

***Título del trabajo:** PESQUISA NEONATAL DE HIPERPLASIA ADRENAL CONGÉNITA: NIVELES DE CORTE DE 17-OH-PROGESTERONA EN UNA POBLACIÓN DE CÓRDOBA, ARGENTINA

***Autores:** Ochetti M, Sobrero G, Silvano L, Nieva V, Dipoi M, Tkalenko N, Signorino M, Martín S, Testa G, Muñoz L, Miras M.

***Lugar:** Hospital de Niños de la Santísima Trinidad. Córdoba.

***Dirección:** Ferroviarios esq. Bajada Pucará. CP 5000.

***Dirección Electrónica:** marianaochetti@hotmail.com

***Teléfonos:** 0351- 4586476/ 03572-15548315

RESUMEN

La determinación de 17- α hidroxiprogesterona (17 OHP), utilizada en la pesquisa neonatal para Hiperplasia Adrenal Congénita, está influenciada por variables como peso al nacer, edad gestacional y edad cronológica.

Objetivos: Obtener una línea de corte de 17 OHP adecuada para la detección neonatal de Hiperplasia Adrenal Congénita y mejorar la relación costo beneficio del Programa.

Sujetos y métodos: En 31.224 neonatos se determinó 17 OHP en sangre entera en papel de filtro utilizando ultramicroelisa. Las relaciones entre las variables fueron obtenidas mediante análisis de regresión.

Resultados: Se obtuvieron valores de referencia de 17 OHP a través de los percentiles 97,5 y 99 % para diferentes grupos de recién nacidos considerando peso al nacer, edad gestacional y edad cronológica.

Conclusión: La utilización de líneas de corte ajustadas a edad gestacional y peso al nacer resultó de gran utilidad para mejorar la especificidad diagnóstica y una reducción en la tasa de rellamados.

Palabras clave: Hiperplasia Adrenal Congénita- Pesquisa Neonatal-

17- α hidroxiprogesterona- Valores de referencia- Falsos Positivos

INTRODUCCIÓN

La Hiperplasia Adrenal Congénita (HAC) comprende un grupo de enfermedades hereditarias autosómicas recesivas, causadas por un defecto en alguna de las enzimas necesarias para la biosíntesis de cortisol con el consecuente incremento en la secreción de adrenocorticotrofina (ACTH) y de andrógenos. En el 90-95% de los casos es producida por la deficiencia de la enzima citocromo P450C21 o 21-hidroxilasa (21-OHD), la cual compromete la biosíntesis de cortisol y resulta en la producción incrementada de andrógenos adrenales (1-5).

El espectro clínico de la 21-OHD varía desde formas asintomáticas a formas graves con deshidratación, alteraciones electrolíticas y genitales ambiguos, dependiendo del grado del déficit enzimático (6). Se presenta en tres formas clínicas: perdedora de sal (HAC-PS), virilizante simple (HAC-VS) (ambas descritas como formas clásicas (HAC-C)) y una forma de comienzo tardío descrita como forma no clásica (HAC-NC) (7). La incidencia global de la forma clásica del déficit de 21-hidroxilasa basada en la detección por pesquisa varía según las diferentes poblaciones siendo el rango muy variable: de 1/21.270 en Nueva Zelanda a 1/5.000 Recién Nacidos (RN) vivos en Arabia Saudita. En Estados Unidos la incidencia es de 1/15.981, en Europa 1/14.970 (8) y en Argentina (Bs As) 1/8.937 (9).

Esta enfermedad constituye una emergencia clínico-metabólica que debe ser tratada en forma rápida, con el objetivo de evitar la crisis adrenal por pérdida salina (hiponatremia, hiperkalemia severas) con riesgo de shock hipovolémico y muerte y las asignaciones erróneas de sexo masculino en niñas RN virilizadas para prevenir las

alteraciones físicas y emocionales causadas por el exceso de andrógenos (pubertad precoz, talla adulta baja, etc.) (1-5).

El diagnóstico neonatal de la HAC por déficit de 21- OH se basa en los signos clínicos y las pruebas de laboratorio. Éstas consisten en la determinación de la concentración de 17 OHP en muestras de sangre seca impregnadas sobre papel de filtro (pesquisa) y en aquellos casos en que se encuentren valores elevados, su posterior confirmación en muestras de suero (10).

El procedimiento diagnóstico debe ser rápido y eficiente. La interpretación de los niveles de 17 OHP en neonatos e infantes puede constituir un dilema debido a que están influenciados por factores tales como edad gestacional (EG), edad cronológica en el momento de la recolección de las muestras (EC), sexo, peso al nacimiento (PN), estrés, y presencia de interferentes esteroideos producidos por la corteza adrenal fetal (11- 15).

En la literatura científica no existe acuerdo acerca de cuál es el punto de corte para definir un resultado de la prueba de pesquisa como normal/anormal. En el documento de consenso de la European Society for Paediatric Endocrinology y la Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society se afirma que cada laboratorio de Pesquisa neonatal para HAC debe establecer sus propios puntos de corte (16).

Con el fin de optimizar la Pesquisa neonatal para HAC los objetivos de este trabajo fueron:

- Obtener valores de referencia y determinar niveles de corte para 17 OHP en sangre seca en papel de filtro utilizando ensayo UltramicroELISA en RN de la provincia de Córdoba de acuerdo a EG, EC y PN.

- Comparar los beneficios de utilizar un valor de corte según EG, EC y PN en términos de la reducción de las tasas de re-llamados considerando especial atención a la población prematura y de bajo peso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron las muestras de 31.224 neonatos (EC: 0-100 días, EG: 24-42 semanas, PN: 0,600-5,500 kg), obtenidas por punción de talón y/o sangre venosa, recolectadas en papel de filtro Schleicher and Schuell 903 (pulpa de papel corrugado que retiene partículas de tamaño medio a fino, muy resistente al agua y a ácidos débiles y alcalinos). Estos niños asistieron para realizarse la Pesquisa Neonatal en el Hospital de Niños de la Santísima Trinidad entre enero de 2007 y diciembre de 2009.

Fueron excluidos del estudio las muestras con un resultado mayor a nuestra línea de corte, a las que posteriormente hemos citado para tomar una segunda muestra. En este caso la determinación de 17 OHP se realizó por radioinmunoensayo previa extracción del suero con un solvente orgánico, para eliminar la posible interferencia de esteroides.

A todas las muestras de sangre entera se les determinó los niveles de 17 OHP por metodología UltramicroELISA. Este método está basado en la competencia entre el antígeno natural (17 OHP) presente en las muestras y el antígeno marcado con la enzima fosfatasa alcalina (FA) por una cantidad limitada de sitios de unión a los anticuerpos policlonales específicos anti- 17 OHP. El coeficiente de variación intraensayo fue de 8,2 % para una concentración de 21,3 nmol/L y de 5,5 % para una concentración de 86,7 nmol/L. El coeficiente de variación interensayo fue de 9,1 % para una concentración de 21,3 nmol/L y de 6,4%, para una concentración de 86,7 nmol/L.

La línea de corte adoptada al comenzar con la Pesquisa de HAC fue de 55 nmol/L (40,15 ng/ml) tal como lo propone el fabricante del equipo (SUMA, La Habana, Cuba).

Se estudió la influencia de EG, PN y EC sobre las concentraciones de 17 OHP.

Estas variables se obtuvieron de los datos recogidos en la tarjeta de pesquisa.

Posteriormente se evaluaron las citaciones realizadas en diferentes periodos de tiempo, analizando el % de Falsos Positivos obtenidos al implementar la nueva línea de corte considerando EG, PN y EC.

- Resguardos éticos

El proyecto fue aprobado por el Comité de Bioética del Polo Hospitalario con sede en el Hospital de Niños de la Santísima Trinidad de Córdoba.

- Análisis Estadístico:

Se realizó un estudio analítico descriptivo retrospectivo. Las relaciones entre las variables fueron obtenidas mediante análisis de regresión lineal. Dado que los valores de 17 OHP no se ajustaban a una distribución normal, éstos fueron previamente transformados a escala logarítmica.

RESULTADOS

La población fue dividida en cuatro grupos: RN pretérmino-bajo peso ($PN \leq 2.500$ g y $EG \leq 37$ semanas), RN pretérmino-peso normal ($PN > 2.500$ g y ≤ 37 semanas), RN a término-bajo peso ($PN \leq 2.500$ g y $EG > 37$ semanas) y RN a término-peso normal ($PN > 2.500$ g y $EG > 37$ semanas). Los niveles de 17 OHP fueron diferentes estadísticamente en función de la edad al momento de la toma de la muestra ($p < 0,001$) Figura N° 1. Los valores de referencia de 17 OHP se establecieron a través de los percentiles de distribución de frecuencia (P) 97,5 y 99% para los diferentes grupos analizados.

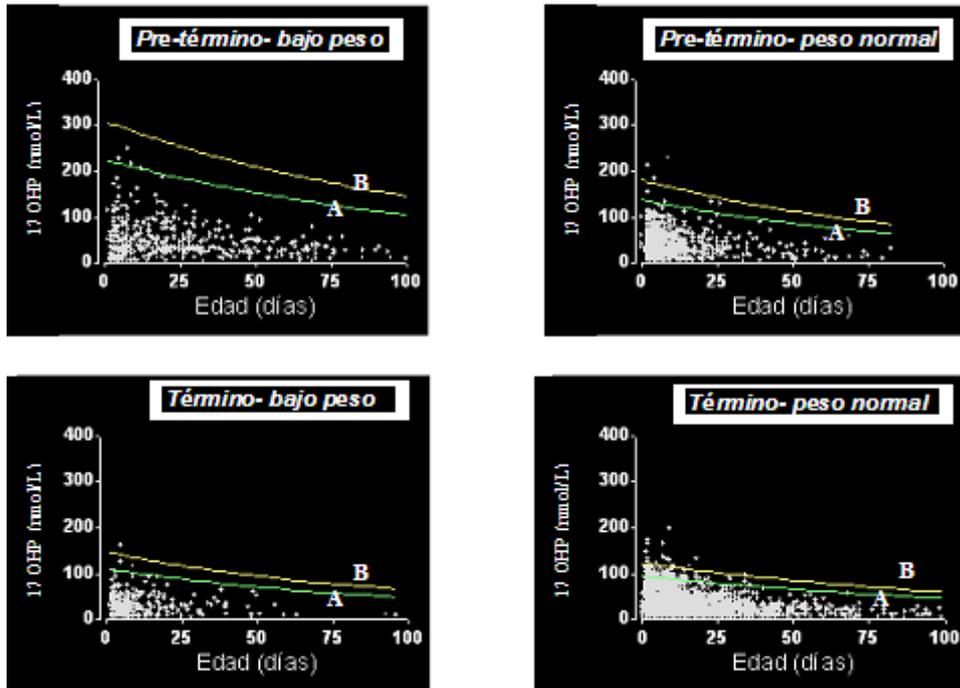


Figura N° 1- Distribución de frecuencia de los valores de 17 OHP (nmol/L) en función de la edad en el momento de la toma de la muestra para los diferentes grupos analizados. A: P 97,5 %, B: P 99 %.

En la Tabla N° 1 se muestran los valores de corte para 17 OHP en sangre seca en papel de filtro en los RN pretérmino según EC, considerando el PN.

Tabla N° 1- Valores de corte para 17 OHP (nmol/L) en RN pretérmino según EC (días), considerando el PN (g) según percentiles 97,5 y 99 %.

EC (días)	17 OHP (nmol/L)			
	Peso < 2.500 g		Peso ≥ 2.500 g	
	P 97,5	P 99	P 97,5	P 99
0-1	224,1	308,6	136,5	179,0
2-3	220,6	303,7	133,9	175,6
4-6	216,3	297,8	130,8	171,5
7-10	210,4	289,7	126,5	165,9
11-20	199,2	274,2	118,4	155,2
> 20	161,2	222,0	97,2	127,5

En la Tabla N° 2 se muestran los valores de corte para 17 OHP en sangre seca en papel de filtro en los RN a término según EC, considerando el PN.

Tabla N° 2- Valores de corte para 17 OHP (nmol/L) en RN a término según EC (días), considerando el PN (g) según percentiles 97,5 y 99.

EC (días)	17 OHP (nmol/L)			
	Peso < 2.500 g		Peso ≥ 25.00 g	
	P 97,5	P 99	P 97,5	P 99
0-1	109,8	146,5	93,3	121,5
2-3	107,8	143,7	91,9	119,7
4-6	105,2	140,3	90,2	117,5
7-10	101,8	135,7	87,9	114,5
11-20	95,3	127,0	83,4	108,6
> 20	79,5	106,2	72,8	94,9

Con el objetivo de evaluar los nuevos valores de corte para la pesquisa neonatal de HAC ajustados de acuerdo a EG, EC y PN, analizamos las citaciones realizadas considerando como punto de corte para 17 OHP el sugerido por el fabricante del equipo,

55 nmol/L. Esta reevaluación nos permitió determinar que un 80% de ellas no debería haber requerido una instancia posterior de evaluación.

Como se muestra en la Figura N° 2, los porcentajes de Falsos Positivos (% FP) posteriores a la introducción de los nuevos valores de referencia (2008- 2009), mostraron una reducción significativa en relación al periodo previo (2007) ($p < 0,01$).

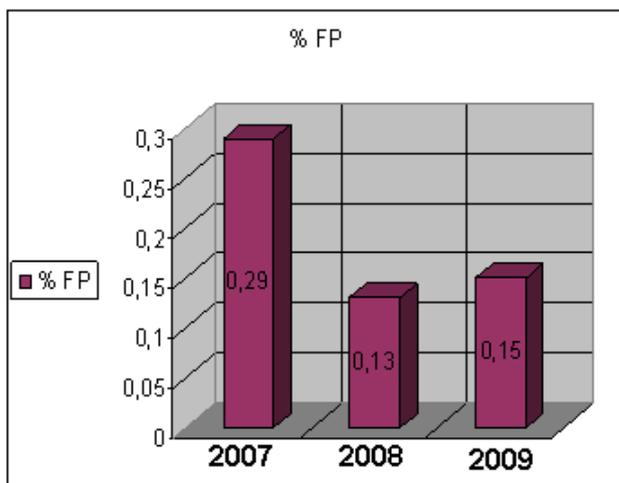


Figura N° 2- Porcentaje de Falsos Positivos (% FP) en diferentes periodos de tiempo ($p < 0,01$).

DISCUSIÓN

Los valores de 17 OHP mostraron cambios en función de la edad al momento de la toma de la muestra, lo que hace necesario la definición de percentiles adecuados. Los resultados obtenidos en este estudio proveen una línea de corte para la metodología utilizada por nuestro laboratorio, ajustada a EG y PN, resultando de gran utilidad para mejorar la especificidad diagnóstica de HAC en nuestra población de neonatos.

En Córdoba, la pesquisa de esta patología se introdujo a través del Programa de Detección de Errores Congénitos del Metabolismo en marzo de 2006 con provisión de equipamiento e insumos. Hasta ese momento, existía en la provincia una infraestructura desarrollada para la detección de Hipotiroidismo Congénito y Fenilcetonuria, en la cual las normas de procedimientos empleados para las etapas de captación y toma de muestra

se ajustaban a las necesidades de la asistencia pública sanitaria, y a las condiciones socioeconómicas de la población. En consecuencia, teníamos un gran número de muestras extraídas de 16 a 48 hs y a esto se sumaba el importante porcentaje de niños nacidos prematuros y/o con un bajo peso. Esta situación provocó dificultades al evaluar los resultados de la pesquisa de HAC, lo que nos llevó a la necesidad de la determinación de esta nueva línea de corte.

Es importante considerar que en el RN antes de las 48 h de vida se produce un aumento fisiológico de 17 OHP en respuesta al estrés propio del parto, por lo que la muestra debe recolectarse después del segundo día de vida. En neonatos prematuros existe una alta incidencia de falsos positivos debido probablemente a una degradación de 17 OHP disminuida por inmadurez de la función hepática, además de una producción aumentada de 17 OHP a causa del estrés al que están sometidos los prematuros (17- 24), siendo difícil definir un valor de corte único para todos los neonatos. Por lo tanto, fue necesario obtener valores referenciales para nuestra población en estudio, subdividiéndola de acuerdo a EG y PN, a modo de orientar acciones para evitar rellamados. Un elevado número de falsos positivos traen como resultado el encarecimiento de la pesquisa, incrementando la relación costo/ beneficio de los programas y generando angustia y ansiedad en la familia de dichos neonatos.

A cuatro años de la implementación de la pesquisa neonatal para HAC en nuestro Centro de diagnóstico, no hemos confirmado ningún neonato con esta patología. Steigert y cols. (8) encontraron sesenta pacientes con pesquisa anormal, de los cuales treinta tuvieron HAC confirmada (VPP 50%), manifestándose sospecha clínica previa en 15 de estos últimos. Voltavá y cols. (25) analizaron las muestras de sangre al nacimiento obtenidas en papel de filtro de pacientes con diagnóstico clínico, de laboratorio y algunos con estudios moleculares del gen CYP 21, previo a la

implementación de los programas de pesquisa neonatal para HAC y concluyeron que el 100% se hubieran podido diagnosticar al nacimiento.

En un estudio reciente de Gruñeiro-Papendiek y cols. (9) se mostró que de todas las HAC detectadas por screening neonatal (HAC-PS, HAC-VS) sólo fueron sospechadas clínicamente el 33% de ellas. En cambio, cuando se analizaron teniendo en cuenta el sexo de los pesquisados, la sospecha clínica en los varones con HAC fue bastante menor, sólo del 25%, ya que en las niñas el hiperandrogenismo es clínicamente más evidente.

La obtención de líneas de corte para la metodología utilizada, ajustadas a EG y PN, resultó de gran utilidad para mejorar la especificidad diagnóstica y obtener una significativa reducción en la tasa de rellamados, especialmente en RN prematuros y de bajo peso. De este modo se evitarían además las repercusiones familiares que derivan de los resultados falsos positivos, pues la ansiedad generada durante el periodo de incertidumbre puede alterar la relación de los padres con sus hijos, además de generar desconfianza en el médico y en el sistema sanitario.

BIBLIOGRAFÍA

- 1-** New MI, Wilson RC. Steroid disorders in children: Congenital adrenal hyperplasia and apparent mineralocorticoid excess. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 12790- 97.
- 2-** Huynh T, McGown I, Cowley D, Nyunt O, Leong GM, Harris M, Cotterill AM. The clinical and biochemical spectrum of congenital adrenal hyperplasia secondary to 21-hydroxylase deficiency. *Clin Biochem Rev* 2009; 30 (2): 75- 86.
- 3-** Speiser PW, White PC. Congenital adrenal hyperplasia. *N Engl J Med* 2003; 349: 766- 88.
- 4-** Riepe FG, Sippell WG. Recent advances in diagnosis, treatment, and outcome of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Rev Endocr Metab Disord* 2007; 8 (4): 349- 63.
- 5-** Torresani T, Biasen Lauber A. Congenital adrenal hyperplasia: diagnostic advances. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30: 563- 75.
- 6-** Bergadá I, Aubert E, Heinrich JJ. Alteraciones hidroelectrolíticas en la hipertrofia suprarrenal congénita perdedora de sal. *Rev Hosp. Niños B. Aires* 1994; 36 (157): 93- 97.
- 7-** White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev* 2000; 21: 245- 91.
- 8-** Steigert M, Schoenle EJ, Biason-Lauber A, et al. High reliability of neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia in Switzerland. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 4106- 10.
- 9-** Gruñeiro-Papendiek L, Chiesa A, Méndez V, et al. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia: experience and results in Argentina. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2008; 21 (1): 73-78.

- 10-** Honour JW, Torresani T. Evaluation of neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *Horm Res.* 2001; 55: 206- 11.
- 11-** Mesiano S, Coulter CI, Jaffe RB. Localization of citocromo P450 cholesterol side chain cleavage, citocromo P450 17-hydroxylase/17,20 lyase, and 3 beta hydroxysteroid dehydrogenase isomerase steroidogenic enzymes in the human and rhesus fetal adrenal gland: reappraisal of functional zonation. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 1184- 89.
- 12-** Mason JL, Hemsell PG, Korte K. Steroidogenesis in desperser cells of the human fetal adrenal. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; 56: 1057- 62.
- 13-** Nelson HP, Kunh RW, Deyman NE, Jaffe RB Human fetal adrenal definitive and fetal zone metabolism of pregnenolone and corticosterone. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70: 693-98.
- 14-** Ducsay Ca, Standzyk FZ. Novy maternal and fetal production rates of progesterone in rhesus macaques: placentals transfer and conversion to cortisol. *Endocrinology* 1985; 117: 1253- 58.
- 15-** Therrel BL: Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2001; 30: 15–30.
- 16-** Joint LWPES/ESPE CAH Working Group. Consensus statement on 21-hydroxylase deficiency from the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society and the European Society for Paediatric Endocrinology. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Sep; 87(9): 4048 – 53.
- 17-** Pang S, Wallace MA, Hofman L, Thuline HC, Dorche C, Lyon ICT, Dobbins RH, Kling S et al. Worldwide experience in newborn screening for classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Pediatrics* 1988; 81: 866-74.
- 18-** Al Saedi S, Dean H, Dent W, Stockl Elizabeth, Cronin C. Screening for congenital adrenal hyperplasia: the Delfia screening test overestimates serum 17-

hydroxyprogesterone in preterm infants. *Pediatrics* 1996; 97: 100- 102.

19- Al Saedi S, Dean HJ, Dent W, Cronin C. Reference ranges for serum cortisol and 17-hydroxyprogesterone levels in preterm infants. *J Pediatr* 1995; 126: 985- 87.

20- Torresani T, Grüters A, Acherz R: Improving the efficacy of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia by adjusting the cut-off level of 17- hydroxyprogesterone to gestational age. *Screening* 1994; 3: 77- 84.

21- Allen DB, Hoffman GL, Fitzpatrick P, Laessing R, Maby S, Slyper A: Improved precision of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia using weight-adjusted criteria for 17-hydroxyprogesterone levels. *J Pediatr* 1997; 130: 128- 33.

22- Berry J, Betts P, Wood PJ: The interpretation of blood spot 17-hydroxyprogesterone levels in term and pre-term neonates. *Ann Clin Biochem* 1986; 23: 546- 51.

23- Kristi W. Fetal Adrenal Development: Implications for lung development and postnatal disease. *Neo Reviews* 2006; 7: 135- 42.

24- Mizuno H, Ohro Y, Sugiyama Y, Ito T, Hasegawa T, Homma K, Ueshiba H, Ono M, Togari H. Transient hyper-17-OHPnemia unrelated to cross-reactions with residual fetal adrenal cortex products. *Horm Res* 2004; 61 (5): 242- 45.

25- Voltavá F, Török D, Kovack S, et al. Estimation of false negative rate in newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Eur J Endocrinol* 2005; 152: 869- 74.