

# Cribado neonatal y genotipado

Begoña Ezquieta<sup>1</sup>, Elena Dulín<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Laboratorio Diagnóstico Molecular Servicio de Bioquímica. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid*

<sup>2</sup>*Laboratorio Cribado Neonatal de la Comunidad de Madrid. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid*

Recogemos en este resumen los aspectos más relevantes de la Editorial dedicada al cribado neonatal y genotipado de la hiperplasia suprarrenal congénita (HSC, Dulín y Ezquieta 2018). Remitimos a ella para su lectura completa incluyendo el material complementario aportado en dicha publicación relativo al análisis *CYP21A2* como herramienta de confirmación y para descartar la enfermedad en las sospechas neonatales y cribado neonatal. El resumen incluye también las observaciones relativas al cribado neonatal, determinación de 17OH proges terona y genotipado *CYP21A2* en la HSC por deficiencia de esteroide 21-hidroxilasa (HSC-21OHD) de la Huía consenso de Recomendaciones clínicas recientemente publicada.

## Cribado neonatal HSC

La HSC, entidad de herencia autosómica recesiva, se produce por la deficiencia enzimática en la esteroidogénesis. La 21OHD (OMIM #201910) constituye el 95% de las posibles hiperplasias. La disminución en la síntesis de cortisol provoca aumento de ACTH con acúmulo de 17-hidroxiprogesterona (17OHP), metabolito previo al bloqueo enzimático. Si la deficiencia enzimática afecta la vía de síntesis de aldosterona dará lugar a la alteración del balance hidrosalino. Como consecuencia del bloqueo enzimático se

produce un aumento de la síntesis de andrógenos suprarrenales, vía metabólica no afectada.

La incidencia de la enfermedad (formas clásicas) varía dependiendo de las poblaciones estudiadas, oscilando entre 1/10.000 y 1:20.000<sup>2</sup>. La detección precoz de las formas clásicas de la HSC está incorporada en los Programas de Cribado Neonatal en numerosos países, y cumple los criterios clásicos de inclusión (Wilson y Junger 1968). La enfermedad produce una severa morbilidad ( posible mortalidad), no siendo fácilmente reconocible clínicamente en el periodo neonatal; existe un tratamiento eficaz, inmediato y de fácil realización; la intervención médica adecuada reduce la morbilidad y las posibles discapacidades asociadas; su frecuencia es relativamente alta (>1/10.000-15.000) y se dispone de un parámetro de cribado cuyo procedimiento analítico es además de sensible y específico, simple, fiable, rápido y económico.

La detección se basa en la medición de la 17OHP en la muestra de sangre capilar obtenida del talón e impregnada en papel absorbente, extraída a las 48 h de vida. El procedimiento analítico utilizado es un inmunoanálisis por fluorescencia a tiempo retardado (AutoDelfia, PerkinElmer Life Sciences). Los resultados del seguimiento de los pacientes detectados en dicho cribado se presentan también en esta Jornada dedicada a la HSC.

Los objetivos de la detección precoz de la HSC son: Identificar las formas clásicas severas, evitando la instauración de cuadros graves de deshidratación, shock y muerte, especialmente en los recién nacidos varones con formas pierde sal; evitar la

---

### Correspondencia:

Begoña Ezquieta  
Laboratorio Diagnóstico Molecular Servicio de Bioquímica  
Hospital General Universitario Gregorio Marañón  
Madrid

asignación incorrecta de sexo en las recién nacidas niñas con genitales muy virilizados y las secuelas derivadas y detectar las formas virilizantes simples para evitar la hiperandrogenización.

La detección precoz de HSC se recomienda internacionalmente con un nivel de evidencia 1/++7. Son factores clave, imprescindibles para la implementación de este cribado: la garantía de un tiempo de respuesta corto (7-8 días) ya que la crisis de pérdida salina puede aparecer a partir de ese momento y el establecimiento de unos puntos de corte propios, por semanas de gestación y sexo para evitar un incremento de los falsos positivos. La HSC es una de las enfermedades candidatas a incorporar en los programas de cribado neonatal. En España, las transferencias de las competencias en materia de Salud Pública a las CC. AA. permitieron a lo largo de los años la incorporación de nuevos programas de detección precoz que difieren en la oferta de las enfermedades a cribar. La Comunidad de Madrid incorporó la detección precoz de HSC en 1990.

### **Aportaciones del genotipado CYP21A2 en el cribado neonatal de la hiperplasia suprarrenal congénita.**

El análisis genético es una herramienta de confirmación diagnóstica para las enfermedades monogénicas en que existe una fuerte correlación genotipo/fenotipo. Podrá además descartar la enfermedad si garantiza un alto rendimiento diagnóstico libre de datos de interpretación incierta (ver anexo 1 del material suplementario de la editorial referida). Aunque el marcador analizado es la 17OHP, se pueden detectar también otros déficits, incluso aquellos cuyas enzimas implicadas se sitúan por encima del metabolito. Esta capacidad es ventajosa porque facilita detectar otras formas raras de HSC, aunque está también poniendo de manifiesto que existen interferencias analíticas.

Los falsos positivos en los inmunoanálisis directos son un hecho reconocido en las muestras perinatales (ver más abajo las observaciones relativas a este tema en la Guía 2018). Se considera que, en una enfermedad recesiva, el genotipo permitirá descartar la enfermedad en >95% de los casos si abarca, en la población analizada, no menos del 80% de las alteraciones causales (dos alelos a caracterizar,  $0,2 \times 0,2 = 0,04$ ; <5% falsos negativos del genotipado). A diferencia de la HSC (incluida en cribado neonatal a comienzos de los años 90), la fibrosis quística fue implementada en el 2000 cuando ya se conocían las alteraciones moleculares causales y el genotipado *CFTR* fue incluido en el propio cribado. Frente a *CFTR*, *CYP21A2* tiene la ventaja de que una batería limitada de alteraciones

frecuentes (puntuales y delecciones) garantiza una cobertura superior (>90%) y es menor la frecuencia de portadores. *CYP21A2* tiene en contra la complejidad del locus a analizar, una mala adaptabilidad a las técnicas de alto rendimiento y la necesidad de contar con una experiencia en este locus concreto.

En nuestra experiencia de más de 20 años hemos podido constatar esta aportación del genotipado para confirmar, clasificar o descartar la enfermedad en las sospechas neonatales establecidas en base a determinaciones de 17OHprogesterona realizadas mediante análisis directos (procedimiento habitual y todavía en curso en nuestro medio). Como se describe en Huidobro, et al 2011; Dulín y Ezquieta 2018 y se presenta en esta Jornada, el genotipo *CYP21A2* ha resultado de ayuda para descartar o confirmar la enfermedad, no solo en los positivos del cribado neonatal, también en las sospechas clínicas neonatales con elevación de 17OH progesterona. No queremos dejar de señalar que la determinación de 17OH progesterona por técnicas más específicas como puede ser tandem masas tras cromatografía líquida es la herramienta de elección como ya anteriormente reflejamos (Ezquieta, et al 2009).

El genotipo *CYP21A2* es notablemente informativo para la HSC y puede ser utilizado en los casos positivos del cribado neonatal (con o sin clínica) para descartar, confirmar y clasificar la enfermedad; sin embargo, es imprescindible disponer de un análisis e interpretación de expertos, dadas las especiales características del locus.

### **Observaciones relativas al cribado neonatal y al genotipado CYP21A2 en la Guía clínica HSC-21OHD de noviembre de 2018**

La 17OH progesterona, tradicionalmente determinado mediante inmunoanálisis de tipo directo, es el marcador empleado para diagnosticar este déficit congénito en los pacientes y es también el marcador empleado para la detección precoz en el cribado neonatal de esta enfermedad. La Guía relativa a la HSC-21OHD publicada en noviembre de 2018 nos recuerda que debemos ser conscientes de que los inmunoanálisis directos de esteroides constituyen una fuente de falsos positivos en el período neonatal. Esta Guía señala que resulta imprescindible que la determinación de esteroides neonatales se realice tras purificación y que el método más preciso es la utilización de tandem masas tras cromatografía líquida.

La Guía HSC 2018 se refiere al potencial del genotipado *CYP21A2* como complemento a los programas de cribado descrito por varios autores, pero también recalca que el genotipado *CYP21A2* puede estar “plagado” de errores. La compleja estruc-

tura del locus *CYP21A2*, en el que existe un pseudogén homólogo duplicado en tandem en el que preexisten las alteraciones más frecuentes, obliga a garantizar la especificidad, lo que exige utilizar abordajes que faciliten la amplificación específica del gen, incluyan el estudio de dosis génica y sean sometidos a una interpretación experta de los resultados. Este complejo locus genético no se adapta bien a las nuevas tecnologías de secuenciación masiva que en los últimos años han pasado a sustituir a los abordajes monogénicos por su alto rendimiento, pero que resultan contraproducentes (fragmentación y un proceso de hibridación múltiple) en locus complejos como el mencionado. Son ya múltiples, y provenientes de poblaciones diversas, aunque siempre en base a estudios monogénicos específicos, las publicaciones que recogen la alta correlación genotipo-fenotipo existente en la enfermedad, poniendo en evidencia la fiabilidad de este tipo de estudios moleculares.

La Guía 2018 enfatiza el hecho de que el genotipo es la única aproximación posible para la confirmación diagnóstica en pacientes con tratamiento ya instaurado o con datos bioquímicos *borderline*, también lo sería en los estudios prenatales y en la sospecha ecográfica y resulta imprescindible en el caso de emplearse inmunoanálisis directos (como es todavía el caso en nuestro medio). Y también señala que supera a la 17OH progesterona en el imprescindible asesoramiento genético a aportar, no solo en los familiares sino también en las formas clínicas leves, también recesivas y alélicas con las clásicas, que en un alto porcentaje (50-70%) son heterocigotas compuestas con alteración grave y en las parejas a riesgo, solo puede ser llevado a cabo en base al genotipo, como la Guía recoge. El genotipo *CYP21A2* es por tanto la herramienta para confirmar y descartar la existencia de alteraciones genéticas que constituyen la base de esta enfermedad genética y es imprescindible garantizar el uso de las técnicas adecuadas e interpretación experta debido a las especiales características del locus.

## Conflictos de interés

Los autores declaran que no tienen conflictos de interés potenciales.

## Referencias Bibliográficas

- GUÍA HSC-21OHD 2018. Speiser PW, Arlt W, Auchus RJ, Baskin LS, Conway GS, Merke DP, et al. Congenital Adrenal Hyperplasia Due to Steroid 21-Hydroxylase Deficiency: An Endocrine Society\* Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018; 103(11):4043-88.
- Asociación Española de Cribado Neonatal (AECNE). Datos acumulados de Programas de Cribado Neonatal en España, actualizado a diciembre de 2016. [Consultado 30 Sep 2016]. Disponible en: <http://aecne.es/datos.html>.
- Castilla I, Vallejo-Torres L, Rica-Echevarría I, Rodríguez-Sánchez A, Dulín-Íñiguez E, Espada M, et al. Coste-efectividad del cribado neonatal de la hiperplasia suprarrenal congénita. Ministerio de Sanidad. Informes de Evaluación de Tecnologías Sanitarias. S. Canario de la Salud; 2013.
- Choi JH, Kim GH, Yoo HW. Recent advances in biochemical and molecular analysis of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Ann Pediatr Endocrinol Metab.* 2016;21:1-6.
- Dulín Iñiguez E, Espada M, Eguileor Gurtubai I. Programas de Cribado Neonatal. *An Pediatr Contin.* 2006;4:61-5. doi: [https://doi.org/10.1016/S1696-2818\(06\)73590-9](https://doi.org/10.1016/S1696-2818(06)73590-9).
- Ezquieta B, Beneyto M, Muñoz-Pacheco R, Barrio R, Oyarzabal M, Lechuga JL, et al. Gene duplications in 21-hydroxylase deficiency: The importance of accurate molecular diagnosis in carrier detection and prenatal diagnosis. *Prenat Diagn.* 2006;26:1172-8.
- Ezquieta B, Oliver A, Gracia R, Gancedo PG. Analysis of steroid 21-hydroxylase gene mutations in the Spanish population. *Hum Genet.* 1995;96:198-204.
- Ezquieta B, Oyarzábal M, Jariego CM, Varela JM, Chueca M. A novel frameshift mutation in the first exon of the 21-OH gene found in homozygosity in an apparently nonconsanguineous family. *Horm Res.* 1999;51:135-41.
- Ezquieta B, Santomé L, Barrio R, Barrionuevo JL, López-Siguero JP, Oliver A, et al. Carrier detection and prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia must identify 'apparently mild' *CYP21A2* alleles which associate neonatal salt-wasting disease. *Prenat Diagn.* 2010;30: 758-63.
- Ezquieta B, Catón B, Ferrero B, Huidobro B, Santomé L. Diagnóstico bioquímico y genético de la HSC en el periodo perinatal. Actualizaciones en Endocrinología Perinatal. 15º Curso de Formación Postgrado de la SEEP. Albacete 2009. ISBN 978-84-95182-52-4.
- Grosse SD, van Vliet G. How many deaths can be prevented by newborn screening for conge-

- nital adrenal hyperplasia? *Horm Res.* 2007;67:284-9.
12. Honour JW. 17-Hydroxyprogesterone in children, adolescents and adults. *Ann Clin Biochem.* 2014;51:424-40.
13. Huidobro Fernández B, Echeverría Fernández M, Dulín Iñiguez E, Ezquieta Zubicaray B, Roldán Martín MB, Rodríguez Arnao MD, et al. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia: Transitory elevation of 17-hydroxyprogesterone. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2011;24:155-62.
14. Kolahdouz M, Mohammadi Z, Kolahdouz P, Tjamolian M, Khanahmad H. Pitfalls in molecular diagnosis of 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal hyperplasia. *Adv Biomed Res.* 2015;4:189-98.
15. Nordenström A, Ahmed S, Jones J, Coleman M, Price DA, Clayton PE, et al. Female preponderance in congenital adrenal hyperplasia due to CYP21 deficiency in England: Implications for neonatal screening. *Horm Res.* 2005;63:22-8.
16. Nordenström A, Thilén A, Hagenfeldt L, Larsson A, Wedell A. Genotyping is a valuable diagnostic complement to neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:1505-9.
17. Paz-Valiñas L, Varela-Lema L, Atienza G. cribado neonatal de la hiperplasia suprarrenal congénita. Revisión sistemática, Red Española de Agencias de Evaluación de Tecnologías y Prestaciones del Sistema Nacional de Salud. Axencia de Avaliación de Tecnoloxías Sanitarias de Galicia; 2014. Informes de Evaluación de Tecnologías Sanitarias.
18. Rodríguez Arnao MD, Rodríguez Sánchez A, Dulín Iñiguez E. Detección precoz de alteraciones endocrinas. *Rev Esp Endocrinol Pediatr* 2013;4 Suppl(1):87-100. doi. <https://doi.org/10.3266/RevEspEndocrinolPediatr.pre2013.Mar.167>.
19. Santomé Collazo JL, Cirujano Segura A, Ferreiro Fernández B, Casado Fúnez C, Muñoz-Pacheco R, Ezquieta Zubicaray B. [Simple virilizing forms of congenital adrenal hyperplasia: adaptation and prospective validation of the molecular screening]. *Med Clin (Barc).* 2010;135:195-201.
20. Soriano Guillén L, Velázquez de Cuellar Paracchi M, Ezquieta B. [Usefulness of molecular analysis in the differential diagnosis of congenital 21-hydroxylase deficiency detected in neonatal screening]. *Med Clin (Barc).* 2011;136:313-4.
21. Therrell BL. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2001;30:15-30.
22. White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev.* 2000;21:245-91.
23. World Health Organization, Wilson JMG, Jungner G. The principles and practice of screening for disease. World Health Organization. 1966. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/208882>.