgment, references and for manuscripts with 5 or more authors each author must take responsibility for at least one component of the work (e.g.: Conception and design; Acquisition of data; Analysis and data interpretation; Technical procedures; Statistical analysis; Manuscript writing; Critical revision; Final approval).

Acknowledgements

All contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in an 'Acknowledgements' section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

Declaration of conflict of interests

It is the policy of Journal of Inborn Errors of Metabolism and Screening to require a declaration of conflict of interests from all authors enabling a statement to be carried within the paginated pages of all published articles.

Please include any declaration at the end of your manuscript after any acknowledgements and prior to the references, under a heading 'Declaration of Conflict of Interests'. If no declaration is made the following will be printed under this heading in your article: 'None Declared'. Alternatively, you may wish to state that 'The Author(s) declare(s) that there is no conflict of interest'.

When disclosing any conflict of interest, the disclosure information must be specific and include any financial relationship that all authors of the article have with any sponsoring organization and the for-profit interests the organization represents, and with any for-profit product discussed or implied in the text of the article.

Any commercial or financial involvements that might represent an appearance of a conflict of interest need to be additionally disclosed in the covering letter accompanying your article to assist the Editor in evaluating whether sufficient disclosure has been made within the Declaration of Conflicting Interests provided in the article.

Funding acknowledgements

To comply with the guidance for research funders, authors and publishers issued by the Research Information Network (RIN), JIEMS additionally requires all authors to acknowledge their funding in a consistent fashion under a separate heading.

Where no specific funding has been provided for the research we ask that corresponding author uses the following sentence: "This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors."

Other statements

Research ethics

All papers reporting animal and human studies must include whether written consent was obtained from the local Ethics Committee or Institutional Review Board. Please ensure that you have provided the full name and institution of the review committee and an Ethics Committee reference number.

We accept manuscripts that report human and/or animal studies for publication only if it is made clear that investigations were carried out to a high ethical standard. Studies in humans which might be interpreted as experimental (e.g. controlled trials) should conform to the Declaration of Helsinki <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html> and typescripts must include a statement that the research protocol was approved by the appropriate ethics committee. In line with the Declaration of Helsinki 1975, revised Hong Kong 1989, we encourage authors to register their clinical trials (at <http://clinicaltrials.gov> or other suitable databases identified by the ICMJE, <http://www.icmje.org/about-icmje/faqs/clinical-trials-registration/>). If your trial has been registered, please state this on the Title Page. When reporting experiments on animals, indicate on the Title Page which guideline/law on the care and use of laboratory animals was followed.

Patient consent

Authors are required to ensure the following guidelines are followed, as recommended by the International Committee of Medical Journal Editors, Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: <http://www.icmje.org/about-icmje/faqs/icmje-recommendations/>. Patients have a right to privacy that should not be infringed without informed consent. Identifying information, including patients' names, initials, or hospital numbers, should not be published in written descriptions, photographs, and pedigrees unless the information is essential for scientific purposes and the patient (or parent or guardian) gives written informed consent for publication. Informed consent for this purpose requires that a patient who is identifiable be shown the manuscript to be published.

Identifying details should be omitted if they are not essential. Complete anonymity is difficult to achieve, however, an informed consent should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of patients is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic pedigrees, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning and editors should so note. When informed consent has been obtained it should be indicated in the submitted article.

CONSORT & ICMJE

All randomized controlled trials submitted for publication should include a completed Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT) flow chart. Please refer to the CONSORT statement website at <http://www.consort-statement.org> for more information.

JIEMS has adopted the proposal from the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), which requires, as a condition of consideration for publication of clinical trials, registration in a public trials registry. Trials must register at or before the onset of patient enrolment. The clinical trial registration number should be included at the end of the abstract of the article. For this purpose, a clinical trial is defined as any research project that prospectively assigns human subjects to intervention or comparison groups to study the cause-and-effect relationship between a medical intervention and a health outcome. Studies designed for other purposes, such as to study pharmacokinetics or major toxicity (e.g. phase I trials), would be exempt. Further information can be found at www.icmje.org.

Medical writers

If paid or unpaid medical writing services are used in the manuscript, this should be clearly informed in the Acknowledgements section. If medical writers meet criteria for authorship, they should be included in the author list.

Statistical analyses

Where statistical analyses have been carried out please ensure that the methodology has been accurately described. In comparative studies power calculations are usually required. In research papers requiring complex statistics the advice of an expert statistician should be sought at the design/implementation stage of the study.

Permissions

Authors are responsible for obtaining permission from copyright holders for reproducing any illustrations, tables, figures or lengthy quotations previously published elsewhere. NB: If an author is using their own work they will still require permission if they did not retain copyright of the previously published work. Papers will not be accepted for publication without the correct permissions.

Manuscript preparation

The text should be double-spaced throughout and with a minimum of 3 cm inches for left and right hand margins and 5 cm inches at head and foot. Text should be standard 12 point.

The abstract should consist of no more than 200 words summarizing the contents of the article. Please do not subdivide, e.g. Background, Aim, Results, Conclusion, or similar. The abstract must stand alone, and it should be presumed that the reader has some knowledge of the subject but has not read the paper. At least 3 **Keywords** should be provided after the abstract.

Title Page

The title page should give the following information: (1) title of the article (in bold), as short and informative as possible, without any abbreviation; (2) one first name, initials (if applicable) and last name of each author; (3) name and address of the department or institution to which the work should be attributed; (4) name, telephone, fax number and e-mail address of the corresponding author and to whom the proofs should be sent.

Citations and References

JIEMS manuscripts must be prepared in accordance with the [American Medical Association](#) (AMA) style guidelines (10th edition). The authors are responsible for the accuracy of the references. Key the references (double-spaced) at the end of the manuscript. Cite the references in text in the order of appearance. Examples below.

Book:

Katz DL, *Clinical Epidemiology & Evidence-Based Medicine: Fundamental Principles of Clinical Reasoning & Research*, Thousand Oaks, CA: SAGE; 2001.

Chapter:

Schulz, J, HIV testing. In Kirton C, ed., *ANAC's Core Curriculum for HIV/AIDS Nursing*, 2nd ed. Thousand Oaks, CA: SAGE; 2003.

Journal:

Baldo G, Mayer FQ, Martinelli BZ, et al. Enzyme replacement therapy started at birth improves outcome in difficult-to-treat organs in mucopolysaccharidosis I mice. *Mol Genet Metab*. 2013; 109(1): 33-40.

English language

The text must be in English language. If the authors' native language is not English, we strongly encourage review and editing by a colleague whose native language is English or the use of an English language editing service.

Editorial peer-review and processing

Manuscripts submitted by authors to the JIEMS will be initially evaluated by the Editor-in-Chief, regarding the scope and standards and by the Assistant Technical Editors regarding formatting and technical requirements.

In this phase, the manuscript may be rejected or returned to the author for adjustments. If the manuscript is in accordance with the rules, it will be forwarded to the Associate Editor, who will designate, peer-reviewers for evaluation of the scientific content. Based on the peer-review, the Associate Editor makes a recommendation to the Editor-in-Chief, who will take the final decision.

The process can be followed by the author in the management system. All accepted manuscripts will be edit by our publishing team to fit the journal format. After authors' approval, the manuscript will be published.

Guidelines for submitting artwork, figures and other graphics

Figures: Figures must be submitted as separate files. Formats for figures are TIFF or JPEG. They must be numbered consecutively using Arabic numerals. Figures in Word, PowerPoint or Excel format cannot be published. Only nucleic acid sequence data can be presented in Word format.

Line art must have a resolution of at least 1200 dpi (dots per inch), and electronic photographs; radiographs, CT scans, MRIs, all medical imaging, and all scanned images must have a resolution of at least 300 dpi. If fonts are used in the artwork, they must be converted to paths or outlines or they must be embedded in the files. Color images must be created/scanned, saved and submitted as CMYK files. Please note that artwork generated from office suite programs such as CorelDRAW and MS Word and artwork downloaded from the Internet (JPEG or GIF files) cannot be used.

Figure Legends: Legends must be submitted for all figures. They should be brief and specific, and they should appear on a separate page place following the references. Use scale markers in the image for electron micrographs and indicate the type of stain used.

Tables: Create tables using the table creating and editing feature of your word processing software (e.g., MS Word or Excel). Group all tables at the end of the manuscript, or supply them together in a separate file. Cite tables consecutively in the text, and number them in that order. Key each on a separate sheet, and include the table title, appropriate column heads, and explanatory legends (including definitions of any abbreviations used). Do not embed tables within the body of the manuscript. They should be self-explanatory and should supplement, rather than duplicate, the material in the text.

After Acceptance

Proofs

We will email a PDF of the proofs to the corresponding author. Any accompanying queries should be answered as soon as possible (typically in 48 hours) so that publication is not delayed.

E-Prints

[Baixar pdf](#)

Further Information

Any correspondence, queries or additional requests for information should be sent to the following e-mail:
jiems@jiems-journal.org