



**VARIABLES CONDICIONANTES EN EL CRIBADO
NEONATAL DE FIBROSIS QUÍSTICA MEDIANTE
TRIPSINA INMUNORREACTIVA**

Memoria Tesis Doctoral

Ana María Roldán Cabanillas



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ
Depto. de Farmacología, Pediatría y
Química Orgánica

Ernesto Cortés Castell, Profesor Secretario del Departamento de Farmacología, Pediatría y Química Orgánica y Coordinador del Cribado Neonatal de la provincia de Alicante

CERTIFICA QUE:

D^a Ana María Roldán Cabanillas ha realizado el trabajo encaminado a la consecución del título de Doctora, titulado:

"VARIABLES CONDICIONANTES EN EL CRIBADO NEONATAL DE FIBROSIS QUÍSTICA MEDIANTE TRIPSINA INMUNORREACTIVA"

bajo mi dirección.

De lo cual doy fe en San Juan, a 30 de mayo de 2013

Fdo.: Dr. Ernesto Cortés Castell



CONTENIDOS

Variables condicionantes en el cribado neonatal de fibrosis quística mediante tripsina inmunorreactiva

Contenidos

01/ INTRODUCCIÓN	11
1.-INTRODUCCIÓN	13
1.1. DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LA ENFERMEDAD	13
1.2. INCIDENCIA DE LA FIBROSIS QUÍSTICA.....	15
1.3. ALTERACIONES BIOQUÍMICAS Y FISIOLÓGICAS DE LA ENFERMEDAD	17
Estructura CFTR.	21
Función CFTR.....	21
Regulación de la Actividad del CFTR.	22
1.4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA FIBROSIS QUÍSTICA ...	23
1.4.1. Manifestaciones clínicas sistema respiratorio.....	24
1.4.2. Manifestaciones nutricionales	24
1.4.3. Manifestaciones en los electrolitos	27
1.5. DIAGNÓSTICO DE LA FIBROSIS QUÍSTICA.....	28
1.5.1. Diagnóstico bioquímico	29
1.5.2. Diagnóstico genético	31
1.6. CRIBADO NEONATAL	32
1.6.1. Ventajas cribado neonatal fibrosis quística.....	33
1.6.2. Estrategias cribado neonatal fibrosis quística.....	39
1.6.2.1. Estrategia TIR/TIR:.....	44
1.6.2.2. Estrategia TIR/DNA:.....	45
1.6.2.2.1. Selección de las mutaciones a estudiar	46
1.6.2.2.2. Detección de portadores.....	47
1.6.2.2.3. Variabilidad étnica de la fibrosis quística	47
a) Variabilidad étnica de las mutaciones.....	48
b) Polimorfismos	53
1.7. RELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO.....	56
02/ JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	61
2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	63
2.1. NECESIDAD DE VALORES DE REFERENCIA PARA CADA LABORATORIO	63
2.2. Necesidad de valores de referencia en diferentes periodos del año.....	64

2.3. Porcentaje alto de nacimientos de madres de otros países.	65
03/ OBJETIVOS.....	69
3.1. OBJETIVO GENERAL	71
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	71
04/ MATERIAL Y MÉTODOS.....	73
4. MATERIAL Y MÉTODOS	75
4. 1. POBLACIÓN	75
4.1.1. Criterios de inclusión:	75
4.1.2. Criterios de exclusión:	75
4.1.3. Muestreo	76
4.2. DETERMINACIONES ANALÍTICAS	78
4.2.1. Método de cuantificación de tripsina inmunorreactiva en sangre desecada en papel	78
4.2.2. Controles de calidad en el entorno de los valores de normalidad	80
4.2.2.1. Control Interno	80
4.3.2.2. Evaluación externa de la calidad	82
4.3. ESTUDIO GENÉTICO	85
4.3. ESTUDIO ESTADÍSTICO	86
05/ RESULTADOS	87
5. RESULTADOS	89
5.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA ESTUDIADA	89
5.1.1. Valores de TIR	89
5.1.2. Valores de las demás variables cuantitativas	90
5.1.3. Distribución de las variables cualitativas	90
5.2. VARIACIÓN ESTACIONAL DE LOS VALORES DE TIR	91
5.3. INFLUENCIA DEL SEXO EN LOS VALORES DE TIR	93
5.4. INFLUENCIA EDAD EN LOS VALORES DE TIR	94
5.5. VARIACIÓN DE TIR CON EDAD GESTACIONAL	95
5.6. VARIACIÓN TIR CON TIPO DE LACTANCIA	97
5.7. VALORES DE TIR Y COMARCALIZACIÓN	98
5.8. INFLUENCIA DE LA EDAD MATERNA EN LOS VALORES DE TIR	99
5.9. ANÁLISIS DEL ORIGEN ÉTNICO Y LOS VALORES DE TIR	100
5.10. ANÁLISIS MULTIVARIANTE	101

5.11. VALORES DE REFERENCIA DE TIR EN EL CRIBADO NEONATAL DE FIBROSIS QUÍSTICA	106
5.12. VALORES ALTOS DE TIR Y ESTUDIOS GENÉTICOS	108
5.12.1. Porcentaje de valores altos con punto de corte establecido de 65 ng/ml	108
5.12.2. Distribución de las mutaciones y polimorfismos	108
5.12.3. Distribución de las mutaciones y polimorfismos según valor de TIR	110
5.13. PROSPECCIÓN DE LOS RESULTADOS QUE SE OBTENDRÍAN CON UN NUEVO PUNTO DE CORTE	112
06/ DISCUSIÓN	115
6.- DISCUSIÓN	117
6.1. DISEÑO Y TAMAÑO DE LA MUESTRA.	117
6.2. CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA.	119
6.3. INFLUENCIA DEL SEXO EN LOS VALORES DE TIR	120
6.4. INFLUENCIA DE LA EDAD NEONATAL EN LOS VALORES DE TIR	121
6.5. INFLUENCIA DE LA EDAD GESTACIONAL EN LOS VALORES DE TIR	123
6.6. INFLUENCIA DEL TIPO DE LACTANCIA EN LOS VALORES DE TIR	123
6.7. INFLUENCIA DE LA COMARCA DE RESIDENCIA DE LOS PADRES EN LOS VALORES DE TIR	125
6.8. INFLUENCIA DE LA EDAD MATERNA EN LOS VALORES DE TIR	125
6.9. INFLUENCIA DEL ORIGEN ÉTNICO MATERNO EN LOS VALORES DE TIR	127
6.10. INFLUENCIA DE LA ESTACIONALIDAD EN LOS VALORES DE IRT	129
6.11. VALORES DE REFERENCIA	130
6.12. VALORES ALTOS DE TIR Y ESTUDIOS GENÉTICOS	130
07/ CONCLUSIONES	139
08/ ABREVIATURAS	143
09/ BIBLIOGRAFÍA	147
9.- BIBLIOGRAFÍA	149
- Dequeker E, Cuppens H, Dodge J, Estivill X, Goossens M, et al. Recommendations for quality improvement in genetic testing for cystic fibrosis. European Concerted Action on Cystic Fibrosis. Eur J Hum Genet. 2000 Sep;8 Suppl 2:S2-24.	155

10/ ANEXOS..... 173



01/ INTRODUCCIÓN

Variables condicionantes en el cribado neonatal de fibrosis quística mediante tripsina inmunorreactiva

1.-INTRODUCCIÓN

1.1. DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LA ENFERMEDAD

La fibrosis quística es una enfermedad hereditaria autosómica recesiva, causada por la mutación en el gen CFTR. El gen está situado en el brazo largo del cromosoma 7 y se compone de dos alelos situados en los loci (7q31) de cada cromosoma homólogo que forman el par. El gen CFTR está compuesto por 27 exones.

Es una enfermedad rara, aunque su incidencia es de las más elevadas entre las mismas, siendo de las que figuran dentro de la clasificación de ORPHANET (2013):

<p>Número de Orphanet : ORPHA586</p> <p>Sinónimos: Fibrosis Quística (FQ) Mucoviscidosis</p> <p>Prevalencia: 1-9 / 100 000</p> <p>Herencia: Autosómico recesivo</p> <p>Edad de inicio o aparición: Neonatal / infancia</p>	CIE-10	• E84
	OMIM	• <u>219700</u>
	UMLS	• C0010674
	MeSH	• D003550
	MedDRA	• 10011762
	SNOMED CT	• 190905008

La fibrosis quística (FQ) es un trastorno genético caracterizado por la producción de sudor con un alto contenido en sales y de secreciones mucosas con una viscosidad anormal. Es el trastorno genético más común entre los niños caucásicos. La incidencia es variable: es mucho menos común en las poblaciones asiáticas y africanas que en las europeas y

norteamericanas, con variación dentro de cada país. Se desconoce la prevalencia exacta en Europa, pero se estima que se sitúa entre 1/8.000 y 1/10.000 individuos. Es una enfermedad crónica y generalmente progresiva, que suele aparecer durante la infancia temprana o, más raramente, en el nacimiento (ileo meconial). Cualquier órgano interno puede verse afectado, aunque las principales manifestaciones afectan al aparato respiratorio (bronquitis crónica), al páncreas (insuficiencia pancreática, diabetes del adolescente y ocasionalmente pancreatitis) y, más raramente, al intestino (obstrucción estercorea) o al hígado (cirrosis). La forma más común de FQ se asocia a síntomas respiratorios, a problemas digestivos (esteatorrea y/o estreñimiento) y a anomalías del crecimiento pondero-estatural. La mortalidad y morbilidad dependen del grado de afectación broncopulmonar. La esterilidad masculina es un rasgo frecuente. También se han registrado formas tardías, que generalmente son de gravedad intermedia o monosintomáticas.

La FQ es una enfermedad autosómica recesiva causada por mutaciones en el gen CFTR (cromosoma 7). Se han identificado más de 1800 mutaciones. Un 70% de los casos están causados por el alelo F508, mientras que otras 30 mutaciones explicarían otro 20% más. Es la enfermedad autosómica recesiva más frecuente en nuestro entorno, calculándose en una incidencia de aproximadamente 1/2500 recién nacidos vivos, lo que supone una frecuencia de portadores de alrededor de 1/30. Aunque la mutación más frecuente es la $\Delta F508$, en la actualidad se conocen más de 1800 mutaciones, lo que complica el diagnóstico molecular así como los casos frontera, en los que la mezcla de mutaciones hace que los valores de TIR estén próximos a la normalidad.

No hay una correlación clara entre el genotipo y el fenotipo. Además de la heterogeneidad alélica y de la ocurrencia de mutaciones múltiples en el mismo gen, una amplia gama de factores puede influir en el fenotipo, incluyendo el ambiente y genes modificantes de la enfermedad.

El diagnóstico se sospecha durante la infancia por las manifestaciones clínicas asociadas y se confirma mediante los resultados

de la prueba del sudor (concentración del cloruro excesiva por encima de 60 mmol/l), se puede además confirmar con la identificación de alguna mutación del gen CFTR. El diagnóstico neonatal mediante cribado está disponible desde finales de 2002 y ha permitido diagnosticar el 95% de los casos en los lugares en que se ha implantado.

El producto codificado por el gen es una glicoproteína de 1.480 aminoácidos que funciona como un canal de ión cloro, que se conoce con el nombre de regulador de conductancia transmembranal de la FQ (Cystic fibrosis transmembrane regulator) (CFTR) o proteína transportadora Cl- acoplada a ATP.

1.2. INCIDENCIA DE LA FIBROSIS QUÍSTICA

La incidencia de la FQ es muy variada, siendo tanto su frecuencia, como las mutaciones asociadas de una gran variabilidad, en las siguientes tablas se muestran las incidencias de algunas comunidades de España y algunos países:

Tabla 1. Incidencia de la FQ en distintas comunidades (España)

COMUNIDAD	INCIDENCIA
Castilla-León	1/4510
Cataluña	1/5532
Baleares	1/5905

Tabla 2. Incidencia de la FQ en distintas poblaciones.

POBLACIÓN	INCIDENCIA
Francia	1/4700
Inglaterra	1/2913
Costa Mediterránea	1/8885

En el trabajo de Ezquieta et al (Ezquieta, 2005) se citan varias publicaciones que ponen de manifiesto la heterogeneidad de la población española. Sin embargo, los autores eluden otras referencias que contribuyen a acotar las prevalencias de FQ en nuestra población. Por ejemplo, los programas de cribado neonatal iniciados en las comunidades de Castilla y León, Cataluña y Baleares entre 1999 y 2000. En la Comunidad de Castilla y León (Tellería, 2002), tras el análisis de 36.086 neonatos se estimó una prevalencia de 1/4.510, mientras que en Cataluña (Gartner, 2003) ésta es de 1/5.532 sobre una casuística de 243.422 y en Baleares (Gil, 2003) de 1/5.905 después de analizar 35.435 muestras.

Estas prevalencias se encuentran en el rango esperado, habida cuenta de las descritas en otros países mediterráneos como Francia (Claustres, 2000) (1/4.000) e Italia (Bossi, 1999) (1/4.700). También la heterogeneidad de las poblaciones francesa e italiana ha sido ampliamente documentada y descubre diferencias importantes. Francia evidencia una de las situaciones más extremas: en la Bretaña (Scotet, 2000) cuya población es de origen celta, la prevalencia de FQ es de 1/2.913, mientras que en la costa mediterránea los afectados representan 1/8.885, un descenso que se atribuye al alto porcentaje de inmigración, en su mayor parte procedente del Norte de África (Des Georges, 2004). La inmigración es un factor variable, previsiblemente en aumento, que debe evaluarse con atención. Así, según Ezquieta et al (Ezquieta, 2005) señalan que, en 2003, un 12% de los nacimientos en la Comunidad de Madrid procedieron de la población inmigrante, formada en su mayoría por hispanos.

1.3. ALTERACIONES BIOQUÍMICAS Y FISIOLÓGICAS DE LA ENFERMEDAD

El gen de la CFTR está localizado en el cromosoma 7 y tiene 24 exones (Figuras 1 y 2):

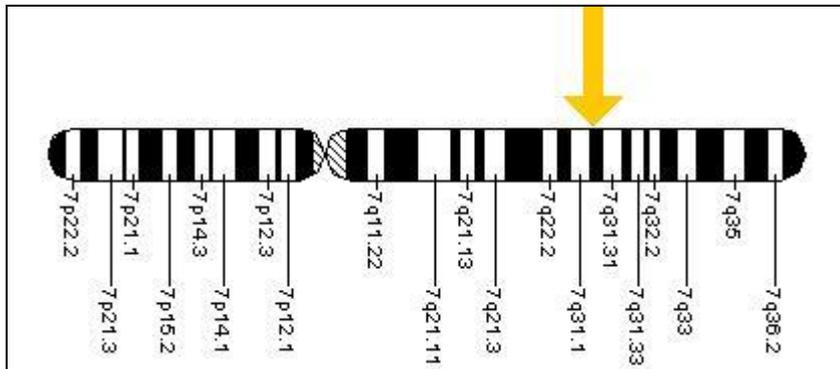


Figura 1. Localización del gen CFTR.

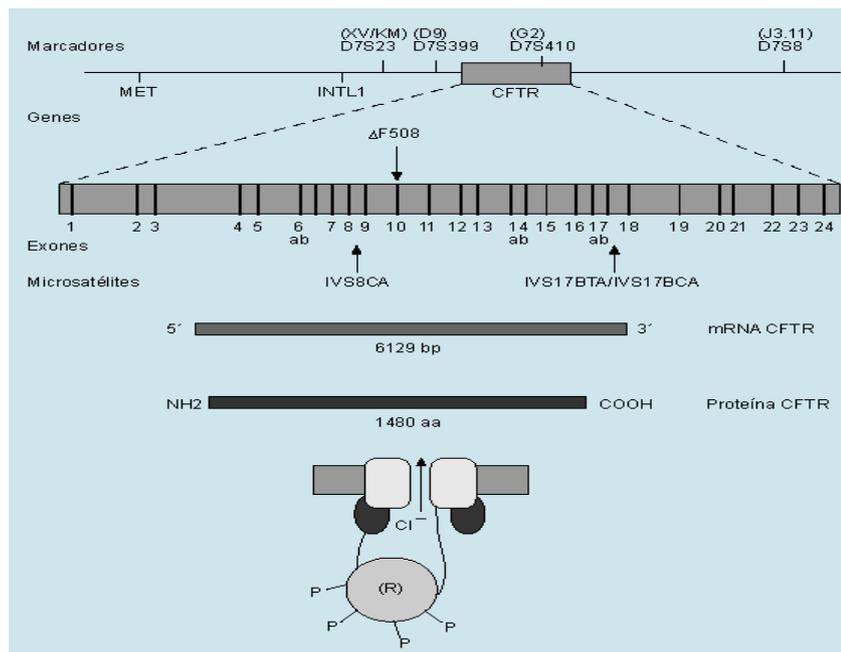


Figura 2. Estructura del gen del regulador de conductancia transmembranal de la FQ.

La proteína transportadora de Cl^- acoplada a ATP se localiza en las membranas celulares y actúa como un canal o bomba aniónica (Figuras 2 y 3). La expresión de la CFTR se produce en las células epiteliales de las superficies húmedas de: Tracto gastrointestinal, tracto respiratorio, tracto reproductivo y glándulas sudoríparas. La FQ se caracteriza por alteraciones en la proteína CFTR que juega un rol en la regulación del flujo hidroelectrolítico transmembrana. Estas alteraciones provocan cambios en las características de las secreciones exocrinas. La ausencia de una proteína CFTR funcional a nivel de la membrana de la célula epitelial provoca la producción de sudor con un alto contenido en sales (asociada a un riesgo de deshidratación hipotónica) y de secreciones mucosas con una viscosidad anormal (que causa estasis, obstrucción e infección bronquial).

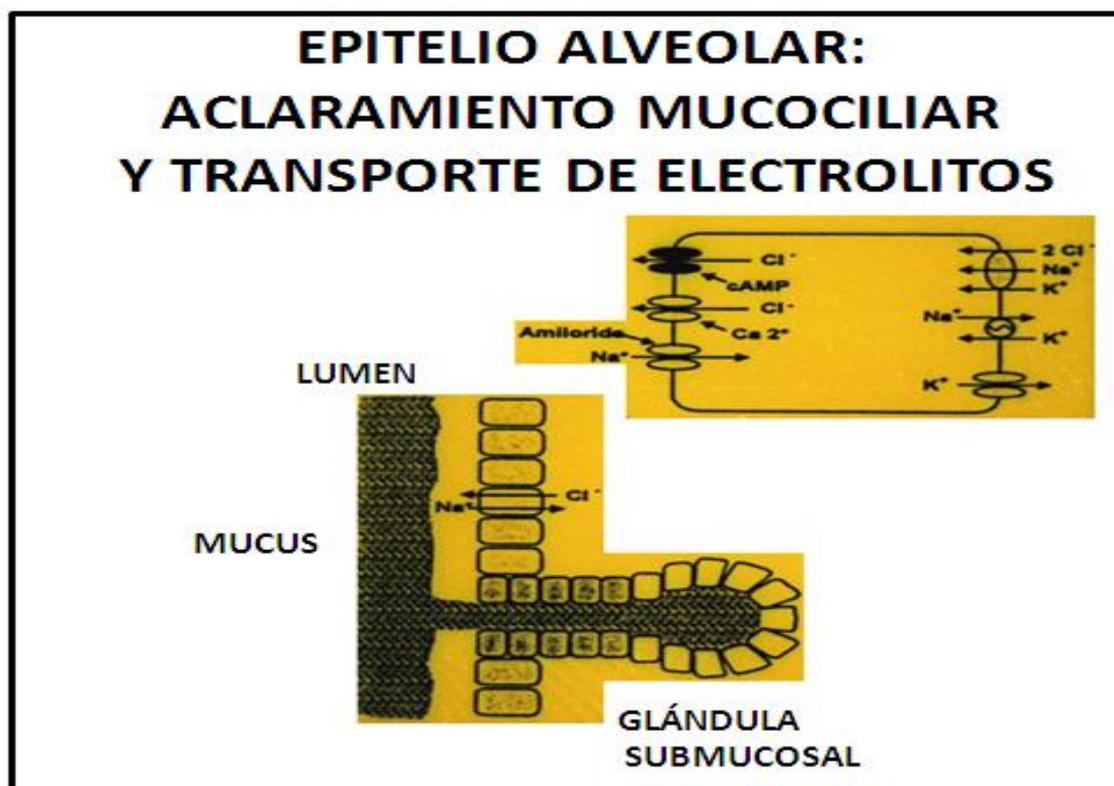


Figura 3. Papel de la proteína CFTR en la formación del moco en el alveolo.

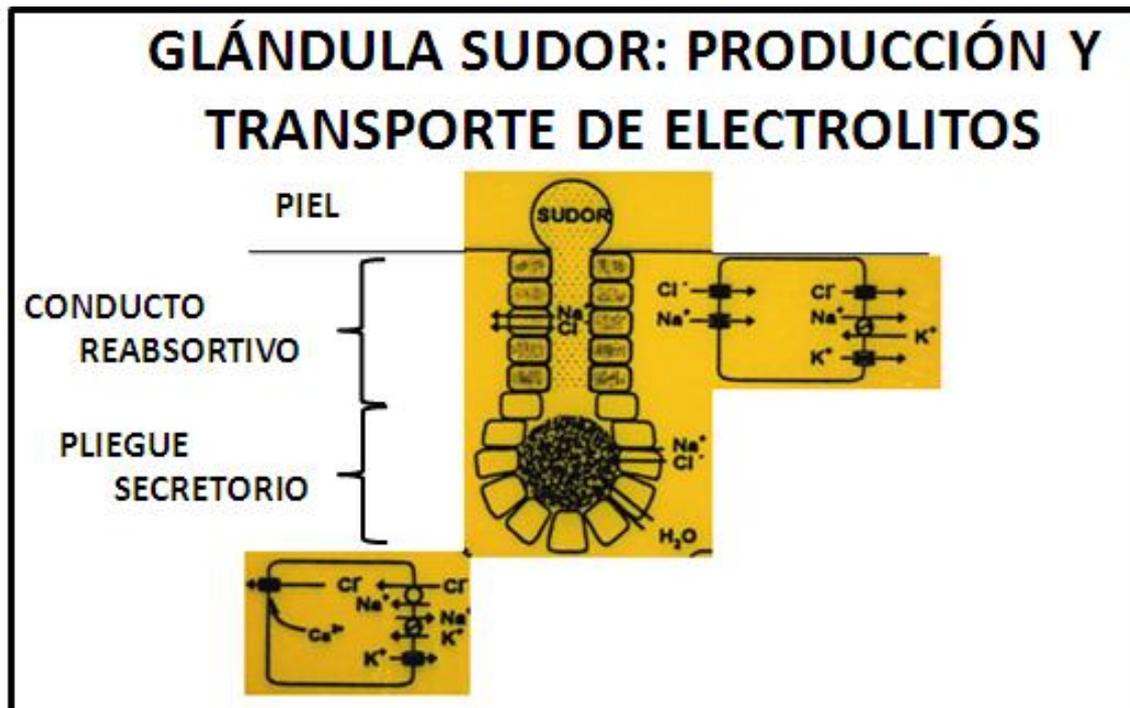


Figura 4. Papel de la proteína CFTR en la formación del sudor.

Mediante estudios con inmunofluorescencia, se ha detectado la proteína CFTR en el páncreas exocrino, tanto en las células acinares como en los conductos proximales. En la membrana apical del epitelio ductal proximal, los canales del cloro (proteína CFTR), activados por el AMPc, regulan el intercambio cloro/bicarbonato (Figura 5). En la FQ, la disfunción del canal del cloro altera la secreción de agua y bicarbonato, con la consiguiente acidificación e insuficiente hidratación de las secreciones acinares ricas en proteínas, que se hacen viscosas y pueden formar tapones proteicos en los conductos, con posterior destrucción de las células acinares, lo que da lugar a fibrosis pancreática y malabsorción. Al no existir CFTR en los islotes de Langerhans, la afectación de éstos se produce por la fibrosis y las alteraciones vecinales.

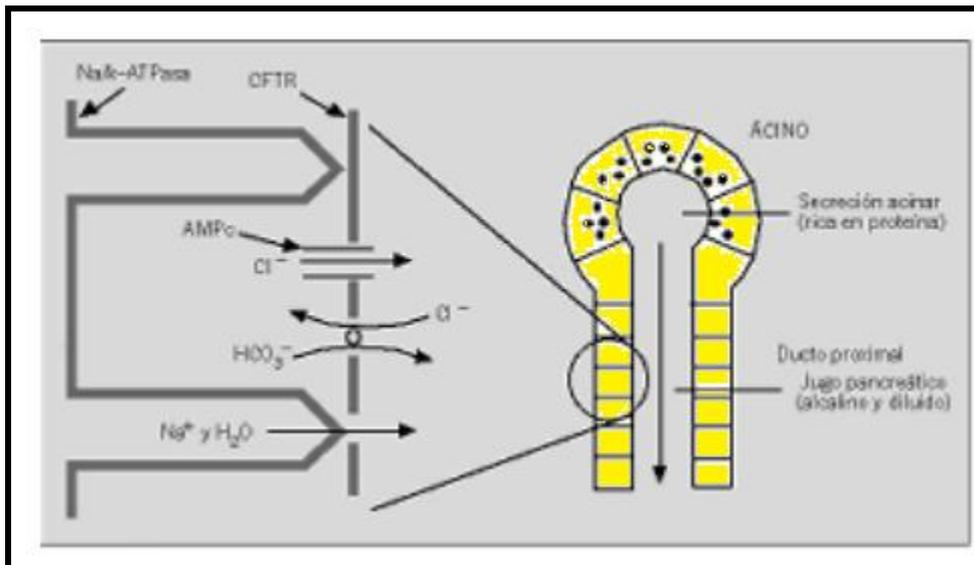


Figura 5. Papel de la CFTR en la secreción pancreática exocrina.

Las alteraciones citológicas acinares más tempranas en la FQ (Scheele, 1996) son secundarias a la disminución del pH en la luz acinar, por la insuficiente secreción ductal de bicarbonato, de tal forma que se impide el transporte de los gránulos de zimógeno en la fase de endocitosis apical, con una importante disminución de dichos gránulos en la porción apical de las células acinares, y con una acumulación excesiva de zimógenos en la luz acinar, donde fueron vertidos por exocitosis; esto produce una dilatación progresiva de la luz acinar, a la vez que se pierde la porción apical de las células acinares. El páncreas normal segrega unas 600.000 UI de lipasa al día: Para prevenir la esteatorrea tras una comida típica (que contiene unos 20 g de grasa), deben liberarse al intestino delgado al menos 30.000 UI de lipasa (equivalente al 10-15% de la secreción normal de lipasa pancreática postprandial) (Regan, 1977). Al progresar la insuficiencia pancreática, la actividad de la lipasa disminuye más rápidamente que la de la amilasa y la proteasa; tanto la lipasa pancreática como la contenida en los preparados comerciales son destruidas más fácilmente por el pH ácido gástrico que la amilasa y la proteasa (Roy, 1988), por ello, la creatorrea resulta más fácil de corregir que la esteatorrea. Pese a una muy reducida secreción de la lipasa pancreática, se absorbe hasta un 60% de la grasa de la dieta (Cox, 1979),

gracias a la actividad de la lipasa lingual y de la gástrica y de la colipasa pancreática (Abrams, 1986).

El 85% de los pacientes con FQ tienen manifestaciones clínicas de insuficiencia pancreática (Lapey, 1974), en clara relación con el genotipo $\Delta F508$, aunque otras mutaciones también cursan con esteatorrea. El resto, principalmente si tienen la mutación R117H, mantienen una función suficiente para una digestión normal. Incluso en neonatos prematuros, el aumento de la tripsina inmunorreactiva sérica refleja ya la anómala función pancreática, siendo como se apuntará la base del cribado neonatal.

Estructura CFTR.

La proteína está conformada por dos dominios transmembranales (MSD1 y MSD2), con seis subdominios transmembranales (TM), dos dominios enlazadores de nucleótidos (NBD1 y NBD2), un dominio regulador R. Se encuentra mayormente embebida en la membrana, que provee al canal o poro de intercambio de iones Cl^- a través de ella. (Morales, 1999) Cada MSD está conformado por 6 hélices transmembranales (Foskett, 1998) y, aparte de los "giros" que intervienen entre las hélices TM 1 y 2 en el MSD1 y entre 7 y 8 en la posición correspondiente en el MSD2, poca más estructura de CFTR se presenta expuesta en la superficie exofacial de la membrana celular (Kopito, 1999).

Función CFTR.

La CFTR funciona como un canal de Cl^- de baja conductancia regulado por AMPc y que es independiente del voltaje. Se requiere de la fosforilación mediante Protein Kinasa A (PKA) dependiente de AMPc y de la unión o hidrólisis de ATP para que el canal se active. La fosforilación ocurre en el Dominio R (RD) y la hidrólisis en uno o ambos NBD's (Morales, 1999). Las fracciones TM6 y TM12 del MSD1 forman el poro del canal y la

TM6 forma una parte crucial en la determinación de sus propiedades permeables al actuar como un filtro selectivo, (Gupta, 2003) dándole al CFTR una ventaja enorme en comparación con el resto de los canales iónicos que suelen ser menos selectivos.

Tabla 3. Funciones de la proteína CFTR (Ratjen, 2003; Rommens, 1989; Navarro, 2002; Molina, 2002; Mckone, 2003; Gibson, 2003).

Equilibrio del agua	
Mecanismo de defensa	
Propiedades de ligazón de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
Acción sobre canales de ENaC*	
Acción sobre la rectificación de canales de cloro	
Acción sobre los canales de potasio	
Acción sobre canales de bicarbonato	
Acción sobre canales de acuaporina	
Activación de las β -defensinas humanas-1	
<hr/>	
* ENaC: Canales de Sodio Sensibles	

Regulación de la Actividad del CFTR.

El CFTR es regulado por cinasas y fosfatasa y por nucleótidos de Adenina, Mg^{2+} y fosfato inorgánico (Pi). La cinética de la apertura y cierre es característicamente lenta con largas aperturas (60-200 ms) y cierres independientes de voltaje (100-400 ms). La característica más inusual de la regulación del CFTR es su dependencia de la hidrólisis de ATP. Con cada ciclo de hidrólisis, el canal normalmente emplea el 50% del tiempo conduciendo Cl^- . Se ha especulado que la sensibilidad al ATP puede facultar al CFTR a determinar el estado metabólico de la célula y regular su actividad de acuerdo a ello. (Foskett, 1998)

1.4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA FIBROSIS QUÍSTICA

La producción de una proteína no funcional causada por mutación se traduce en diversas formas clínicas que dependen de la severidad del déficit que exprese la mutación:

- Formas severas: síntomas malabsortivos y respiratorios crónicos de iniciación precoz.
- Formas atípicas o monosintomáticas:
 - esterilidad masculina
 - síndromes por pérdidas excesivas de sales a través del sudor
 - poliposis nasal y sinusitis.

En ambos casos las alteraciones clínicas están causadas por alteración en la viscosidad de las secreciones exocrinas, difíciles de eliminar, acumulándose en los conductos excretores, que producen un amplio abanico de síntomas. Las manifestaciones clínicas se pueden resumir en la siguiente tabla:

Tabla 4. Manifestaciones clínicas producidas en las alteraciones del gen regulador de conductancia transmembranal de la FQ.



Y concretando por sistemas:

1.4.1. Manifestaciones clínicas sistema respiratorio

La enfermedad fibroquística del pulmón, está caracterizada por la obstrucción causada por secreciones espesas de las vías aéreas, acompañada de la infección bacteriana crónica y una respuesta inflamatoria excesiva, que son las responsables de la mayor parte de la morbilidad y mortalidad (Rojo, 2007).

La infección endobronquial más frecuente es la producida por la bacteria *Pseudomona aeruginosa* y se caracteriza por su multirresistencia a los antimicrobianos y se asocia a un gran deterioro pulmonar y muerte. A los 17 años, cerca del 70 % de los afectados presentan esta bacteria en sus cultivos de esputo (Ferkol, 2006).

La infección y colonización de las vías respiratorias por *Pseudomona aeruginosa* se ha relacionado con las exacerbaciones de la enfermedad pulmonar y con el deterioro progresivo de la función pulmonar (Couriel, 2002).

1.4.2. Manifestaciones nutricionales

La afectación del estado nutricional está provocada, entre otros factores, por un incremento de las infecciones, los problemas pulmonares, el mal funcionamiento pancreático y fallos en la eliminación de las enzimas pancreáticas al tubo digestivo y el defecto básico de la enfermedad que a su vez provoca un aumento del gasto energético, un crecimiento de las pérdidas y aumento de los requerimientos. El déficit energético también resulta del incremento en el consumo de oxígeno y del gasto energético en reposo, esto contribuye a empeorar la enfermedad pulmonar, lo que hace más difícil la recuperación de las exacerbaciones (Escribano, 2000). Pencharz (1984) demostró que los pacientes con FQ presentan un aumento del gasto energético entre 25 y 80 % superior que los pacientes

sanos por la hipertermia, expectoración, tos y el esfuerzo respiratorio que conlleva la enfermedad.

Los trastornos digestivos observados en los pacientes son consecuencia de la insuficiencia pancreática exocrina que se correlaciona particularmente con la mutación $\Delta F508$, que determina la forma clínica severa (Navarro, 2002). Para que no se afecte el estado nutricional de estos pacientes, es necesaria una nutrición apropiada. Los pacientes con FQ deben tener un adecuado manejo nutricional, con un ajuste apropiado de acuerdo con la edad, sexo, estado fisiológico y momento evolutivo, y a las recomendaciones propias para la enfermedad, además, de enzimas pancreáticas suplementarias y suministros de vitaminas liposolubles, lo que garantiza mantener y mejorar el crecimiento y desarrollo (Aida, 2005).

La anorexia, a menudo relacionada con las infecciones respiratorias se refleja en que suelen ingerir menos del 80 % de la energía requerida, lo que se convierte en factor esencial de malnutrición, la cual a su vez, agrava la función respiratoria y facilita la sobreinfección (Escribano, 2000). En una situación de malnutrición aguda inicialmente se detiene la ganancia ponderal y se mantiene la velocidad de crecimiento, así, en algunas series de enfermos, alrededor de la tercera parte de los pacientes se ubicó por debajo del percentil 10, en la relación P/E, por tanto, se clasificó como bajo peso. Este indicador se asocia a una inadecuada ingesta calórica. Diversos estudios han mostrado que alrededor del 50 % de los pacientes con FQ, están situados por debajo del percentil 10 de peso y talla para la edad (Morrison, 1997). Esto es debido a que muchos pacientes con FQ no tienen apetito durante la enfermedad, aunque estén estabilizados y libres de infección pulmonar, pueden presentar problemas emocionales y trastornos de la conducta, pérdidas energéticas por las heces que reflejan el grado de insuficiencia pancreática y problemas intestinales que, además, de aumentar el desaprovechamiento de los alimentos, pueden originar dolor abdominal que contribuyen a disminuir el apetito. La alteración en los hábitos alimenticios por falta de apetito junto a la mala absorción intestinal, favorece la pérdida de peso, y provoca un balance energético

negativo (Asociación Argentina Lucha FQ Páncreas, 2006). La reducción de las áreas de músculo y grasa del brazo se han observado también como muestras de desnutrición aguda (Navarro, 2002).

La evaluación de los indicadores bioquímicos no refleja en muchos casos el estado real, y da sensación de un estado nutricional adecuado en relación con las proteínas totales y la albúmina sérica. Este indicador se evaluó una vez al año en alguna de las consultas de estos pacientes. La proteína total sérica es un indicador poco sensible del estado proteico visceral, sus niveles disminuyen solo cuando se manifiesta la malnutrición proteica. La hipoalbuminemia es un indicador que refleja estrés fisiológico importante, observándose en un grupo de pacientes de 10-14 años de edad (Gibson, 1990), que mantuvo una ingesta deficiente en cuanto a energía, proteínas y grasas, clasificándose con desnutrición aguda, debido a las infecciones recurrentes y el gasto energético que conlleva la enfermedad. Una disminución en los niveles séricos de albúmina, generalmente, indica una disminución de la síntesis hepática, causada por una limitación en el aporte de sustratos durante el ayuno o en estados catabólicos; como también en enfermedades gastrointestinales e infecciones, en este caso no había alteraciones hepática, pero si la enfermedad de base que ocasiona trastornos gastrointestinales, que puede provocar esta disminución en los valores de albúmina. No se observó anemia en ningún paciente estudiado.

La FQ es una enfermedad multiorgánica que afecta al páncreas, tanto exocrino como endocrino. La diabetes mellitus relacionada con FQ se debe a una disminución en la secreción de la insulina secundaria por la insuficiencia pancreática. La alteración de la función endocrina del páncreas es una manifestación tardía en el proceso de la enfermedad. La prevalencia de DM es 100 veces más elevada en los pacientes con FQ, y solo en aquellos con insuficiencia exocrina pancreática asociada y preferentemente en los pacientes portadores de la mutación $\Delta F508$ (Stewart, 1997).

1.4.3. Manifestaciones en los electrolitos

La fibrosis quística se presenta en épocas muy calurosas o en estados de hipertermia. En esta situación, las pérdidas electrolíticas llevan a una situación de shock en el que el paciente presenta una deshidratación hiponatémica grave, temperatura corporal alta y signos de colapso cardiovascular o bien una depleción crónica de electrólitos dando lugar al síndrome de Pseudo-Bartter. El tratamiento consiste en reposición de fluidos y corrección del déficit de electrólitos con altos aportes de sodio, cloro y potasio para corregir la alcalosis. Es necesario prevenir esta complicación mediante la suplementación con NaCl (22 mEq/kg/día) utilizando sal de mesa común, suero de rehidratación oral, etc.

Además, en los pacientes con FQ existe una pérdida aumentada de cloro y sodio por el sudor, secundario a la alteración de la CFTR a nivel de las glándulas sudoríparas, pérdidas gastrointestinales y en el aparato respiratorio, que condicionan un estado de hiponatremia, hipocloremia y alcalosis metabólica, originando los denominados síndromes pierde sal. Así, una de las formas clínicas de presentación de la FQ en lactantes y niños pequeños, es la deshidratación hiponatémica e hipoclorémica. En adultos, es más frecuente el denominado golpe de calor, que vinculados con el acceso a un diagnóstico precoz e implementación inmediata de un tratamiento apropiado.

Se ha postulado que el genotipo determina la cantidad de proteína funcionante. Así, se señala que para que el páncreas se afecte debe haber menos del 1% de CFTR normal, mientras que las glándulas sudoríparas se afectan con menos del 5%, existe clínica pulmonar con menos del 4,5% y ausencia congénita de vasos deferentes con menos del 10% (Chu, 1993).

En esta última situación se encontraría el caso de la mutación IVS8-6(5T) (localizada en el intrón 8, mutación de *splicing*), también conocida como alelo 5T (Kerem, 1997; Chillón, 1995) cuya presencia en los varones se asocia con frecuencia a una agenesia congénita de los vasos deferentes (CBAVD) y a poca o ninguna manifestación pulmonar o digestiva, aunque

parecen implicados otros factores genéticos no conocidos. El mecanismo molecular por el que ocurre este fenómeno no está completamente dilucidado. Parece que esta mutación permitiría la existencia de, aproximadamente, un 10% de proteína activa, cantidad que sería suficiente para el normal funcionamiento del tejido pulmonar o digestivo, pero no así del aparato genital masculino. La presencia de esta mutación en ambos cromosomas no se considera diagnóstica de FQ, pero la asociación de un alelo 5T con una mutación reconocida como causante de enfermedad sí es diagnóstica (Rosenstein, 1998).

Un caso similar ocurre con la mutación R117H (mutación leve relacionada con edad tardía de inicio de los síntomas, suficiencia pancreática y concentraciones bajas de cloro en el sudor), que acompañada de la mutación 5T en el mismo cromosoma se asocia a enfermedad, aunque ninguna de las dos, de manera aislada, puede considerarse mutación de FQ.

1.5. DIAGNÓSTICO DE LA FIBROSIS QUÍSTICA

Los criterios diagnósticos de la enfermedad son el de la presencia de 1 o más de los síntomas anteriores, junto con historia familiar, o el cribado neonatal positivo. Para la confirmación del diagnóstico las pruebas complementarias son las de función pulmonar, función pancreática, test del sudor positivo al menos en dos ocasiones con valores > 60 mEq/l (90% de los pacientes). Pero el diagnóstico definitivo es el genético de los dos alelos mutados, con las restricciones anotadas debidas a la gran cantidad de mutaciones. Las manifestaciones clínicas más relevantes se producen a nivel respiratorio y digestivo, siendo las respiratorias las relacionadas principalmente con la mortalidad. Aunque los síntomas suelen manifestarse en la infancia, su amplia variabilidad clínica puede demorar el diagnóstico hasta la edad adulta.

El diagnóstico de FQ es fundamentalmente clínico, confirmado por técnicas diagnósticas en centros con experiencia en FQ.

1.5.1. Diagnóstico bioquímico

- **Albúmina meconial y lactasa.** El contenido de albúmina en el meconio de los neonatos con FQ es elevada con respecto a los neonatos no afectados por la enfermedad. El poder de discriminación de la prueba del meconio es pobre, con un porcentaje elevado de falsos positivos y falsos negativos.
- **Enzimas del líquido amniótico.** En la década de los ochenta del siglo XX, era el método elegido para el diagnóstico prenatal de FQ. Actualmente este método ha sido desbancado por los diagnósticos genéticos.
- **El “Test del sudor”** sigue siendo el método diagnóstico principal de la FQ. El test del sudor continúa siendo el patrón oro. La constatación, en dos muestras de sudor, de concentraciones de $Cl > 60$ mmol/l confirma el diagnóstico de FQ. Salvo raras excepciones, el diagnóstico se puede excluir con niveles de $Cl < 30$ mmol/l. Las concentraciones de Cloro en sudor entre 30-59 mmol/l son consideradas como dudosas, recomendándose la realización de un estudio genético mediante un kit comercial que contenga el panel de las mutaciones más frecuentes de FQ en la población de origen.

Falsos negativos (Barrio Gómez de Agüero, 2009)

- error técnica, edema zona estimulada
- hipoproteinemia, RN de pocos días de vida

Falsos positivos

- pseudohipoaldosteronismo congénito (con hiperpotasemia)
- insuficiencia suprarrenal, hipotiroidismo

- **malnutrición mixta, sd nefrítico, retraso crecimiento psicosocial**
- **diabetes insípida nefrogénica, anorexia nerviosa**
- **glucogenosis tipo I, fucosidosis, déficit Glucosa 6P-DH**
- **Klinefelter, síndrome de Mauriac, Down**
- **colestasis familiar, displasia ectodérmica, disautonomía familiar**
- **PG mucho tiempo**
- **hipogammaglobulinemia, ID adquiridas**
- **dermatitis atópica**

Un resultado positivo del cribado (TIR elevado y 2 mutaciones) debe confirmarse mediante el test del sudor. Las células secretoras de las glándulas sudoríparas de los individuos sanos producen una secreción isotónica que en su curso por el conducto excretor, impermeable al agua, se va haciendo más hipotónica. La secreción de las glándulas sudoríparas de pacientes con FQ es isosmolar, igual que en los sujetos sanos, pero en pacientes con FQ la secreción es más escasa y la impermeabilidad del conducto excretor al ión cloro hace que su concentración aumente en el sudor.

En el test del sudor se estimula la producción de sudor por iontoforesis (método terapéutico de introducción del fármaco en los tejidos por medio de corrientes eléctricas) con pilocarpina y se recoge en un colector (Macroduct) o en otro soporte para su procesamiento. De momento ni la conductividad del sudor ni su osmolalidad deberán usarse para diagnosticar la FQ, aunque en un futuro podrían aceptarse.

Para garantizar una buena muestra de sudor se recomienda que el RN tenga al menos 2 semanas de vida y un peso superior a los 2 kg. El *Clinical and Laboratory Standards Institute* de los EEUU (2011) permite realizar un test del sudor a partir de las 48 horas de vida. Valores: i) Normal <40 mmol/l; ii) Borderline 40-60 mmol/l; iii) Patológico >60 mmol/l. Dos resultados positivos confirman el diagnóstico.

1.5.2. Diagnóstico genético

El diagnóstico genético se inicia a partir del trabajo colaborativo de Tsui y Collins (1989) que permitió la identificación y detección de la delección de los 3 pares de bases entre los 250.000 que forman el gen (Riordan, 1989; Tellería, 2002). El hecho de esa delección de los 3 pares de bases (TTT, en el exón 1.501-1.681) hace que la CFTR carezca de fenilalanina en posición 508; con esta proteína de membrana anómala no habrá transporte del Cl⁻ ni de su contraión y, en consecuencia, el moco no estará hidratado suficientemente, desencadenándose las manifestaciones de esta grave enfermedad. Es la mutación más frecuente: en la población blanca aproximadamente el 50% de los pacientes afectados de FQ son homocigotos para esta mutación, habiéndose obtenido un 70% de frecuencia en cromosomas de fibrosis quística, pero existen otras mutaciones. Esta variabilidad ha hecho que técnicas recientes de genética molecular, como el estudio de fragmentos de restricción, vayan cediendo el paso a otras, que utilizan la posibilidad de transformar cualquier alteración en la secuencia del ADN en un sitio de reconocimiento alelo específico para la enzima de restricción (PCR-site-mutagénesis, PSM). El hecho real es que cada vez se descubren más familias “no informativas”, por otras mutaciones (30%) y que no presentan otro diagnóstico que el clínico.

Sin embargo, dado el gran número de mutaciones, y según el European Concerted Action on Cystic Fibrosis (Dequeker, 2000) se deberían identificar un mínimo de 80% de las mutaciones de la población estudiada en el cribado para disminuir los falso negativos. A la fecha el Consorcio Internacional de Fibrosis Quística ha reportado más de 1,300 mutaciones diferentes y alrededor de 200 polimorfismos en el gen *CFTR*. Su distribución en el gen no parece ser al azar, ya que se ha detectado una alta frecuencia de mutaciones en ciertos exones como el 4, 7, 11, 17b y 20.

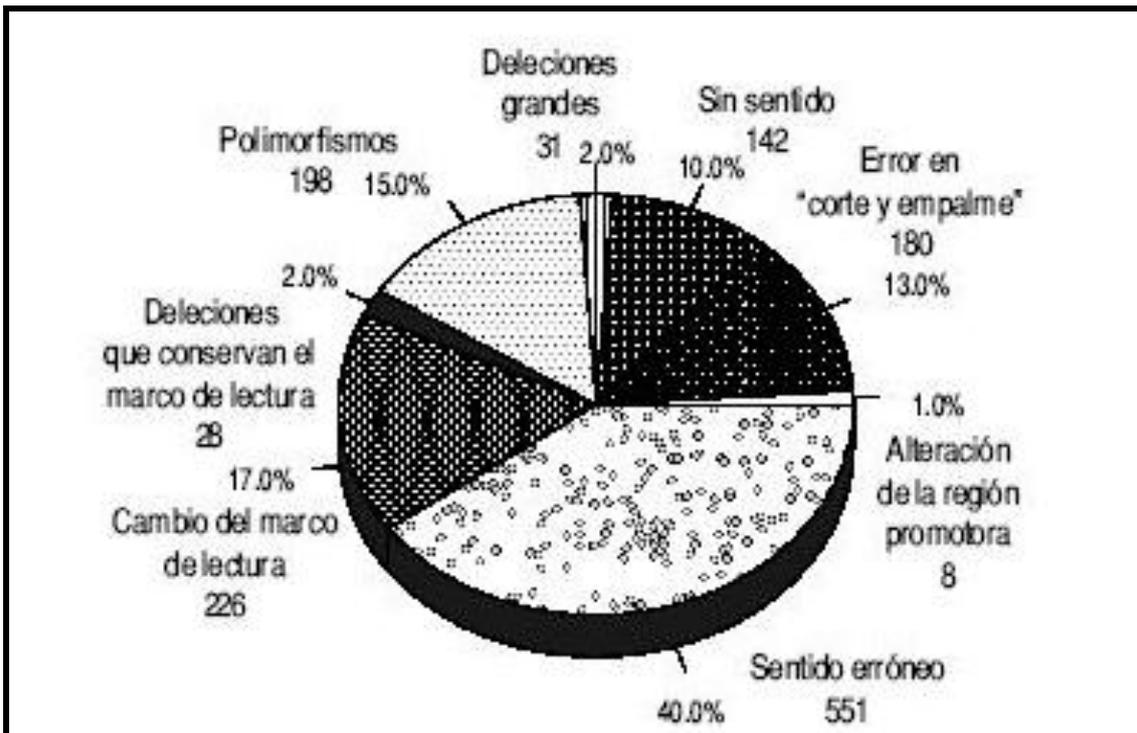


Figura 6. Mutaciones gen CFRT (Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium; 2012).

1.6. CRIBADO NEONATAL

La FQ es una de las enfermedades raras para las que existe la posibilidad de realizar un cribado neonatal con el que poder detectarla precozmente e iniciar un seguimiento estrecho del niño, con el objetivo de retrasar, o disminuir, el impacto negativo que supone un diagnóstico clínico tardío en la evolución de la misma.

Se ha demostrado la importancia de un diagnóstico temprano para un tratamiento precoz y un correspondiente descenso de la morbi-mortalidad. De lo que se deduce la importancia del cribado neonatal de dicha patología. Aunque la FQ carece de un tratamiento curativo, a lo largo de los últimos años se ha producido un incremento significativo en la mediana de supervivencia y en la calidad de vida de estos pacientes, ligado al tratamiento integral en Unidades de FQ y al desarrollo de terapias

específicas como las enzimas pancreáticas ácido-resistentes, antibioterapia antipseudomonas, diseño de fármacos para uso inhalatorio, trasplante pulmonar y hepático y un correcto seguimiento y tratamiento nutricional.

Hace ya más de 25 años, diferentes países iniciaron la realización de un cribado neonatal para el diagnóstico precoz de la enfermedad, basándose en la determinación, en la primera semana de vida, de tripsina inmunorreactiva (TIR) en sangre seca de talón recogida mediante filtro, debido a su nivel aumentado en los pacientes con FQ, probablemente en relación a la obstrucción de los conductos pancreáticos (Paz-Valiñas, 2004; AECNE, 2008; Serra, 2000; Mérelle, 2008).

Desde entonces, distintos estudios han demostrado que los niños diagnosticados por cribado presentan mejores parámetros nutricionales y respiratorios y un mejor desarrollo intelectual que los diagnosticados tras presentar manifestaciones clínicas (Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium (CFGAC), 2007 Database; Castellany, 2010; Castellany, 2009; Gartner, 2010).

Esta inclusión de la fibrosis quística ha tenido toda una serie de altibajos, así, en 1998, una editorial BMJ titulaba: "No hay evidencia de ningún beneficio" (Wald, 1998), lo que fue recibido con una ráfaga de cartas de indignación (Dodge, 1998; Farrell, 1998). Posteriormente, una revisión sistemática Cochrane (Mérelle, 2001) analizó dos ensayos que involucraron a más de un millón de bebés, y favoreció la progresiva implantación del cribado. En 2004 se publican las recomendaciones del Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, 2004; Grosse, 2004) que recomienda el cribado para todos los estados, ampliándose progresivamente desde entonces, siendo el último estado Texas en asumirlo (Cystic Fibrosis Foundation, 2007).

1.6.1. Ventajas cribado neonatal fibrosis quística

- **Descenso de la colonización crónica por microorganismos potencialmente patógenos (fundamentalmente *Pseudomonas aeruginosa*).**

- **Mejoría de la función pulmonar** (menor deterioro del FEV1). La función pulmonar se utiliza a menudo como predictor de mortalidad. Lamentablemente, el estudio Wisconsin no encontró diferencias en el FEV1 a las 7 - 8 años, y ninguna diferencia en términos cuantitativos radiografía de tórax (Farrell, 2003). Análisis posteriores han mostrado que el grupo de niños con diagnóstico posterior tuvo peores puntuaciones en la radiografía de tórax inicial, aunque con el tiempo no hubo diferencias entre los dos grupos, hasta que los efectos de *P. aeruginosa* sobrevinieron, siendo peores en el grupo cribado a los 10 años (Farrell, 2005). Otro estudio comparó la función pulmonar de niños menores de 24 meses con fibrosis quística, detectados por cribado con aquellos que lo habían sido por clínica, observándose que los flujos espiratorios forzados (V_{max} FRC) fueron de 229 ml/seg en los del grupo cribado y de 104 ml/seg en los del grupo de clínica, la resistencia de la vía aérea evaluada por pletismografía fue de 0,71 (cribado) y 1,70 (clínica) (D'Alessandro, 2005). Un estudio australiano demostró significativamente mejor resultado en función pulmón en los niños cribados hasta 15 años de edad, en comparación con los no cribados (McKay, 2005).

- **Mejoría del estado nutricional** (peso y talla), muy ligado a la supervivencia y al progreso de la enfermedad pulmonar. Una mejor nutrición fue el resultado en el ensayo Wisconsin, en niños diagnosticados por cribado que tienen significativamente mayor altura, peso y percentiles del perímetro craneal (Farrell, 1997). Los resultados muestran que la desnutrición severa persiste después de retraso en el diagnóstico de la FQ y de puesta al día puede no ser posible. Llegamos a la conclusión que el diagnóstico precoz de la FQ mediante el cribado neonatal combinada con la terapia nutricional agresivo puede resultar en mejorado significativamente el estado nutricional a largo término. (Farrell, 2001). El desarrollo y estado de la nutrición adecuada en los pacientes con fibrosis quística (FQ) es un aspecto decisivo en el tratamiento de la enfermedad e influye de manera particular y favorablemente en el curso de la enfermedad; así como en la calidad de vida. Sin embargo, a lo largo de la evolución, diversos factores

entre los que se incluyen la insuficiencia pancreática exocrina, la enfermedad pulmonar crónica y la anorexia que acompaña a la infección, pueden ser negativo en el balance de la energía, lo que desencadena desnutrición en el paciente. Incluso, circunstancias biológicas propias de la edad, como la aceleración puberal del crecimiento, pueden acentuar el deterioro nutricional en un momento evolutivo en el que además, suelen debutar otras complicaciones como la diabetes. (Martínez, 2005; Murray, 1999).

Estos cuadros de pérdida brusca de peso se acompañan de una depleción en las reservas proteicas, por ser una de las primeras que se pierde y también en las reservas energéticas, debido a una ingesta dietética inadecuada, deficiente en proteína y grasas, y al aumento del requerimiento de energía debido a las reagudizaciones respiratorias que conlleva la enfermedad y a la presencia de la insuficiencia pancreática que presentan estos pacientes, donde se observó un deterioro nutricional. (Navarro HM, 2002).

La FQ es una enfermedad multiorgánica que afecta el páncreas, tanto exocrino como endocrino. La diabetes mellitus relacionada con FQ se debe a una disminución en la secreción de la insulina secundaria por la insuficiencia pancreática. La alteración de la función endocrina del páncreas es una manifestación tardía en el proceso de la enfermedad. En todos los pacientes estudiados los niveles de glucemia tuvieron valores normales. Hay que destacar que la prevalencia de DM es 100 veces más elevada en los pacientes con FQ, y solo en aquellos con insuficiencia exocrina pancreática asociada y preferentemente en los pacientes portadores de la mutación $\Delta F508$, que constituye la mayoría de los pacientes del estudio. (Stewart, 1997; Rosenecker, 1995).

La enfermedad fibroquística del pulmón, está caracterizada por la obstrucción por secreciones espesas de las vías aéreas, la infección bacteriana crónica y una respuesta inflamatoria excesiva, son la responsable de la mayor parte de la morbilidad y mortalidad (RojoM, 2007).

La infección endobronquial más frecuente fue la producida por la bacteria *Pseudomona aeruginosa* y se caracteriza por su multirresistencia a los antimicrobianos y se asocia a un gran deterioro pulmonar y muerte. A los 17 años, cerca del 70 % de los afectados presentan esta bacteria en sus cultivos de esputo (Ferkol, 2006).

La infección y colonización de las vías respiratorias por *Pseudomona aeruginosa* se ha relacionado con las exacerbaciones de la enfermedad pulmonar y con el deterioro progresivo de la función pulmonar (Couriel, 2002).

El déficit energético también resulta del incremento en el consumo de oxígeno y del gasto energético en reposo, esto contribuye a empeorar la enfermedad pulmonar, lo que hace más difícil la recuperación de las exacerbaciones (Escribano, 2000). Pencharz (1984) demostró que los pacientes con FQ presentan un aumento del gasto energético entre 25 y 80 % superior que los pacientes sanos por la hipertermia, expectoración, tos y el esfuerzo respiratorio que conlleva la enfermedad.

Los trastornos digestivos observados en los pacientes son consecuencia de la insuficiencia pancreática exocrina que se correlaciona particularmente con la mutación $\Delta F508$, que determina la forma clínica severa. (Navarro, 2002).

- Mejoría del desarrollo cognitivo del niño.

- Disminución del número de hospitalizaciones (Accurso, 2005; Chatfield, 1991; Dankert-Roelse, 2005).

- Disminución de la mortalidad debido al mejor pronóstico actual y a la menor mortalidad en la niñez (Dodge, 2007), aunque esto ha sido difícil de evaluar y demostrar, en análisis en EEUU mediante los datos del registro de FQ de 1986-2000 encontraron que los pacientes diagnosticados por síntomas o íleo meconial en lugar de por cribado tenían un riesgo

significativamente mayor de acortar supervivencia (Lai, 2005). Una revisión reciente de los datos en EEUU comparando niños cribados con los que no lo fueron, encontró una modesta disminución de alrededor del 2% en el riesgo de mortalidad (Grosse, 2006).

- **Pretratamiento sintomático:** las complicaciones son mucho menos comunes con el tratamiento adecuado en bebés cribados, por ejemplo, el 9% de los bebés diagnosticados por síntomas clínicos tenían desequilibrio electrolítico o edema en comparación al 3% de bebés cribados (Accurso, 2005).

- **Mayor confianza en la profesión médica:** no hay duda de que los padres cuyos niños han sido diagnosticados tardíamente, tienen un desconfianza innata de los médicos y de trabajadores de la salud. Sobre todo cuando los padres ven anomalías en sus hijos y son tratados como padres neuróticos, así que no es sorprendente que el diagnóstico tardío se asocia con mayor ansiedad de los padres (Al-Jader, 1990), ingresos hospitalarios repetidos y un mal control de síntomas (Castellani, 2003). Un estudio holandés mostró que un corto período pre-diagnóstico (definido como el de confirmación de diagnóstico de FQ de menos 3 meses) se asoció con menos sentimientos negativos de los padres, y aumento de la confianza en la profesión médica en comparación con los diagnosticados después de 3 meses (Mérelle, 2003).

- **Consecuencias psicológicas padres:** existen datos que sugieren que el cribado tiene el mayor potencial para reducir a largo plazo consecuencias psicológicas adversas que un retraso diagnóstico (Wilfond, 2005).

- **Otros beneficios:**

- Posibilidad de realizar planificación familiar precoz una vez diagnosticada la enfermedad en el primer hijo. Son conocidas las limitaciones del estudio de las mutaciones de FQ por su gran número. Pero éste análisis es fundamental y es recomendado en todo paciente con FQ. A pesar de las deficiencias metodológicas, se reconoce la utilidad del diagnóstico

molecular para el consejo genético como único método capaz de establecer si otros miembros de la familia son portadores (Wheeler, 2001; Ciske, 2001).

- Permitir el estudio de portadores en familiares de riesgo. Se ha demostrado que da lugar a malentendidos y respuestas emocionales negativas de los padres. Los estudios han demostrado que incluso 1 año más tarde, algunos padres creían que su niño tenía FQ o aún podría desarrollarla. Algunos padres también creen que su hijo "No es normal" y podría llegar a ser enfermo como resultado de ser portador. Éste es un asunto complicado, ya que aunque los portadores de FQ tienden a estar en perfecto estado de salud, los datos muestran un grupo de portadores de fibrosis quística con bronquiectasias idiopáticas, infección micobacteriana pulmonares no tuberculosa, rinosinusitis crónica idiopática y pancreatitis crónica (Ziedalski, 2006; Wang, 2005; Weiss, 2005). Los padres no entienden la información consejo genético") comprensión de los padres puede ser evaluada rutinariamente inmediatamente después y varios meses después del consejo genético. En el futuro, profesionales del cribado de FQ deben dar seguimiento a esta estrategia mediante la creación de soluciones y herramientas que se ocupan de estas áreas problemáticas que empiezan con los elementos con mayor puntuación y difundir ampliamente las posibles soluciones (Campbell, 2005).

- Beneficios psicosociales: mejoría de la calidad de vida de los cuidadores, disminución de la ansiedad familiar y de la carga asistencial, ligada al fallo de medro o a los problemas respiratorios recurrentes del niño.

Estos beneficios, sumados a las experiencias exitosas en otras comunidades, han hecho que su implantación haya sido continua, así en el año 2012, en España la cobertura por comunidades está como se muestra en la figura siguiente, habiéndose implantado en dicho año el cribado neonatal en la Comunidad Valenciana.

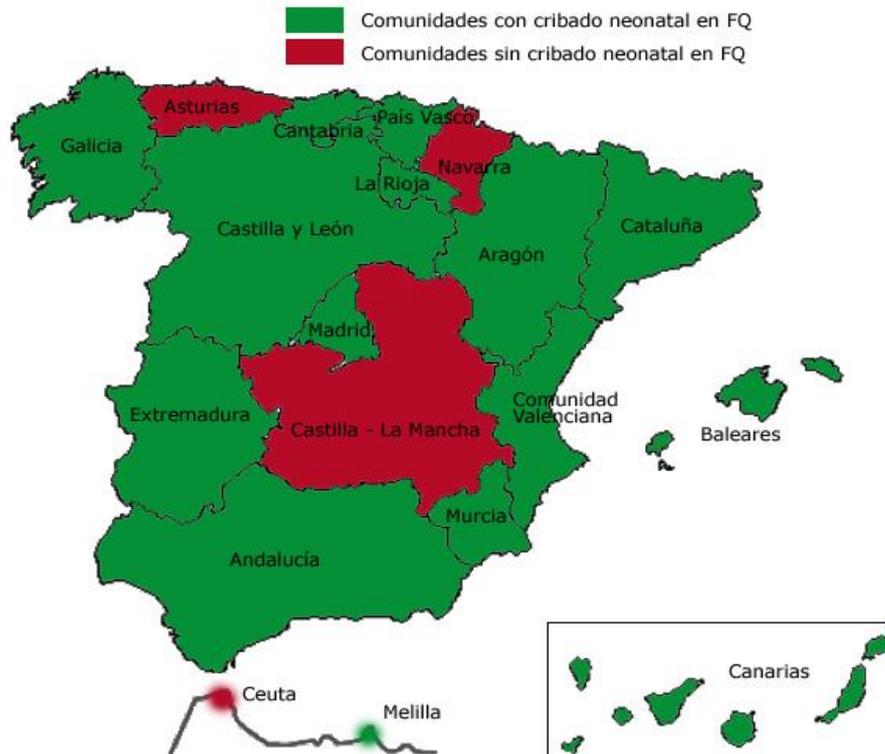


Figura 7. Cobertura del Cribado Neonatal de Fibrosis Quística en España en el año 2012.

1.6.2. Estrategias cribado neonatal fibrosis quística

Las estrategias para la detección neonatal de la fibrosis quística han ido evolucionando, así:

- **1960:** detección de la albúmina en el meconio: poca sensibilidad y especificidad.
- **1979:** se demostró que la concentración de tripsinógeno inmunorreactivo (TIR) estaba aumentado en las muestras de sangre de recién nacidos que padecían fibrosis quística (Crossley, 1979), A partir de ese momento, el primer programa midiendo TIR en sangre en papel se instauró en Nueva Zelanda en 1979 (Crossley, 1979)

Los neonatos con fibrosis quística tienen aumentada la concentración de tripsina inmunorreactiva (TIR) en la sangre, incluso en los casos de insuficiencia pancreática, ello es debido a fibrosis pancreática de

los pacientes con FQ incluso en el periodo intrauterino, lo cual produce reflujo de enzimas pancreáticas dentro de la circulación. Desde 1979, cuando Crossley y cols. observaron que los niños con FQ presentaban niveles elevados de Tripsina Inmunorreactiva (TIR) en sangre de cordón, se consideró factible la realización del cribado neonatal masivo de FQ a través de esta determinación.

La TIR es una familia de moléculas producida por el páncreas exocrino y está constituida por tripsina y distintas formas de tripsinógeno indistinguibles desde el punto de vista inmunológico, de las cuales en condiciones normales, menos del 0,1% de la producción diaria alcanza la circulación siendo la principal vía de eliminación el riñón. Una vez en la circulación la tripsina se encuentra unida a α 1-antitripsina (15 %) y a γ 2-macroglobulina (85 no siendo posible encontrarla en su estado libre a consecuencia de la actividad antiproteásica del suero).

Si bien la TIR se encuentra aumentada en individuos con FQ, también se ha observado un incremento de TIR en individuos normales con inmadurez del sistema ductal, en portadores de FQ (66%) y en neonatos con otras patologías como: trisomías del 13, 18 y 21, infecciones congénitas (citomegalovirus y otras subclínicas), insuficiencia renal, perfusión pancreática deficiente y atresia intestinal. Por otro lado se ha descrito que el estrés perinatal puede ser responsable hasta del 25% de los casos positivos.

El cribado de FQ a través de los niveles de TIR es una herramienta útil para identificar niños afectados. La aplicación de esta técnica junto con la identificación de niños con íleo meconial, permite la identificación temprana en niños menores de dos meses de edad, con una incidencia esperada a la de la enfermedad (Hammond, 1991; Steinberg, 1960; Kramm, 1962).

Las concentraciones de TIR pueden no estar elevadas en niños con íleo meconial, confirmando que estos niveles en niños que presentan este trastorno (Hammond, 1991; Rock, 1990; Duhamel, 1984).

Habitualmente el aumento en el recién nacido es debido a FQ, y expresa la obstrucción de los conductos pancreáticos con reflujo de la tripsina a la sangre. Los valores de TIR se normalizan cuando se produce la destrucción de los acinos, habitualmente hacia los 6 meses.

Actualmente el cribado neonatal de la FQ se basa en el estudio de TIR, que se cuantifica en la misma muestra de sangre obtenida por punción en el talón, que se recoge en el papel de filtro para el cribado endocrinometabólico neonatal a las 48 horas de vida. Aproximadamente el 0,5% de los RN tienen unos niveles de TIR por encima del valor de corte, pero menos del 10% de ellos tendrá la enfermedad. Para cuantificar TIR se utilizan métodos basados en el inmunoensayo.

Existe un punto crítico, que es el establecimiento del punto de corte en primera muestra, para lo cual cada laboratorio debe establecer sus propios puntos de corte, teniendo en cuenta que la concentración de TIR es dependiente de la edad del recién nacido, disminuyendo notablemente a partir de los 20-21 días de vida.

Los valores del TIR disminuyen pasadas las primeras semanas de vida por lo que se debe tener muy en cuenta la edad del paciente, tanto que se recomienda utilizar valores de corte específicos para cada edad.

Por el contrario, la TIR en muestras muy precoces y en RN con íleo meconial con FQ puede ser negativo, y por el contrario podría elevarse en RN prematuros, con asfixia perinatal o de etnia negra sin FQ. Hay un aumento significativo, doble riesgo de TIR elevado, entre los RN afroamericanos y entre los norteafricanos residentes en Europa en relación con la población general a pesar de una significativa menor incidencia de FQ entre ellos (1/17.000), lo que podría tener una base genética común.

La influencia étnica en el nivel de TIR ha sido estudiada previamente (Gregg, 1997), mostrando una sobrerrepresentación de los afroamericanos en los bebés recién nacidos cribados positivos (10% de la población general, llegando a 28% en los positivos) a pesar de la menor

incidencia de fibrosis quística en esta población. Este hallazgo es muy similar a otros estudios, donde el porcentaje de los niños del norte de África aumentó de 25% en la población general al 40% en resultados positivos, sin FQ. Variaciones étnicas de los valores de referencia son un fenómeno biológico descrito recientemente.

Varios estudios proponen determinar parámetros étnicos para la interpretación de estos resultados tales como la testosterona (Heald, 2003), la proteína C reactiva (Anand, 2004), el factor de von Willebrand (Sukhu, 2003), el antígeno prostático específico (He, 2004) o lipoproteína en plasma (Watson, 2003), pero hasta la fecha no se han publicado parámetros neonatales biológicos. También existen variaciones étnicas en el peso al nacimiento (Alshimmiri, 2003; Madan, 2002).

El intervalo de referencia de TIR puede variar según el origen étnico de los recién nacidos. Los recién nacidos de familias del Norte de África tienen valores más altos de TIR y la mayoría de los recién nacidos cribados positivos en esta población podría ser considerada como "falsos positivos" (Cheillan, 2005).

Así, en el cribado neonatal de la FQ llevado a cabo en Francia, en la región Ródano-Alpes desde octubre de 2002 mediante una estrategia de tres etapas (TIR / ADN / TIR), ha mostrado que este protocolo es el más eficaz, siendo utilizado por varios programas de cribado (Corbetta, 2002; Farriaux, 2003). El principal problema de Francia es un porcentaje mayor de lo esperado de falsos positivos en las pruebas. La hipótesis es que la gama de referencia del TIR podría ser diferente según la etnia de los RN.

También se muestran valores más altos de TIR asociados con la trisomía 13 (Priest, 1991), asfixia perinatal (Rock, 1989) o lactantes enfermos (Ravine, 1993). Sin embargo, otros estudios son contradictorios, en particular sobre el efecto de la infección (Wilson, 1994).

A pesar de estas consideraciones no se recomienda una estrategia especial para los bebés prematuros y recién nacidos enfermos. Sin

embargo puede ser útil registrar el origen étnico del RN para poder relacionarlo con posibles desviaciones de los resultados analíticos.

Los valores de corte a las 48 horas de vida se pueden establecer de distintas maneras: un valor absoluto, habitualmente 60-65 ng/ml aunque se pueden aceptar valores de hasta 90-105 ng/ml, o un valor cambiante en función de los resultados obtenidos en un período de tiempo determinado que puede ser un día o un mes aceptando como patológicos los valores superiores al P90, P95 ó 98 para ese período.

Los portadores de una sola mutación del CFTR (heterocigotos) presentan unos valores de TIR significativamente superiores a los no portadores, aunque en la mayor parte de los casos dentro de rango. Esta diferencia es mayor en los portadores de mutaciones con insuficiencia pancreática. Se estima que la TIR solo detecta aproximadamente el 1,5% de los heterocigotos.

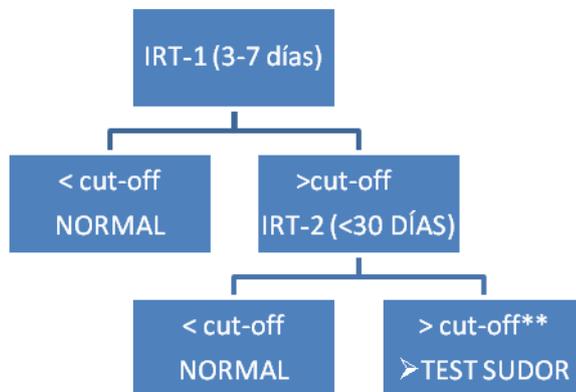
La utilización de TIR presenta las siguientes limitaciones:

- La concentración de TIR a los 3-7 días es sensible pero poco específica, teniendo un VPP= 3-10% (Wilcken, 2007) existiendo estado de hipertripsinemia neonatal transitoria en no fibrosis quística dando falsos positivos. Una segunda muestra a los 15 días aumenta la especificidad.
- Existe elevación de TIR sin FQ en: Neonatos con APGAR bajas; asfixia u otros problemas de salud perinatal, medicación, malformación congénita, etc.; infecciones congénitas; trisomía 13 y 18; origen africano.
- A una edad superior a los 30-35 días disminuye la sensibilidad (Rock, 1990), porque existe atrofia secundaria de las células acinares, que son sustituidas por tejido fibrótico, igualándose la concentración de TIR en pacientes y en no pacientes.
- Es importante por ello establecer puntos de corte acordes a la edad a la que se va a realizar el cribado neonatal (2-20 días y 21-30 ó 21-35 días).

- Se necesita la optimización del punto de corte para minimizar los falsos positivos y negativos (Wilcken, 2003)
 - VPP 1ª TIR: debería estar entre 3-10%
 - VPP 2ª TIR :debería estar entre 45-55%
 - Para permitir > 95 % niños FQ detectados
- Existe una situación, ileo meconial (IM), en la cual se pasa directamente al test del sudor, sin determinaciones de tripsina inmunorreactiva.

Estas últimas consideraciones, conducen a un número apreciable de falsos positivos, por lo que es necesario establecer protocolos que confirmen el cribado sin llegar a provocar en los padres de los recién nacidos situaciones de estrés emocional e incertidumbre. Para ello se han establecido diferentes protocolos en el cribado neonatal de la fibrosis quística, entre los cuales están:

1.6.2.1. Estrategia TIR/TIR:



** Dependencia de la concentración de TIR con la edad

Figura 8. Esquema del protocolo de cribado neonatal de FQ con doble determinación de TIR.

1.6.2.2. Estrategia TIR/DNA:

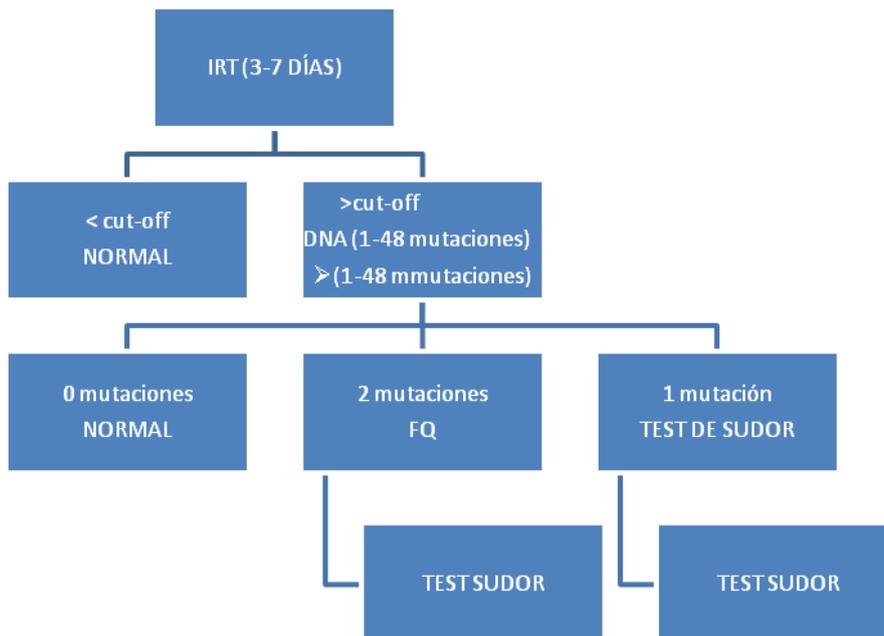


Figura 9. Esquema del protocolo de cribado neonatal de FQ con determinación de TIR seguida del estudio de mutaciones.

Como ya se ha indicado, según European Concertated Action on Cystic Fibrosis en este caso se deberían identificar un mínimo del 80% de las mutaciones de la población estudiada en el cribado para disminuir los falsos negativos. Así, el American College of Medical Genetics (ACMG) (Grody, 2001) propone un panel de 25 mutaciones ampliadas en 2004 a 31, más 14 en etnias específicas (Watson, 2004).

Esta estrategia permite un punto de corte para TIR más bajo que TIR/TIR, con lo que se evitan falsos negativos por TIR; evita una segunda muestra: las TIR positivas, se analizan mutaciones en la misma muestra y así evita ansiedad de los padres por falsos positivos en TIR.

El cribado neonatal para la fibrosis quística sobre la medición de TIR en muestras de sangre seca detecta aproximadamente el 90% de los casos con enfermedad grave. Las formas más leves se pueden perder. A veces se requiere una segunda muestra de sangre de al menos 0,5% de los bebés si la detección se basa sólo en TIR, pero esto puede evitarse mediante el

análisis de la mutación de fibrosis quística en su lugar. La detección basada en el ADN plantea otros problemas. Hay claras ventajas a corto plazo de cribado neonatal para la FQ y la creciente evidencia de que reduce la morbilidad a largo plazo. (Gregg RG, 1993).

La combinación de ensayo de TIR además el análisis del genotipo (1998-1999) parece ser un método más fiable de detección de FQ que la medición TIR sólo o combinado con sólo la mutación $\Delta F508$ (Padoan, 2002).

1.6.2.2.1. Selección de las mutaciones a estudiar

Existe un factor que determina los falsos negativos y falsos positivos que es la elección de número de mutaciones a detectar, a más mutaciones, mayor sensibilidad (disminución de falsos negativos) pero disminuye la selectividad (aumentando los falsos positivos), siendo necesario llegar a un equilibrio y una selección adecuada de las mutaciones más frecuentes presentes en la población a cribar (Comeau , 2004).

Es necesario también tener en cuenta la distinta gravedad de las mutaciones, así:

- Mutaciones responsables de fibrosis quística: $\Delta F508$, G542X, 711+1G>T,...
- Mutaciones asociadas a patologías del adulto: L997F, D443Y-G576A-R668C, R258G,...
- Mutaciones sin consecuencias clínicas: I148T, M470V, F508C, 1716G>A,...
- Mutaciones con expresión clínica desconocida: L967S, Y1014C,...

A mayor nº de mutaciones estudiadas:

- VENTAJAS: disminución de falsos negativos, aumento de la sensibilidad..

- **DESVENTAJAS:** aumento de nº de pruebas del test del sudor, aumento de portadores
- VPP similares

1.6.2.2.2. Detección de portadores

Al aumentar el número de mutaciones a estudiar, aumentan también las posibilidades de detectar portadores sanos, lo cual conlleva una serie de ventajas e inconvenientes:

- **A favor:** se realiza un consejo genético permitiendo un asesoramiento reproductivo. Permite un cribado poblacional a parejas identificando a los portadores, de tal manera que disminuye la incidencia de la enfermedad.
- **En contra:** se genera ansiedad a los padres (hijo enfermo o no enfermo), llevando una sobrecarga del consejo genético.

1.6.2.2.3. Variabilidad étnica de la fibrosis quística

La expresión heterogénea de la proteína CFTR evidencia que las diferentes mutaciones se manifiestan con una evolución clínica altamente variable. La combinación de los distintos tipos de mutación en un individuo y la evaluación de las características clínicas que presentan los pacientes permiten establecer las correlaciones entre el genotipo y el fenotipo. Incluso antes de que se identificase el gen CFTR se sabía que parte de las diferencias clínicas de los pacientes FQ están determinadas genéticamente. Alrededor del 15% de los pacientes FQ son pancreáticos suficientes (SP) comparado con la mayoría de los pacientes con FQ, los cuales precisan del tratamiento con enzimas pancreáticos (pancreático insuficientes, IS) (Wilschanski, 1995).

a) Variabilidad étnica de las mutaciones

La mutación $\Delta F508$ es responsable del 60% de los enfermos FQ en el mundo. Esta mutación es responsable de formas muy severas (aquellas acompañadas de insuficiencia pancreática). En la mayor parte de los pacientes aparecen los primeros síntomas durante la lactancia, es decir, con menos de 1 año de edad (Dyce, 2000).

La frecuencia de esta mutación en la población mundial es de 66 % (Araújo, 2005). Esta mutación provoca una alteración en el proceso post-transcripcional de la proteína, con una disminución del tráfico de la proteína madura desde el aparato de Golgi a la superficie celular apical (Loo, 1998). Se encuentra aproximadamente en el 70 % de los cromosomas fibroquísticos en Estados Unidos y Canadá, si bien varía su incidencia, dependiendo del grado de heterogeneidad genética en las distintas poblaciones (Murray, 1999; García, 1999).

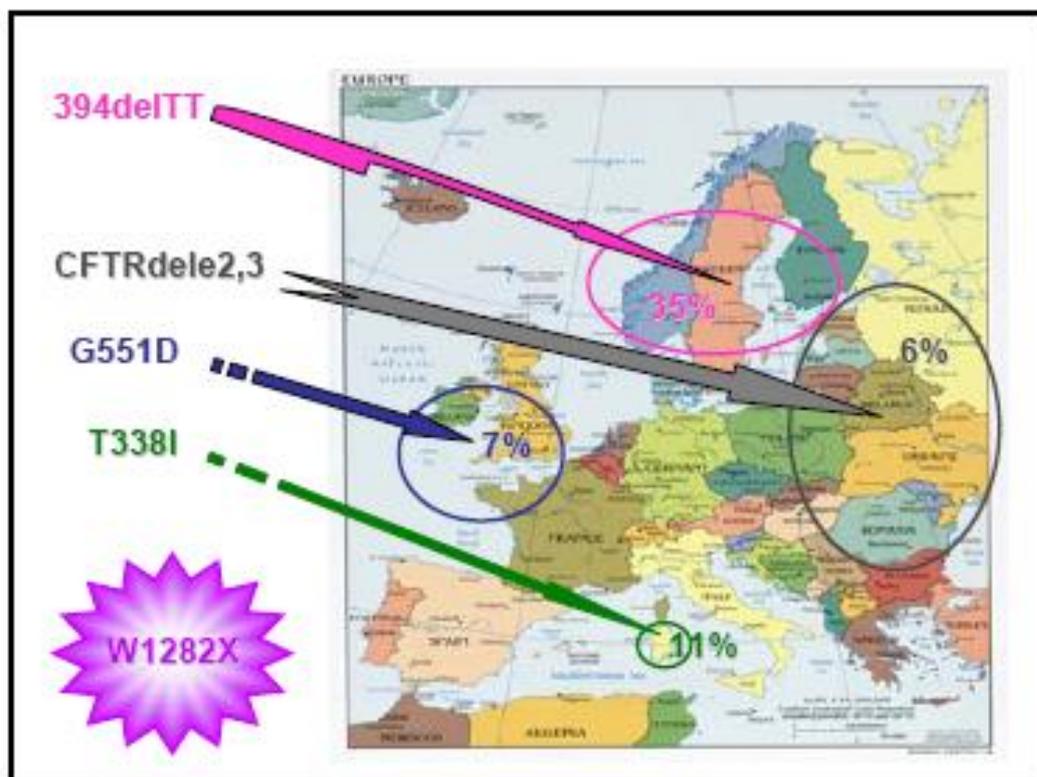


Figura 10. Variabilidad de la frecuencia de mutaciones entre la población de Europa.

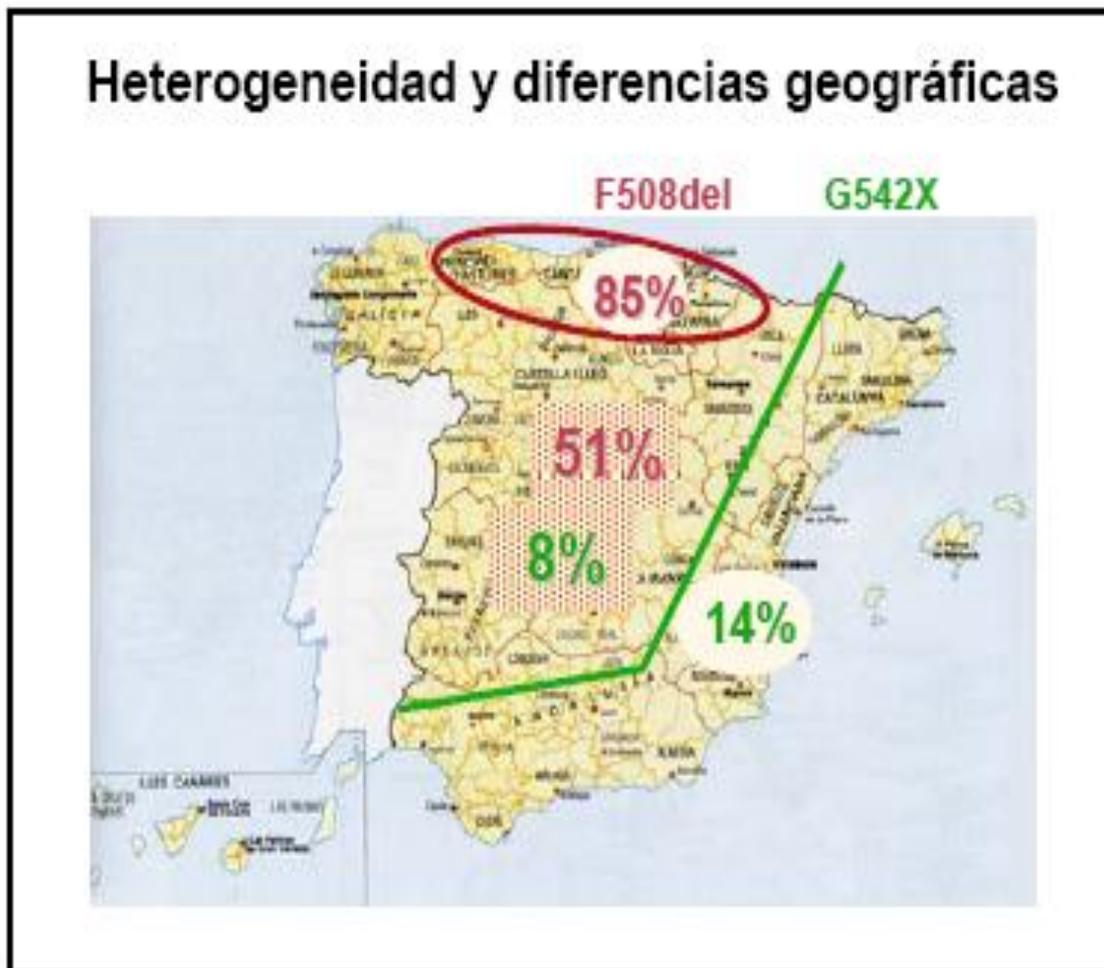


Figura 11. Distribución en España de las mutaciones más frecuentes.

Está presente con un máximo de incidencia en Dinamarca de 87,2 %, un mínimo en Turquía de 21,3 %, (Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium, 1990; European Working Group on CF Genetics, 1990; Estivill, 1997). Pocas han sido las publicaciones de FQ en América Latina; al ser principalmente una combinación de tres poblaciones: Indios-americanos, africanos y caucásicos, su incidencia varía en los diferentes países: 45 % en México (Villalobos, 1997); 50,8 % en Brasil (Maróstica 1998; Bernardino, 2000); entre 57 % y 60,9 % en Argentina (Luna, 1997); en

Uruguay es de un 40 % (Luzardo, 2001) y en Cuba se reporta un 34 % (Collazo, 1995).

Hay otras mutaciones poco frecuentes que están restringidas a determinadas regiones geográficas o grupos étnicos como la 3120+1 G[®]A, que con un cuadro clínico similar a la mutación Δ F508, se presenta en pacientes homocigóticos con una insuficiencia pancreática severa y síntomas respiratorios con un patrón clínico severo que conduce a la muerte precoz (Carles, 1996). Esta mutación ha sido caracterizada como una mutación relativamente común en las poblaciones sudafricanas y consiste en la ruptura del sitio 5' de empalme en el intrón 16 del CFTR.

La FQ es muy rara en poblaciones negras de África, quienes tienen una mezcla mínima con la raza blanca. Sólo unos pocos casos han sido reportados y muy pocos han sido estudiados a escala molecular. El investigador Padoa (1999) realizó un estudio en Sudáfrica con una muestra de 1360 sujetos aparentemente saludables no relacionados detectándose nueve portadores de la mutación y en un estudio de sujetos enfermos se concluyó que dos de cada cinco pacientes negros fibroquísticos dieron positivos a la prueba de electrolitos en sudor y son heterocigóticos para dicha mutación donde se obtuvo una frecuencia de portadores de 1/91 en sudafricanos negros, hallándose la mutación entre el 15-65 % de los cromosomas fibroquísticos de esta población. También Padoa (1999) y otros investigadores encontraron un individuo de origen camerunés con un cromosoma que contenía la mutación 3120+1G[®]A.

En un estudio realizado en Baltimore (EEUU), en un grupo de 82 afroamericanos con cromosomas fibroquísticos se identificó la mutación 3120+1G[®]A con una frecuencia de 12,3 % (Macek, 1997). Una frecuencia similar de 12,5 % obtuvo Bienvenu (1996) en estudio realizado en la Isla Reunión (Francia).

Existe la mutación 3120 G[®]A, frecuente en las poblaciones caucásicas, la cual no puede diferenciarse de la 3120+1G[®]A mediante el estudio molecular utilizando la enzima de restricción BstN I. Para lograr

esto es necesario realizar la secuenciación del fragmento del gen donde aparecen dichas mutaciones.

La mutación G542X es común en los países del Mediterráneo, la frecuencia más alta se ha encontrado en Islas Baleares con un 16,7 %, la frecuencia en la población mundial es de 4,4 % (Francia 3,1 %, Italia 4,8 %, España 7,7 %, Cuba 6%).

La mutación N1303K, está presente alrededor del Mediterráneo, alcanzando su mayor frecuencia (17,2%) en Túnez (Estivill, 1997).

La especificidad de mutaciones en regiones geográficas definidas indica un origen común. La mutación CFTR Δ 2,3 se ha identificado en el Este y Centro de Europa con frecuencias del 2-6 %. El mismo haplotipo observado utilizando marcadores intragénicos fundamenta la hipótesis del origen común de esta mutación (Dörk, 2000).

Un caso interesante es la mutación R334W, para la cual el análisis de un amplio número de pacientes ha permitido definir claramente su asociación a IP (insuficiencia pancreática) de inicio tardío con variabilidad inter e intrafamiliar, mientras los datos clínicos iniciales (incluyendo los estudios funcionales) sugirieron que se trataba de una mutación SP (Gasparini, 1991). Esta mutación provoca un cambio de arginina por triptófano en el codón 334 del gen CFTR, ocurre en el primer dominio transmembranal. Ha sido reportada en diferentes poblaciones, la incidencia en la población mundial es de 0.1 %, en la población española la frecuencia es de 1 %. Esta mutación se ha encontrado asociada con los haplotipos 17-46/47-13 de los microsatélites (IVS8CA- IVS17BTA) (Morral, 1994).

Otra de las mutaciones detectadas en la población mundial es la R553X, que consiste en un cambio de C por T en el nucleótido 1789 en el exón 11 y es responsable de una mutación de parada en el aminoácido 553. La frecuencia reportada en el consorcio de Fibrosis Quística es de 1,5%, en la población española es de 0,34 %, en Chile es de 4,2 %, la más

alta encontrada en todo el mundo, ellos explican las diferencias encontradas en la población chilena por una posible prevalencia de genes Indio-americanos a la población chilena (Rios, 1994).

La mutación G85E está localizada en el primer dominio transmembranal del gen CFTR, ocurre aproximadamente en el 1 % de los cromosomas fibroquísticos españoles, dicha mutación es un cambio de nucleótido G®A en la posición 386 en el exón 3, la cual provoca cambio de glutámico por glicina en el codón 85 en el primer dominio MSD en el CFTR, provocando una degradación rápida de la proteína, antes del tránsito a través del complejo de Golgi. La prevalencia mundial es de 0,2 %, y las frecuencias más altas han sido reportadas en EEUU (0,7 %) , Italia (1,7 %) y España (1 %) (The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium, 1994; Friedman, 1997; Bonizzato, 1995; Casals, 2001). Esta mutación ocurre en el 70 % con suficiencia pancreática y también presenta variabilidad intrafamiliar y hay la influencia de otros factores en el genotipo, tales como el medio ambiente los cuales están involucrados en la severidad de la enfermedad (Chillón, 1995).

La mutación 2183AA®G es una mutación del corrimiento del marco de lectura, la cual provoca una terminación prematura de codón 38 en el exón 13. Fue descrita por primera vez en tres pacientes canadienses y después se encontró una frecuencia significativa en el centro y sur de Europa. En el noreste de Italia la frecuencia es de 9.3%, 2.1 % en Bélgica, 1.8 en Grecia, 1 % en Bulgaria y Francia, 0.4 % en el centro y norte de Alemania, 2.5 % en Turquía, 0.8 % en Bulgaria y 0.5 % en España. Esta mutación ha sido descrita asociada a un fenotipo severo, con insuficiencia pancreática, variables complicaciones pulmonares, en ocasiones complicaciones con bacterias patógenas y otras complicaciones tales como problemas hepáticos y bronquiectasias (Kilinc, 2000). En los pacientes de España y Turquía esta mutación se encontraba asociada al alelo 7T del polimorfismo IVS8-6(T) (Chu, 1993) y al haplotipo de los microsatélites IVS8CA, IVS17bTA y IVS17bCA, en España al haplotipo (16-30-13) y en Turquía a los haplotipos (16-31-13) y (16-32-13) (Morrall, 1993).

Otra de las mutaciones descritas, 3272-26A>G ha sido encontrada en España, Grecia, Alemania, Portugal y Bélgica, el 73 % de los paciente portadores de la misma resultaron heterocigóticos compuestos con $\Delta F508$, además se ha encontrado con las mutaciones R1162X, E822X, G542X, N1303K, 2869insG, L206W, entre otras. Por lo general los pacientes que resultan heterocigóticos para esta mutación, la cual se describe como moderada y otra mutación grave, se comportan como pacientes con un cuadro clínico moderado, en estos casos hay una significativa reducción de la severidad del fenotipo, sin embargo en estos pacientes se encuentra aumentado el porcentaje de ellos que presentan pólipos nasales (37 %) (Amaral, 2001).

b) Polimorfismos

Además de las mutaciones en el gen CFTR, polimorfismos genéticos en regiones no codificantes pueden tener un impacto en los niveles de CFTR funcional y en el fenotipo FQ (Kiesewetter, 1993).

Otras mutaciones de CFTR en regiones no codificantes han sido asociados con fenotipos FQ atípicos. El análisis mutacional evidencia la especificidad entre este fenotipo y la variante 5T [IVS8-6(5T)] (Haardt, 1999; Larriba, 1998). El alelo 5T en la secuencia del intrón 8 resulta en la delección del ARNm del exón 9 del gen CFTR, conduciendo a la reducción de los niveles de la proteína CFTR normal, no generando las cantidades para apoyar las funciones fisiológicas requeridas. El polimorfismo de timidinas en el final del intrón 8 del gen CFTR, 3 alelos diferentes han sido encontrados dependiendo del número de timidinas (5, 7 ó 9) presentes en este sitio (Chu, 1991). El número de timidinas determina la eficiencia del intrón 8 como aceptor. La eficiencia disminuye cuando es más pequeño el número de timidinas encontradas debido a la alta frecuencia de la variante cinco timidina (5T) en pacientes con ausencia congénita bilateral de los vasos deferentes (CBAVD) con respecto a la población general (21 contra 5 %), la variante 5T fue clasificada como una mutación CBAVD con penetrancia incompleta. El alelo 5T en el intrón 8 del gen CFTR conduce a baja proporción de ARNm transcrito faltando el exón 9.

Consecuentemente, la variante 5T produce bajos niveles anormales de la proteína CFTR.

La variante 5T es la causa más frecuente asociada a la CBAVD (Chillón, 1995). Mutaciones FQ han sido encontradas en el 65% de individuos con CBAVD, sugiriendo que pacientes CBAVD con mutaciones en el gen CFTR tienen una forma ante todo genital de FQ (Anguiano, 1992). La presencia de una mutación CFTR en un alelo y la variante 5T en el otro puede conducir a un déficit de transcripto normal (Teng, 1997; Mak, 1997).

En resumen el alelo 5T en el intrón 8 del gen *CFTR* está en aproximadamente el 10% de los individuos. El número de repeticiones CG adyacentes a 5T influye en la penetrancia de la enfermedad.

Groman (2004), determinando el número de repeticiones TG en 98 pacientes (hombres infértiles debido a la ausencia congénita de los vasos deferentes), se encontraron 9 pacientes con FQ no clásica y 27 individuos no afectados. Cada uno de los individuos de este estudio tiene una mutación severa CFTR y en el otro 5T. De los individuos no afectados, 78 % (21 de 27) tiene adyacente a 5T 11 repeticiones TG, comparado con el 9 % (10 de 107) de los individuos afectados. Inversamente, 91 % (97 de 107) de los individuos afectados tienen 12 o 13 repeticiones TG, contra solo 22 % (6 de 27) de los individuos no afectados. Estos individuos con 5T adyacente a 12 ó 13 repeticiones TG fueron sustancialmente más probable a tener un fenotipo anormal que estos con el alelo 5T adyacente a 11 repeticiones TG. Determinándose que el número de repeticiones TG puede predecir si el alelo 5T es benigno o patogénico. En Francia, el alelo 5T estuvo presente en 7 de 36 pacientes, la frecuencia del alelo fue de 9,7%, mientras que en la población general es de 5% (Audrezet, 2002).

La mutación $\Delta F508$ tiene una fuerte asociación con el alelo 9T. Esto se puede inferir debido a que los diez casos homocigóticos $\Delta F508$ tienen el alelo 9T/9T y 37 de 38 heterocigóticos tienen al menos un alelo 9T (Roland, 2002).

La cuestión que se plantea en nuestro artículo era si polimorfismos 7T/9T debe ser informado como cribado positivo. En vista de la elevada frecuencia de R117H-7T ,el resultado incierto de la asintomática niños,dificultades de los médicos en el manejo de estos situaciones, Scotet et al (Scotet V, 2006) propone la retirada de la variante R117H de los paneles de las mutaciones de FQ del recién nacido debe ser consciente de la utilización de mutaciones asociadas a fenotipos más leves pueden conducir a resultados que son difíciles de interpretar (Comeau AM, 2007).

En resumen, en España se tienen como más frecuentes las mutaciones expresadas en la tabla y su distribución en España que se observa en la figura :

Tabla 5. Mutaciones encontradas en España.

País Vasco Casals et al,1992 (16)		Asturias Coto et al, 1994 (15)		Diversas áreas geográficas Casals at al, 1997 (17)		Castilla-León Tellería et al, 1999 (14)		Sur de España (Andalucía) Gómez-Llorente et al, 2001 (18)	
Mut.	Frec. (%)	Mut.	Frec. (%)	Mut.	Frec. (%)	Mut.	Frec. (%)	Mut.	Frec. (%)
ΔF508	87	ΔF508	77,5	ΔF508	53,2	ΔF508	65,4	ΔF508	43,5
		G542X	5	G542X	8,43	G542X	3,8	G542X	11,4
				N1303K	2,65	711+1G→T	3,8	R334W	5
				1881+1,6kbA→G	1,87	1213delT	2,6	R1162X	3
				711+1G→T	1,71	1341G→A	2,6	2789+5G→A	2,3
				R1162X	1,64	R1066C	2,6	R117H	1
				R334W	1,64	1717-1G→A	1,3	ΔI507	1
				R1066C	1,09	S549R	1,3	W1282X	1
				1609delCA	1,01	V5621	1,3		
				Q890X	1,01	G576A	1,3		
						2183AA→G	1,3		
						2789+5G→A	1,3		
						Q890X	1,3		
						3849+1G→A	1,3		
						N1303K	1,3		

Tabla 6. Mutaciones, su combinación y manifestaciones asociadas.

Mutación	Órganos afectados				
	RTFQ funcional (%)	Vasos deferentes	Glándulas sudoríparas	Pulmón	Páncreas
Normal/mutación	50	-	-	-	-
5T/5T polimorfismo con tipo normal	10	+	-	-	-
R117H en 7T	±4-5	++	-	+/-	-
A455E	±4	++	+/-	+/-	-
3849+10kb C a T	±4	+/-	-	+/-	-
R117H en 5T	±1	++	+	+	-
G551D	<1	++	++	++	++
ΔF508	<1	++	++	++	++
G52X	<1	++	++	++	++

FQ: fibrosis quística; RTFQ: regulador de la conductibilidad transmembrana de la fibrosis quística; ++: comienzo temprano de la enfermedad, normalmente grave; +: comienzo tardío o enfermedad leve; +/-: enfermedad leve o clínicamente insignificante; -: función normal.

Las mutaciones del gen TFO son clasificadas como moderadas o graves dependiendo de si confieren suficiencia o insuficiencia pancreática. Sin embargo, esta relación entre genotipo y fenotipo no es aplicable a todos los sistemas afectados (Davidson, 1998).

También fue pronosticado que una mutación grave podría producir un fenotipo grave si estaba en estado homocigótico o en combinación con otra mutación grave (Murray, 1999). En los individuos portadores de un alelo mutado, se espera que se exprese sólo en un 50% de su dotación genética normal, pero no presentan el fenotipo enfermo, esto sugiere que una reducción del 50% de la expresión del gen RTFQ normal es insignificante desde el punto de vista fisiológico y del desarrollo (Pilewski, 1999).

Con la finalidad de entender más acerca de la fisiopatología de la FQ, las mutaciones se han clasificado en cinco clases de acuerdo con la alteración que se genera en la proteína.

Clase I: mutaciones que bloquean la síntesis de la proteína

Cerca de la mitad de las mutaciones en el gen CFTR que pertenecen a este grupo conducen a la formación de proteínas truncadas y no

funcionales. Entre ellas se encuentran aquellas que generan codones de terminación (18%), corrimiento del marco de lectura (22%) y las que afectan el proceso de corte y empalme del RNA (8%). Las dos primeras generalmente causan ausencia total de la proteína (Zielenski, 1995).

Clase II: mutaciones que afectan el procesamiento postraduccional

La biosíntesis de la proteína CFTR requiere pasos de maduración complejos, por lo que algunas mutaciones, como la AF508, afectan este proceso y generan péptidos anormales que quedan atrapados en el retículo endoplásmico (RE) donde son degradados por el sistema ubiquitina–proteosoma (vida media de 0.5h) (Cheng, 1990; Amaral, 2004).

Clase III: mutaciones que afectan la regulación del canal de cloro

Las mutaciones clasificadas en esta categoría son aquellas que generan proteínas que parecen estar correctamente localizadas en la membrana apical, pero que no funcionan adecuadamente como un canal iónico.

Algunas de estas mutaciones afectan los dominios NBDs y el dominio R (Hiestad, 1994). El grado de alteración puede variar desde una leve reducción de la actividad del canal (mutaciones G551S, G1244E y G1349D) hasta la pérdida grave de su función (mutaciones G551D y S1255P) (Carson, 1995).

Clase IV: mutaciones que afectan la conductancia del canal de cloro

Estas mutaciones se localizan en regiones del gen que codifican para algunos de los segmentos TMs de la proteína (Mansoura, 1998); por ejemplo la R117H en la región TM2, la G314E y G314Q en TM5 y la R334W, R347P y R347H en TM6. En estos casos aunque la regulación del canal es adecuada, su conductancia es anormal. Estudios recientes mostraron que algunas mutaciones del dominio R también pertenecen a este grupo (Vankeerberghen, 1998).

Clase V: mutaciones que causan reducción en la síntesis de la proteína

Las mutaciones de esta clase incluyen aquellas localizadas en el promotor, las cuales reducen la transcripción y las mutaciones puntuales que conducen a un procesamiento erróneo del mRNA o a sustituciones de aminoácidos como la P574H y la A455E. Las proteínas mutadas tienen una actividad normal tanto en regulación como en conductancia; sin embargo, su procesamiento postraduccional es ineficiente (Zielenski, 1995).



02/ JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Variables condicionantes en el cribado neonatal de fibrosis quística mediante tripsina inmunorreactiva

2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

2.1. NECESIDAD DE VALORES DE REFERENCIA PARA CADA LABORATORIO

Dado el distinto grado de prevalencia de la fibrosis quística en las distintas comunidades, es necesario que cada laboratorio establezca su base de datos con sus propios valores de corte de TIR, así como de las distintas mutaciones y polimorfismos, para un adecuado proceso de cribado al que se ajusten los presupuestos de cada comunidad. Cada laboratorio debe establecer sus propios puntos de corte, siendo este un punto crítico:

- Puntos de corte fijos (p99, optimizado)
- Puntos de corte variables (p95 ensayo diario)

Desde el inicio del cribado neonatal (McCready, 1963) se han utilizado diferentes programas como se ha visto en el apartado correspondiente.

En el algoritmo de TIR / TIR, tanto el primero y el segundo valor de TIR deben estar por encima de los puntos de corte fijos para recomendar la prueba del sudor, por lo que el TIR inicial es el paso crucial. Típicamente, se utilizan en los Estados Unidos, 100 o 105 ng / ml (primero) y 70 ng / ml (segundo). Estos valores de corte se han establecido en un intento de maximizar la sensibilidad y el valor predictivo positivo. Aunque el valor de corte inicial para TIR / TIR ha disminuido con el tiempo a partir de 140 ng/ml (McCready, 1963) a 100 ó 105 ng/ml (Sontag, 2005) en varios intentos para disminuir falsos negativos en el método TIR / TIR. Esto ha hecho que los laboratorios de cribado neonatal hayan ido incorporando un valor de corte de TIR inferior (56 ng /ml) (Kerem, 1989). Estos hechos hacen importante establecer un punto de corte e ir adaptándolo a los datos que se vayan obteniendo. Por ello se establece después de un año de funcionamiento del Programa de Cribado Neonatal de Fibrosis Quística en la Comunidad Valenciana, el obtener puntos de corte acordes con los

resultados obtenidos para la provincia de Alicante en el Laboratorio de Cribado del Hospital General Universitario de Alicante.

2.2. Necesidad de valores de referencia en diferentes periodos del año.

La tecnología ha evolucionado (Comeau, 2004), pero poco se ha hecho para investigar los efectos de dichos cambios en la sensibilidad y la equidad de los ensayos.

Así, de acuerdo con la conclusión de un reciente estudio (Ross, 2008) en el que se analizaron las variaciones en los niveles de TIR durante 10 años, en un total de 660 443 niños, mediante lo que se han podido determinar los factores que influyen en el valor de TIR de manera significativa. En este estudio, variaciones estacionales y tan elevado número de reactivos se observaron a lo largo de los 10 años. Los niveles de TIR durante los meses de verano fueron inferiores a los de los meses de invierno de forma constante durante todo el período. La media general \pm de los valores de SD para todos los períodos estudiados fue $56,8 \pm 0,02$ (verano) y $60,8 \pm 0,02$, (invierno) siendo significativa la diferencia ($p < 0,001$). Las mismas tendencias se muestran al investigar el percentil 95 según la estación con el tiempo. Aunque los valores medios de cada verano y el invierno variaron de año en año, y que pueden atribuirse a la variación causada por el cambio de lotes de reactivos, la causa más probable es la diferencia tan acusada de temperaturas en la localidad del estudio (Wisconsin), que pueden oscilar desde $-14\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta los $28\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Esta tendencia estacional apoyaría la necesidad de utilizar puntos de corte variables, pues en dicho estudio, en EEUU mediante la aplicación de un punto de corte inicial de TIR de 105 ng/ml, pasando al punto de corte variable estacionalmente, el porcentaje de muestras en el verano que estaría por encima del punto de corte pasaría de 0,25% a 0,59% de las muestras analizadas y en invierno del 0,76% al 0,36%. El porcentaje de las

muestras con valores de TIR >105 ng/ml también varió según lote de reactivos desde el 0,30% como el más bajo y 0,59% como el más alto.

Aunque se han notificado casos de inestabilidad de TIR con la temperatura, (Cabrini, 1990; Dhondt, 1994) se necesitaría una evaluación sistemática de estas variables con una base de datos suficientemente grande.

Con la variación observada queda claro que un punto de corte variable de TIR es una buena estrategia para manejar este problema. Las sensibilidades mostradas se calcularon sobre una población con marcadas variaciones estacionales de la temperatura y pueden no ser generalizables a otras poblaciones.

Por otra parte, la composición racial y étnica de una región es un factor determinante en el mejor protocolo de cribado neonatal para cada población (Gregg, 1997).

Por todo lo anotado, parece también interesante observar si en el caso de la provincia de Alicante se produce esa variación estacional para poder adecuar los puntos de corte de la manera más eficaz.

2.3. Porcentaje alto de nacimientos de madres de otros países.

Desde finales de la década de 1990, España ha sido el escenario de un importante fenómeno inmigratorio que ha invertido la tasa de migración neta, hasta entonces negativa (ONU, 2010). Según datos del Instituto Nacional de Estadística, la población inmigrante pasó de representar el 7% de la población española en 2004 al 12,2% en 2010 (INE, 2010). Este fenómeno inmigratorio es muy patente en la Comunidad Valenciana y de los mayores porcentajes de España.

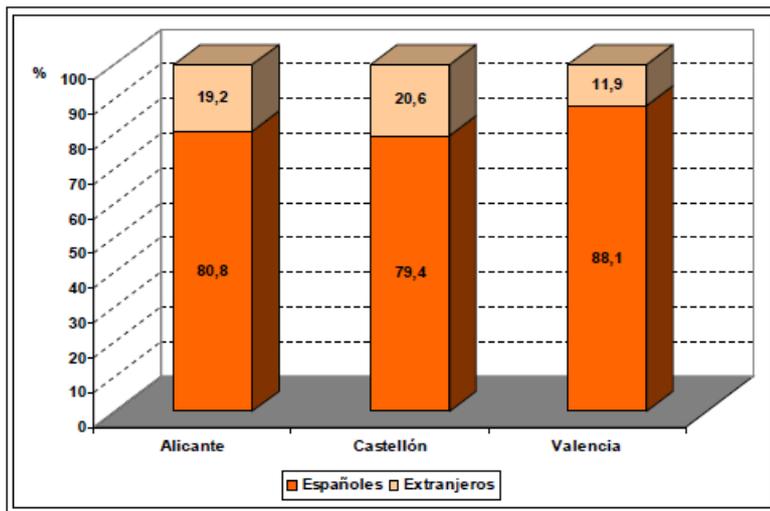
En la Comunidad Valenciana se ha producido durante los últimos años un crecimiento paulatino del número de hijos de inmigrantes, que

está referido en la tabla siguiente. Dicho crecimiento se ha visto frenado en los dos últimos años debido a la crisis económica y la vuelta a sus países de algunos inmigrantes.

Tabla 7. Evolución del porcentaje de población según nacionalidad en la Comunidad Valenciana, 2000 – 2010. Fuente: Situación de la salud infantil y perinatal en la Comunitat Valenciana 2010. OSIP.

Residentes 0 - 4 años		
año	% españoles	% extranjeros
2000	98,30	1,70
2001	97,59	2,41
2002	95,72	4,28
2003	93,68	6,32
2004	92,39	7,61
2005	90,95	9,05
2006	89,91	10,09
2007	88,31	11,69
2008	86,30	13,70
2009	85,37	14,63
2010	84,97	15,03

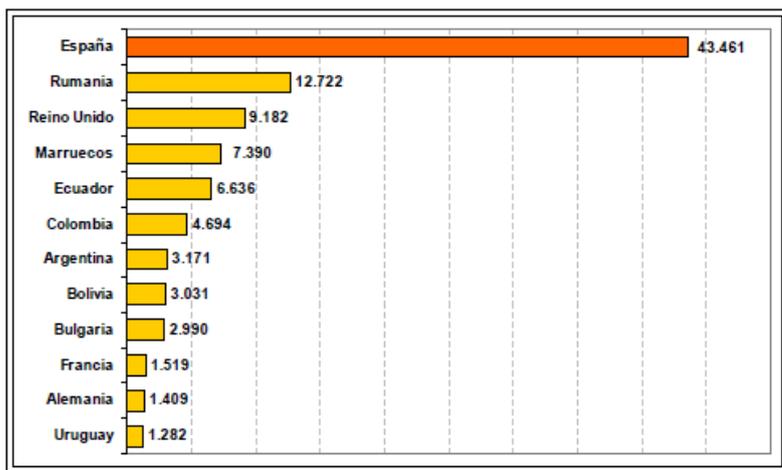
Este aumento es mayor en la provincia de Alicante, frente al resto de la Comunidad, como se muestra en la figura siguiente:



Fuente: Demografía y población, Cifras de población y Censos demográficos. Instituto Nacional de Estadística. www.ine.es

Figura 13. Distribución de la población menor de 18 años de padres extranjeros según provincia de residencia de la Comunidad Valenciana, 2010 OSIP.

Por países de origen, como se observa en la figura siguiente, punto a tener en cuenta a la hora de diseñar estrategias del estudio de mutaciones a realizar.



Fuente: Demografía y población, Cifras de población y Censos demográficos. Instituto Nacional de Estadística. www.ine.es

Figura 14. Población extranjera menor de 15 años según país de nacimiento Comunitat Valenciana, 2010 OSIP.



03/ OBJETIVOS

Variables condicionantes en el cribado neonatal de fibrosis quística mediante tripsina inmunorreactiva

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar los valores de referencia de Tripsina Inmunorreactiva (TIR) para el cribado neonatal de fibrosis quística en los recién nacidos de la provincia de Alicante.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A partir del objetivo general se han propuesto los siguientes objetivos específicos:

- Determinar los percentiles de los valores de TIR en las muestras acumuladas durante un año de implantación del programa.
- Evaluar la posible variación de los valores de TIR durante los meses del año.
- Valorar las posibles variaciones de los valores de TIR con el sexo de los neonatos.
- Determinar la influencia de la edad gestacional en los valores de TIR.
- Valorar la posible influencia del tipo de alimentación sobre los valores de TIR.
- Valorar la influencia de la edad maternal sobre los niveles de TIR.
- Determinar si los valores de referencia han de modificarse según el origen de la madre del recién nacido.
- Evaluar con los datos de los estudios genéticos realizados y las mutaciones encontradas la posibilidad de modificar los valores de referencia a los nuevos percentiles encontrados.



04/ MATERIAL Y MÉTODOS

Variables condicionantes en el cribado neonatal de fibrosis quística mediante tripsina inmunorreactiva

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4. 1. POBLACIÓN

El presente estudio se realizó con las muestras de sangre desecada sobre papel obtenida para el cribado neonatal de todos los recién nacidos en la provincia de Alicante y remitidas al HGUA en un periodo completo de 12 meses desde marzo de 2012 a febrero de 2013, ambos inclusive.

De estos niños se recogieron los datos: edad gestacional, sexo, tiempo desde el nacimiento a la extracción de sangre, tipo de lactancia, comarca de residencia de los padres, edad materna y país de origen de la madre, todos ellos constan en la ficha del recién nacido entregada a los padres para realizar el cribado neonatal de enfermedades metabólicas.

4.1.1. Criterios de inclusión:

Todos los recién nacidos en la provincia de Alicante durante el periodo de tiempo de marzo de 2012 a febrero de 2013 con las condiciones siguientes:

- Muestras de sangre desecada sobre papel en el laboratorio de Cribado Neonatal del Hospital General Universitario de Alicante.
- Niños en los que la muestra de sangre desecada sobre papel estaba acorde con los criterios de calidad preanalítica definidos (Espada, 2001).

4.1.2. Criterios de exclusión:

- No se aplicó en este estudio ningún criterio de exclusión.

4.1.3. Muestreo

Las muestras se recogieron en los diferentes hospitales de la red pública y privada según el protocolo de la Consellería de Sanidad de la Comunidad Valenciana y según los criterios de calidad en la toma de muestras.

Previo a la extracción se rellenó el formulario específico utilizado de rutina por el programa de Cribado Neonatal de la Comunidad Valenciana en el que constan los datos de identificación y datos clínicos del niño.

La muestra debe tomarse antes de los 30 días de vida debido a que la TIR disminuye en forma progresiva hasta valores normales luego de este tiempo. Esto ocurre debido a que el tejido fibroso y graso van reemplazando al tejido pancreático normal (Revista Fundación Bioquímica Argentina 1997; Wilcken, 1993; Heeley, 1992).

Las muestras obtenidas cada día se conservaron en condiciones adecuadas hasta el envío al laboratorio para su procesamiento. Todos los hospitales tienen al menos dos días de envío al laboratorio de cribado mediante mensajeros específicos.

Una vez en el laboratorio, el procesado de las mismas incluye:

- Numeración de las muestras.
- Traslado de los datos del niño recogidos en la ficha en papel proporcionada por la Consellería de Sanidad a la aplicación informática específica de la Consellería (MetaB).
- Análisis de las muestras mediante el método analítico descrito posteriormente.

- **Introducción de los valores de tripsinógeno inmunoreactivo en la ficha informatizada del niño de la aplicación informática MetaB.**

Todo este proceso se realizó según los protocolos del laboratorio **PNT-CN-01: "Recepción de muestras, identificación y registro informático"** y **PNT-CN-10: "Determinación de TSH y TIR en sangre desecada en papel de filtro analizada en AutoDelfia"**, y que se presentan como anexos.

Para esta investigación se creó un archivo Excell al que se trasladaron los valores de tripsina inmunorreactiva de las muestras que cumplieron los criterios de inclusión y exclusión establecidos, junto con los datos pertinentes (mes de nacimiento, EG, días a la toma de muestra, tipo de lactancia, sexo, comarca, edad materna y país de origen de la madre) de forma totalmente anónima y no filiable.

Con las muestras obtenidas se definieron distintos subgrupos atendiendo a las variables:

- **Sexo: niños y niñas.**
- **Mes del año**
- **Tipo de alimentación: Materna, fórmula, mixta y dieta absoluta.**
- **Comarca en la que viven los padres: Marina Alta, Alcoia-Comtat, Marina Baixa, Valles del Vinalopó, L'Alacantí, Baix Vinalopó y Vega Baja.**
- **Grupos de edad gestacional. La división de las muestras según edad gestacional se realizó de acuerdo a la clasificación de los recién nacidos según edad gestacional, considerando a los niños con edad gestacional inferior a 32 semanas recién nacidos muy pretérmino (RNMP), de 32 a 37 semanas pretérmino (RNPT) y de 37 en adelante a término (RNT) (Avery, 1988; Saenz 2008; Comisión de Estándares de la Sociedad Española de Neonatología).**
- **Origen de la madre: España, África, América, Resto Europa y Asia.**

- Tipos de mutaciones más frecuentes.
- Tipos de polimorfismos.

Pueden no coincidir los totales en cada una de las divisiones por subgrupos, pues puede faltar alguna de las variables en la ficha del recién nacido, como edad gestacional, tipo de lactancia, día de extracción, comarca, edad materna o país de origen de la madre.

4.2. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

4.2.1. Método de cuantificación de tripsina inmunorreactiva en sangre desecada en papel

La cuantificación de tripsina inmunorreactiva se realiza mediante el "kit Neonatal Autodelfia TIR" de Perkin Elmer, optimizado para la determinación cuantitativa de TIR en muestras de sangre seca sobre papel y según el protocolo del laboratorio que se presenta en los anexos, elaborado siguiendo las normas relativas a la calidad y competencia (AENOR 2007), documento PNT-CN-10: "Determinación de TSH y TIR en sangre desecada en papel de filtro analizada en AutoDelfia".

Utiliza un método basado en una modificación del procedimiento fluorométrico publicado por McCaman y Robins (McCaman 1962).

El ensayo TIR neonatal proporciona alta sensibilidad analítica con el límite en blanco de 0,43 ng/ml para Delfia y 0,53 ng/ml.

Para la imprecisión intraensayo clínicamente, la zona está cerca de un 9%. Todos los calibradores y controles son de lote específico para asegurar que cada lote es del mismo nivel.

El sistema automático permite un mejor rendimiento en precisión, fiabilidad y buen coste-efectividad para la detección de la fibrosis quística.

El ensayo se basa en sándwich directo: técnica en la cual dos anticuerpos monoclonales se unen a diferentes epítomos en la molécula diana. La señal se mide con alta sensibilidad analítica mediante fluorometría (figura 15).

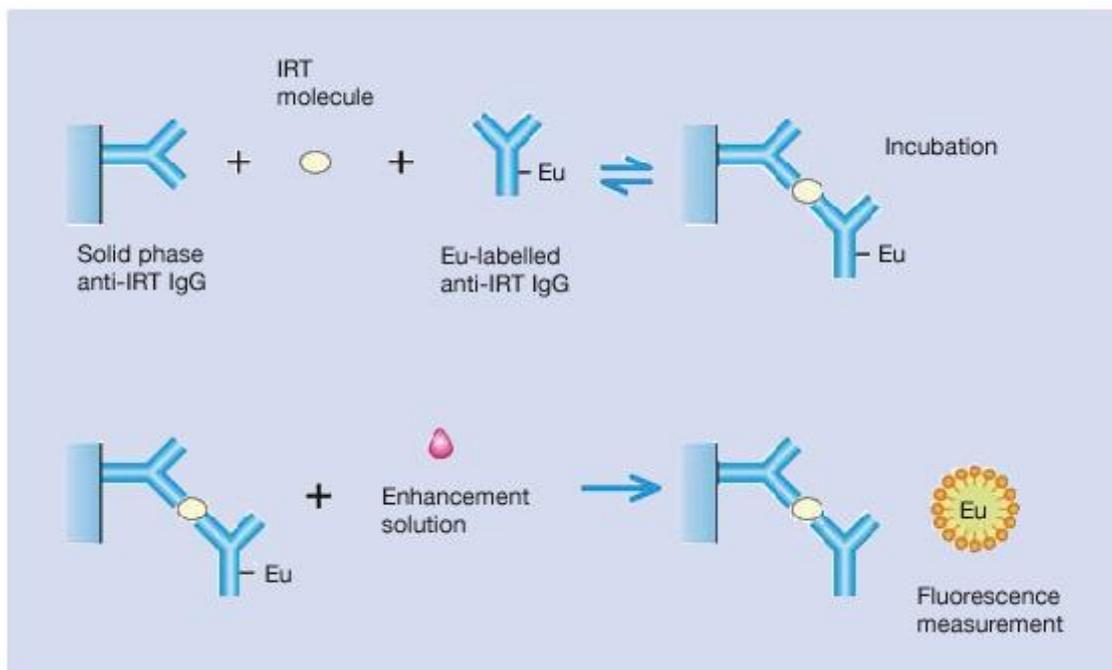


Figura 15. Esquema de la reacción de formación del complejo fluorescente de la TIR para su cuantificación.

Consiste en la reacción inmunológica entre una molécula de anti_TIR IgG con la TIR sanguínea y la formación del sándwich con una nueva molécula

de anti-TIR IgG marcada con Europio, soluble en el medio de incubación. Posteriormente se provoca la disociación del Eu del complejo y se promueve su fluorescencia siendo ésta proporcional a la cantidad de TIR que ha servido de puente.

La fluorescencia se lee utilizando una longitud de onda de excitación de 390 nm y una longitud de onda de emisión de 486 nm..

Las concentraciones se han expresado en ng/ml, al ser estas unidades las que se reflejan en la ficha informatizada en el programa MetaB y que figuran en todos los programas de control utilizados.

4.2.2. Controles de calidad en el entorno de los valores de normalidad

4.2.2.1. Control Interno.

En cada serie analítica se introducen tres controles proporcionados por Perkin Elmer junto con el "kit Neonatal AutoDelfia TIR", uno de concentración alta aproximada según lote de 90 ng/ml de TIR en sangre, otro cercana al punto de corte de alrededor de 60 ng/ml de TIR en sangre y otro de valor normal de unos 30 ng/ml.

En la siguiente figura se representan los valores de estos controles obtenidos en el laboratorio de Cribado Neonatal del HGUA en 18 series analíticas distintas:

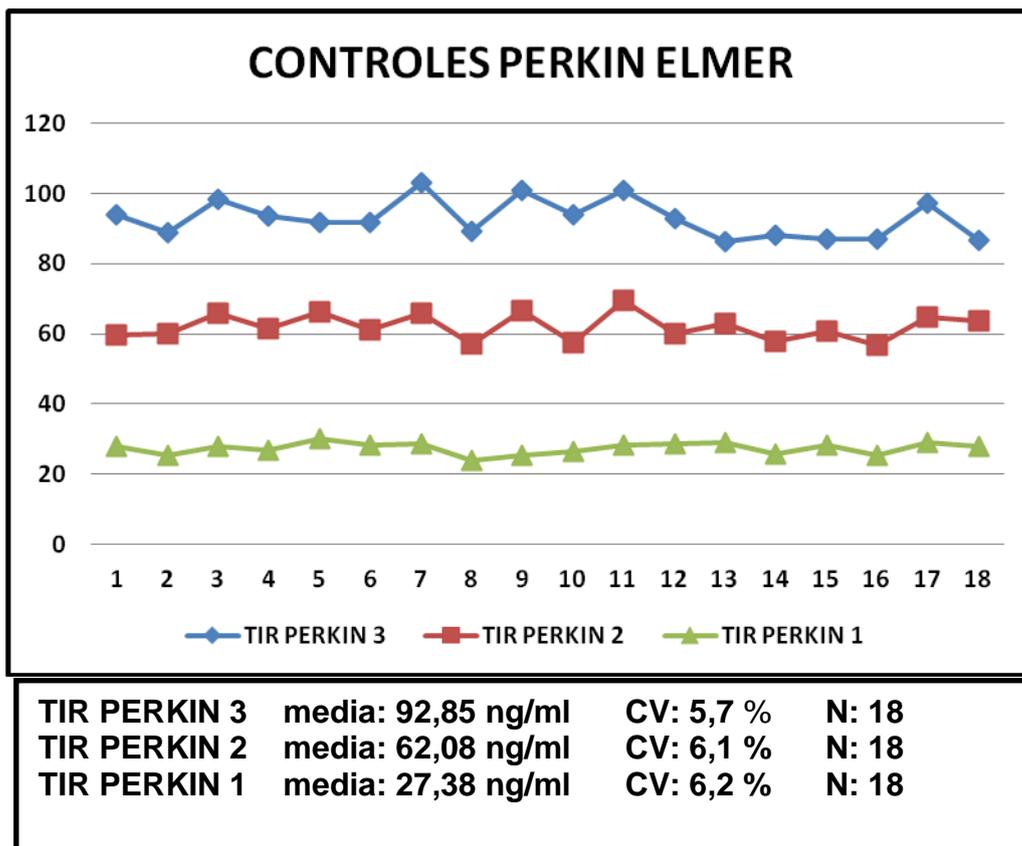


Figura 16. Controles internos de TIR proporcionados por Perkin Elmer.

- De uno a cuatro controles suministrados por *Center for Disease Control (CDC)* Atlanta. USA, enviados por el programa de intercomparación y utilizados como controles internos una vez enviados los resultados al programa de control de calidad de *CDC* con concentraciones medias aproximadas según lote de 15 ng/ml, 45 ng/ml, 85ng/ml y 140 ng/ml de TIR en sangre, y que están representados en la siguiente figura:

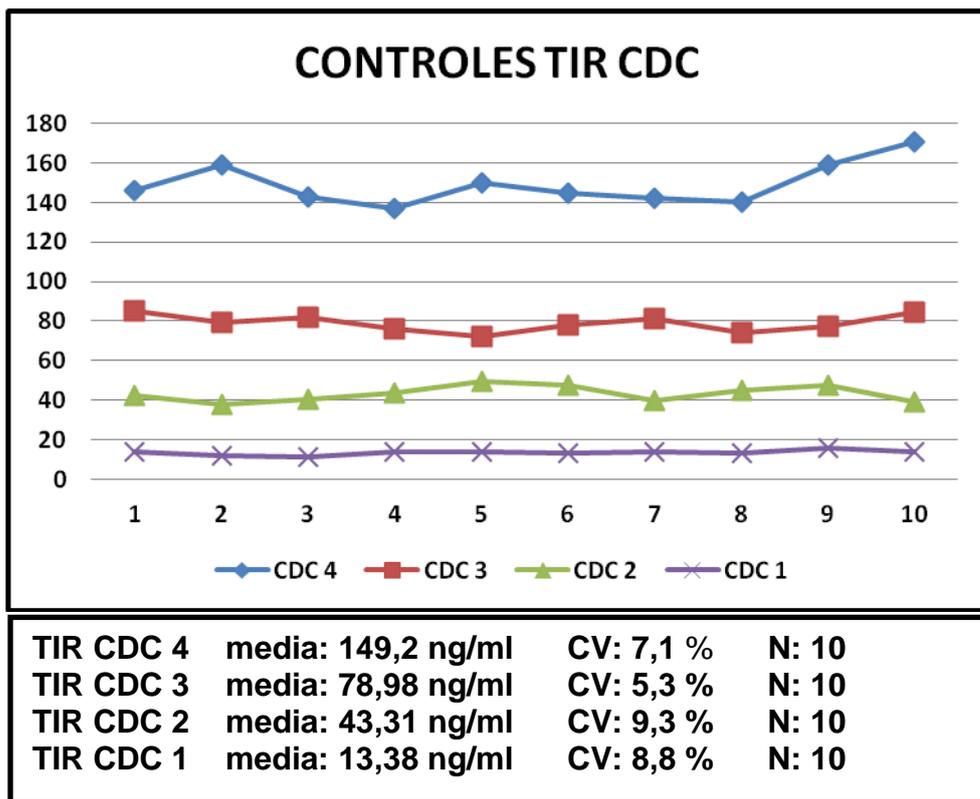


Figura 17. Controles TIR CDC

Se aceptan los controles siempre que exista una variación interserial inferior al 20%. Los criterios de aceptación de los controles quedan reflejados en la especificación de calidad del laboratorio E2-PNT-CN-03: "Control interno de calidad" que se presenta en los anexos.

4.3.2.2. Evaluación externa de la calidad

Como evaluación externa de la calidad, se participa, en los siguientes ejercicios de intercomparación, según las recomendaciones establecidas (Hawkins, 2006; Gella, 2009; Izquierdo, 2011):

- *"Infant Screening Quality Assurance Program". Center for Disease Control (CDC) Atlanta. USA. Evaluación semestral con tres niveles de concentración para procesar en cinco series analíticas diferentes.*

- ***“Infant Screening Quality Assurance Program”*. Center for Disease Control (CDC) Atlanta. USA. Evaluación trimestral con cinco problemas de distintas concentraciones, entre los cuales puede haber algún patológico y de los que se remite resultado indicando si está en rango normalidad o anormalidad**

- **Programa de “Evaluación Externa de la Calidad de la Asociación Española de Cribado Neonatal (AECNE)”, en la que se suministran tres controles mensuales por AECNE. Una vez remitidos los resultados, son analizados todos los meses estadísticamente por AECNE y publicados en la página web de la sociedad, así como el conjunto de resultados de todo el año. Se siguen las guías de participación en programas de intercomparación (ENAC, 2008).**

Los resultados de septiembre 2012 se presentan en las figuras siguientes para cada uno de los tres niveles analizados. Están indicados mediante una flecha los resultados del laboratorio de Alicante, siendo desconocida la asignación de los demás resultados al resto de laboratorios participantes:

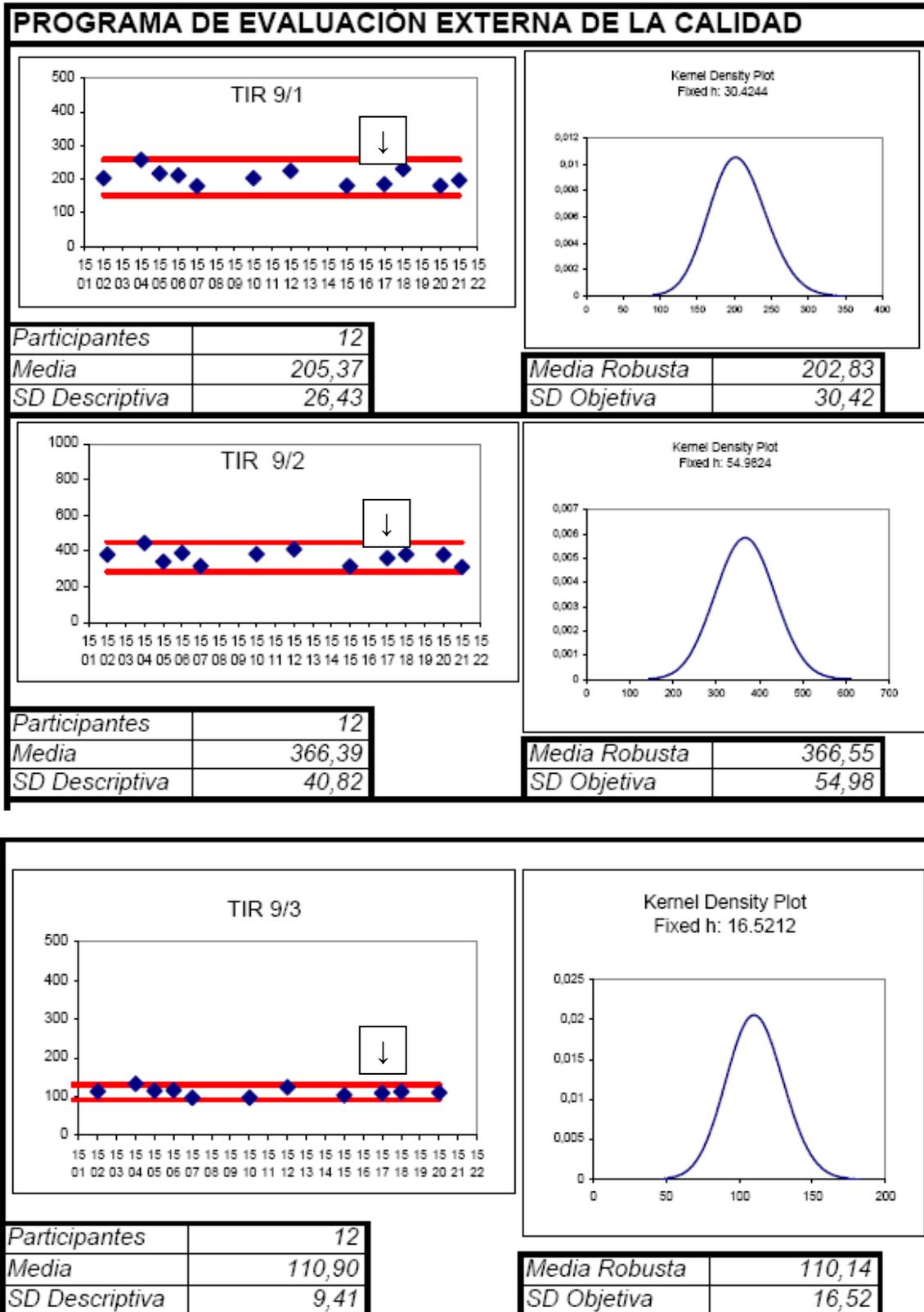


Figura 18. Informe Septiembre 2012 de los controles externos de calidad de TIR realizados por AECNE (www.aecne.es).

Los criterios de aceptación de los controles quedan reflejados en la especificación de calidad del laboratorio E3-PNT-CN-03: "Control externo de calidad" y que se presenta en los anexos.

4.3. ESTUDIO GENÉTICO

A todas las muestras que superaron el punto de corte establecido previamente de 65 ng/ml de TIR se les ha realizado el estudio genético en el laboratorio de Genética del Hospital la Fé de Valencia, analizando las mutaciones más frecuentes en España mediante el sistema de análisis ELUCIGENE CF-EU2v1 (Gen- Probe Life Sciences LtdP) para el rastreo de diversa mutaciones en el gen CFTR, incluyendo las más frecuentes en diferentes poblaciones. El nivel de detección de este ensayo en cromosomas FQ de la población española es $\geq 80\%$.

También se ha incluido el estudio del polimorfismo IVS8-9T, IVS8-7T, IVS8-5T (éste junto con el número de repeticiones de TG adyacentes).

Las mutaciones estudiadas han sido: R347H, R347P, 2789+5G>A, 3120+1G>A, 711+1G>T, R334W, I507del, F508del, 3849+10KbC>T, 1677delTA, 1078delT, V520F, L206W, W1282X, R560T, 2347delG, Q890X, R553X, G551D, S549R(T>G), S549N, M1101K, G542X, 3905insT, Y1092X(C>A), S1251N, 444delA, 1811+1.6kbA>G, 1717-1G>A, R117H, R117H, R117C, N1303K, Y122X, 394delTT, G85E, R1066C, 1898+1G>A, W846X, 2184delA, D1152H, CFTRdele2.3, P67L, 2143delIT, E60X, 3659delC, 3272-26^a>G, 621+1G>T, A455E, R1162X, R1158X.

Y los polimorfismos 9T, 7T y 5T mediante el Intrón 8 poliT's (9T/7T/5T) y TGn adyacente.

4.3. ESTUDIO ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se han procesado a través del paquete estadístico IBM- SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, 2000) versión 20.0. Se han obtenido estadísticas descriptivas, como frecuencias, proporciones, medidas de tendencia central y de dispersión.

Posteriormente para decidir el uso de pruebas paramétricas o no paramétricas se aplicó la prueba de normalidad y bondad de ajuste de Kolmogorov–Smirnov. Ésta prueba rechaza o aprueba la hipótesis de normalidad de los datos, e indica si la estadística inferencial a aplicar es mediante pruebas paramétricas o no paramétricas.

Las distribuciones han sido analizadas mediante el test de la Chi cuadrado y se han realizado los cálculos de las prevalencias y odds ratio mediante el Programa para análisis epidemiológicos de datos tabulados de la Junta de Galicia, Epidat, versión 3.1.

Se ha considerado un nivel de significación para $p < 0,05$.



05/ RESULTADOS

**Variables condicionantes en el cribado neonatal de fibrosis quística mediante
tripsina inmunorreactiva**

5. RESULTADOS

5.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA ESTUDIADA

5.1.1. Valores de TIR

Los valores de TIR no presentan una distribución normal según la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov ($p < 0,0001$) con una media de 22,2 y desviación estándar de 14,0. Claramente hay una distribución que se alarga hacia valores altos.

La distribución está expresada en la figura siguiente:

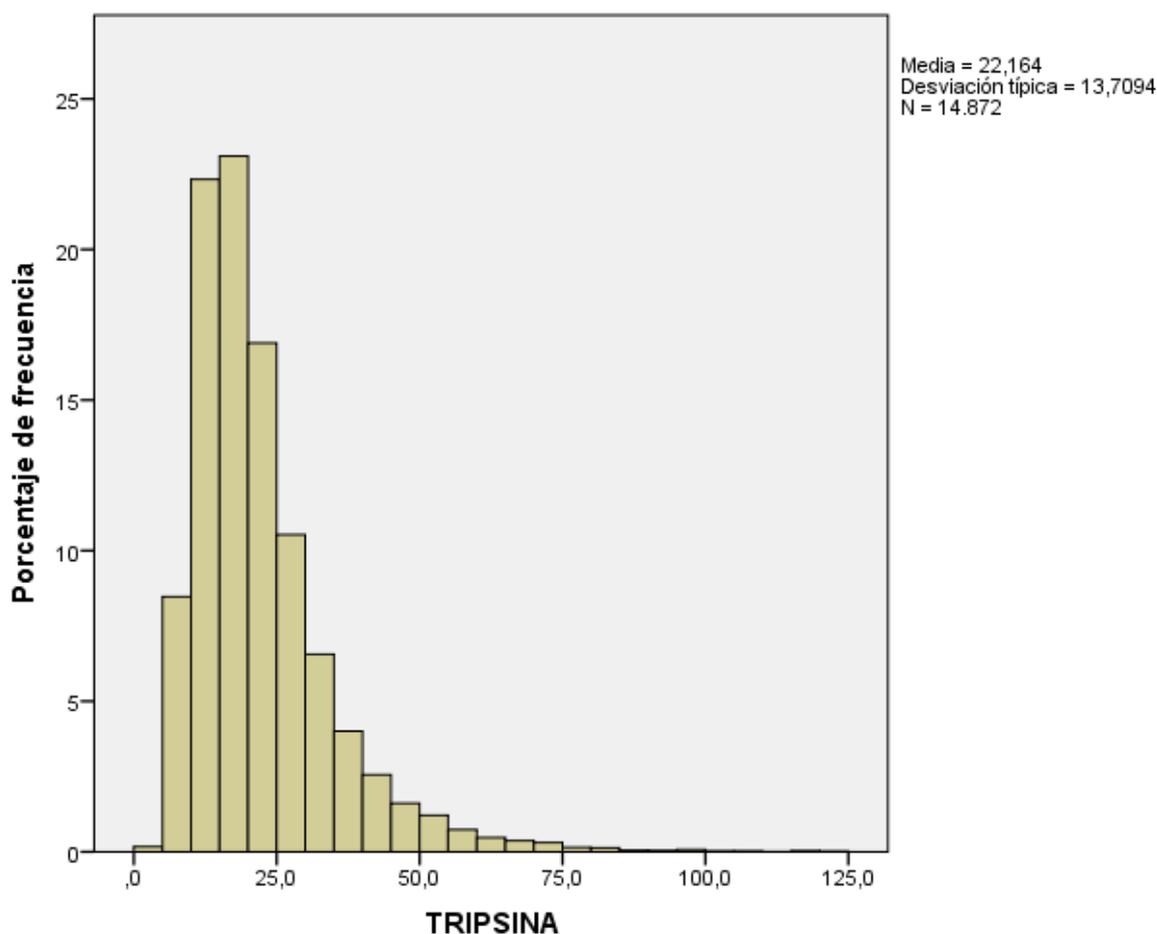


Figura 19. Distribución de los valores de TIR en el total de la muestra (n=14872).

Calculando los percentiles se han obtenido para el total de la muestra los siguientes valores

Tabla 8. Percentiles de los valores de TIR.

Percentiles de TIR (ng/ml)								
5	10	25	50	75	90	95	99	99,5
8,8	10,5	13,7	19,0	26,6	37,1	45,8	69,4	80,7

5.1.2. Valores de las demás variables cuantitativas

Los valores medias y desviaciones estándar de las demás variables cuantitativas están expresados en la tabla siguiente:

Tabla 9. Edad gestacional, edad a la extracción y edad de la madre en la muestra total.

	n	Media	SD
Edad gestacional (semanas)	14450	39,0	1,9
Edad extracción (días)	14016	5,4	3,3
Edad madre (años)	14688	31,6	6,7

5.1.3. Distribución de las variables cualitativas

Los porcentajes de las distribuciones según las variables cualitativas están expresados en la tabla siguiente:

Tabla 10. Porcentajes de la muestra según sexo, tipo de lactancia, comarca de nacimiento y origen de la madre.

Variable	N	%
Sexo:		
Niños	7600	51,2
Niñas	7241	48,8
Tipo lactancia:		
Materna	9372	65,0
Fórmula	2087	14,5
Mixta	2932	20,3
Dieta absoluta	21	0,1
Comarca		
Marina Alta	1217	8,3
Alcoia-Comtat	960	6,5
Marina Baixa	1179	8,0
Valles del Vinalopó	1288	8,8
L'Alacanti	4914	33,5
Baix Vinalopó	2767	18,9
Vega Baja	2339	16,0
Origen madre		
España	11062	75,3
África	1029	7,0
América	1057	7,2
Resto Europa	1155	7,9
Asia	381	2,6

5.2. VARIACIÓN ESTACIONAL DE LOS VALORES DE TIR

La distribución mensual de la muestra está expresada en la tabla siguiente:

Tabla 11. Distribución de la muestra según mes del año y temperatura media (Tutiempo, 2013).

MES	T media (°C)	Nº MUESTRAS
Enero	12,9	1357
Febrero	12,1	1313
Marzo	12,9	1374
Abril	16,1	1297
Mayo	20,3	1270
Junio	25,0	1013
Julio	26,2	1186
Agosto	27,7	1300
Septiembre	23,6	1192
Octubre	19,8	1147
Noviembre	15,2	1354
Diciembre	12,5	1072

Se han analizado las variaciones de los valores de TIR según el mes, mediante la representación de la mediana y de varios percentiles, estando representados en la figura:

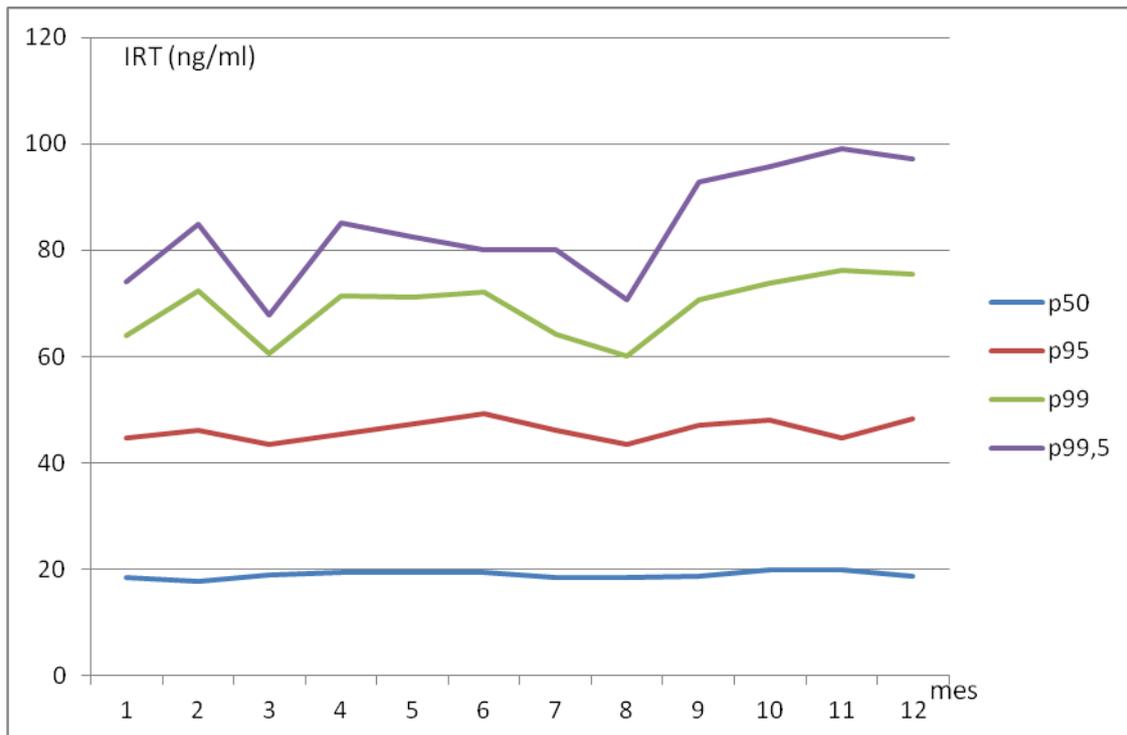


Figura 20. Variación estacional de los valores de TIR.

5.3. INFLUENCIA DEL SEXO EN LOS VALORES DE TIR

Se ha analizado la posible influencia del sexo en los valores de TIR, al no ser distribuciones normales se ha realizado el estudio estadístico mediante test no paramétrico, encontrando los valores que se expresan en la siguiente tabla:

Tabla 12. Media, SD de los valores de TIR (ng/ml) según sexo.

	N	Media	SD	P (Kruskal-Wallis)
Niños	7592	21,5	13,7	0,000
Niñas	7238	22.8	13.5	

Se observa un valor medio superior para las niñas, por lo que se han realizado los percentiles de ambos, que figuran en la tabla siguiente:

Tabla 13. Percentiles de los valores de TIR (ng/ml) según sexo.

Percentil	50	95	99	99,5
Niños	18,5	44,0	67,4	77,5
Niñas	19,6	47,1	70,6	83,5

Aún así, el número de niños con valores ≥ 65 ng/ml de TIR es de 97 frente al de niñas de 102, valores que no son significativos por la prueba de Chi cuadrado con una OR de 1,0 (IC 95% 0,95-1,04).

Se confirma que los valores en niñas de todos los percentiles son mayores que en los niños.

5.4. INFLUENCIA EDAD EN LOS VALORES DE TIR

Con el fin de observar la variación de los valores de TIR con los días de vida a la extracción de la muestra se representa la mediana de los mismos según los días de extracción, observándose que es prácticamente constante hasta el día 19-20 de vida del recién nacido, lo que se confirma mediante la representación logarítmica.

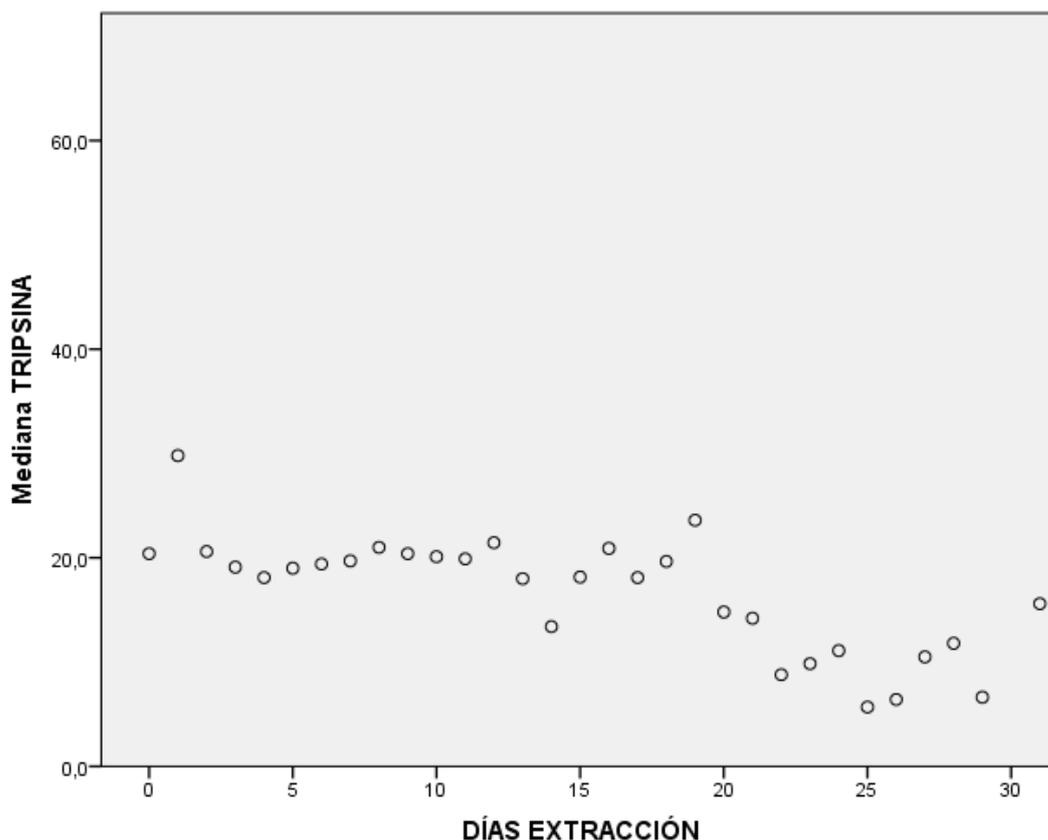


Figura 21. Variación de la mediana de TIR (ng/ml) con los días de vida del recién nacido.

Todas las muestras, que han tenido valores para estudio genético, o sea $TIR \geq 65$ ng/ml han sido tomadas con menos de 20 días de vida del recién nacido, excepto una, de origen africano y cuyo valores ha sido 146 ng/ml y sin mutación conocida y polimorfismo 7T/7T.

5.5. VARIACIÓN DE TIR CON EDAD GESTACIONAL

Se ha representado la variación de la mediana de TIR con las semanas de gestación, observándose (figura) que a partir de las 37 semanas se estabiliza el valor de TIR, existiendo una mayor variación aparente entre los niños prematuros, posible a la prematuridad a al menor número de muestras de estos niños, para verificar si existe variación respecto a la edad gestacional se ha realizado el estudio de las variables

estadísticas media, mediana y percentiles agrupando a los recién nacidos en tres grupos de edad gestacional (tabla).

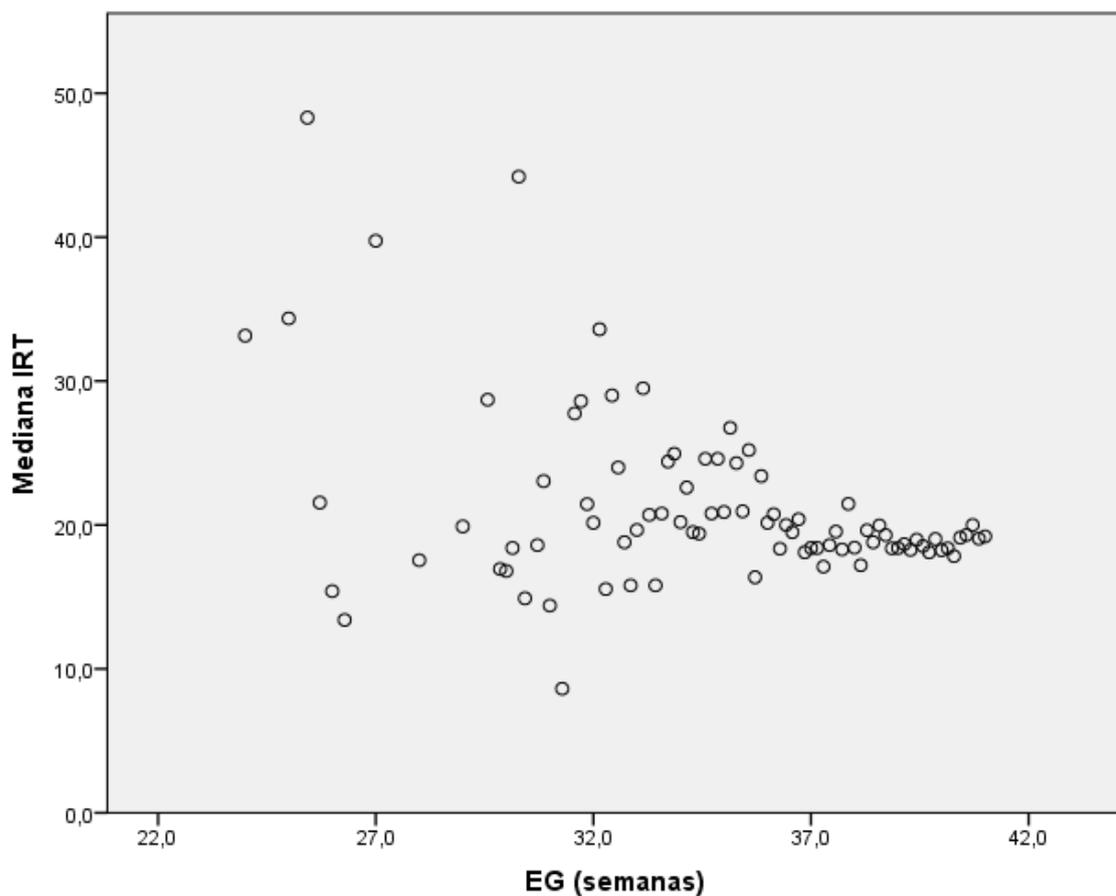


Figura 22. Variación de la mediana de TIR con la edad gestacional del recién nacido.

Los valores obtenidos están reflejados en la siguiente tabla:

Tabla 14. Valores de TIR (ng/ml) según grupo de edad gestacional.

Grupo EG	n	media	SD	Mediana	P 90	P 95	P 99
≤ 32 sem	158	27,3	20,6	21,3	51,3	64,5	83,0
32-37 sem	978	23,2	11,7	20,5	38,0	45,9	64,2
≥ 37 sem	13310	22,0	13,7	18,8	36,8	45,4	69,3

Con el valor de corte de 65 ng/ml se han obtenido los casos dudosos que se establecen en la tabla siguiente:

Tabla 15. Distribución por grupo de edad gestacional de las muestras de valor de TIR \geq 65 ng/ml).

Grupo edad gestacional	TIR \geq 65 ng/ml	Total casos
RNMPT	8	178
RNPT	13	1735
RNT	178	12563

Distribución que es significativamente diferente según grupo de EG ($p < 0,0001$ test Chi cuadrado) y con OR de los RNMPT frente a los RNT de 3,3 (IC 95% 1,6-6,8) y de los RNPT de 0,5 (IC 95% 0,3-0,9).

5.6. VARIACIÓN TIR CON TIPO DE LACTANCIA

Los valores de los parámetros estadísticos obtenidos están reflejados en la siguiente tabla:

Tabla 16. Valores de TIR (ng/ml) según tipo de alimentación.

Lactancia	N	Media(SD)	Mediana	P 90	P 95	P 99
Materna	9352	22,0(13,6)	18,7	37,0	45,8	69,4
Mixta	2932	22,2(12,4)	19,5	37,4	45,3	65,1
Fórmula	2087	21,9(12,0)	19,1	36,1	44,0	62,8
Dieta absoluta	21	53,3(52,9)	42,5	94,9	234,6	-

Test Kruskal-Wallis $p=0,044$

Al ser tan distintos los valores estadísticos en el grupo de dieta absoluta, se ha analizado el número de casos dudosos dividiendo la muestra en dos grandes grupos, con alimentación y con dieta absoluta, obteniéndose 7 casos dudosos de 21 de las muestras analizadas con dieta absoluta, frente a 192 casos dudosos del resto de la muestra analizada, lo

que es muy significativo ($p < 0,0001$ en el test de Chi cuadrado) y una OR de 36,9 (IC 95% 14,7-92,5).

5.7. VALORES DE TIR Y COMARCALIZACIÓN

Se ha realizado el estudio de las variables estadísticas teniendo en cuenta la comarca de residencia de los padres de los recién nacidos, figurando los datos en la tabla siguiente:

Tabla 17. Valores de TIR (ng/ml) según comarca de residencia de los padres.

Comarca	n	Media (SD)	P 50	P 90	P 95	P 99
Marina Alta	1217	22,4(29,7)	13,0	37,4	46,6	84,3
Alcoia-	960	20,7(12,4)	17,4	35,8	44,9	80,7
Comtat						
Marina	1179	21,9(16,6)	18,7	34,9	44,1	89,9
Baixa						
Valles del	1288	22,6(15,8)	19,4	37,8	47,7	79,1
Vinalopó						
L'Alacanti	4914	21,8(12,4)	18,9	36,6	44,0	79,0
Baix	2767	22,1(13,3)	19,1	37,0	45,9	79,1
Vinalopó						
Vega Baja	2339	23,2(14,4)	19,7	39,7	49,2	89,4

Test Kruskal-Wallis $p < 0,0001$

5.8. INFLUENCIA DE LA EDAD MATERNA EN LOS VALORES DE TIR

Se ha analizado la variación de los valores de TIR con la edad materna, observándose los valores para la mediana que se representan en la figura siguiente:

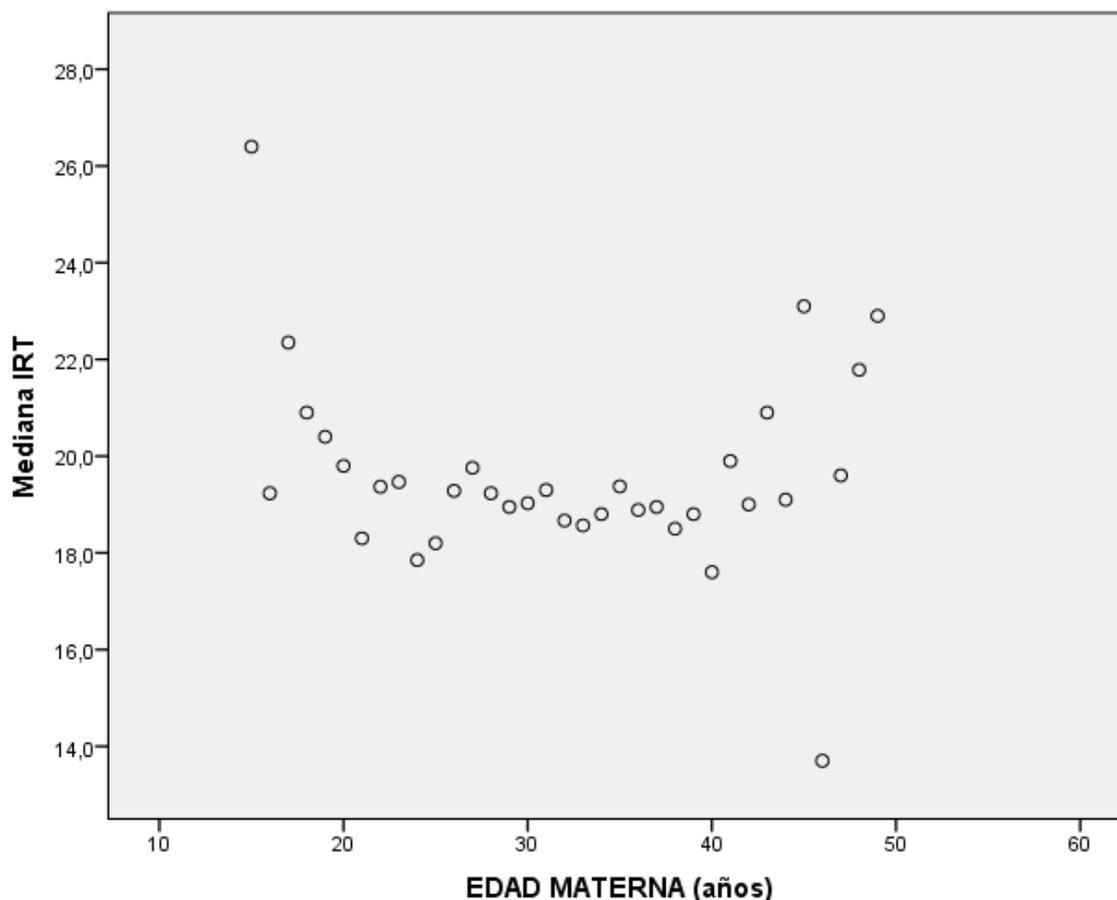


Figura 23. Variación de la mediana de TIR (ng/ml) según edad de la madre.

Se observa que hay valores de TIR mayores en los extremos de edad de la madre, en concreto por debajo de los 20 años y por encima de los 40 años. Por ello, se ha estudiado el número de dudosos en tres grupos de edad de la madre: < 20 años, entre 20-40 años y > 40 años, obteniéndose la siguiente distribución:

Tabla 18. Distribución por grupo de edad materna de las muestras de valor de TIR \geq 65 ng/ml).

Grupo edad materna	TIR \geq 65 ng/ml	Total casos
<20 años	8	375
20-40 años	185	13845
>40 años	6	479

No siendo significativa (test Chi cuadrado) la distribución por dichos grupos de edad materna.

5.9. ANÁLISIS DEL ORIGEN ÉTNICO Y LOS VALORES DE TIR

Se han analizado los parámetros estadísticos según el origen de la madre, estando representados los valores en la tabla siguiente:

Tabla 19. Valores de TIR (ng/ml) según origen de la madre.

Origen	N	Media(SD)	P50	P90	P95	P99
España	11062	22,2(13,7)	19,0	37,0	45,4	79,4
África	1029	23,8(16,6)	19,9	41,3	53,4	113,2
América	1057	20,8(11,3)	18,2	33,4	41,7	75,6
Resto	1155	22,1(12,2)	19,4	37,4	44,5	75,9
Europa						
Asia	381	20,1(12,1)	17,6	34,2	46,2	74,6

Test Kruskal-Wallis $p < 0,0001$

Se observan valores claramente superiores entre los recién nacidos de origen africano y ligeramente inferiores entre los de origen asiático, con diferencias que son significativas ($p < 0,0001$).

Del mismo modo apuntado en el apartado anterior, los niños de madre africana tienen valores estadísticos diferentes a los de los demás orígenes, por lo que se ha realizado la distribución de casos dudosos según estos dos grupos, se encuentran 22 casos dudosos de 1032 analizados de

origen africano frente a los 177 casos dudosos del resto de orígenes, con una OR de 1,7 (IC 95% 1,1-2,6) que es significativo ($p= 0,025$).

5.10. ANÁLISIS MULTIVARIANTE

Como se ha observado en los apartados anteriores, parece que los valores de TIR son superiores en los meses de invierno, bajan a partir de los 20 días, son valores inferiores en los niños a término, claramente mayores en niños con dieta absoluta, aumentan a edades extremas de la madre, en concreto por debajo de los 20 años y en madres con edad superior a los 40 años y por último tienen valores superiores los niños cuya madre es de origen africano.

Pero existe claramente unas influencias que pueden estar cruzadas, así son conocidas las influencias mostradas en la siguiente figura:

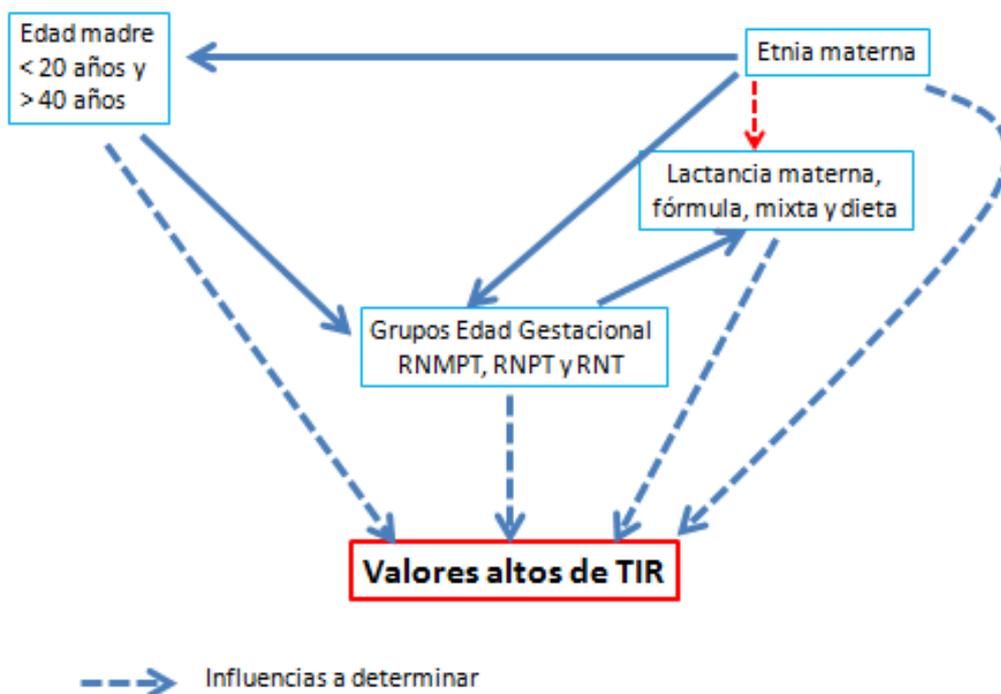


Figura 24. Posibles factores que pueden influir en valores anormales de TIR.

Con el fin de eliminar posibles injerencias de unas variables con otras, se ha realizado el análisis multivariante de estas variables, estableciendo como variable dependiente dicotómica los valores normales de TIR o por encima del punto de corte establecido de 65 ng/ml, variable cuantitativa la temperatura media del mes de nacimiento del niño, y como variables cualitativas el sexo; grupos de edad gestacional; RNMPT \leq 32 semanas, RNPT 32-37 semanas y RNT \geq 37 semanas; la edad de extracción hasta los 20 días y superior a dicha edad; tres grupos de edad de la madre: < 20 años, entre 20 y 40 años y > 40 años; y origen africano de la madre frente al resto de recién nacidos.

Tabla 20. Significación, odds ratio e intervalo de confianza del mismo, según el análisis multifactorial respecto a sexo, grupo étnico africano, grupo días extracción, grupo edad materna, grupo lactancia y temperatura media.

	Sig. (p)	OR	I.C. 95% para OR	
			Inferior	Superior
Sexo	,398	1,1	0,9	1,5
África vs resto	,055	1,6	1,0	2,5
Días extracción < 20 vs ≥ 20	,714	1,5	0,2	10,6
Edad materna	,405			
Grupo EM < 20 vs 20-40 años	,179	1,6	0,8	3,4
Grupo EM > 40 vs 20-40 años	,928	1,0	0,5	2,4
Edad gestacional	,129			
EG(1)	,500	1,4	0,5	4,2
Grupos EG(2)	,067	0,6	0,3	1,0
LACTANCIA	,000			
LM vs L F	,022	0,5	0,3	0,9
LM vs L mixta	,096	0,7	0,5	1,1
LM vs Dieta	,000	22,4	7,1	70,5
Temperatura media	,067	1,0	1,0	1,0

La probabilidad de encontrar un valor de TIR igual o superior a 65 ng/ml, está representada en las siguientes figuras:

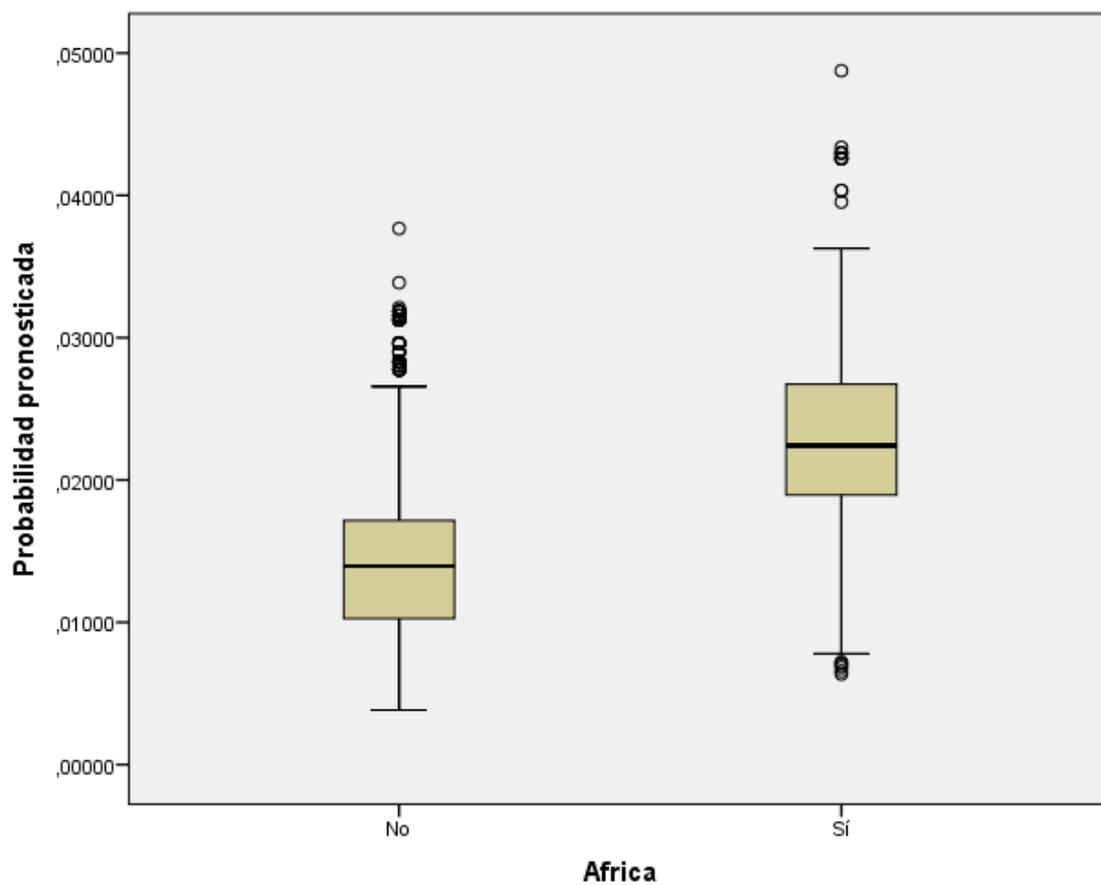


Figura 25. Probabilidad de que el valor de TIR de un niño de madre africana y no africana sea ≥ 65 ng/ml.

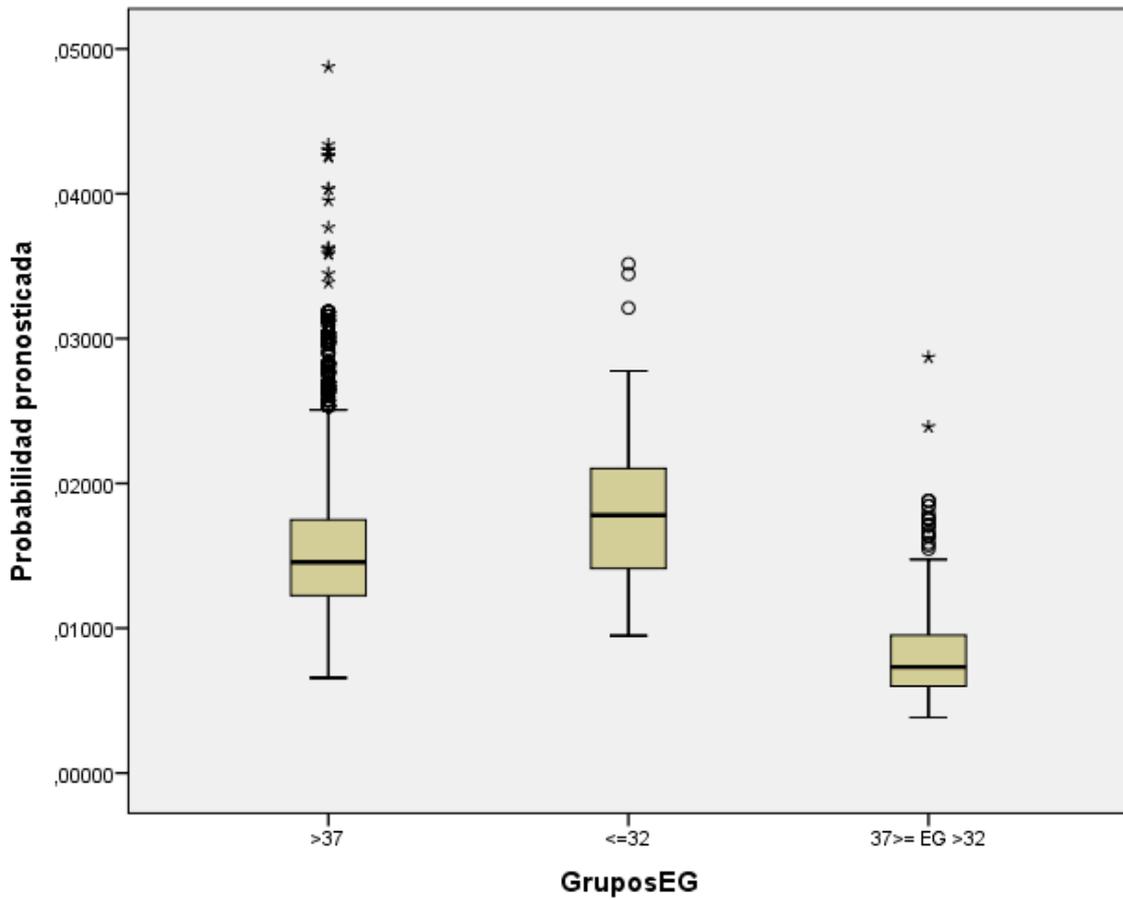


Figura 26. Probabilidad de que el valor de TIR de los tres grupos de edad gestacional sea ≥ 65 ng/ml.

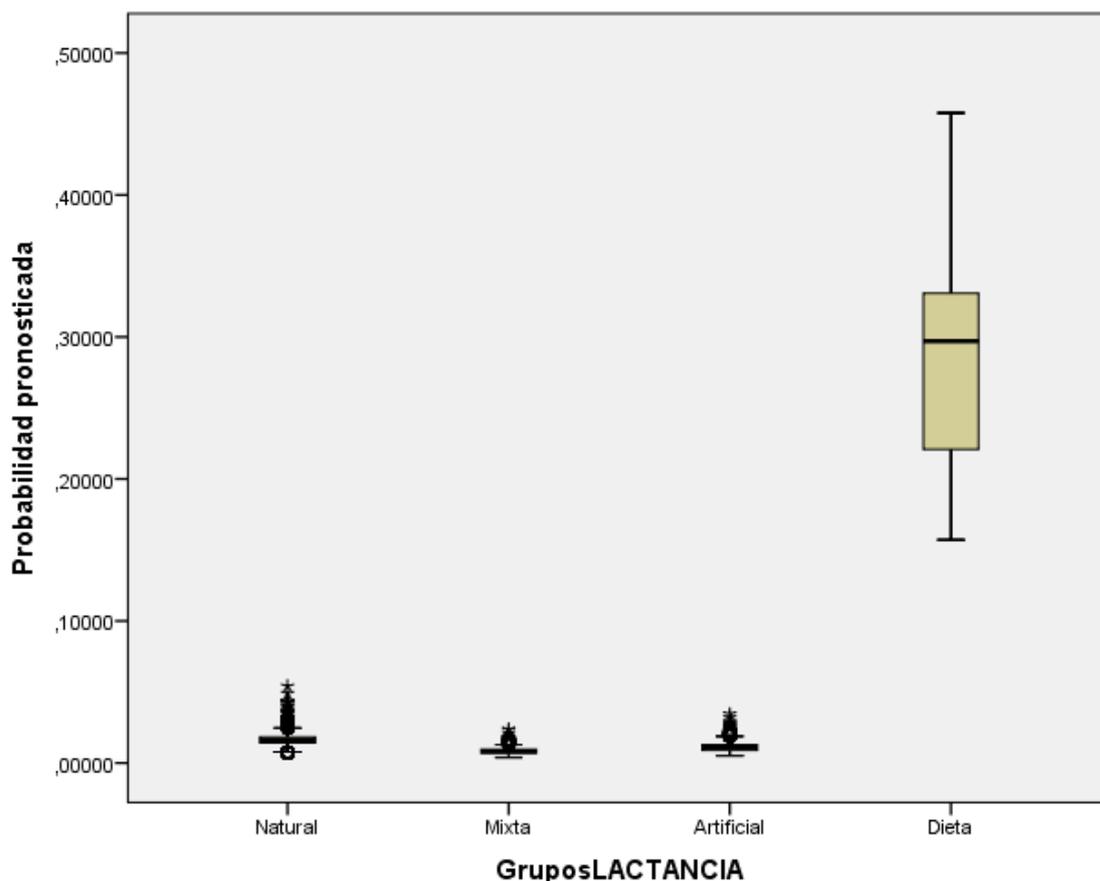


Figura 27. Probabilidad de que el valor de TIR de los grupos de tipo de lactancia sea ≥ 65 ng/ml.

5.11. VALORES DE REFERENCIA DE TIR EN EL CRIBADO NEONATAL DE FIBROSIS QUÍSTICA

A partir de los datos reflejados anteriormente, parece aconsejable, buscando un número menor de repeticiones o realizaciones de estudio genético, optimizar el punto de corte a partir de unos percentiles adecuados a la población en estudio.

Para ello parece aconsejable tomar las medidas de eliminar del cribado neonatal mediante la muestra de los primeros días a aquellos niños con dieta absoluta y realizarles el cribado de fibrosis quística cuando se haya estabilizado su ingesta o las causas que llevaron a la misma, y por

otro lado, establecer un punto de corte distinto para los recién nacidos de madre africana.

Los valores de normalidad excluyendo estos dos colectivos están expresados en la siguiente tabla:

Tabla 21. Percentiles de los valores de TIR en la muestra total y excluyendo los niños con dieta o de madre africana (Grupo estándar).

grupo	Percentiles de TIR (ng/ml)								
	5	10	25	50	75	90	95	99	99,5
Total (14872)	8,8	10,5	13,7	19,0	26,6	37,1	45,8	69,4	80,7
Estándar (13244)	8,8	10,4	13,7	18,9	26,4	36,8	45,3	68,8	79,0

Con una distribución que está representada en la siguiente figura:

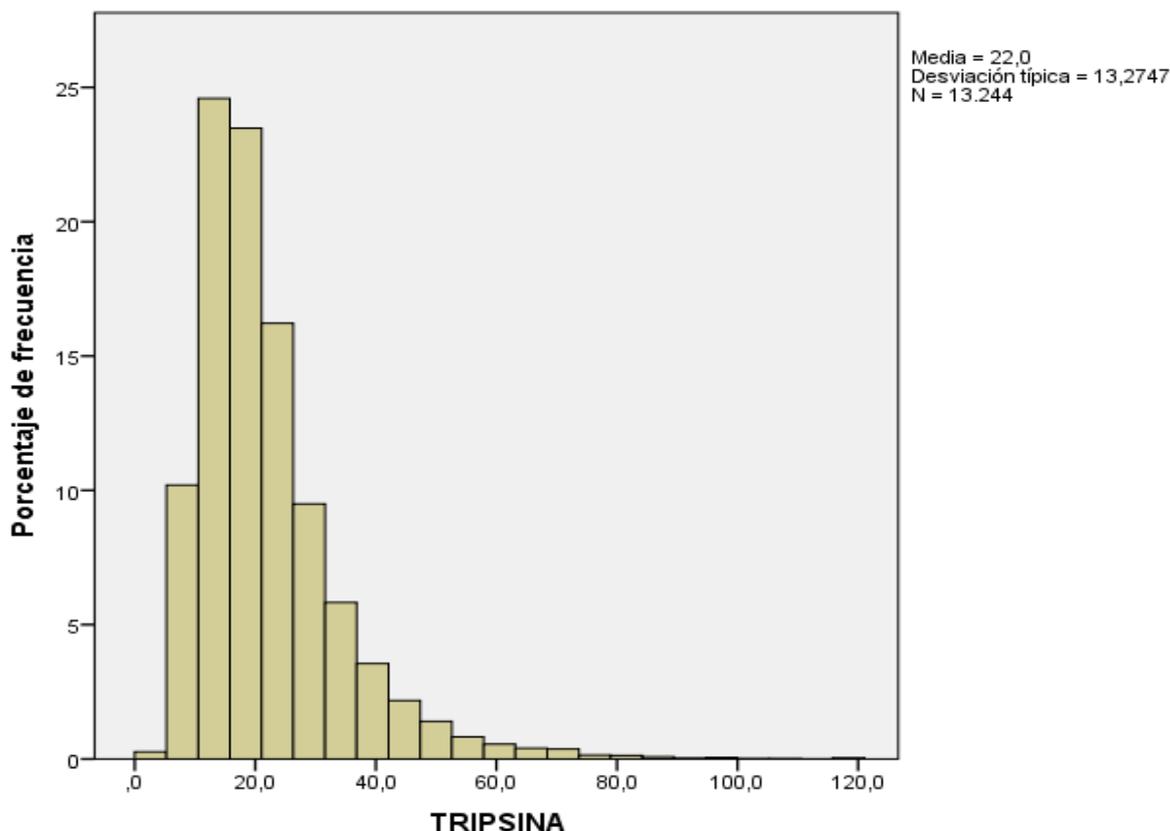


Figura 28. Distribución de los valores de TIR en el grupo de muestras estandarizadas (n=13244).

Y para los niños de madres africanas se podrían establecer los rangos de valores de normalidad que figuran en la tabla siguiente:

Tabla 22. Percentiles de los valores de TIR entre los recién nacidos de madre africana (n=998).

Percentiles de TIR (ng/ml)								
5	10	25	50	75	90	95	99	99,5
8,6	10,6	13,8	19,8	28,9	41,4	54,1	97,7	137,0

5.12. VALORES ALTOS DE TIR Y ESTUDIOS GENÉTICOS

5.12.1. Porcentaje de valores altos con punto de corte establecido de 65 ng/ml

Se han encontrado entre los 14872 niños recién nacidos analizados, 199 muestras con valores superiores al punto de corte establecido inicialmente de 65 ng/ml de TIR, lo que supone un porcentaje de muestras a seguir en estudio genético del 1,34%.

5.12.2. Distribución de las mutaciones y polimorfismos

En las 199 muestras con valores superiores a 65 ng/ml de TIR se han analizado las mutaciones más frecuentes en España, dando los siguientes resultados en relación a las mutaciones encontradas:

Tabla 23. Mutaciones encontradas en recién nacidos con TIR \geq 65 ng/ml..

Mutación	n	%
Alelo 1		
Sin mutación	183	92,0
Δ F508	9	4,5
D1152H	4	2,0
R1162X	2	1,0
L206W	1	0,5
Alelo 2		
Sin mutación	198	99,5
Δ F508	1	0,5

Con estos valores, se ha encontrado una incidencia durante el año analizado para FQ de 1/14872, dato que no se puede extrapolar a la población de la provincia de Alicante al ser un periodo pequeño, se debe de recopilar información en periodos más largos.

Respecto al número de portadores encontrados de la mutación Δ F508 de 1/22 es prácticamente la descrita para la población general, y por tanto el cribado de fibrosis quística mediante TIR no discrimina de una forma específica a los portadores de dicha mutación.

Y respecto a los polimorfismos:

Tabla 24. Polimorfismos encontrados en recién nacidos con TIR \geq 65 ng/ml (n=199).

Polimorfismo	n	%
5T/7T	10	5,0
5T/9T	3	1,5
7T/7T	131	65,8
7T/9T	51	25,6
9T/9T	4	2,0

5.12.3. Distribución de las mutaciones y polimorfismos según valor de TIR

Con el fin de dilucidar si la existencia de mutaciones o polimorfismos está más elevada en alguno de los valores de TIR se ha realizado la distribución de la muestra en varios grupos de valores de TIR, obteniéndose la siguiente distribución de las mutaciones:

Tabla 25. Distribución de las mutaciones y polimorfismos según valores de TIR (n=199).

TIR (ng/ml)	n	Mutaciones	Polimorfismos
≥ 200	6		7T/7T (50%) 7T/9T (50%)
150-200	4	1 ΔF508	7T/7T (50%) 7T/9T (50%)
125-150	7	1 ΔF508	7T/7T (42,9%) 7T/9T (57,1%)
100-125	17	1 ΔF508	7T/7T (94,1%) 7T/9T (5,9%)
90-100	17	1 homo ΔF508 2 D1152H 1 R1162X	5T/7T (5,9%) 7T/7T (70,6%) 7T/9T (17,7%) 9T/9T (5,9%)
80-90	27	1 L206W	5T/7T (3,7%) 7T/7T (59,3%) 7T/9T (33,3%) 9T/9T (3,7%)
70-80	67	4 ΔF508 1 R1162X	5T/7T (3,0%) 5T/9T (1,5%) 7T/7T (71,6%) 7T/9T (22,4%) 9T/9T (1,5%)
65-70	53	2 ΔF508 1 D1152H	5T/7T (11,2%) 5T/9T (3,7%) 7T/7T (57,4%) 7T/9T (25,9%) 9T/9T (1,9%)

Las combinaciones de las mutaciones con los polimorfismos están expresadas en la siguiente tabla:

Tabla 26. Combinaciones de mutaciones y polimorfismos en las muestras con TIR \geq 65 ng/ml (n=199).

Mutación	Polimorfismo
1 ΔF508/ΔF508	1 9T/9T
8 ΔF508	8 7T/9T
4 D1152H	3 7T/7T 1 7T/9T
2 R1162X	2 7T/7T
1 L206W	1 7T/7T
183 Sin mutación encontrada	10(5,5%) 5T/7T 3(1,6%) 5T/9T 126(68,9%) 7T/7T 43(23,5%) 7T/9T 3(1,6%) 9T/9T

5.13. PROSPECCIÓN DE LOS RESULTADOS QUE SE OBTENDRÍAN CON UN NUEVO PUNTO DE CORTE

El número de casos a remitir para el estudio genético en caso de eliminar los niños con dieta absoluta y con el nuevo punto de corte de TIR > 68,8 ng/ml sería de 149 recién nacidos, lo cual supone un ahorro de 50 muestras en un año, lo que supondría el 25% de muestras a estudio genético, y su repercusión sobre los resultados del estudio genético sería la pérdida de 2 portadores de la mutación F508 del y 1 portador de la mutación D1152H.

Tabla 27. Combinaciones de mutaciones y polimorfismos en las muestras con TIR \geq 68,8 ng/ml y sin dieta (n=149)

Mutación TIR\geq 65 ng/ml.	Polimorfismo TIR\geq 65 ng/ml.	Mutaciones perdidas	Polimorfismos perdidos
1 ΔF508/ΔF508	1 9T/9T		
8 ΔF508	8 7T/9T	-3 ΔF508	- 3 7T/9T
4 D1152H	3 7T/7T 1 7T/9T	-1 D1152H	-1 7T/9T
2 R1162X	2 7T/7T		
1 L206W	1 7T/7T		
183 Sin mutación encontrada	10(5,5%) 5T/7T 3(1,6%) 5T/9T 126(68,9%) 7T/7T 43(23,5%) 7T/9T 3(1,6%) 9T/9T	-46 Sin mutación encontrada	-25 7T/7T -12 7T/9T

Si además se establece como criterio el punto de corte para los recién nacidos de madre africana en su percentil 99, o sea en 97,7 ng/ml de TIR, el número de niños descartados del estudio genético hubiese sido de otros 9 niños, sin pérdida de ninguna de las mutaciones encontradas.

Con estas tres medidas, eliminación dieta absoluta, nuevo punto de corte para la población general y punto de corte específico para los recién nacidos de madre africana, se hubiesen tenido que hacer 140 estudios genéticos, lo que supondría un ahorro del 30,0%.



06/ DISCUSIÓN

Variables condicionantes en el cribado neonatal de fibrosis quística mediante tripsina inmunorreactiva

6.- DISCUSIÓN

6.1. DISEÑO Y TAMAÑO DE LA MUESTRA.

Se ha realizado un estudio descriptivo de los valores de Tripsina inmunoreactiva (TIR) obtenidos en el cribado neonatal de todos los recién nacidos en la provincia de Alicante desde su implantación en febrero de 2012.

Todas las muestras cumplieron los criterios de inclusión y exclusión establecidos, en concreto todas las muestras analizadas cumplieron los criterios de calidad preanalítica establecidos en la bibliografía sin ninguna intervención ni modificación sobre las variables establecidas, el estudio se realizó de forma totalmente anónima, utilizándose únicamente los datos de las fichas del cribado neonatal de forma estadística.

Se han obtenido dichos datos de forma totalmente anónima de las fichas del cribado neonatal de los recién nacidos de la provincia de Alicante, nacidos durante un periodo de 12 meses, del 1 de marzo de 2012 al 28 de febrero de 2013.

La toma de muestras se realizó en las consultas de enfermería pediátrica especializada de los hospitales en los que se ha establecido de este modo (Hospital General Universitario de Alicante, Hospital Universitario de San Juan, y Hospital Virgen de los Lirios de Alcoy), en las unidades de neonatos en el caso de los niños ingresados, siempre por los mismos profesionales, con formación específica para esta tarea, por lo que es muy infrecuente el caso de muestra insuficiente, mala impregnación o mala calidad en la muestra, en los cuales ha sido utilizada la segunda muestra para el cribado de fibrosis quística.

Se han estudiado algunas de las condiciones que podrían influir en los valores de corte del cribado neonatal de TIR elevado establecidos previamente para la población general de recién nacidos de 65 ng/ml, como son el tipo de alimentación (lactancia materna, fórmula, mixta o dieta absoluta), la edad gestacional, los días transcurridos desde el nacimiento hasta la toma de la muestra, comarca de residencia de los padres, origen materno, edad de la madre.

En las muestras iguales o superiores al punto de corte se ha realizado el estudio genético incluyendo mutaciones y polimorfismos y prueba de cloro en sudor en aquellos con estudio genético positivo o valores de IRT superiores a 100 ng/ml.

Se ha partido de una muestra total de 14872 recién nacidos, con la que, teniendo en cuenta que la variable a comparar es el valor de TIR, se han realizado grupos según las distintas variables analizadas (edad gestacional, edad a la toma de muestra, tipo de alimentación: lactancia materna, con fórmula, mixta o dieta absoluta, días transcurridos desde el nacimiento hasta la toma de muestra, comarca, origen materno, edad de la madre, estudio genético incluyendo mutaciones y polimorfismos y prueba de cloro en sudor), con el fin de poder analizar la posible repercusión de éstas en las concentraciones de TIR.

Del mismo modo se realizaron subgrupos combinando las distintas variables, con el fin de utilizar muestras homogéneas. En esta distribución de subgrupos, todos tuvieron un número suficiente de muestras.

Además se realizó el estudio genético en todos los niños que tenían concentraciones de TIR igual o superiores a 65 ng/ml, buscando las mutaciones más frecuentes y polimorfismos que pudieran confirmar la existencia de fibrosis quística u otras manifestaciones clínicas relacionadas con esta patología.

El tamaño muestral de 14872 recién nacidos es superior al establecido para un 95% de confianza ($z=1,96$) y un margen de error del 1%, en cuyo caso son necesarias 9604 muestras. La cuantificación de TIR está en una media de 22 y desviación estándar de 14, muy alejadas del valor de corte establecido previamente de 65 ng/ml; con una variabilidad en los interensayos establecida mediante los controles internos y externos en el entorno de normalidad de alrededor del 6%.

6.2. CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA.

Aunque no ha sido objetivo de esta memoria el estudio de las características de la población de recién nacidos de la provincia de Alicante, se observa una gran similitud de la población estudiada con las características de poblaciones semejantes descritas en la bibliografía. Así, al estudiar en la muestra total:

- El porcentaje de edad gestacional (semanas): 39 semanas, frente otros estudios (media 39,4).
- Edad de la madre: 31,6 años, frente 31,4 frente otros estudios (Rizo, 2013).
- Los porcentajes del tipo de alimentación se destaca que existe un mayor porcentaje de niños que reciben lactancia materna (65%) respecto a otros tipos de alimentación.

El tipo de lactancia está directamente relacionado con la edad gestacional del recién nacido, cuanto mayor es la edad gestacional existe mayor porcentaje de niños que reciben lactancia materna y esto es debido al menor tiempo de estancia hospitalaria de estos niños; a que los niños pretérminos necesitan de fórmulas enriquecidas, en los que se recomiendan aportes proteicos bastante más elevados que los contenidos en la leche materna (Hay, 2008), y a las dificultades que tienen los niños hospitalizados para recibir lactancia materna, etc. (Merewood, 2006; Nakao, 2008; Walker, 2008; Vieira, 2010).

Respecto a la distribución de la muestra por sexo, se obtuvo una muestra homogénea, no encontrándose prácticamente diferencias en la población estudiada y siendo común el pequeño incremento en porcentaje de niños frente al de niñas en los últimos años (Manero, 2012; Rizo, 2013).

No es homogénea la distribución de la muestra en cuanto a la comarca, destacando un porcentaje de recién nacidos más elevado en la comarca l'Alacantí con un 33,5%, seguida de la comarca del Baix Vinalopó, acorde con la distribución de la población de la provincia de Alicante.

Tampoco es homogénea la distribución de recién nacidos respecto al origen de la madre, encontrándose un alto porcentaje de recién nacidos de madre no española 24,7%, acorde a lo descrito en años previos para la provincia de Alicante (Rizo, 2013) y del resto de la Comunidad Valenciana (Aguado, 2011).

Respecto la distribución de la muestra por meses de nacimiento no se encontraron diferencias significativas entre los meses analizados, siendo el número de nacimientos prácticamente constante durante todo el año.

6.3. INFLUENCIA DEL SEXO EN LOS VALORES DE TIR

En el estudio de la variación en la concentración de TIR respecto al sexo neonatal se observan niveles más altos de tripsina inmunorreactiva en las niñas respecto a los niños (valores medios de 22.8 frente 21.5 y percentil 99.5 de 83.5 frente 77.5 respectivamente) con una diferencia estadísticamente significativa.

Estas pequeñas diferencias se diluyen al efectuar el estudio estadístico multifactorial. En un estudio (Vernooij-van Langen, 2012), los varones mostraron menores concentraciones de PAP (proteína asociada a la pancreatitis que se usa junto con la TIR en algunos países en el cribado

neonatal) que en las mujeres; esta diferencia no fue estadísticamente significativa; así pues se concluyó que el sexo no aumenta el riesgo de un resultado positivo de la prueba de cribado.

No se ha encontrado ninguna referencia en relación a posibles diferencias en los niveles de TIR entre niños y niñas; por lo que se llega a la conclusión de que se trata de un hallazgo casual y sin ninguna repercusión para los valores de referencia.

6.4. INFLUENCIA DE LA EDAD NEONATAL EN LOS VALORES DE TIR

En el presente estudio se observa, coincidiendo con la bibliografía como los niveles de TIR permanecen prácticamente constantes hasta el día 20 de vida del recién nacido (con una mediana de tripsina de 20 ng/ml), para después descender de forma significativa como apuntan otros estudios. En ese sentido se apunta en la bibliografía que la concentración de TIR a los 3-7 días es sensible pero poco específica, teniendo un VPP= 3-10% (Wilcken, 2007), existiendo estado de hipertripsinemia neonatal transitoria en recién nacidos sin fibrosis quística dando falsos positivos.

Una segunda muestra a los 15 días aumenta la especificidad, siendo la causa de que en algunos laboratorios de cribado se tenga como protocolo la doble muestra para TIR en los casos que en la primera muestra se supere el punto de corte, con los inconvenientes de rellamada, estrés de los padres, etc.

A una edad superior a los 30-35 días disminuye la sensibilidad (Rock, 1990), porque existe atrofia secundaria de las células acinares, que son sustituidas por tejido fibrótico, igualándose la concentración de TIR en pacientes y en no pacientes, dejando de ser un parámetro analítico válido.

Por ello es importante establecer puntos de corte acordes a la edad a la que se va a realizar el cribado neonatal (2-20 días y 21-30 ó 21-35 días), necesitando la optimización del punto de corte para minimizar los falsos positivos y negativos (Wilcken, 2003).

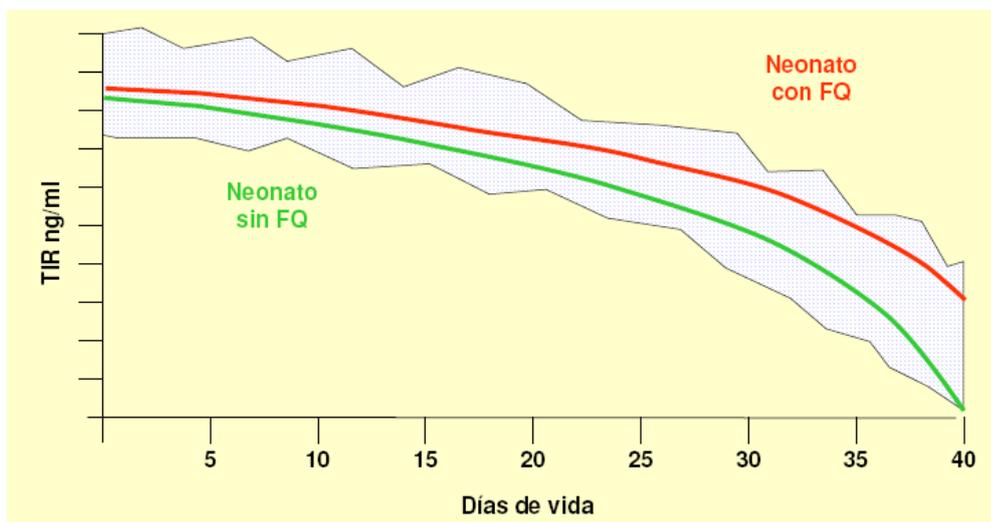


Figura 29. Variación de TIR con los días de vida.

Existe un punto crítico en el cribado neonatal de FQ mediante la cuantificación de TIR, que es el establecimiento del punto de corte en la primera muestra, para lo cual cada laboratorio debe establecer sus propios puntos de corte, teniendo en cuenta que la concentración de TIR es dependiente de la edad del recién nacido, disminuyendo notablemente a partir de los 20-21 días de vida. Los valores del TIR disminuyen pasadas las primeras semanas de vida por lo que se debe tener muy en cuenta la edad del paciente, tanto que se recomienda utilizar valores de corte específicos para cada edad.

Por ello será necesario vigilar el cumplimiento del protocolo establecido de toma de muestras entre los 3-5 días de vida (Aguado, 2011) y para los casos en que se incumplan dichos plazos, tener valores de referencia adecuados a la edad de toma de la muestra.

6.5. INFLUENCIA DE LA EDAD GESTACIONAL EN LOS VALORES DE TIR

Al estudiar la posible variación de los niveles de TIR respecto a la edad gestacional, se determinaron valores más elevados cuanto menor es la edad gestacional del niño con una diferencia estadísticamente significativa; observándose como a partir de la semana 37 el valor se estabiliza (Figura 22).

Este hecho puede deberse al estado general de salud de los niños pretérmino, niños que en general tienen mayor patología asociada, dietas, etc, por lo que al realizar el estudio multifactorial esta diferencia se diluye.

La edad gestacional está directamente relacionada con el peso al nacimiento, así pues un niño pretérmino pesa menos que uno a término, confirmándose este hecho en estudios en los que se ha observado que los recién nacidos con bajo peso al nacimiento (<2500 g) tuvieron mayores niveles de TIR con una diferencia estadísticamente significativa frente los niños con normopeso (>2500 g) (Kloosterboer, 2009).

En el presente estudio, la media, mediana y hasta el percentil 95 siguen la tendencia de disminuir al aumentar la edad gestacional, sin embargo al realizar el estudio de los casos que superan el punto de corte original el orden del factor de riesgo es RNMPT > RNT > RNPT, hecho que se diluye bastante y deja de ser significativo en el estudio multivariante. Es un punto que necesitaría de un mayor número de muestras para poder corroborarlo o descartarlo.

6.6. INFLUENCIA DEL TIPO DE LACTANCIA EN LOS VALORES DE TIR

Cuando se estudió la variación en la concentración de TIR según el tipo de alimentación en la muestra total, se observó que las concentraciones de TIR no variaban de forma significativa entre los tres

grupos de alimentación (lactancia materna, lactancia con fórmula y mixta) pero llama la atención la elevación de los niveles de TIR en neonatos con dieta absoluta encontrándose una diferencia estadísticamente significativa, observándose como llega a ser la media de TIR más del doble que en los otros casos (Tabla 15), y se tienen niños con valores de TIR superiores al punto de corte en mucha mayor medida que en los demás casos de recién nacidos.

Este hecho se confirma mediante el estudio multivariante que da probabilidades de estar por encima del punto de corte para los recién nacidos con dieta absoluta del orden de 20 veces superior que los niños alimentados. Este hecho está sin duda relacionado con que estos niños están sometidos a dieta absoluta por su patología inherente y ésta es causante del incremento de TIR.

Si bien la TIR se encuentra aumentada en individuos con FQ, también se ha observado un incremento de TIR en individuos normales con inmadurez del sistema ductal, en portadores de FQ (66%) y en neonatos con otras patologías como: trisomías del cromosoma 13, 18 y 21 (Priest, 1991), infecciones congénitas (citomegalovirus y otras subclínicas), insuficiencia renal, deficiente perfusión pancreática y atresia intestinal.

También se muestran valores más altos de TIR asociados con asfixia perinatal (Rock, 1989) o lactantes enfermos (Ravine, 1993). Por otro lado se ha descrito que el estrés perinatal puede ser responsable hasta del 25% de los casos positivos.

Hay que destacar que en el presente estudio no se ha encontrado ninguna mutación en los casos de TIR superiores a 200 ng/ml y únicamente 3 portadores $\Delta F508$ por encima de 100 ng/ml.

6.7. INFLUENCIA DE LA COMARCA DE RESIDENCIA DE LOS PADRES EN LOS VALORES DE TIR

Cuando se estudiaron las concentraciones de tripsina inmunorreactiva según la comarca de residencia de los padres se determinó un aumento en la concentración de dicho parámetro en la comarca de la Vega Baja con una diferencia estadísticamente significativa, encontrándose una media de 23.2 ng/ml y percentil 99 de 89.4, respecto a los niños de la comarca de Alcoy con menos niveles de TIR (media 20.7 y percentil 99 de 80.7).

Esto puede ser debido a que la zona de la Vega Baja acoge un alto porcentaje de inmigración, en su mayoría procedente del Norte de África. Así pues la heterogeneidad de las poblaciones influye en la prevalencia de la fibrosis quística (Ezquieta, 2005), pues aunque los africanos, más en concreto los nacidos de madre norteafricana, cursan con niveles más altos de TIR, la prevalencia de la fibrosis quística es más baja en esta raza, siendo más frecuente en la raza caucásica.

La inmigración es un factor variable, previsiblemente en aumento, que debe evaluarse con atención.

6.8. INFLUENCIA DE LA EDAD MATERNA EN LOS VALORES DE TIR

Al estudiar la posible variación de la concentración de TIR respecto a la edad materna se observa que hay valores de TIR más elevados en extremos de edad materna, por debajo de los 20 años y por encima de los 40 (Figura 23).

No cabe duda que la embarazada de mayor edad, tiene más probabilidades de encontrarse con complicaciones, que son el resultado del proceso natural del envejecimiento materno, lo cual lleva asociado un embarazo con mayor número de complicaciones, mayor riesgo de

prematuridad (Cortés, 2013) y presencia de mayor número de patología neonatal y mortalidad fetal, neonatal y perinatal (Rodas, 1992), como se observa en la tabla siguiente:

Tabla 28. Patologías del recién nacido según edad materna (Rodas, 1992).

	MENOS 18	18 A 35	MAS 35
HIPERBILIRRUINEMIA	12.64 %	10.47 %	11.40 %
PREMATUROS	13.79 %	11.82 %	15.78 %
MACROSOMICOS	1.91 %	6.97 %	10.96 %
ANOMALIAS CONGENITAS	3.07 %	2.28 %	2.19 %

Entre las patologías peri-neonatales más frecuentes de hijos de madres mayores de 35 años predominan el Prematuro y el Macrosómico lo cual coincide con las patologías maternas más relevantes: RPM y Diabetes.

Según el mismo estudio, no son mayores los casos de Anomalías Congénitas en el grupo de madres de más 35 años, coincidiendo en esta observación con otros autores (Delgado, 1992).

También la mayor tasa de mortalidad perinatal en madres añosas y el incremento en la terminación mediante cesárea abdominal en las madres añosas, puede conducir a porcentajes de Apgar deprimidos mayor y patologías asociadas, dieta etc. que conduzcan a valores de TIR superiores.

En relación al incremento de TIR en madres de edad inferior a los 20 años, cabe indicar también el mayor riesgo entre las adolescentes de prematuridad (Cortés, 2013) y que la maternidad en adolescentes conlleva mayores riesgos de salud para ellas y sus hijos, aumentando la morbilidad, mortalidad y repercusiones en el recién nacido, así todos los reportes internacionales coinciden en que los problemas comienzan en el útero: desnutrición, restricción del crecimiento intrauterino y bajo peso al nacer,

que junto a la prematuridad, serán las condiciones determinantes en la mayor morbilidad y mortalidad de éstos en relación a la población general (Trave, 1989; Escobedo, 1995; Jaskiewicz, 1994; Bortman, 1998; Mendoza, L. A., 2012).

Puesto que existe una relación directamente proporcional entre ser madre en edades extremas con mayor número de patologías neonatales, esto podría explicar el porqué de niveles más elevados en la TIR en dichos niños al nacimiento.

En el presente estudio se observan que hay valores de TIR mayores en los extremos de edad de la madre, en concreto por debajo de los 20 y por encima de los 40 años, pero cuando se realiza la distribución por grupo de edad materna de las muestras de valor de TIR ≥ 65 ng/ml no es significativa la distribución por dichos grupos de edad materna, confirmándose en el estudio multivariante.

Así pues, en otros estudios se aprecia como las madres más jóvenes y las añosas tienen más riesgo de prematuridad (Rizo, 2013; Cortés 2013), lo que conllevaría a un aumento en los niveles de TIR.

6.9. INFLUENCIA DEL ORIGEN ÉTNICO MATERNO EN LOS VALORES DE TIR

Cuando se estudiaron las concentraciones de tripsina inmunorreactiva según la etnia materna se observaron valores claramente superiores en los recién nacidos de origen africano, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.0001$), dato que concuerda con la bibliografía (Gregg, 1997).

Además también se han encontrado valores de TIR ligeramente inferiores en los neonatos de madres asiáticas y americanas.

Si se efectúa el estudio de los recién nacidos de etnia africana respecto al resto de la muestra mediante el estudio multivariante se obtiene una diferencia casi estadísticamente significativa ($p=0.055$) y una probabilidad mayor (OR 1,6) de que el neonato que procede de madre africana tiene mayor posibilidad de tener los niveles de TIR por encima del valor de referencia.

La influencia étnica en el nivel de TIR ha sido estudiada previamente (Gregg, 1997), mostrando una sobrerrepresentación de los afroamericanos en los bebés recién nacidos cribados positivos (10% de la población general, llegando a 28% en los positivos) a pesar de la menor incidencia de fibrosis quística en esta población.

Este hallazgo es muy similar a otros estudios, donde el porcentaje de los niños del norte de África aumentó de 25% en la población general al 40% en resultados positivos, sin FQ.

Hay que señalar que en el presente estudio se dividió el origen materno en: España, resto de Europa, África, América y Asia; aunque el origen africano corresponde mayoritariamente a países del Norte de África (Marruecos principalmente).

Variaciones étnicas de los valores de referencia son un fenómeno biológico descrito recientemente. Así, los recién nacidos de familias del Norte de África tienen valores más altos de TIR y la mayoría de los recién nacidos cribados positivos en esta población podría ser considerada como "falsos positivos" (Cheillan, 2004).

Cabe destacar que la fibrosis quística es el trastorno genético más común entre los niños caucásicos. La incidencia es variable: es mucho menos común en las poblaciones asiáticas y africanas que en las europeas y norteamericanas, con variaciones dentro de cada país. La prevalencia

varía entre 1 en 2000 en Irlanda frente a uno en cerca de 500.000 en Japón (Bush, 2003; Lewis, 2000).

6.10. INFLUENCIA DE LA ESTACIONALIDAD EN LOS VALORES DE IRT

Aunque en el presente estudio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de TIR con los meses de nacimiento de los neonatos (tabla 11), algunos artículos muestran lo contrario; así pues un estudio (Kloosterboer, 2009) refiere que se encontraron variaciones estacionales en los niveles de TIR del neonato en 10 años de investigación.

Los valores de TIR durante los meses de verano fueron inferiores a los de los meses de invierno durante todo el período de investigación. Aunque las medias de cada verano e invierno variaron de año en año, estas variaciones pueden ser atribuidas a los cambios de lote de reactivos. Puede ser que estas diferencias estacionales sean atribuibles a los grandes cambios en la temperatura ambiente donde se realizó dicho estudio (Wisconsin); desde inviernos muy fríos hasta veranos calurosos, con diferencias de temperaturas medias que pueden ir de $-8,9^{\circ}\text{C}$ a $20,6^{\circ}\text{C}$ (Protiempo, 2013) o sea una diferencia térmica de casi 30°C .

El presente estudio se ha realizado en muestras de recién nacidos en la Provincia de Alicante en las que la diferencia de temperaturas máxima de $27,7^{\circ}\text{C}$ y mínima de $12,1^{\circ}\text{C}$ es mucho menor (Tutiempo, 2013), de forma que aunque se observa un pequeño incremento, este deja de ser significativo al hacer el estudio multivariante considerando la temperatura media mensual en dicho estudio.

6.11. VALORES DE REFERENCIA

Dado que las variables que influyen significativamente en los valores de los niveles de TIR en la población analizada de la Provincia de Alicante, son como se ha visto previamente, la etnia africana (teniendo en cuenta que la mayoría son norteafricanos) y la dieta absoluta, parece aconsejable optimizar un punto de corte a partir de percentiles adecuados a la población estudiada.

Los valores de normalidad excluyendo los recién nacidos con dieta absoluta y nacidos de madres africanas, el percentil 99 se puede establecer en 68,8ng/ml y para los niños de madres norteafricanas subir el punto de corte a su percentil 99 que está en el valor de TIR de 97,7 ng/ml.

Respecto a los niños que reciben dieta absoluta, cualquiera que sea su causa, sería recomendable demorar la toma de muestra para la determinación de TIR, hasta que el niño reciba algún tipo de alimentación, ya sea leche materna, fórmula o mixta, siempre que se normalice el estado de salud de los niños antes del mes de vida, dada la pérdida de valor de la determinación de TIR después de este periodo y teniendo en cuenta la necesidad de valores de referencia adecuados para esas edades.

Con estas medidas se efectuarían un menor número de repeticiones y de realización de estudios genéticos.

6.12. VALORES ALTOS DE TIR Y ESTUDIOS GENÉTICOS

Se han encontrado entre los 14872 niños recién nacidos analizados, 199 muestras con valores superiores al punto de corte establecido inicialmente de 65 ng/ml de TIR, lo que supone un porcentaje de muestras a seguir en estudio genético del 1,34%.

En dichas muestras y según protocolo establecido y con el consentimiento informado previo, se han analizado las mutaciones más frecuentes en España mediante el sistema de análisis ELUCIGENE CF-EU2v1, que incluye un porcentaje mayor del 80% de las mutaciones encontradas en España, que cumple los requisitos marcados por la European Concertated Action on Cystic Fibrosis, que indica la necesidad de identificar un mínimo del 80% de las mutaciones de la población estudiada en el cribado para disminuir los falsos negativos.

Existe un factor que determina los falsos negativos y falsos positivos que es la elección de número de mutaciones a detectar, a más mutaciones, mayor sensibilidad (disminución de falsos negativos) pero disminuye la selectividad (aumentando los falsos positivos), siendo necesario llegar a un equilibrio y una selección adecuada de las mutaciones más frecuentes presentes en la población a cribar (Comeau, 2004).

Es necesario también tener en cuenta la distinta gravedad de las mutaciones, así:

- Mutaciones responsables de fibrosis quística: F508del, G542X, 711+1G>T,...
- Mutaciones asociadas a patologías del adulto: L997F, D443Y-G576A-R668C, R258G,...
- Mutaciones sin consecuencias clínicas: I148T, M470V, F508C, 1716G>A,...
- Mutaciones con expresión clínica desconocida: L967S, Y1014C,...

En la población estudiada se han encontrado 4 mutaciones:

- 1 homocigoto Δ F508;
- 8 heterocigotos Δ F508;
- 4 heterocigotos D1152H;
- 2 heterocigotos R1162X
- 1 heterocigoto L206W.

Esto supone una incidencia durante el año analizado para FQ de 1/14872, dato que no se puede extrapolar a la población de la provincia de Alicante al ser un periodo pequeño, se debe de recopilar información en periodos más largos.

Respecto al número de portadores encontrados de la mutación $\Delta F508$ de 1/22 entre las muestras analizadas, es prácticamente la descrita para la población general en España (Tellería, 1999; Araújo, 2005), y por tanto el cribado de fibrosis quística mediante TIR no discrimina de una forma específica a los portadores de dicha mutación.

Hay que recordar que el objetivo del Programa de Cribado Neonatal no es el de encontrar portadores, sino discriminar aquellos que pueden ser positivos para FQ.

Los portadores de una sola mutación del CFTR (heterocigotos) presentan unos valores de TIR significativamente superiores a los no portadores, aunque en la mayor parte de los casos dentro de rango. Esta diferencia es mayor en los portadores de mutaciones con insuficiencia pancreática. Se estima que la TIR solo detecta aproximadamente el 1,5% de los heterocigotos. En los individuos portadores de un alelo mutado, se espera que se exprese sólo en un 50% de su dotación genética normal, pero no presentan el fenotipo enfermo, esto sugiere que una reducción del 50% de la expresión del gen CFTR normal es insignificante desde el punto de vista fisiológico y del desarrollo (Pilewski, 1999).

En relación con los portadores de una sola mutación, debe tomarse en consideración otro aspecto más: cuando una pareja ha tenido un hijo portador, el riesgo de que el siguiente sea enfermo es de 1/100-1/120 si se asume una frecuencia de portadores en la población del 1/25-1/30 (Tellería, 1999).

Es necesario por lo tanto ofrecer un adecuado asesoramiento genético a estas familias, así como realizar el estudio genético de los padres (Tellería, 1999).

La distribución de las mutaciones encontradas no se ajusta a excepción de la $\Delta F508$, a las referidas por otros autores en algunas áreas geográficas de España, así hay coincidencia generalizada respecto a la mutación $\Delta F508$, pero no respecto a la segunda en frecuencia la G542X en Asturias, Castilla-León y Andalucía (Tabla 4, Figura 10), que no está presente en la población de la provincia de Alicante analizada (Casals, 1992; Coto, 1994; Casals, 1997; Tellería, 1999; Gómez-Llorente, 2001).

Las mutaciones G542X, R1162X N1303K pertenecen a la clase 1 dentro de la clasificación que está descrita para las mutaciones en el gen CFTR. La mutación G542X se produce en el exón 11 y consiste en una terminación precoz de la cadena, la R1162X es una mutación sin sentido que se encuentra en el exón 19 y la N1303K en el exón 22 y consiste en un corrimiento del marco de lectura. Dichas mutaciones son graves con insuficiencia pancreática y producen una clínica que permite un diagnóstico precoz (García, 1999).

La mutación $\Delta F508$, que se ha encontrado mayoritariamente entre las mutaciones halladas, es responsable del 60% de los enfermos FQ en el mundo. Esta mutación es responsable de formas muy severas (aquellas acompañadas de insuficiencia pancreática). En la mayor parte de los pacientes aparecen los primeros síntomas durante la lactancia, es decir, con menos de 1 año de edad (Dyce, 2000). La frecuencia de esta mutación en la población mundial es de 66 % (Araújo, 2005). La delección de los 3 pares de bases (TTT, en el exón 1.501-1.681) hace que la CFTR carezca de fenilalanina en posición 508; con esta proteína de membrana anómala no habrá transporte del Cl⁻ ni de su contraión y, en consecuencia, el moco no estará hidratado suficientemente, desencadenándose las manifestaciones de esta grave enfermedad.

La mutación G542X es común en los países del Mediterráneo, la frecuencia más alta se ha encontrado en Islas Baleares con un 16,7 %, la frecuencia en la población mundial es de 4,4 % (Estivill, 1997), pero

durante el año analizado no ha sido descrita en ningún caso en la Provincia de Alicante.

Otra de las mutaciones detectadas en la población mundial es la R553X, la frecuencia reportada en el consorcio de Fibrosis Quística es de 1,5% y en la población española es de 0,34 %.

La mutación G85E está localizada en el primer dominio transmembrana del gen CFTR, ocurre aproximadamente en el 1 % de los cromosomas fibroquísticos españoles provocando una degradación rápida de la proteína (The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium, 1994; Friedman, 1997; Bonizzato, 1995; Casals, 2001).

La mutación 2183AA®G es una mutación del corrimiento del marco de lectura, la cual provoca una terminación prematura de codón 38 en el exón 13. Se encontró una frecuencia significativa en el centro y sur de Europa. Su frecuencia es de 0.5 % en España. Esta mutación ha sido descrita asociada a un fenotipo severo, con insuficiencia pancreática, variables complicaciones pulmonares, en ocasiones complicaciones con bacterias patógenas y otras complicaciones tales como problemas hepáticos y bronquiectasias (Kilinc, 2000).

De la comparación entre las incidencias generales encontrados en todos estos estudios y lo descrito en el presente trabajo cabe deducir que es necesario profundizar y llegar a un mayor número de muestras para poder concluir la semejanza o diferencia de la población de la provincia de Alicante con el resto de España y Europa.

Respecto a los polimorfismos encontrados en recién nacidos de la provincia de Alicante en el presente estudio con TIR ≥ 65 ng/ml fueron: 5T/7T (5%); 5T/9T (1,5%); 7T/7T (65,8%); 7T/9T (25,6%) y 9T/9T (2%) (tabla 23). Es claramente mayoritario el polimorfismo 7T/7T.

Además de las mutaciones en el gen CFTR, polimorfismos genéticos en regiones no codificantes pueden tener un impacto en los niveles de CFTR funcional y en el fenotipo FQ (Kiesewetter, 1993).

Otras mutaciones de CFTR en regiones no codificantes han sido asociados con fenotipos FQ atípicos. El análisis mutacional evidencia la especificidad entre este fenotipo y la variante 5T[IVS8-6(5T)] (Haardt, 1999; Larriba, 1998).

El alelo 5T en la secuencia del intrón 8 resulta en la delección del ARNm del exón 9 del gen CFTR, conduciendo a la reducción de los niveles de la proteína CFTR normal, no generando las cantidades para apoyar las funciones fisiológicas requeridas.

El polimorfismo de timidinas en el final del intrón 8 de el gen CFTR, 3 alelos diferentes han sido encontrados dependiendo del número de timidinas (5, 7 ó 9), presentes en este sitio (Chu, 1991).

El número de timidinas determina la eficiencia del intrón 8 como aceptor. La eficiencia disminuye cuando es más pequeño el número de timidinas encontradas (Chu, 1993) debido a la alta frecuencia de la variante cinco timidina (5T) en pacientes con ausencia congénita bilateral de los vasos deferentes (CBAVD) con respecto a la población general (21 contra 5 %), la variante 5T fue clasificada como una mutación CBAVD con penetrancia incompleta.

El alelo 5T en el intrón 8 del gen CFTR conduce a baja proporción de ARNm transcripto faltando el exón 9. Consecuentemente, la variante 5T produce bajos niveles anormales de la proteína CFTR. La variante 5T es la causa más frecuente asociada a la CBAVD (Chillón, 1995).

Mutaciones FQ han sido encontradas en el 65 % de individuos con CBAVD, sugiriendo que pacientes CBAVD con mutaciones en el gen CFTR tienen una forma ante todo genital de FQ (Anguiano, 1992).

La presencia de una mutación CFTR en un alelo y la variante 5T en el otro puede conducir a un déficit de transcripto normal (Teng, 1997; Mak, 1997).

En resumen el alelo 5T en el intrón 8 del gen CFTR es encontrado en aproximadamente el 10 % de los individuos. En este estudio se ha encontrado una frecuencia de este alelo en la población estudiada de 6,5%.

El número de repeticiones CG adyacentes a 5T influye en la penetrancia de la enfermedad (Groman, 2004), determinando el número de repeticiones TG en 98 pacientes (hombres infértiles debido a la ausencia congénita de los vasos deferentes), se encontraron 9 pacientes con FQ no clásica y 27 individuos no afectados. Cada uno de los individuos de este estudio tiene una mutación severa CFTR y en el otro 5T. De los individuos no afectados, 78 % (21 de 27) tiene adyacente a 5T 11 repeticiones TG, comparado con el 9 % (10 de 107) de los individuos afectados. Inversamente, 91 % (97 de 107) de los individuos afectados tienen 12 o 13 repeticiones TG, contra solo 22 % (6 de 27) de los individuos no afectados. Estos individuos con 5T adyacente a 12 o 13 repeticiones TG fueron sustancialmente más probable a tener un fenotipo anormal que estos con el alelo 5T adyacente a 11 repeticiones TG. Entonces determinaron que el número de repeticiones TG puede predecir si el alelo 5T es benigno o patogénico. (Groman, 2004).

En Francia, el alelo 5T estuvo presente en 7 de 36 pacientes, la frecuencia del alelo fue de 9,7 %, mientras que en la población general es de 5 % (Audrezet, 2002).

La mutación $\Delta F508$ tiene una fuerte asociación con el alelo 9T. Esto se puede inferir debido a que los diez casos homocigóticos $\Delta F508$ tienen el alelo 9T/9T y 37 de 38 heterocigóticos tienen al menos un alelo 9T (Roland, 2002). Esta asociación ha sido observada antes (Friedman, 1997). Esta misma asociación se ha encontrado en el presente estudio, tanto en el homocigoto como en los heterocigotos.

Un porcentaje de mutaciones CFTR son deleciones / inserciones de gran tamaño que no pueden ser detectadas mediante las técnicas de cribaje. Para su caracterización se necesitan técnicas más complejas como

Southern Blot, la electroforesis en campos pulsantes, RCP múltiple cuantitativa de pequeños fragmentos fluorescentes (Audrézet, 2004).

Probablemente el continuo avance de la tecnología será un factor decisivo en la implantación de nuevos métodos de análisis más eficaces, algunos ya disponibles, como los secuenciadores multicanales, el análisis en cromatografía líquida de alto rendimiento desnaturizante (DHPLC) (Ravnik-Glavac, 2002) y otros, todavía en fase experimental (microchips).

La mutación IVS8-6(5T) (localizada en el intrón 8, mutación de splicing), también conocida como alelo 5T (Kerem, 1997; Chillón, 1995) cuya presencia en los varones se asocia con frecuencia a una agenesia congénita de los vasos deferentes (CBAVD) y a poca o ninguna manifestación pulmonar o digestiva. Parece que esta mutación permitiría la existencia de, aproximadamente, un 10% de proteína activa, cantidad que sería suficiente para el normal funcionamiento del tejido pulmonar o digestivo, pero no así del aparato genital masculino. La presencia de esta mutación en ambos cromosomas no se considera diagnóstica de FQ, pero la asociación de un alelo 5T con una mutación reconocida como causante de enfermedad sí es diagnóstica (Rosenstein, 1998).

En el estudio también cabe destacar que entre los niños con niveles de TIR ≥ 65 ng/ml, no por mayor concentración de éste parámetro se encuentran más mutaciones (tabla 24), pues en el grupo de 90-100 ng/ml se han encontrado un paciente homocigoto $\Delta F508$, 2 heterocigotos D1152H y otro heterocigoto R1162X; mientras que entre los niños con TIR ≥ 200 ng/ml, no se encontró ninguna mutación.

Con el fin de eliminar posibles variables de confusión de unas con otras, se realizó el análisis multivariante de estas variables, estableciendo como variable dependiente dicotómica los valores normales de TIR o por encima del punto de corte establecido de 65 ng/ml, variable cuantitativa la temperatura media del mes de nacimiento del niño, y como variables cualitativas el sexo; grupos de edad gestacional; RNMP ≤ 32 semanas, RNPT 32-37 semanas y RNT ≥ 37 semanas; la edad de extracción hasta los

20 días y superior a dicha edad; tres grupos de edad de la madre: < 20 años, entre 20 y 40 años y > 40 años; y origen africano de la madre frente al resto de recién nacidos.

Es necesario optimizar el punto de corte a partir de unos percentiles adecuados a la población en estudio. Para ello parece aconsejable tomar las medidas de eliminar del cribado neonatal a aquellos niños con dieta absoluta y realizarles el cribado de fibrosis quística cuando se haya estabilizado su ingesta o las causas que llevaron a la misma, y por otro lado, establecer un punto de corte distinto para los recién nacidos de madre africana.

El número de casos a remitir para el estudio genético en caso de eliminar los niños con dieta absoluta y con el nuevo punto de corte de TIR > 68,8 ng/ml sería de 149 recién nacidos, lo cual supone un ahorro de 50 muestras en un año, lo que supondría el 25% de muestras a estudio genético, y su repercusión sobre los resultados del estudio genético sería la pérdida de 2 portadores de la mutación $\Delta F508$ del y 1 portador de la mutación D1152H.

Si además se establece como criterio el punto de corte para los recién nacidos de madre africana en su percentil 99, o sea en 97,7 ng/ml de TIR, el número de niños descartados del estudio genético hubiese sido de otros 9 niños, sin pérdida de ninguna de las mutaciones encontradas.

Con estas tres medidas, eliminación de muestras de neonatos con dieta absoluta, nuevo punto de corte para la población general y punto de corte específico para los recién nacidos de madre africana, se hubiesen tenido que hacer 140 estudios genéticos, lo que supondría un ahorro del 30,0%.



07/ CONCLUSIONES

**Variables condicionantes en el cribado neonatal de fibrosis quística mediante
tripsina inmunorreactiva**

7.- CONCLUSIONES

1.- Los percentiles de normalidad establecen un punto de corte de 68,8 ng/ml de TIR, mayor que el utilizado (65 ng/ml) en el primer año de implantación del Cribado Neonatal de FQ.

2.- Evaluando la muestra total de recién nacidos analizados con el punto de corte de 68,8 ng/ml en lugar de 65 ng/ml se pueden evitar 50 estudios genéticos.

3.- La temperatura ambiente es un factor a tener en cuenta a la hora de determinar los valores de referencia de TIR, pues aunque en la provincia de Alicante no existen diferencias importantes de °C entre las diferentes estaciones, existen otras comunidades donde esta variable podría influir.

4.- El sexo del recién nacido no influye sobre los niveles de TIR.

5.- Los recién nacidos muy pretérminos (<32 semanas) dan valores de TIR superiores a los nacidos a término.

6.- Los recién nacidos sometidos a dieta absoluta dan valores de TIR muy superiores, con una probabilidad 20 veces mayor de estar por encima del valor de referencia establecido y sin mutaciones.

7.- Es aconsejable realizar el cribado de FQ a los neonatos con alimentación especial, una vez inicien alimentación materna, fórmula o mixta, entre las que no se han determinado diferencias en las concentraciones de TIR.

8.- Valores extremos de edad materna (>40 años y <20 años) parecen tener impacto sobre el aumento de niveles de TIR, por mayor número de RNPT y patología peri-neonatal, pero al realizar el estudio multivariante se demuestra que no influye en dichos niveles.

9.- La etnia africana, concretamente los niños nacidos de madres norteafricanas tienen niveles de IRT mayores que los de otras etnias.

10.- Si se establece como criterio el punto de corte para los recién nacidos de madre africana en su percentil 99 de 97,7 ng/ml de TIR, el número de niños descartados del estudio genético hubiese sido de otros 9 niños, sin pérdida de ninguna de las mutaciones encontradas.

11.- Ninguno de los estudios genéticos que se hubieran rechazado utilizando el nuevo punto de corte habrían dado positivo con 2 mutaciones o polimorfismos de riesgo.



08/ ABREVIATURAS

**Variables condicionantes en el cribado neonatal de fibrosis quística mediante
tripsina inmunorreactiva**

8.- ABREVIATURAS

TIR: Tripsina inmunorreactiva

FQ: Fibrosis Quística

IP: Insuficiencia pancreática

SP: Suficiencia pancreática

EG: Edad Gestacional

RN: Recién nacido

RNT: Recién nacido a término

RNPT : Recién nacido pretérmino

RNMPT: Recién nacido muy pretérmino

LM: Lactancia materna

IM: Íleo meconial

CFTR: Proteína transportadora de Fibrosis Quística

CBAVD: Agenesia congénita de conductos deferentes



09/ BIBLIOGRAFÍA

Variables condicionantes en el cribado neonatal de fibrosis quística mediante tripsina inmunorreactiva

9.- BIBLIOGRAFÍA

- Abrams CK, Hamosh M, Hubbard VS, Dulta SK, Hamosh P. Lingual lipase in cystic fibrosis: quantification of enzyme activity in the upper small intestine of patients with exocrine pancreatic insufficiency. *J Clin Invest* 1986; 73: 374-382.
- Accurso FJ, Sontag MK, Wagener JS. Complications associated with symptomatic diagnosis in infants with cystic fibrosis. *J Pediatr* 2005;147(3 Suppl):S37-41.
- AECNE (Asociación Española de Cribado Neonatal) Real Patronato sobre Discapacidad. Programas de Cribado Neonatal en España. XIV Reunión de los Centros de Cribado Neonatal 14 de octubre de 2008 [consultado el 09/08/2009]. Disponible en <http://aecne.es/pdf/datos2007.pdf>
- Aguado C, Barona C, Carpio ML, Fullana AM, Mas R, et al. Programa de Cribado Neonatal de Enfermedades Congénitas en la Comunidad Valenciana. Generalitat Valenciana. Conselleria Valenciana. 2011.
- Al-Jader LN, Goodchild MC, Harper PS. Attitudes of parents of cystic fibrosis children towards neonatal screening and antenatal diagnosis. *Clin Genet* 1990; 38(5). 460-5.
- Alshimmiri MM, Hammoud MS, Al-Saleh EA, et al. Ethnic variations in birthweight percentiles in Kuwait. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2003; 17: 355-362.
- Amaral D, Pacheco P, Beck S, Farinha CM, Penque D, Nogueira P et al. Cystic fibrosis patients with the 3272-26A>G splicing mutation have milder disease than F508del homozygotes: a large European study. *J Med Genet* 2001; 38 (11): 777-782.
- Amaral MD, Kunselmann K. Molecular targeting of CFTR as a therapeutic approach to cystic fibrosis. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 28(7): 334-41.

- Anand SS, Razak F, Yi Q, et al. C-reactive protein as a screening test for cardiovascular risk in a multiethnic population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1509-1515.
- Anguiano A, Oates RD, Amos JA, Dean M, Guerrad B, Steward C, Maher TA, White MB, Milunski A. *JAMA* 1992; 267(13): 1794-1797.
- Araújo FG, Novaes FC, Dos Santos NP, Martins VC, de Souza SM, dos Santos SEB and Ribeiro-dos-Santos AKC. Prevalence of DF508, G551D, G542X, and R553X mutations among cystic fibrosis patients in the North of Brazil. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38 (1): 11-15.
- Asociación Argentina de lucha contra la Enfermedad fibroquística del Páncreas. Publicación El Cisnes. *Fibrosis Quística*, 2006.
- Audrezet MP, Chen JM, Le Marechal C. Determination of the relative contribution of three genes-the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene, the cationic trypsinogen gene, and the pancreatic secretory trypsin inhibitor gene-to the etiology of idiopathic chronic pancreatitis. *Eur J Hum Genet* 2002; 1.
- Avery M, Richardson D (1998). History and epidemiology. *Avery's Diseases of the Newborn*. 7th Ed. Philadelphia, Pa: WB Saunder, 1-12.
- Barrio Gómez de Agüero MI, García Hernández G, Gartner S y Grupo de Trabajo de Fibrosis Quística. Protocolo de diagnóstico y seguimiento de los pacientes con fibrosis quística. *An Pediatr (Barc)* 2009; 71(03): 250-64.
- Bernardino AL, Ferri A, Passos-Bueno MR, Kim CE, Nakaie CM, Gomes C, Damaceno N, y Zatz, M. Molecular analysis on Brazilian cystic fibrosis patients reveals five novel mutations. *Genet Test* 2000; 4: 69-74.
- Bienvenu T. A splicing mutation in intron 16 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene, associated with severe disease, is common on Reunion Island. *Hum Hered* 1996; 46: 168-177.

- Bonizzato A, Bisceglia L, Marigo C. **Análisis of the complete coding region of the CFTR gene in a cohort of CF patients from north -eastern Italy: identification of 90 % of the mutations. Hum Genet 1995; 95: 399-402.**
- Bortman M. **Risk factor for low birth weight. Rev Panam Salud Pública 1998;3:3 14-21.**
- Bossi A, Battistini F, Braggion C, Magno EC, Cosimi A, De Candussio G, et al. **Italian Cystic Fibrosis Registry: 10 years of activity. Epidemiol Prev 1999;23:5-16.**
- Bush A. **Cystic fibrosis. European lung white book. Publ Eur Resp Soc; 2003. p. 89- 95.**
- Cabrini G, Pederzini F, Perobelli L, Mastella G. **An evaluation of enzyme immunoassay method for immunoreactive trypsin in dried blood spots. Clin Biochem 1990;23(3):213-219.**
- Campbell PW, White TB. **Newborn screening for cystic fibrosis: an opportunity to improve care and outcomes. J Pediatr. 2005; 147(3 Suppl):S2-S5.**
- Carles S, Desgeorges M, Goldman A, Thiart R, Guittard C, Kitazos CA, Ravel TJ, Westwood AT, Claustres M, Ramsay M. **First report of CFTR mutations in black cystic fibrosis patients of southern African origin. J Med Genet 1996; 33(9): 802-804.**
- Carson, MR, Travis SM, Welsh MJ. **The Two Nucleotide-binding Domains of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Have Distinct Functions in Controlling Channel Activity. J Biol Chem 1995; 270: 1711-7.**
- Casals T, Ramos MD, Gimenez J, Larriba S, Nunes V, Estivill X. **High heterogeneity for cystic fibrosis in Spain families: 75 mutations account for 90% of chromosomes. Hum Genet 1997;101(3):365-70.**

- Casals T, Vázquez C, Lázaro C, Girbau E, Gimenez FJ, Estivill X. Cystic fibrosis in the Basque country: high frequency of mutation delta F508 in patients Basque origin. *Am J Hum Genet* 1992;50(2):404-10.
- Casals T. Comunicación personal. Institut de la Reserca Oncològica. Barcelona, 2001.
- Castellani C. Evidence for newborn screening for cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev* 2003;4:278-84.
- Castellany C, Macek M, Cassiman JJ, Duff A, Massie J, ten Kate LP et al. Benchmark for cystic fibrosis carrier screening: A European consensus document. *J Cyst Fibros* 2010; 9:165-78.
- Castellany C, Southern KW, Brownlee K, Dankert Roelse J, Duff A, Farrell M et al. European best practice guidelines for cystic fibrosis neonatal screening. *J Cyst Fibros* 2009; 8:153-73.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 2004. Disponible en: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5313a1.htm>
- Chatfield S, Owen G, Ryley HC. Neonatal screening for cystic fibrosis in Wales and the West Midlands: clinical assessment after 5 years of screening. *Arch Dis Child* 1991;66(1 Spec No.): 29-33.
- Cheillan D, Vercherat M, Chevalier-Porst F, Charcosset M, Rolland MO and Dorche C. False-positive results in neonatal screening for cystic fibrosis based on a three-stage protocol (IRT/DNA/IRT): Should we adjust IRT cut-off to ethnic origin? *J Inher Metabol Dis* 2005; 28(6): 813-8.
- Chillón M, Casals T, Mercier B, Bassas LI, Lissens W, Silber S, et al. Cystic fibrosis mutations in congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med* 1995; 332: 1475-80.

- Chu CS, Trapnell B, Murtagh J. Variable deletion of exon 9 coding sequences in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mRNA transcripts in normal bronchial epithelium. *EMBO J* 1991; 10: 1355-1363.
- Chu CS, Trapnell BC, Curristin S, Cuttieng GR, Crystal RG. Genetic basis of variable exon 9 skipping in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA. *Nat Genet* 1993; 3: 151-156.
- Ciske DJ, Haavisto A, Laxova A, Rock LZ, Farrell PM. Genetic counseling and neonatal screening for cystic fibrosis: an assessment of the communication process. *Pediatrics* 2001;107:699-705.
- Claustres M, Guittard C, Bozon D, Chevalier F, Verlingue C, Ferec C, et al. Spectrum of CFTR mutations in cystic fibrosis and in congenital absence of the vas deferens in France. *Hum Mutat* 2000;16:143-56.
- Clinical and Laboratory Standards Institute of EEUU 2011. CLSI Publishes New Guideline: Newborn Screening for Cystic Fibrosis (I/LA35-A) Posted on November 30, 2011 by CLSI. Marketing.
- Collazo T, Magariño C, Chavez R, Suardíaz B, Gispert S, Gómez M, et al. Frequency of "F508 Mutation and XV2C/KM19 Haplotypes in Cuba Cystic Fibrosis Families. *Hum Hered* 1995; 45: 55-7.
- Comeau AM, Accurso FJ, White TB, et al. Guidelines for implementation of cystic fibrosis newborn screening programs: Cystic Fibrosis Foundation workshop report. *Pediatrics*. 2007; 119(2). Available at: www.pediatrics.org/cgi/content/full/119/2/e495
- Comeau AM, Parad RB, Dorkin HL, Dovey M, Gerstle R, Haver K, et al. Optimizing cystic fibrosis newborn screening in heterogeneous populations with multiple-mutation testing. *Pediatrics* 2004;113:1573-81.
- Comeau AM, Parad RB, Dorkin HL, Dovey M, Gerstle R, Haver K. Population-based newborn screening for genetic disorders when multiple

mutation DNA testing is incorporated: a cystic fibrosis newborn screening model demonstrating increased sensitivity but more carrier detections. *Pediatrics*. 2004;113(6):1573-1581.

- Comisión de Estándares de la Sociedad Española de Neonatología CESEN.[consultado enero 2013]. Disponible en: <http://www.se.neonatal.es>

- Cortés E, Rizo MM, Aguilar MJ, Rizo J, Gil V. Maternal age as risk factor of prematurity in Spain: Mediterranean area. *Nutr Hosp* 2013; aceptado en prensa.

- Coto E, Bousoño C, Menéndez MJ, Cue , Toral JF, Benavides A, et al. Fibrosis quística en Asturias: una frecuencia elevada de la mutación delta F508. *Med Clin (Barc)*, 1994;103(18):681-3.

- Couriel J. Assessment of the child with recurrent chest infections. *Br Med Bull*. 2002;61:115-32.

- Cox K, Isenberg J, Osher AB, Dooley RR. The effect of cimetidine on maldigestion in cystic fibrosis. *J Pediatr* 1979; 94: 488-492.

- Crossley JR, Elliott RB, Smith PA. Dried-blood spot screening for cystic fibrosis in the newborn. *Lancet* 1979;1 (8114):472-4.

- Cystic Fibrosis Foundation. Newborn screening. Disponible en: <http://www.cff.org/AboutCF/Testing/NewbornScreening> (accessed noviembre 2012).

- Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium (CFGAC) Database <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>.

- Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. Worldwide survey of the DF508 mutation. Report from the Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. *Am J Hum Genet* 1990; 47: 354- 9. 18.

- D´Alessandro V, Rentería F, Borrajo G, Díez G, Prates S, Segal E. Función pulmonar en niños menores de 2 años con fibrosis quística (FQ) detectados

por pesquisa neonatal y por síntomas clínicos (D100). 4to Congreso Argentino de Neumonología Pediátrica - Sociedad Argentina de pediatría [en línea] 2005 [fecha de acceso 20 de abril de 2006]; 85.

- Dankert-Roelse JE, Mérelle ME. Review of outcomes of neonatal screening for cystic fibrosis versus non-screening in Europe. *J Pediatr* 2005;147(3Suppl):S15-20.

- Davidson DJ, Porteous DJ. The genetics of cystic fibrosis lung disease. *Thorax* 1998;53:389-397.

- Dequeker E, Cuppens H, Dodge J, Estivill X, Goossens M, et al. Recommendations for quality improvement in genetic testing for cystic fibrosis. European Concerted Action on Cystic Fibrosis. *Eur J Hum Genet*. 2000 Sep;8 Suppl 2:S2-24.

- Delgado F. "Correlación entre las patologías del embarazo y la edad de la gestante". Servicio de Obstetricia. Hospital San Roque de Gonnet. La Plata. *Revista de la Sociedad de Obstetricia y Ginecología en la Provincia de Buenos Aires*. Volumen 23, N° 132, 20:22, 1992.

- Des Georges M, Guittard C, Altieri JP, Templin C, Sarles J, Sarda P, et al. High heterogeneity of CFTR mutations and unexpected low incidence of cystic fibrosis in the Mediterranean France. *J Cyst Fibros* 2004;3:265-72.

- Dhondt JL, Farriaux JP. What do immunoreactive trypsin assays measure? *Screening* 1994;3(1):33-38.

- Dodge JA, Lewis PA, Stanton M, et al. Cystic fibrosis mortality and survival in the UK: 1947-2003. *Eur Respir J* 2007;29:522-6.

- Dodge JA. Cystic fibrosis should be added to diseases sought in all newborn babies. *BMJ* 1998;317:411-12.

- Dörk T, Macek M Jr, Mekus F, Tümmler B, Tzountzouris J, Casals T, et al. Characterization of a novel 21-kb deletion, CFTRdele2,3(21kb), in the CFTR

gene: a cystic fibrosis mutation of Slavic origin common in Central and East Europe. *Hum Genet* 2000; 106: 259-68.

- Duhamel JF, Travert G, Delmas P, Brouard J, Venezia R. Special features of the time related evolution in IRT blood levels in six out of seven newborns with Cystic fibrosis complicated by meconium ileus. In: Lawson D, ed. *Cystic fibrosis: horizons* Chichester, England: John Wiley, 1984:208.

- Dyce E, Fernández A, Avilés A. Aspectos clínicos y genéticos de la Fibrosis Quística. *Archivo Médico de Camagüey* 2001; 5(1). Disponible en: <http://www.amc.sld.cu/amc/2001/v5n1/370.htm>

- ENAC. Entidad Nacional de Acreditación. Guía sobre la participación en programas de intercomparaciones. G-ENAC. Madrid: ENAC; 2008.

- Escribano MA. Diagnóstico y tratamiento de la exacerbación infecciosa en la Fibrosis Quística. *Arch Bronconeumol*. 2000;36 (supl 9):525-32.

- Espada M, Dulín E. Procedimiento para la obtención de especímenes de sangre sobre papel de filtro en los Programas de Detección Precoz Neonatal de Errores Congénitos del Metabolismo. *Quim Clin* 2001; 20 (2) 81-88.

- Esplugas AE, Razón R, Ojea A, Servide N, Vera M. Evaluación nutricional, antropométrica y bioquímica, de pacientes afectos de fibrosis quística. *Rev Cubana Pediatr* [revista en la Internet]. 2008; 80(2): . Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75312008000200006&lng=es.

- Farrell PM, Kosorok MR, Laxova A, et al. Nutritional benefits of newborn screening for cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1997; 337(14):963-969.

- Farrell PM, Lai HJ, Li Z, et al. Evidence of improved outcomes with early diagnosis of cystic fibrosis through neonatal screening: enough is enough! *J Pediatr* 2005;147(3 Suppl):S30-6.

- Farrell PM, Li Z, Kosorok MR, et al. Bronchopulmonary disease in children with cystic fibrosis after early or delayed diagnosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168:1100-8.
- Farrell PM. Early diagnosis of cystic fibrosis can improve children's growth. *BMJ* 1998;317:1017.
- Farrell PM, Kosorok MR, Rock MJ, Laxova A, Zeng L, Lai HC, et al. Early diagnosis of cystic fibrosis through neonatal screening prevents severe malnutrition and improves long-term growth. *Pediatrics* 2001; 107(1), 1-13.
- Farriaux JP, Vidailhet M, Briard ML, et al (2003) Neonatal screening for cystic fibrosis: France rises to the challenge. *J Inherit Metab Dis* 26: 729-744.
- Ferkol T, Rosenfeld M, Milla CE. Cystic Fibrosis Pulmonary exacerbations. *J Pediatr* 2006;148(2):259-64.
- Foskett JK. CIC and CFTR chloride channel gating. *An Rev Physiol* 1998; 60:689-717.
- Friedman, KJ, Heim, RA, Knowles, MR. Rapid characterization of the variable length polythymidine tract in the cystic fibrosis (CFTR) gene: association of the 5T allele with selected CFTR mutations and its incidence in atypical sinopulmonary disease. *Hum Mutat* 1997; 10: 108-11.
- García N MD. Avances en Fibrosis Quística. *Rev Esp Pediat* 1999; 55(328): 299-310.
- Gartner S, Cobos N, Maya A, Casals T, Séculi JL, Asensio O, et al. Neonatal screening for cystic fibrosis in Cataluña, Spain. *Pediatr Pulmonol* 2003;25 Suppl:221.
- Gartner S, Cystic Fibrosis Newborn Screening in Spain: Lessons learned during a decade in Catalonia and progress/Challenges in other regions. 33rd European Cystic Fibrosis Conference. Valencia 2010.

- Gasparini P, Nunes V, Savoia A, Dognini M, Morral N et al. The search for south European cystic fibrosis mutations: identification of two new mutations, four variants, and intronic sequences. *Genomics* 1991; 10: 193-200.

- Gella FJ, Canalías F, Izquierdo S, Martínez V, Sánchez M. Recomendaciones para la estimación de la incertidumbre de medida en el laboratorio clínico. *Documentos de la SEQC* 2009; 27-9.

- Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003. Oct 15;168(8):918-51.

- Gibson RS. Principles of nutritional assessment. NY: Orford University Press. 1990:219-23.

- Gil JA, Amo R, Rosell A, Figuerola J, Heine D, Román JM. Resultados del programa de detección precoz de FQ en las Islas Baleares. *Pediátrika* 2003;23 Supl C1:27.

- Gómez-Llorente MA, Suárez A, Gómez-Llorente C, Muñoz A, Arauzo M, Antúnez A, et al. Analysis of 31 CFTR mutations in 55 families from the South of Spain. *Early Hum Dev* 2001;65(Suppl):S161-4.

- Gregg RG, Simantel A, Farrell PM, et al. Newborn screening for cystic fibrosis in Wisconsin: comparison of biochemical and molecular methods. *Pediatrics* 1997;99(6):819-824.

- Gregg RG, Wilfond BS, Farrell PM, Laxova A, Hassemer D, Mischler EH. Application of DNA analysis in a population screening program for neonatal diagnosis of cystic fibrosis: comparison of screening protocols. *Am J Hum Genet.* 1993; 52(3):616-62.

- Grody WW, Cutting GR, Klinger KW, Richards CS, Watson MS, Desnick RJ. Laboratory standards and guidelines for population- based cystic fibrosis carrier screening. *Genet Med.* 2001; 3(2):149-154.

- Groman JD, Hefferon TW, Casals T, Bassas L, Estivill X, Des Georges M, et al. Variation in a repeat sequence determines whether a common variant of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene is pathogenic or benign. *Am J Hum Genet* 2004; 74(1): 176-9.
- Grosse SD, Boyle CA, Botkin JR, Comeau AM, Kharrazi M, Rosenfeld M, et al. Newborn screening for cystic fibrosis: evaluation of benefits and risks and recommendations for state newborn screening programs. *MMWR Recomm Rep.* 2004;53(RR-13):1-36.
- Grosse SD, Rosenfeld M, Devine OJ, et al. Potential impact of newborn screening for cystic fibrosis on child survival: a systematic review and analysis. *J Pediatr* 2006;149:362-6.
- Gupta J, Linsdell P. Extent of the selectivity filtered conferred by the sixth transmembrane region in the CFTR chloride channel pore. *Mol Memb Biol* 2003; 20:45-52.
- Haardt M, Benharouga M, Lechardeur D, Kartner N, Lukacs GL. C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis. A novel class of mutation. *J Biol Chem* 1999; 274: 21873-7.
- Hammond KB, Abman SH, Sokol RJ, Accurso FJ. Efficacy of statewide neonatal screening for cystic fibrosis by assay of trypsinogen concentrations. *New Engl J Med.* 1991;325(11): 769-774.
- Hawkins RC. Effect of variability in assay bias and imprecision on external quality assessment bias and imprecision measures. *Ann Clin Biochem* 2006; 43:507-9.
- Hay Jr W.W. Strategies for feeding the preterm infant *Neonatology*, 2008; 94 (4): 245-254.

- He D, Wang M, Chen X, et al. Ethnic differences in distribution of serum prostate-specific antigen: a study in a healthy Chinese male population. *Urology* 2004; 63: 722-726.
- Heald AH, Ivison F, Anderson SG, et al. Significant ethnic variation in total and free testosterone concentration. *Clin Endocrinol* 2003; 58: 262-266.
- Heeley AF and Bangert SK. The neonatal detection of cystic fibrosis by measurement of immunoreactive trypsin in blood. *Ann Clin Biochem* 1992; 29:361-376.
- Hiestad DM, Sorcher EJ, Huang Z, Wang Y, haley BE. Use of 2-N3ATP to identify the site of ATP interaction on nucleotide binding domain-2 from cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Pediatr Pulmunol* 1994; 10:42.
- INE. (2010) .Instituto Nacional de Estadística. Madrid. (Actualizado en septiembre de 2010; consultado junio 2012.)Disponible en: <http://www.ine.es/>.
- INE. (2010).Madrid: Instituto Nacional de Estadística. Movimiento natural de la población.2010. Disponible en:<http://www.ine.es/jaxi/tabla.do?path=/t20/e301/provi/>
- Kilinc MO, Ninis VN, Tolun A, Estivill X, Casals T, Savov A, et al. Genotype-phenotype correlation in three homozygotes for the cystic fibrosis mutation 2183AA->G shows a severe phenotype. *J Med Genet* 2000; 37: 307-9.
- Kloosterboer M, Hoffman G, Rock M, Gershan W, Laxova A, Li Z and Farrell PhM. Clarification of Laboratory and Clinical Variables That Influence Cystic Fibrosis Newborn Screening With Initial Analysis of Immunoreactive Trypsinogen. *Pediatrics* 2009;123:e338 DOI: 10.1542/peds.2008-1681

- Kopito RR. Biosynthesis and degradation of CFTR. *Physiol Rev* 1999; 79:suppl. 1 S167-S173.
- Kramm ER, Crane MM, Sirkin MG, Brown ML. A Cystic Fibrosis pilot survey in three England States. *Am J Public Health*. 1962;52:2041-57.
- Lai HC, Cheng Y, Farrell PM. The survival advantage of patients with cystic fibrosis diagnosed through neonatal screening: evidence from the United States. Cystic Fibrosis Foundation registry data. *J Pediatr* 2005;147(3 Suppl):S57-63.
- Lapey A, Kattwinkel J, DiSanAgnese PA. Steatorrhea and azotorrhea and their relation to growth and nutrition in adolescents and young adults with cystic fibrosis. *J Pediatr* 1974; 84: 328-334.
- Larriba S, Bassas LI, Giménez J, Ramos MD, Segura A, Nunes V, et al. Testicular CFTR splice variants in patients with congenital absence of vas deferens patients. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 1739-44.
- Lewis PA. The epidemiology of cystic fibrosis. In: Hodson M, Geddes DM, editors. *Cystic fibrosis*, 2nd Edition. Publ Arnold; 2000. p. 13- 25.
- Loo MA, Jensen TJ, Cui L, Hou Y, Chang XB, Riordan JR. Perturbation of Hsp90 interaction with nascent CFTR prevents its maturation and accelerates its degradation by the proteasome. *EMBO J* 1998; 17: 6879-6887.
- Luna MC, Granados PA, Olek K, Pivetta OH. Cystic Fibrosis in Argentina: The frequency of the DF508 mutation. *Human Genetic* 1997; 97: 314.
- Luzardo G, Aznarez I, Crispino B, Mimbacas A, Martínez L, Poggio R, Zielenski J, Tsui L-C and Cardoso H. Cystic fibrosis in Uruguay. *Genet Mol Res* 2002; 1 (1): 32-38.

- Macek M Jr, Mackova A, Hamoosh A, Hilman BC, Selden RF 40, Luccote G, et al. Identification of common cystic fibrosis mutations in African-Americans with cystic fibrosis increases the detection rate to 75 %. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 1122-1127.
- Madan A, Holland S, Humbert JE, et al. Racial differences in birth weight of term infants in a northern California population. *J Perinatal* 2002; 22: 230-235.
- Mak V, Jarve KA, Zielenski J, Durie P and Stui LC. Higher proportion of intact exon 9 mRNA in nasal epithelium compared with was deferens. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 2099-2107.
- Manero H. Variables que pueden influir en el cribado neonatal de hiperfenilalaninemias y fenilcetonuria. Tesis Doctoral 2012. Universidad Miguel Hernández.
- Mansoura MK, Smith SS, Choi AD, Richards NW, Strong TV, et al. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Anion Binding as a Probe of the Pore. *Biophys J* 1998; 74(3): 1320-32.
- Maróstica PJ, Raskin S, Abreu FA. Analysis of DF508 mutation in a Brazilian cystic fibrosis populations: comparison of pulmonary status of homozygotes with other patients. *Braz J Med Biol Res* 1998; 3(4): 529-532.
- Martínez C, Escribano A, Núñez GF, García Maset L, Luján J, Martínez RL. Intervención nutricional en niños y adolescentes con fibrosis quística. Relación con la función pulmonar. *Nutr Hosp.* 2005;20(3)182-8.
- McCaman, E. Robins; Fluorometric method for the determination of phenylalanine in serum. *J.Lab. & Clin. Med.*, 59 (1962), p. 885. ... *Anal. Biochem.*, 3 (1962), p. 131.
- McCready R. Phenylketonuria screening program. *N Engl J Med.* 1963;269(1):52-56.

- McKay KO, Waters DL, Gaskin KJ. The influence of newborn screening for cystic fibrosis on pulmonary outcomes in New South Wales. *J Pediatr* 2005;147(3 Suppl):S47-50.
- McKone EF, Emerson SS, Edwards KL, Aitken ML. Effect of genotype on phenotype and mortality in cystic fibrosis: a retrospective cohort study. *The Lancet* 2003; 361(9370): 1671-6.
- Mendoza LA, Arias M, Mendoza LI. Hijo de madre adolescente: riesgos, morbilidad y mortalidad neonatal. *Rev Chil Obstet Ginecol* 2012; 7(5): 375-382.
- Mérelle ME, Huisman J, van der Vecht AA, et al. Early versus late diagnosis: psychological impact on parents of children with cystic fibrosis. *Pediatrics* 2003;111:346-50.
- Mérelle ME, Nagelkerke AF, Lees CM, Dezateux C. Cribaje (screening) de la enfermedad fibroquística en el recién nacido (Revisión Cochrane traducida). En: *La Biblioteca Cochrane Plus*, 2008 Número 4. Oxford: Update Software Ltd. Disponible en <http://www.updatesoftware.com> (Traducida de *The Cochrane Library*, 2008 Issue 3. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.).
- Mérelle ME, Nagelkerke AF, Lees CM, et al. Newborn screening for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2001;(3):CD001402.
- Merewood A, Brooks D, Bauchner H, MacAuley L, Mehta S D, Maternal birthplace and Breastfeeding initiation among term and preterm infants a statewide assessment for Massachussets. *Pediatrics* 206; 118:e 1048-1054,dol:10.1542/peds. 2005-2637.
- Molina-Teran A, Hilliard TN, Saglani S, Haxby E, Scallan M, Bush A. Davies JC. Safety of endobronchial biopsy in children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2006; 41(11): 1021–1024.

- Morales MM, Capella MAM, Lopez AG. Structure and function of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Braz J Med Biol Res* 1999; 32:1021-1028.
- Morral N, Bertranpetit J, Estivill X, Nunes V, Casals T, Giménez J, et al. The origin of the major cystic fibrosis mutation (delta F508) in European populations. *Nat Genet* 1994; 7: 169-75.
- Morral N, Nunes V, Casals T, Chillón M, Giménez J, Bertranpetit J, Estivill X. Microsatellite haplotypes for cystic fibrosis: mutation frameworks and evolutionary tracers. *Hum Mol Genet* 1993; 2:1015-1022.
- Morrison S, Dodge JA, Cole TJ. Height and weight in cystic fibrosis: a cross sectional study. *Arch Dis Child* 1997; 77:497-500.
- Murray J, Cuckle H, Taylor G, Littwood J, Hewison J. Screening for cystic fibrosis. *Health Technol Assess.* 1999;3(8):1-104.
- Nakao Y, Moji K, Honda S, Oishi K. Initiation of breastfeeding within 120 minutes after birth is associated with breastfeeding at four months among Japanese women: A self-administered questionnaire survey. In *Breastfeeding J.* 2008; 3:1. doi: 10.1186/1746-4358-3-1.
- Navarro HM, Kolbach R, Repetto L, Guiraldes C, Harris D, Foradori C, et al. Correlación genotipo-fenotipo de un grupo de pacientes con fibrosis quística. *Rev Med Chile* 2002; 130(5):475-81.
- ONU (2009). Population Division of the Department of Economic and Social Affairs of the United Nations. *World population prospects: the 2008 revision.* (Actualizado 11/3/2009; consultado 30/6/2010.) Disponible en: <http://esa.un.org/unpp>.
- Orphanet [Internet]. Consultado Enero 2013. Disponible en: http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search_Simple.php?Ing=ES
- Padoa C, Goldman A, Jenkins T, Ramsay M. Cystic fibrosis carrier frequencies in populations of African origin. *J Med Genet* 1999; 36: 41-44.

- Padoan R, Genoni S, Moretti E, Seia M, Giunta A, Corbetta C. Genetic and clinical features of false-negative infants in a neonatal screening programme for cystic fibrosis. *Acta Paediatr.* 2002;91(1):82-87.
- Paz-Valiñas L, García-Vega FJ. Cribado neonatal de la fibrosis quística. Serie *Avaliación de Tecnoloxías. Informes de avaliación: INF2004/02.* Santiago de Compostela: Servicio Galego de Saúde, Axencia de Avaliación de Tecnoloxías Sanitarias de Galicia, Avalia-t; 2004.
- Pearson H. Human genetics: One gene, twenty years. *Nature* 2009; 460: 164-169.
- Pencharz PB, Hill R, Archiblad E, and cols. Energy needs and nutritional rehabilitation in undernourished adolescents and young adults patients with cystic fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1984; 3(Suppl):S141-S53.
- Pilewski JM, Frizzell RA. Role of CFTR in airway disease. *Physiol Rev* 1999;79(Suppl 1):S215-55.
- Priest FJ, Nevin NC (1991) False positive results with immunoreactive trypsinogen screening for cystic fibrosis owing to trisomy 13. *J Med Genet* 28: 575-576.
- Protiempo, 2013. www.protiempo.es/tiempo/wisconsin-dells/estados-unidos/uswi0756),
- Ratjen F, Döring G. Cystic fibrosis. *Lancet* 2003; Feb 22;361(9358):681-9.
- Ravine D, Francis RI, Banks DM. Non-specific elevation of immunoreactive trypsinogen in sick infants. *Eur J Pediatr* 1993; 152: 348-349.
- Ravnik-Glavac M, Atkinson A, Glavac D, Dean M. DHPLC screening of cystic fibrosis gene mutations. *Hum Mutat* 2002; 19: 374-83.
- Ravnik-Glavač, M., Atkinson, A., Glavač, D., & Dean, M. (2002). DHPLC screening of cystic fibrosis gene mutations. *Human mutation*, 19(4), 374-383.

- Regan PT, Malagelada JR, DiMagno EP, Glanzmann SL, Go VLW. Comparative effects of antiacids, cimetidene and enteric coating on the therapeutic response to oral enzymes in severe pancreatic insufficiency. *N Engl J Med* 1977; 297: 854-858.
- Rich DP, Anderson MP, Gregory RJ, Cheng SH, Jefferson DM, et al. Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Nature* 1990; 347: 358 - 363.
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA . *Science* 1989; 245:1066-73.
- Ríos J, Orellana O, Aspillaga M, Avedano I, Largo I y Riveros N. CFTR mutations in Chilean cystic fibrosis patients. *Hum Genet* 1994; 94: 291-294
- Rizo Baeza J. Edad y origen de la madre como factores de riesgo de prematuridad. Tesis Doctoral 2012. Universidad de Alicante.
- Rock MJ, Hoffman G, Laessig RH, Kopish G, Listheim T, Farrell PM. Newborn screening for cystic fibrosis in Wisconsin: nine year experience with routine trypsinogen/DNA testing. *J Pediatr.* 2005;147(3 suppl):S73-S77.
- Rock MJ, Mischler EH, Farrell PM, Bruns WT, Hassemer DJ, Laessig RH. Immunoreactive trypsinogen screening for cystic fibrosis: characterization of infants with a false positive screening test. *Pediatr Pulmonol.* 1989;6(1):42-48.
- Rock MJ, Mischler EH, Farrell PM, Wei LJ, Bruns WT, Hassemer DJ, et al. Newborn screening for cystic fibrosis is complicated by age-related decline in immunoreactive trypsinogen levels. *Pediatrics* 1990; 85:1001-7.
- Rojo CM. Fibrosis quística o mucoviscidosis. En De la Torre, ME, Pelayo GE, eds. *Pediatría*. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2007. Pp.1012-55.

- Roland K, Mirkovik B, Nersesian R, Myers A, Saiki R and Bauer K. Survey of CF mutations in the clinical laboratory. *BMC Clin Pathol* 2002; 2: 4.
- Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science*. 1989 Sep 8;245(4922):1059–1065.
- Rosenecker J, Elchier I, Kuhn L, Harmshk, Vonder Hardt J. Genetic determination of diabetes mellitus in patients with cystic Fibrosis. *J Pediatr*. 1995;127:441-43.
- Rosenstein BJ, Cutting GR. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. *J Pediatr* 1998; 132: 589-595.
- Ross LF. Newborn screening for cystic fibrosis: a lesson in public health disparities. *J Pediatr* 2008;153(3):308-313.
- Roy CC, Weber AM, Lepage G, Smith L, Levy E. Digestive and absorptive phase anomalies associated with the exocrine pancreatic insufficiency of cystic fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1988; 7 (Supl 1): 1-7.
- Sáenz González P. Nuevo modelo de alta precoz para el niño pre-término: impacto sobre el bienestar psicológico de los padres. Calidad y costes asistenciales. Tesis doctoral 2008. UHM . pp 21-22.
- Scotet V, Audre 'zet MP, Roussey M, et al. Inmunorreactiva tripsina / DNA cribado neonatal para la fibrosis quística: si el R117H variante se incluirá en los paneles de mutación CFTR? *Pediatrics* 2006; 118 (5).
- Serra M. Cribaje neonatal de la fibrosis quística. *Breus (Bar)*. AATM BR01;2000:1-20.
- Sontag MK, Hammond KB, Zielenski J, Wagener JS, Accurso FJ. Two-tiered immunoreactive trypsinogen-based newborn screening for cystic fibrosis in Colorado: screening efficacy and diagnostic outcomes. *J Pediatr* 2005;147(3 Suppl):S83-S88.

- Steinberg AG, Brown DC. On the incidence of cystic fibrosis of the pancreas. *Am J Human Genet*, 1960; 12:416-24.
- Stewart AK, Hanna M, Corey, Zielenski J, Tsui LC, Durie PB, et. al. Glucose tolerance in adults with CF: phenotype/genotype correlations. *Pediatr Pulmonol*. 1997;8 (suppl 14):361-13.
- Sukhu K, Poovalingam V, Mahomed R, Giangrande PL. Ethnic variation in von Willebrand factor levels can influence the diagnosis of von Willebrand disease. *Clin Lab Haematol* 2003; 25: 247-249.
- Tellería JJ, Alonso MJ, Calvo C, Alonso M, Blanco A, Spectrum of CFTF mutations in the Middle North of Spain and identification of a novel mutation (1342G-A). *Mutation in brief* nº 252. Online. *Hum Mutat* 1999;14(1):89.
- Tellería JJ, Alonso MJ, Garrote JA, Fernández I, Blanco A. Neonatal screening for cystic fibrosis. *An Esp Pediatr* 2002; 57:60-5.
- Tellería Orriols JJ, Alonso Ramos MJ, Garrote Adrados JA, Fernández Carvajal I y Blanco Quirós A. Cribado neonatal de fibrosis quística. 1999. Área de Pediatría. Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM). Universidad de Valladolid/CSIC. España.
- Teng H, Jorrisen M, Poppel H, Legius E, Cassiman JJ and Cuppens H. Increased proportion of exon 9 alternatively spliced CFTR transcripts in vas deferens compared with nasal epithelial cells. *Hum Mol Genet*. 1997; 6: 85-90.
- The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium (CFGAC). Population variation of common CF mutations. *Hum Mutat* 1994; 4: 167-77.
- Trave T, Maya M, Vilaplana E. Repercusión neonatal del embarazo en adolescentes. *An Esp Pediatr* 1989;3L(4):368-71.
- Tutiempo, 2013. www.tutiempo.net › Clima › Europa › España

Vankeerberghen A , Wei L , Teng H , Jaspers M , Cassiman JJ , Nilius B , Cuppens H. Characterization of mutations located in exon 18 of the CFTR gene. FEBS Lett. 16 de octubre de 1998; 437 (1-2).ç

- Vankeerberghen A, Wei L, Jaspers M, Cassiman JJ, Nilius B, Cuppens H. Characterization of 19 disease-associated missense mutations in the regulatory domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Hum Molec Gen 1988; 7(11), 1761-1769.

- Vernooij-van Langen AMM, Loeber G, Elvers B, Triepels RH, Roefs J, Gille JJ, et al. The influence of sex, gestational age, birth weight, blood transfusion, and timing of the heel prick on the pancreatitis-associated protein concentration in newborn screening for cystic fibrosis. J Inherit Metab Dis 2013; 36(1):147-54.

- Vieira TO, Vieira GO, Giugliani ER, Mendes CM, Martins CC, Silva LR. Determinants of breastfeeding initiation within the first hour of life in a Brazilian population: cross-sectional study. BMC Public Health. 2010 Dec 9; 10:760.

- Villalobos C, Rojas A, Villareal E, Cantú JM, Sánchez FJ, Saiki RK, Barrera HA. Análisis of 16 cystic fibrosis mutations in Mexican patients. Am J Med Genet 1997; 69: 4380-4382.

- Wald NJ, Morris JK. Neonatal screening for cystic fibrosis. BMJ 1998;316:404-5.

- Walker M. Breastfeeding the late preterm infant. J Obstet Gynecol Neonatal Nurs 2008 Nov-Dec; 37(6):692-701.

- Wang X, Kim J, McWilliams R, et al. Increased prevalence of chronic rhinosinusitis in carriers of a cystic fibrosis mutation. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 2005;131:237-40.

- Watson KE. Plasma lipoprotein concentrations in ethnic populations. Curr Cardiol Rep 2003; 5: 483-487.

- Watson MS, Cutting GR, Desnick RJ, et al. Cystic fibrosis population carrier screening: 2004 revision of American College of Medical Genetics mutation panel. *Am J Med Genet* 2004;6:387-91.
- Weiss FU, Simon P, Bogdanova N, et al. Complete cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene sequencing in patients with idiopathic chronic pancreatitis and controls. *Gut* 2005;54:1456-60.
- Wheeler PG, Smith R, Dorkin H, Parad RB, Comeau AM, Bianchi DW. Genetic counseling after implementation of statewide cystic fibrosis newborn screening: Two years' experience in one medical center. *Genet Med* 2001;3:411-5.
- Wilcken B, Wiley V. Newborn screening methods for cystic fibrosis. *Paediatr. Respir. Rev.* 2003; 4: 272-7.
- Wilcken B. Newborn screening for cystic fibrosis: techniques and strategies. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30: 537-43.
- Wilcken B. Newborn screening for cystic fibrosis: Its evolution and a review of the current situation. *Screening* 1993; 2: 43-62.
- Wilfond BS, Parad RB, Fost N. Balancing benefits and risks for cystic fibrosis newborn screening: implications for policy decisions. *J Pediatr* 2005;147(3 Suppl):S109-13.
- Wilschanski M, Zielenski J, Markiewicz D, tsui LT, Corey M, Levison H, Durie P. Correlation of sweat chloride concentration with classes of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations. *J Pediatric* 1995; 127: 705-710.
- Wilson DC, Leslie H, Edgar JD, et al. Neonatal infection does not affect the immunoreactive trypsinogen screening test for cystic fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1994; 19: 97-99.
- www.cff.org/UploadedFiles/research/ClinicalResearch/2007-Patient-Registry-Report.pdf.

- Ziedalski TM, Kao PN, Henig NR, et al. Prospective analysis of cystic fibrosis transmembrane regulator mutations in adults with bronchiectasis or pulmonary nontuberculous mycobacterial infection. *Chest* 2006;130:995-1002.

- Zielenski J, Tsui LC. Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. *Annu Rev Genet* 1995;29:777-807.



10/ ANEXOS

**Variables condicionantes en el cribado neonatal de fibrosis quística mediante
tripsina inmunorreactiva**



PNT-CN- 01
Edició 1

**SERVICIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS
DEPARTAMENTO DE SALUD DE ALICANTE
HOSPITAL GENERAL**
Recepción de muestras, identificación
y registro informático

- 1. OBJETO**
- 2. ALCANCE**
- 3. REFERENCIAS Y DEFINICIONES**
- 4. DESARROLLO**
- 5. RESPONSABILIDADES**
- 6. FORMATOS**

1. Objeto

El objeto del presente documento es describir las actividades desarrolladas por el LABORATORIO de ANÁLISIS CLÍNICOS DEL HOSPITAL GENERAL DE ALICANTE para definir el proceso que se sigue para la recepción de las muestras de cribado neonatal y el registro de la petición.

2. Alcance

Describir las actividades empleadas en el LABORATORIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS DEL HOSPITAL GENERAL DE ALICANTE para la recepción y registro de todas las muestras para Cribado Neonatal de los recién nacidos de la Provincia de Alicante remitidas por los hospitales, centros de salud de la misma o por los representantes de los recién nacidos.

3. Referencias y definiciones

- UNE-EN-ISO 9001:2008: Sistemas de Gestión de la Calidad (SGC) - Requisitos.
- UNE-EN-ISO 9000:2000: SGC - Fundamentos y Vocabulario.
- UNE-EN-ISO 9004:2000: SGC - Guía de la Mejora Continua.
- Decreto 108/2000 para la Autorización de los Laboratorios Clínicos.
- Manual de la Calidad
- Protocolos de Cribado Neonatal en vigor de la Dirección de Salud Pública de la Consellería de Sanidad.
- Documento Calidad Preanalítica: “Procedimiento para la obtención y recogida de especímenes de sangre sobre papel de filtro en los Programas de Detección Precoz Neonatal de Errores Congénitos del Metabolismo”. M. Espada. E. Dulín. Química Clínica 2001; 20(2) 81-88.

4. Desarrollo

4.1. Recepción y control de la calidad de las muestras.

Las fases previas de recogida de muestras y fichas con los datos de filiación del recién nacido, así como el envío a la Sección están especificados en la documentación que se adjunta y que es emitida por la Consellería de Sanidad de la Comunidad Valenciana.

La recepción de las muestras de sangre desecada impregnada en papel se realiza sobre una mesa despejada, en la cual se van abriendo los sobres de las muestras y las fichas, comprobándose la recepción de cada muestra con los listados remitidos, éstos son fechados y firmados si hay conformidad.

Si existen errores, omisiones o falta de muestras se comunica inmediatamente la incidencia por teléfono al centro de envío y se registra en la ficha informatizada del recién nacido en MetaB.

Se codifican las muestras y las fichas del niño con la fecha del día de recepción y un número correlativo iniciado en 1.

Se separan las muestras de HIPOTIROIDISMO y ANEMIA FALCIFORME (fichas y papel de filtro con distintivo color verde, en documentos referidos) de las muestras para HIPERFENILALANINEMIAS y FIBROSIS QUISTICA (ficha y papel de filtro con distintivo color rojo, en documentos referidos).

Se anotan en la ficha del recién nacido en MetaB aquellas muestras que son insuficientes, deficientes o incluso sin sangre impregnada (Documento Calidad Preanalítica).

Se llama telefónicamente a los padres o tutores de los niños con muestras deficientes para que remitan una nueva muestra, indicándoles el centro más cercano al que pueden acudir. Si no hay teléfono consignado se envía carta con esta misma finalidad.

Se registra en la ficha informatizada del recién nacido en MetaB.

Las fichas pasan a su registro informático y archivo, y las muestras se guardan en cajas herméticas en la cámara frigorífica (BG-5) hasta su procesamiento y durante un periodo de, al menos, 1 año. Su conservación y uso posterior está descrito el PNT-CN-05.

Se aceptarán todas las muestras en las que el papel de filtro este impregnado de sangre por los dos lados en cantidad suficiente para poder extraer un disco totalmente impregnado, con el taladro de muestras. Se rechazarán las que no cumplan este requisito. También se rechazarán aquellas muestras de niños que ya tengan las pruebas realizadas

4.2. Registro informático

Se utiliza para todo el proceso del cribado neonatal el Programa de la Consellería de Sanidad “MetaB”, al que se accede mediante un password personal.

El sistema informático está diseñado para permitir a todos los usuarios entrar en los campos de introducción de datos del recién nacido y muestras, no así en el de resultados, validación de los mismos e informes a los que únicamente tiene acceso el personal facultativo.

Se introduce el número SIP del recién nacido o lectura del número de referencia barrado de la ficha, que es único y común a los dos volantes posibles del mismo niño.

En el caso de que éste no sea reconocido, se introduce el nombre y apellidos del niño, cuidando la duplicidad de niños con los mismos nombres y apellidos y diferenciándolos mediante el día de nacimiento. Después se introducen todos los demás datos presentes en las fichas y la muestra.

Debido a que el sistema de numeración de la muestra en el programa no permite la misma numeración correlativa para segundas muestras de una misma determinación en el mismo niño, el sistema de informatización de segundas muestras (por deficiente la primera, resultados dudosos, etc.) se realiza mediante los dígitos de día de recepción, mes, dos dígitos del año seguido por el número asignado en la recepción (ddmmaanºref). Esta numeración deberá de tenerse en cuenta para la introducción informática de los resultados de las mismas.

4.3. Conservación de fichas y soporte informático.

Las fichas, por su contenido en datos personales, se guardarán en el laboratorio de forma controlada, archivándose en las estanterías del laboratorio al menos durante cinco años, y bajo las condiciones de seguridad de todo el Laboratorio General. Su destrucción se efectuará de forma que no puedan ser identificados ni recogidos los datos de las mismas, no siendo necesaria su conservación después de transcurrido dicho tiempo al estar los datos archivados en soporte informático.

La destrucción se efectuará siempre de más antigua a actual, por periodos de años completos.

5. Responsabilidades

Es responsabilidad del personal administrativo y técnico de la sección la realización de la recepción, control de las muestras y registro informático según este documento.

La asignación de password es función del Facultativo Responsable de la Sección que lo solicita a los Servicios Informáticos de la Consellería de Sanidad y es responsabilidad del usuario su utilización personal.

Es responsabilidad del Facultativo la supervisión y el cumplimiento de éste procedimiento.

6. Formatos

- Programa de la Consellería de Sanitat “MetaB”



PNT-CN-10
Edició 0

**SERVICIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS
DEPARTAMENTO DE SALUD DE ALICANTE
HOSPITAL GENERAL**

**Determinación de TSH y TIR en sangre desecada
sobre papel en el Autodelfia**

- 1. OBJETO**
- 2. ALCANCE**
- 3. REFERENCIAS Y DEFINICIONES**
- 4. DESARROLLO**
- 5. RESPONSABILIDADES**
- 6. FORMATOS/ESPECIFICACIONES**
- 7. INDICADORES**
- 8. FORMATOS**
- 9. ANEXOS**

5. Objeto

Describir las actividades desarrolladas por el LABORATORIO de ANÁLISIS CLÍNICOS DEL HOSPITAL GENERAL DE ALICANTE para realizar la determinación cuantitativa de tirotropina (TSH) y tripsina inmunoreactiva (TIR) en especímenes de sangre desecada en papel de filtro.

6. Alcance

Describir las actividades empleadas en el LABORATORIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS DEL HOSPITAL GENERAL DE ALICANTE para realizar la determinación de TSH y TIR en especímenes de sangre neonatal recogidos sobre papel de filtro. Estas determinaciones se utilizan para el cribado neonatal de hipotiroidismo congénito y fibrosis quística respectivamente.

7. Referencias y definiciones

- UNE-EN-ISO 9001:2008: Sistemas de Gestión de la Calidad (SGC) - Requisitos.
- UNE-EN-ISO 9000:2000: SGC - Fundamentos y Vocabulario.
- UNE-EN-ISO 9004:2000: SGC - Guía de la Mejora Continua.
- Decreto 108/2000 para la Autorización de los Laboratorios Clínicos.
- Manual de la Calidad
- Manuales incluidos en los kits de TSH y TIR

8. Desarrollo

4.1. Principios del método

Los ensayos están basados en la técnica de inmunofluorescencia doble en fase sólida, técnica directa del “sándwich”. Se basan en la reacción simultánea del analito: TSH o TIR con los anticuerpos monoclonales fijados en la placa, y con los anticuerpos monoclonales marcados con europio del trazador. Posteriormente y en presencia de una solución intensificadora se realiza la lectura de la fluorescencia del quelato formado por los iones de europio que es proporcional a la concentración de analito: TSH o TIR.

4.2. Características analíticas del método.

En especímenes de sangre recogidos sobre papel de filtro:

TSH

El intervalo de trabajo está entre 1,5-300 $\mu\text{U/ml}$ de tirotrópina en sangre.

El valor de referencia discriminante se ha establecido en 10 $\mu\text{U/ml}$ en sangre, por consenso internacional y de la Asociación Española de Cribado Neonatal (AECNE).

Para una mayor seguridad, se repetirá el análisis de toda aquella muestra que tenga un valor entre 7,5-10 $\mu\text{U/ml}$.

Los resultados de precisión y límite de determinación se encuentran en los informes de validación suministrados por la casa comercial y son comprobados continuamente en el laboratorio.

TIR

El intervalo de trabajo está entre 5 y 500 ng/ml de tripsina inmunoreactiva en sangre.

El protocolo de cribado seguido por la Comunidad Valenciana es el TIR/ADN/TIR para el cual se ha establecido como valor discriminante de la primera determinación de TIR 65 ng/ml, a partir de este valor, se realiza la determinación de mutaciones en la misma muestra, realizada en el laboratorio de genética del Hospital La Fé de Valencia, si aparece alguna mutación se comunica al centro de seguimiento, si no aparecen mutaciones, se realiza una segunda determinación de TIR en una nueva muestra en papel, que será normal si es inferior a 100 ng/ml, si la TIR en esta segunda muestra es superior 100 ng/dl, se comunica al centro de seguimiento y a los padres. tal como se describe en el Programa de cribado de enfermedades congénitas de la Comunidad Valenciana.

Los resultados de precisión y límite de determinación se encuentran en los informes de validación suministrados por la casa comercial y son comprobados continuamente en el laboratorio

4.3. Aparatos

- Autodelfia

4.4. Reactivos, Calibradores y Controles

Los reactivos son específicos y exclusivos para la realización del análisis de la TSH O TIR neonatal y son suministrados por Perkin Elmer Life Sciences, bajo la forma comercial de Kit Autodelfia Neonatal hTSH y Kit Autodelfia Neonatal IRT.

- **Reactivos**

TSH

- Solución madre de trazador anti-hTSH-Eu (aprox. 20ug/ml), 6 viales de 1.1 ml. Conservar en la Cámara Frigorífica BG-5 a 2-8°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial.
- Tampón de ensayo Neo h TSH, 3 frascos de 120ml preparado para su uso. Conservar en la Cámara Frigorífica a 2-8°C, conservar en la Cámara Frigorífica BG-5 a 2-8°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial.
- Tiras de microtitulación anti hTSH 12x8x12 pocillos recubiertos de anticuerpo dirigidos frente a un sitio específico de la subunidad beta de la hTSH, 12 placas. Conservar en la Cámara Frigorífica BG-5 a 2-8°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Etiquetas de código de barras para el cassette de reactivo, 3 unidades, los códigos son específicos de lote.
- Etiquetas adicionales de código de barras para las placas, 3 unidades, específicas de lote.

TIR

- Solución madre de trazador anti-IRT-Eu (aprox. 50 ug/ml), 6 viales de 2.4 ml. Conservar en la Cámara Frigorífica BG-5 a 2-8°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial.
- Tampón de ensayo IRT, 3 frascos de 120ml preparado para su uso. Conservar en la Cámara Frigorífica a 2-8°C, conservar en la Cámara Frigorífica BG-5 a 2-8°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial.
- Tiras de microtitulación anti IRT 12x8x12 pocillos recubiertos de anticuerpo monoclonal de ratón dirigidos frente a un sitio específico de la

molécula de IRT, 12 placas. Conservar en la Cámara Frigorífica BG-5 a 2-8°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

- Etiquetas de código de barras para el cassette de reactivo, 6 unidades, los códigos son específicos de lote.
- Etiquetas adicionales de código de barras para las placas, 3 unidades, específicas de lote.

El control de los lotes de reactivo en uso se registra en el R2-PGS-CN

4.4.1. Calibradores.

TSH

Contiene 6 calibradores, con concentraciones aproximadas de: 1, 10, 25, 50, 100, 250 uU/ml de TSH en sangre, con pequeñas variaciones según lotes.

En la especificación E1-PNT-CN-10 (calibración TSH) están definidos los materiales de calibración que se utilizan, a qué técnicas aplican, la frecuencia de utilización, el tratamiento de los datos y los criterios de aceptación y evaluación de resultados.

TIR

Contiene 6 calibradores, con concentraciones aproximadas de: 0, 25, 50, 100, 250, 500 ng/dl de TIR en sangre, con pequeñas variaciones según lotes.

En la especificación E2-PNT-CN-10 (calibración TIR) están definidos los materiales de calibración que se utilizan, a qué técnicas aplican, la frecuencia de utilización, el tratamiento de los datos y los criterios de aceptación y evaluación de resultados

4.4.3. Control de la calidad del método

Control Interno.

TSH

En el Kit de se incluye 1 hoja de papel con 5 juegos de manchas de sangre seca, los valores aproximados de los mismos son 15 y 60 uU/ml, con pequeñas variaciones según lote, En la especificación E3-PNT-CN-10 (control interno TSH) están definidos los materiales de calibración que se utilizan, a qué

técnicas aplican, la frecuencia de utilización, el tratamiento de los datos y los criterios de aceptación y evaluación de resultados

TIR

En el Kit de se incluye 1 hoja de papel con 5 juegos de manchas de sangre seca, los valores aproximados de los mismos son 30, 70 y 110 ng/ml, con pequeñas variaciones según lote, En la especificación E4-PNT-CN-10 (control interno de TIR) están definidos los materiales de calibración que se utilizan, a qué técnicas aplican, la frecuencia de utilización, el tratamiento de los datos y los criterios de aceptación y evaluación de resultados

Conservar todos los componentes de los kit de TSH y TIR neonatal en la Cámara Frigorífica (BG-5) 5 ± 3 °C hasta la fecha de caducidad indicada en el envase

- **Evaluación Externa de la Calidad.**

Como evaluación externa de la calidad, el laboratorio participa en los siguientes ejercicios de intercomparación:

- “Infant Screening Quality Assurance Program”. Center for Disease Control (CDC) Atlanta. USA. Evaluación trimestral con cinco problemas de distintas concentraciones por envío, cuyos resultados se imprimen y guardan en carpeta de controles externos.
- Programa de “Evaluación Externa de la Calidad en la Detección Precoz Neonatal” llevada a cabo entre todos los centros de cribado neonatales nacionales por la Asociación Española de Cribado Neonatal (AECNE) con tres niveles de concentraciones mensuales, cuyos resultados se imprimen y guardan en carpeta de controles externos.

En la especificaciones E5-PNT-CN-10. (control externo TSH) y E6-PNT-CN-10 (control externo TIR) están definidos los materiales de control externo que se utilizan, a qué técnicas aplican, la frecuencia de utilización, el tratamiento de los datos y los criterios de aceptación y evaluación de resultados.

4.5. Requisitos específicos de seguridad

Debido a que no siempre se puede establecer que especímenes pueden resultar infecciosos, todas las muestras de sangre deberán tratarse siguiendo las “Precauciones universales” recogidas en las guías para la manipulación de especímenes publicadas por la U.S. Centres for Disease and Control y la NCCLS.

4.6. Características de la muestra

La Sección de Cribado neonatal recibe los especímenes de sangre sobre papel de filtro obtenidos mediante punción en el talón. El procedimiento de extracción y envío de las muestras están descritos en la normativa de la Consellería de Sanidad, la recepción de las muestras está descrita en el documento PNT-CN-01.

4.7. Registro de los resultados y comunicación de los mismos.

Los resultados se registran en la ficha informatizada del recién nacido del programa MetaB, mediante la opción registro de resultados, exclusiva del personal facultativo

Las hojas de trabajo, con sus correspondientes resultados, controles y calibraciones (R2-PNT-CN-02 Calibraciones, controles y resultados del Cribado Neonatal de TSH y R1-PNT-CN-10 (Calibraciones, controles y resultados del Cribado Neonatal de TIR) se imprimen y guardan en papel durante al menos tres años, se guardan en las estanterías de la sección por años, los del mes en curso están en un AZ eliminándose consecutivamente.

Los resultados de genética vienen por correo desde el laboratorio de La Fé, se guardan en R2-CN-PNT-10

Una vez introducidos los resultados, se validan, apareciendo para su validación individual, todos aquellos casos que hayan sido dudosos, repetición de muestras por cualquier motivo, valores altos, etc.

Los casos patológicos son comunicados a los padres y centros de seguimiento para que sean sometidos a análisis de confirmación diagnóstica y tratamiento y se guarda un registro en papel en R5-PGS-CN Carpeta registros positivos

9. Responsabilidades

Es responsabilidad del personal técnico de la sección el desarrollo del método en todas sus fases bajo la supervisión del personal facultativo.

Es responsabilidad del personal facultativo de la sección el registro y la validación de los resultados.

La llamada para cita y petición de nuevas muestras una vez indicada por el personal facultativo puede realizarla cualquiera de los estamentos del personal, únicamente cuando los padres soliciten una información adicional, será el personal facultativo el encargado de dársela.

Se procurará no realizar en viernes o días previos a festivos la comunicación de valores dudosos o altos para no intranquilizar a los padres.

La comunicación de resultados positivos a los centros de seguimiento será realizada por el personal facultativo o bajo su supervisión.

10. Formatos/Especificaciones

- E1-PNT-CN-10 Calibración TSH neonatal en autodelfia
- E2- PNT-CN-10 Calibración TSH neonatal en autodelfia
- E3- PNT-CN-10 Control interno TSH neonatal en autodelfia
- E4- PNT-CN-10 Control interno TIR neonatal en autodelfia
- E5- PNT-CN-10 Control externo TSH neonatal en autodelfia
- E6- PNT-CN-10 Control externo TIR neonatal en autodelfia

11. Indicadores

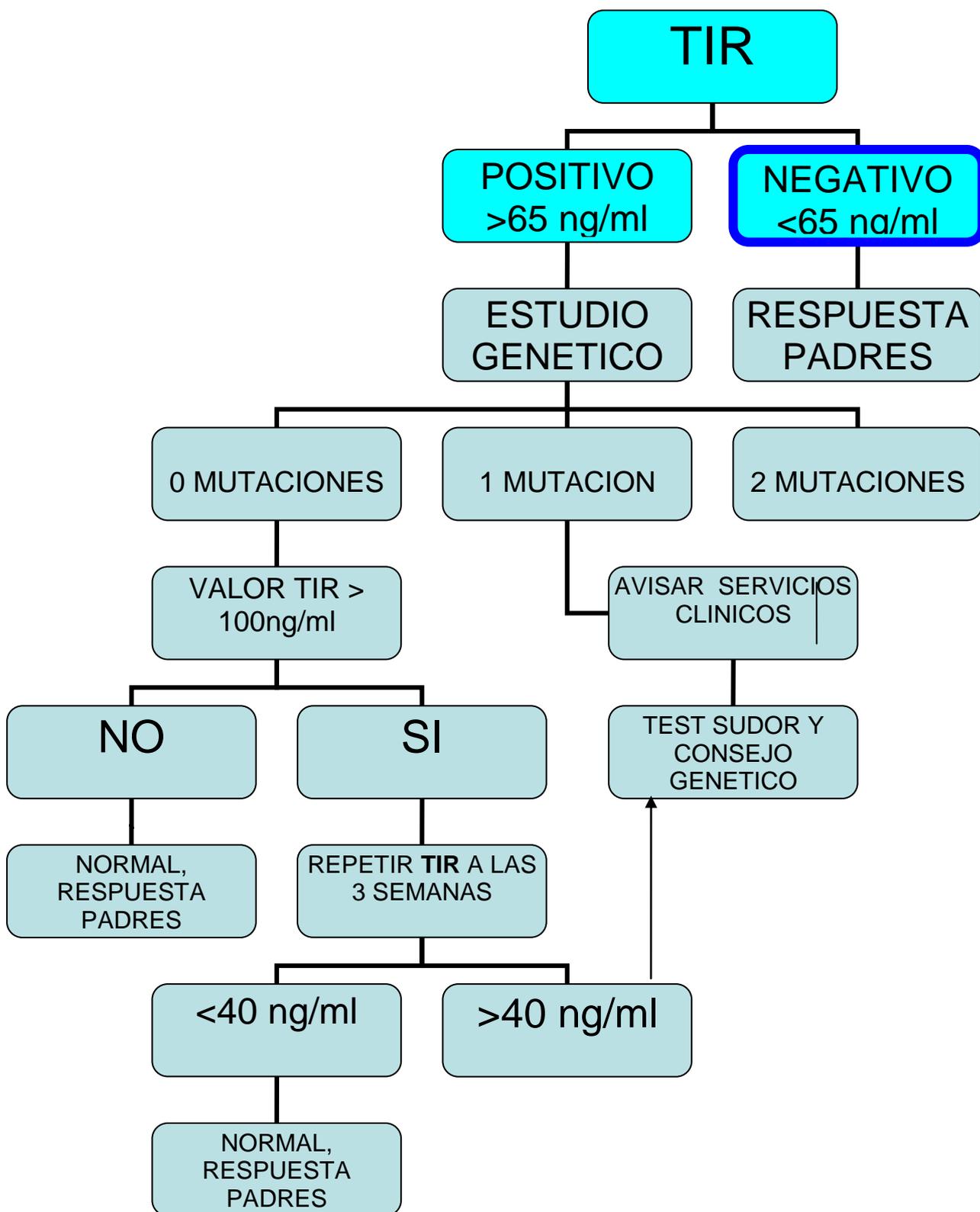
12. Formatos

- Programa de la Consellería de Sanitat “MetaB”.
- F7-PGS-CN. Hoja de trabajo para técnicas de cribado neonatal
- F2-PNT-CN-02 Calibraciones, controles y resultados del Cribado Neonatal de TSH
- F1-PNT-CN-10 Calibraciones, controles y resultados del Cribado Neonatal de TIR
- F2-PNT-CN-10 Resultados de genética
- F2-PGS-CN Control de reactivos.

- F3-PGS-CN “Dietario del año en curso”. Registro repeticiones
- F5-PGS-CN Carpeta positivos

13. ANEXOS

- Algoritmo funcionamiento fibrosis quística



TIR autodelfia

CONTROLES	TÉCNICAS	UBICACIÓN	FRECUENCIA	TRATAMIENTO DE DATOS	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y EVALUACIÓN DE RESULTADOS
C1 (BAJO) C2 (MEDIO) C3 (ALTO) Incluidos en el kit autoDELFI Neonatal TIR kit PerkinElmer	TIR	En uso: Cámara frigorífica BG-5	C1 en primera placa por duplicado, sencillo en siguientes C2 en primera placa por duplicado, sencillo en siguientes C3 en primera placa por duplicado, sencillo en siguientes	Los datos se procesan automáticamente en el programa informático Multical, el cual guarda la información a modo registro gráfico e informático. Los datos se pasan de forma manual al programa MedlabQC, en aplicaciones de equipo del ordenador H1200INF1024-M	Se acepta la serie si: - Los resultados control tienen un CV igual o inferior al 20% Se revisa la serie sí: - Dos o más controles sobrepasan el 20% de CV. En estos casos se rechaza la serie si los valores alterados se encuentran en la zona de corte, valorando la variabilidad biológica y capacidad diagnóstica de la prueba, siempre a criterio del facultativo.

Controles en papel, listos para uso.

CONTROL EXTERNO DE CALIDAD
LABORATORIOS CLINICOS

E3-PNT-CN-02- 03

TIR autodelfia

CONTROLES	FRECUENCIA		TRATAMIENTO DE DATOS	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y EVALUACIÓN DE RESULTADOS
PROGRAMA DE CONTROL EXTERNO DE CALIDAD AECNE	TIR ng/ml sangre	3 niveles de sangre impregnada en papel que se reciben una vez al mes	El facultativo rellenará el archivo Excel correspondiente (Mis documentos archivo 1517. "año en curso") con los resultados obtenidos y la presunción diagnóstica haciendo constar en las mismas: <ul style="list-style-type: none"> - Código del laboratorio - Número del control - Número de lote del kit 	<p><u>Aceptación:</u> Resultados dentro de la media calculada para todos los laboratorios por AECNE Si resultados por encima de la media: Se realiza un seguimiento del parámetro mediante los controles internos Se llama al servicio técnico.</p> <p>Idem para CDC</p>
PROGRAMA CONTROL EXTERNO DE CALIDAD CDC	TIR ngl/ml sangre	1) 5 niveles de sangre impregnada en papel que se reciben cada tres meses	El facultativo rellenará la página web correspondiente en la dirección www.cdc.gov/nsqap/public/default.aspx con los resultados obtenidos y la presunción diagnóstica haciendo constar en las mismas: <ul style="list-style-type: none"> - Código del laboratorio - Número del control 	

Controles en papel, listos para uso.