

PAPEL DE LA PROTEÍNA ASOCIADA A PANCREATITIS EN EL CRIBADO NEONATAL DE LA FIBROSIS QUÍSTICA.

I. Delgado Pecellín¹, M.E. Quintana Gallego², J. Mora Vallellano³, J.L. López-Campos², A.I. Álvarez Ríos³, M.J. Moreno Valera⁴, C. Delgado Pecellín³.

¹Unidad de Neumología y Alergología Pediátrica, Unidad de Fibrosis Quística, Servicio de Pediatría, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES). Instituto Carlos III, Madrid.

²Unidad Médico-Quirúrgica Enfermedades Respiratorias. Instituto Biomedicina Sevilla (IBIS). Hospital Universitario Virgen del Rocío. Centro Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES). Instituto de Salud Carlos III, Madrid.

³Servicio de Bioquímica Clínica, Unidad de Metabolopatías, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla.

⁴Unidad de Neumología y Alergología Pediátrica, Servicio de Pediatría, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla.

Proyecto Financiado con la Beca Neumosur nº 5/2016.

RESUMEN

Objetivo: El objetivo es comparar la eficacia de dos métodos de cribado de fibrosis quística (FQ) mediante la utilización de la medición del tripsinógeno inmunorreactivo (TIR) y la proteína asociada pancreatitis (PAP) en gota de sangre seca.

Métodos: Estudio observacional prospectivo que evaluó a neonatos con niveles de TIR inicial (TIR1) mayor de 50ng/mL a los que se le ha realizado cuantificación de la PAP y una segunda determinación de TIR (TIR2) entre diciembre 2017 y junio 2020. Se comparó la detección de FQ entre dos protocolos de cribado TIR1/TIR2 vs TIR1/PAP/TIR2.

Resultados: Durante el período analizado se sometieron a cribado neonatal 60.399 neonatos, de los que 316 tuvieron TIR1 elevada. Se confirmaron 10 casos de FQ, con una incidencia de 1 caso por cada 6.039 neonatos cribados. El protocolo TIR1/TIR2 identificó 34 casos con una sensibilidad del 88,89%, especificidad 91,53%, valor predictivo positivo 23,53% y valor predictivo negativo de 99,65%. El protocolo TIR1/PAP/TIR2 obtuvo una sensibilidad 88,89 %, especificidad 96,42%, valor predictivo positivo 42,11% y valor predictivo negativo 99,66%. El alelo c.1521_1523delCTT se identificó en el 80% de los casos.

Conclusiones: El protocolo TIR1/PAP/TIR2 aumenta la especificidad del cribado neonatal, obteniendo una disminución del 4,89% de la proporción de falsos positivos respecto al protocolo TIR1/TIR2. Este nuevo protocolo de cribado puede permitir hacer un cribado de la FQ más eficiente.

Palabras clave: fibrosis quística, cribado neonatal, tripsinógeno inmunorreactivo, proteína asociada pancreatitis.

ABSTRACT

Objective: The aim is to compare the efficacy of two screening methods for cystic fibrosis (CF) by measuring immunoreactive trypsinogen (IRT) and pancreatitis-associated protein (PAP) in dried blood spots.

Methods: Prospective observational study that evaluated neonates with initial IRR levels (IRR1) greater than 50ng/mL who underwent PAP quantification and a second IRR determination (IRR2) between December 2017 and June 2020. The CF detection between two screening protocols TIR1/TIR2 vs TIR1/PAP/TIR2.

Results: During the analyzed period, 60,399 neonates underwent neonatal screening, of which 316 had elevated IRR1. 10 cases of CF were confirmed, with an incidence of 1 case per 6,039 newborns screened. The TIR1/TIR2 protocol identified 34 cases with a sensitivity of 88.89%, specificity 91.53%, positive predictive value 23.53%, and negative predictive value 99.65%. The TIR1/PAP/TIR2 protocol obtained a sensitivity of 88.89%, a specificity of 96.42%, a positive predictive value of 42.11%, and a negative predictive value of 99.66%. The c.1521_1523delCTT allele was identified in 80% of cases.

Conclusions: The TIR1/PAP/TIR2 protocol increases the specificity of neonatal screening, obtaining a 4.89% decrease in the proportion of false positives compared to the TIR1/TIR2 protocol. This new screening protocol may allow CF screening to be more efficient.

Keywords: cystic fibrosis, neonatal screening, immunoreactive trypsinogen, pancreatitis associated protein.

INTRODUCCIÓN

Desde sus comienzos en Nueva Zelanda y Australia, el cribado neonatal de la fibrosis quística se ha ido extendiendo a los diferentes estados de EE. UU y la mayoría de los países europeos¹⁻³. En los últimos años, este cribado se ha incluido dentro de las enfermedades incluidas en la mayoría de los programas de cribado neonatal en España.

Los resultados de este cribado neonatal han puesto de manifiesto beneficios a largo plazo, tales como mejor estado nutricional, menor deterioro de la función pulmonar, menor tasa de colonizaciones crónicas, menor estrés asociado a un diagnóstico tardío y un menor coste¹⁻⁵. Consecuentemente, el cribado neonatal de la FQ se ha extendido al resto de países y consolidado dentro del cribado neonatal.

Recibido: 23.02.2021 Aceptado: 22.04.2021

Dra. Isabel Delgado Pecellín
idelpe@gmail.com

De manera interesante, a pesar de los beneficios clínicos demostrados, hasta el momento no existe un programa de cribado universal, existiendo una considerable variabilidad en el algoritmo usado en cada centro^{1,3}. La gran mayoría de los programas de cribado comienzan con una primera determinación de tripsinógeno inmunorreactivo (TIR1), pasando en un segundo tiempo a la determinación de diferentes marcadores en aquellos sujetos con elevación de este biomarcador. Entre los estudios realizados en este segundo tiempo se incluyen la determinación de la proteína asociada a pancreatitis (PAP), una nueva determinación de TIR (TIR2) o bien directamente el estudio genético de las mutaciones asociadas a la FQ^{1,3}.

Consecuentemente, las potenciales diferencias en el perfil diagnóstico de cada algoritmo pueden condicionar la detección de nuevos casos de FQ^{1,3,5}. Además, la sospecha de una FQ tras la primera determinación conlleva no solo costes asociados al resto de pruebas, sino que produce una angustia familiar y es causa de absentismo laboral. Por tanto, sería necesario contar con un algoritmo de cribado lo más certero posible. El objetivo del presente trabajo fue la comparación de dos algoritmos de cribado neonatal para la FA en Andalucía occidental que permita comparar los resultados de dos estrategias, TIR1/TIR2 frente a TIR1/PAP/TIR2. Los resultados del presente trabajo ayudarán a identificar la mejor estrategia posible en nuestro entorno sanitario.

MÉTODO

Se trata de un estudio observacional prospectivo realizado entre diciembre 2017 y junio 2020 en la Unidad de Referencia de Fibrosis Quística de Andalucía Occidental del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla. La población en estudio estaba compuesta por recién nacidos, mayores de 24 horas y menores de 28 días de vida, con niveles de TIR1 mayores o iguales a 50 ng/mL. Se excluyeron a niños cuyos padres o representantes legales no firmen el consentimiento informado, niños con otras enfermedades que puedan interferir en los resultados del cribado neonatal, tales como, cardiopatías congénitas, insuficiencia renal y encefalopatía hipóxico-isquémica y a aquellos de los que no se dispuso de muestras de sangre seca en papel, tras completar el screening neonatal ampliado. Durante el trabajo de campo se recogieron datos clínicos mediante un cuestionario estandarizado que incluía datos socio-demográficos (edad, sexo), edad gestacional en semanas, peso al nacer en gramos, lactancia materna y la cuantificación de cloro en el sudor mediante la realización de un test del sudor.

El algoritmo diagnóstico realizado está resumido en la **figura 1**. Tras la determinación de TIR1, a todos los pacientes incluidos en el estudio se les realizó una cuantificación de PAP en la muestra de sangre seca en papel que en su día los padres remitieron para la cuantificación del TIR1. La única excepción eran los casos que presentaron un TIR1 ≥ 150 ng/ml, a los que se les realizaba directamente el TIR2. Para la determinación del punto de corte óptimo para discriminar FQ mediante los niveles de PAP nos basamos en datos previamente publicados⁶. TIR2 fue recogida entre los días 25 - 28 días de vida y aquellos pacientes con TIR2 igual o superior a 35 ng/ml se remitieron a la unidad de FQ para la realización de test del sudor. En aquellos neonatos con cloruro en sudor igual o superior a 30 mmol/L se le realizó estudio genético de FQ.

Las determinaciones de laboratorio se realizaron sobre una muestra de gota seca en papel secante. Para la obtención de estas muestras se dispuso de papel cromatográfico Whatman 903[®] utilizado para la realización del programa de cribado neonatal. La muestra fue recortada en círculos de 3 mm utilizando un taladrador de Perkin Elmer y se utilizó la misma muestra para la determinación de TIR1 y PAP.

Los niveles de TIR fueron determinados mediante técnica de ELISA utilizando el kit comercial DELFIA Neonatal IRT (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), siguiendo las instrucciones del fabricante. El equipo usado en la lectura de placas fue DELFIA de Perkin Elmer. Los niveles de PAP fueron determinados mediante técnica de ELISA mediante el uso del kit comercial, MucoPAP ELISA kit (DynaBio, Marseille, France) siguiendo las instrucciones del fabricante. El equipo usado en la lectura de placas sería DELFIA de Perkin Elmer. El fundamento de la técnica fue un fluoroinmunoensayo. El estudio genético se realizó el kit de cribado de mutaciones relacionadas con la FQ Elucigene[®] CF-EU2v1 kit (Elucigene Diagnostics, Manchester, UK).

El proyecto fue aprobado por el comité ético y de investigación local (código 1293-N-16) bajo los principios de la Declaración de Helsinki para proyectos de investigación con seres humanos. Todos los participantes fueron informados de la naturaleza del estudio y sus objetivos y otorgaron su participación en el mismo mediante firma del consentimiento informado a los padres o tutores legales de los neonatos coincidiendo con la solicitud de nueva muestra para la cuantificación de la TIR2, tal y como está establecido en el programa de screening neonatal de FQ en Andalucía.

ESTUDIO ESTADÍSTICO

Previo al inicio del reclutamiento se estimó un tamaño muestra de 260 muestras para conseguir una potencia del 80% para detectar diferencias en el contraste de la hipótesis nula $H_0: p_1 = p_2$ mediante una prueba de McNemar para dos muestras relacionadas, teniendo en cuenta que el nivel de significación es del 5% y asumiendo que la sensibilidad del TIR2 es del 85%, esperando encontrar una sensibilidad del 95% con PAP y la proporción de pares discordantes es del 30% e incluyendo un 10% de abandono.

Las variables se describieron usando medidas de centralización y dispersión para las variables cuantitativas y mediante las frecuencias absolutas y relativas para las cualitativas. Utilizando el estudio genético como estándar de referencia se realizó un análisis del perfil diagnóstico de cada algoritmo de cribado calculando la sensibilidad, la especificidad, así como los valores predictivos positivos y negativos y la exactitud, junto con sus intervalos de confianzas del 95%. El análisis estadístico se realizó con el programa IBM SPSS Statistics (Armonk, Nueva York, EEUU), versión 19.0.

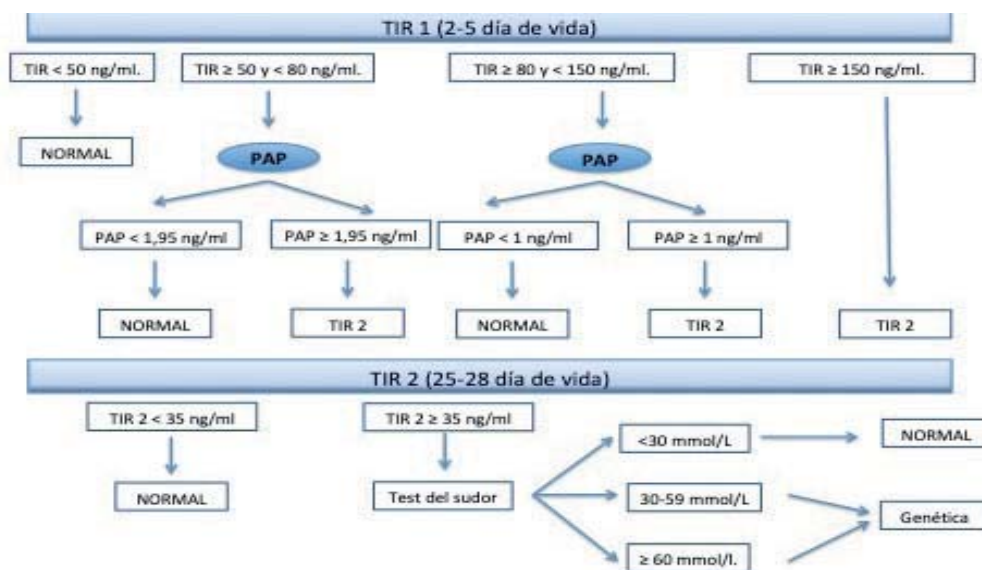
RESULTADOS

Durante el período analizado 60.399 neonatos se sometieron al cribado de FQ. De ellos 840 (1,39%) tuvieron una TIR1 elevada y tuvieron que someterse a una según muestra de TIR2 a los 25 - 28 días de vida, de los que 64 fueron positivas (0,1%). Hemos reclutado un total de 316 pacientes con TIR1 positiva que finalmente constituye nuestra población de análisis. El resto de recién nacidos con TIR1 positiva no se incluyeron en el estudio por no dar los padres el consentimiento informado o por tener muestra insuficiente para la cuantificación de PAP. La **tabla 1** resume las características de los neonatos incluidos.

Según el protocolo TIR1/TIR2, de los 316 recién nacidos que han participado en el estudio, 34 han tenido un cribado positivo. Según el protocolo TIR1/PAP/TIR2, de los 316 recién nacidos que han participado en el estudio, 19 han tenido un cribado positivo. El perfil diagnóstico de ambos protocolos está resumido en la **tabla 2**. Comparando ambos protocolos, la proporción de falsos positivos que se pueden disminuir utilizando la estrategia TIR/PAP/TIR2 es de 4,89%. La **tabla 3** resume las características bioquímicas de los neonatos con $TIR1 \geq 150$ ng/ml.

Durante el período de datos analizados se diagnosticaron un total de 10 pacientes, que supone una incidencia de la enfermedad de 1:6.039. La **tabla 4** recoge los niveles de TIR1, TIR2, PAP, test del sudor, mutaciones y niveles de elastasa fecal de los 10 fibróticos quísticos diagnosticados durante el período de estudio.

Figura 1. Algoritmo diagnóstico de screening de fibrosis quística.



TIR: tripsina inmunorreactiva; PAP: proteína asociada a pancreatitis.

Tabla 1. Descripción de la muestra.

Variable	Valor* (n = 316)
Sexo niño	132 (41,8%)
Edad gestacional (semanas)	39,1 (1,8)
Lactancia materna	142 (44,9%)
Peso al nacer (g)	3.222,7 (539,7)
TIR1 (ng/ml)	77,8 (47,0)
TIR2 (ng/ml)	26,4 (30,7)
PAP (ng/ml)	1,9 (4,4)

* Expresado en media (desviación estándar) o por sus frecuencias absolutas (relativas) según la naturaleza de las variables

Tabla 2. Comparativa de los resultados del cribado según los protocolos TIR1/TIR2 y TIR1/PAP/TIR2.

	Protocolo TIR1/TIR2			Protocolo TIR1/PAP/TIR2		
	Valor	IC 95%		Valor	IC 95%	
Sensibilidad	88,9%	85,4%	92,3%	88,9%	85,4%	92,3%
Especificidad	91,5%	88,5%	94,6%	96,4%	94,4%	98,5%
Proporción falsos positivos	8,5%	5,4%	11,5%	3,6%	1,5%	5,6%
Proporción falsos negativos	11,1%	7,6%	14,6%	11,1%	7,6%	14,6%
Valor predictivo positivo	23,5%	18,8%	28,2%	42,1%	36,6%	47,5%
Valor predictivo negativo	99,6%	98,9%	100,0%	99,6%	99,0%	100,0%

Tabla 3. Características bioquímicas de los neonatos con TIR1 ≥150 ng/ml.

TIR1 (ng/ml)	PAP (ng/ml)	TIR2 (ng/ml)	Cloro sudor (mmol/l)	Mutaciones
275	4,74	28,9	---	
189	4,51	20,95	---	
196	0,51	27,7	---	
164	21,7	164,5	87,2	c.1521_1523delCTT/c.1521_1523delCTT
249,5	3,84	15,1	---	
222	15,9	271	101,3	c.1521_1523delCTT/c.3196C>T
260	23,2	134	104	c.1521_1523delCTT/c.2125C>T
579	0,32	364	12	Quiste mesentérico.
455	0,72	8,59	---	
232	0,52	9,1	---	
468	0,48	21,6	---	
174	12	130	103,1	c.1521_1523delCTT/c.1521_1523delCTT
208	0,52	8,86	---	
152	1,78	33,6	---	
150	18,1	15,4		

Tabla 4. Descripción de los pacientes diagnosticados de fibrosis quística.

Caso	TIR1 (ng/ml)	TIR2 (ng/ml)	PAP (ng/ml)	Cloro sudor (mmol/l)	Mutaciones	Elastasa fecal (µg/gr heces)	IP
1	164	164,5	21,7	87,2	c.1521_1523delCTT/c.1521_1523delCTT	<15	Sí
2	75,1	38,3	0,9	68,8	c.1647T>G/c.3140-26A>G	>500	No
3	222	271	15,9	101,3	c.1521_1523delCTT/c.3196C>T	<15	Sí
4	78,4	43,5	3,74	14,8	c.350G>A;c.3909C>G	>500	No
5	99,5	49,1	2,25	30,2	c.1521_1523delCTT; C.1210-12T[5]; 1210-34TG[13]; [1210-12T[9]]	>500	No
6	102	101	4,89	98	c.1521_1523delCTT/ c.3484C>T	< 15	Sí
7	260	134	23,3	104	c.1521_1523delCTT/c.2125C>T	< 15	Sí
8	131	70,2	9,54	95	c.1521_1523delCTT/c.2051_2052delAAinsG	<15	Sí
9	88,9	120	1,43		c.1521_1523delCTT/c.1853_1863del	<15	Sí
10	174	130	12	130,1	c.1521_1523delCTT/ c.1521_1523delCTT	<15	Sí

TIR: tripsinógeno inmunorreactivo. PAP: proteína asociada pancreatitis. IP: insuficiente pancreático.

DISCUSIÓN

El presente estudio evalúa la comparación de dos métodos de cribado neonatal para la detección de FQ. Según nuestros resultados, la introducción de la PAP como segundo marcador presentó un mejor perfil diagnóstico que el protocolo basado en dos determinaciones de TIR.

La FQ es una enfermedad genética con un alto impacto en la salud de los pacientes y los familiares, además de un elevado coste para el sistema sanitario. Debido a su importancia resulta relevante poder establecer claramente los protocolos de cribado de una enfermedad con una alta carga psicológica. Se sabe que el protocolo TIR1/TIR2 asocia gran cantidad de resultados falsos positivos, que afectan a la ansiedad de los padres debido a la incertidumbre prolongada sobre un posible diagnóstico de FQ y que obliga a la derivación de pacientes a las unidades de referencia de FQ para completar el estudio, con el consiguiente consumo de recursos sanitarios¹. Mediante el algoritmo TIR1/PAP/TIR2 se observa una clara reducción de esa proporción de falsos positivos. Entre las causas de falsos positivos descritos en la bibliografía se encuentran la prematuridad, las cardiopatías congénitas, insuficiencia renal, íleo meconial, muestras de sangre extraídas muy precoz o tardíamente, estrés, o la asfixia perinatal, entre otros^{2, 7-10}.

La PAP es una proteína secretora que no se puede medir en sangre en condiciones normales, pero que se puede detectar en grandes cantidades en el contexto de una lesión pancreática^{2, 3}. Un estudio piloto demostró que la mayoría de los recién nacidos con TIR positiva sin FQ tenían una PAP normal, mientras que la PAP estaba aumentada en los recién nacidos con FQ³. Sin embargo, el aumento de la PAP observado en los recién nacidos no es específica de la FQ³. Si la medición de PAP se usara solo para el cribado neonatal de la FQ, tendría una especificidad similarmente baja como el uso del TIR de manera aislada³.

La PAP ha estado elevada en todos nuestros FQ excepto en el paciente número 2 que presentó también niveles normales de TIR2 debido a que porta mutaciones leves que justifican la ausencia de elevación de PAP y sin suficiencia pancreática.

Comparando con otros estudios con un algoritmo similar encontramos en la bibliografía que Marcão y colaboradores hallaron una sensibilidad y especificidad del 94,44y99,98% respectivamente mediante el programa TIR1/PAP/TIR21. Krulišová V et al. sometieron a cribado a 106.522 recién nacidos mediante el algoritmo TIR/PAP. Los puntos de corte de la PAP utilizados, acordes a las características epidemiológicas de su población, fueron de ≥1,8ng/mL para los recién nacidos con TIR entre 50,0 y 99,9 ng/ml y para la TIR ≥100.0 consideraron una PAP ≥1,0 ng/mL. Mediante el algoritmo TIR/PAP estos autores encontraron una sensibilidad del 76,19, ligeramente inferior a la nuestra y una especificidad de 99,82¹¹.

Una de las principales ventajas de los protocolos que incluyen determinación de PAP frente a los que incluyen determinación de mutaciones del gen de la FQ es que no es necesario incluir un consentimiento informado para la realización de genética y evita su efecto colateral del estudio de genético, como es el posible diagnóstico de portadores o la detección de casos de cribado de FQ positivo con diagnóstico no concluyente^{1, 3, 12-14}. En los últimos años, con el aumento de la migración y la mezcla de diferentes grupos étnicos, especialmente en las grandes ciudades, existe una tendencia a aumentar el panel de mutaciones de FQ para asegurar una sensibilidad suficiente³, aumentando así el riesgo de detectar portadores y pacientes con diagnóstico concluyente³. La PAP también puede ser una herramienta valiosa para identificar recién nacidos con íleo meconial ya que aproximadamente un 30% de los pacientes con FQ que debutan con un íleo meconial tienen valores normales de TIR1, pudiendo ser causas de falsos negativos¹⁵.

Existen estudios que demuestran que la estrategia TIR/PAP es además también viable en términos de costes por caso detectado^{1, 2, 9, 10, 16, 17}, aunque las tasas de detección de formas clásicas de FQ podría ser menor en comparación con las estrategias TIR/ADN^{7, 12, 15}. Según Seror *et al.* la tasa de detección de formas clásicas de FQ obtenidas con la estrategia TIR/PAP es similar a la obtenida con TIR/ADN y con TIR/PAP/ADN, pero la estrategia TIR/PAP requiere menos recursos y permite una detección de un número menor de formas leves en comparación con TIR/ADN¹⁵.

La incidencia encontrada en nuestro estudio realizado en Andalucía occidental ha sido de 1 por cada 6.039 recién nacidos, ligeramente mayor respecto a la encontrada en un estudio que analizaba los resultados del cribado neonatal de FQ de Andalucía tras cinco años desde su implantación, donde la incidencia encontrada fue de 1 caso por cada 6.506 recién nacidos⁷. La incidencia encontrada en este estudio es, sin embargo, menor a la existente en Galicia y Castilla y León (1:4.439), y Aragón (1:4.800). Igualmente, es inferior a la incidencia global de España según la Asociación Española del Cribado Neonatal y similar a la encontrada en Cataluña (1:6.244) y las Islas Baleares (1:6.602)^{7, 18, 19}.

Pese a la elevada heterogeneidad genética de la población andaluza, la mutación más frecuentemente encontrada fue la F508del (c.1521_1523delCTT), presente en 8 (80%) de los 10 pacientes diagnosticados en el período estudiado, similar a la de otros artículos publicados²⁰. De ellos, 2 (25%) fueron homocigotos para dicha mutación, frente al 75% de los pacientes restantes que la presentaron en heterocigosis.

El presente estudio muestra los posibles beneficios de la cuantificación de la PAP en el SNFQ de Andalucía occidental, no estudiado hasta ahora, pero presenta la limitación de no haber podido incluir al 100% de los recién nacido con TIR1 positivo.

En conclusión, el presente estudio pone de manifiesto la implantación del algoritmo de SNFQ TIR1/PAP/TIR2 en nuestra población permitiría una clara reducción de los falsos positivos con el consiguiente aumento del valor predictivo positivo. Nuestro estudio demuestra que la cuantificación de PAP y TIR en duplicado en muestras de sangre seca de la primera semana de vida (algoritmo TIR1/PAP/TIR2) mejora el rendimiento del cribado neonatal para la FQ en nuestra población, logrando aumentar la especificidad sin disminuir la sensibilidad y especialmente permite reducir significativamente la tasa de falsos positivos. La consecuencia es una reducción de pacientes que precisan derivación a unidades de referencia y el consumo de recursos sanitarios asociados, evitando los

problemas asociados al estudio de mutaciones del gen de la FQ.

AGRADECIMIENTOS

A los técnicos de la Unidad de Metabolopatías del Hospital Virgen del Rocío por su empeño en la obtención de las muestras de sangre en papel seco de todos los pacientes incluidos en el estudio.

CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

La Dra. María Esther Quintana Gallego y la Dra. María José Moreno Valero han participado en la redacción del proyecto de tesis y en la valoración clínica de los recién nacidos con SNFQ positivo derivados a la Unidad de Referencia de Andalucía occidental del Hospital Virgen del Rocío; la Dra. Josefa Mora Vallengano, Dra. Carmen Delgado Pecellín y Dra. Ana Isabel Álvarez Ríos han participado en la inclusión de los recién nacidos con TIR1 positiva y en el análisis de la PAP en las muestras de sangre seca en papel; el Dr. José Luis López-Campos ha participado en la escritura del proyecto de investigación, en la redacción del artículo y en el análisis estadístico de todos los datos; la Dra. Isabel Delgado Pecellín se ha encargado de la elaboración del proyecto de investigación y del presente artículo y en la coordinación de las actividades de los diferentes autores.

BIBLIOGRAFÍA

1. Marcao A, Barreto C, Pereira L et al. Cystic Fibrosis Newborn Screening in Portugal: PAP Value in Populations with Stringent Rules for Genetic Studies. *Int J Neonatal Screen.* 2018; 4(3): 22.
2. Sadik I, Perez de Algaba I, Jimenez R et al. Initial Evaluation of Prospective and Parallel Assessments of Cystic Fibrosis Newborn Screening Protocols in Eastern Andalusia: IRT/IRT versus IRT/PAP/IRT. *Int J Neonatal Screen.* 2019; 5(3): 32.
3. Sommerburg O, Hammermann J. Pancreatitis-Associated Protein in Neonatal Screening for Cystic Fibrosis: Strengths and Weaknesses. *Int J Neonatal Screen.* 2020; 6(2): 28.
4. Castellani C, Massie J, Sontag M, et al. Newborn screening for cystic fibrosis. *Lancet Respir Med.* 2016; 4(8): 653-61.
5. Farrell PM, Sommerburg O. Toward quality improvement in cystic fibrosis newborn screening: Progress and continuing challenges. *J Cyst Fibros.* 2016; 15(3): 267-9.
6. Pajares García S, López Galera RM, Marín Soria JL et al. [Impact of the inclusion of second-tier tests in the newborn screening program of Catalonia and in other international programs.]. *Rev Esp Salud Publica.* 2020; 94.
7. Delgado Pecellín I, Perez Ruiz E, Alvarez Rios AI et al. Results of the Andalusian Cystic Fibrosis Neonatal Screening Program, 5 Years After Implementation. *Arch Bronconeumol.* 2018; 54(11): 551-8.
8. Arrudi-Moreno M, García-Romero R, Samper-Villagrasa al. [Neonatal cystic fibrosis screening: Analysis and differences in immunoreactive trypsin levels in newborns with a positive screen]. *An Pediatr (Barc).* 2020.

9. Korzeniewski SJ, Young WI, Hawkins HC et al. Variation in immunoreactive trypsinogen concentrations among Michigan newborns and implications for cystic fibrosis newborn screening. *Pediatr Pulmonol.* 2011; 46(2): 125-30.
10. Kay DM, Langfelder-Schwind E, DeCeglie-Germana J et al. Utility of a very high IRT/No mutation referral category in cystic fibrosis newborn screening. *Pediatr Pulmonol.* 2015; 50(8): 771-80.
11. Krulisova V, Balascakova M, Skalicka V et al. Prospective and parallel assessments of cystic fibrosis newborn screening protocols in the Czech Republic: IRT/DNA/IRT versus IRT/PAP and IRT/PAP/DNA. *Eur J Pediatr.* 2012; 171(8): 1.223-9.
12. Sarles J, Giorgi R, Berthezene P et al. Neonatal screening for cystic fibrosis: comparing the performances of IRT/DNA and IRT/PAP. *J Cyst Fibros.* 2014; 13(4): 384-90.
13. Kay DM, Maloney B, Hamel R et al. Screening for cystic fibrosis in New York State: considerations for algorithm improvements. *Eur J Pediatr.* 2016; 175(2): 181-93.
14. Southern KW. Determining the optimal newborn screening protocol for cystic fibrosis. *Thorax.* 2012; 67(4): 281-2.
15. Seror V, Cao C, Roussey M et al. PAP assays in newborn screening for cystic fibrosis: a population-based cost-effectiveness study. *J Med Screen.* 2016; 23(2): 62-9.
16. Van der Ploeg CP, van den Akker-van Marle ME, Vernooij-van Langen AM et al. Cost-effectiveness of newborn screening for cystic fibrosis determined with real-life data. *J Cyst Fibros.* 2015; 14(2): 194-202.
17. Schmidt M, Werbrouck A, Verhaeghe N et al. Strategies for newborn screening for cystic fibrosis: A systematic review of health economic evaluations. *J Cyst Fibros.* 2018; 17(3): 306-15.
18. Bauca JM, Morell-Garcia D, Vila M et al. Assessing the improvements in the newborn screening strategy for cystic fibrosis in the Balearic Islands. *Clin Biochem.* 2015; 48(6): 419-24.
19. Gartner S, Cobos N. [Neonatal screening for cystic fibrosis]. *An Pediatr (Barc).* 2009; 71(6): 481-2.
20. Bobadilla JL, Macek M, Jr., Fine JP et al. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat.* 2002; 19(6): 575-606.