



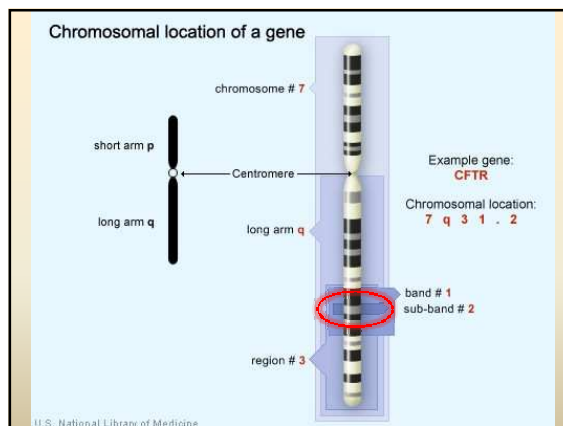
Cribado bioquímico y genético: análisis de los protocolos existentes

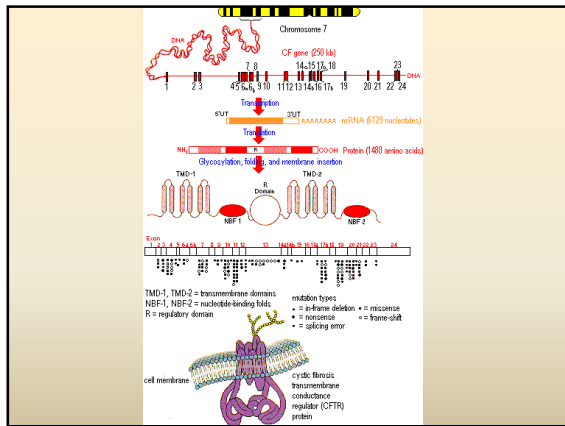
José María Egea Mellado
Laboratorio de Metabolopatías
Centro de Bioquímica y Genética Clínica
Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca
El Palmar (Murcia)

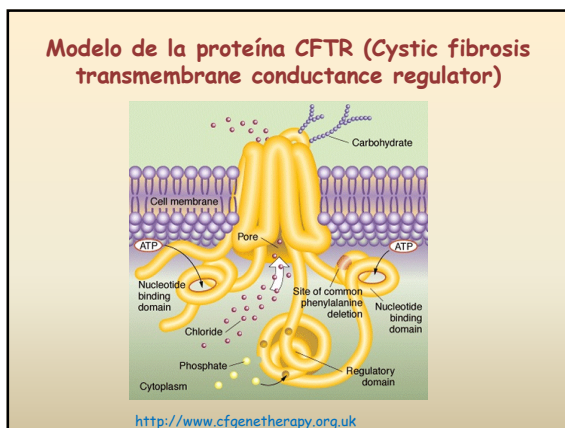


Fibrosis quística (FQ)

- Enfermedad genética grave más frecuente en población de origen caucásico con patrón de herencia autosómica recesiva.
- Incidencia 1:2.000 - 6.000 r.n.
- Mutación en el gen CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) compuesto por 27 exones y localizado en el cromosoma 7 (q31.2)



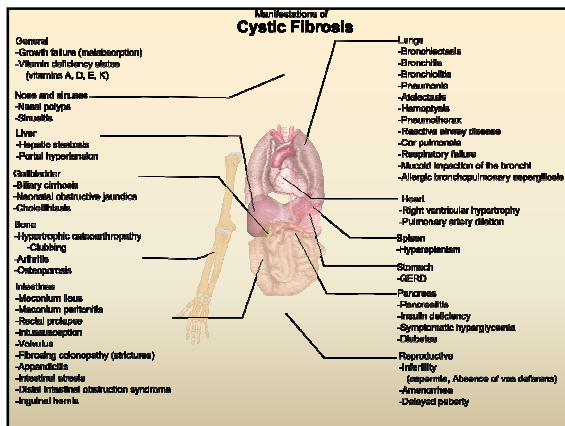




Expresión del CFTR

Células epiteliales de las superficies húmedas del:

- Tracto gastrointestinal
- Tracto respiratorio
- Tracto reproductivo
- Glándulas sudoríparas



Criteria para incluir una enfermedad en el cribado neonatal

- Que la enfermedad tenga una incidencia importante.
- Que el método de cribado sea simple y práctico.
- Que tenga un alto grado de sensibilidad y especificidad.
- Que exista una adecuada relación coste-beneficio.
- Que el tratamiento precoz sea beneficioso en el curso de la enfermedad.

Justificación de FQ en cribado neonatal

- Conocer la incidencia real de la enfermedad en las distintas poblaciones.
- Poder realizar un asesoramiento genético precoz con la posibilidad de realizar diagnósticos prenatal o preimplantacional en futuros embarazos.
- Para iniciar un tratamiento inmediato destinado a prevenir o minimizar el daño pulmonar, con la perspectiva de realizar una intervención inmediata con terapias.

Estrategias de detección FQ

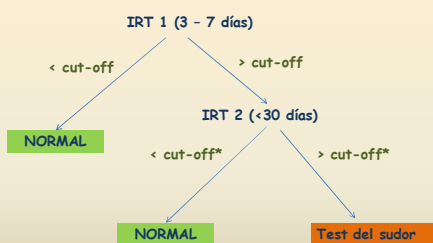
- 1960 → detección de la albúmina en el meconio como método de cribado → poca sensibilidad y especificidad.
- 1979 → se demostró que la concentración de la IRT estaba aumentada en las muestras de sangre de recién nacidos que padecían FQ

Crossley JR et al Lancet vol 1 (1979): 472-4

Tripsina inmunoreactiva o IRT (immunoreactive trypsin)

Neonatos con FQ → ↑ [IRT]_{sangre} incluso en los casos de insuficiencia pancreática →
fibrosis pancreática de la mayoría de los pacientes con FQ incluso en el periodo intrauterino →
reflujo de las enzimas pancreáticas dentro de la circulación →
↑ [IRT]_{sangre}

Estrategia IRT/IRT

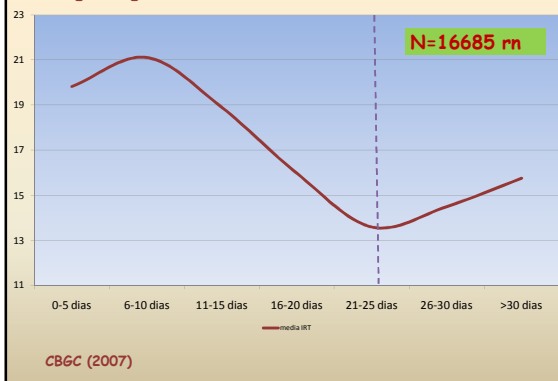


* Dependencia de la [IRT] con la edad

Cuantificación de IRT

- Actualmente se utilizan métodos basados en el enzimoimmunoensayo.
- **Punto crítico** → establecimiento del punto de corte en primera muestra:
 - Cada laboratorio debe establecer sus propios puntos de corte
 - Puntos de corte fijos (p99, optimizado)
 - Puntos de corte variables (p95 ensayo diario)
- [IRT] es dependiente de la edad del r.n.

[IRT] vs edad de toma de muestra



Limitaciones IRT

- [IRT] a los 3-7 días es sensible pero poco específica → (VFP = 3-10%) (J Inherit Metab Dis (2007) 30:537-43) hipertripsinemia neonatal transitoria en no-FQ
- Elevación [IRT]:
 - Neonatos con APGAR bajos
 - Asfisia u otros problemas de salud perinatal, medicación, malformación congénita, etc.
 - Infecciones congénitas.
 - Trisomía 13 y 18.
 - Origen africano.
- segunda muestra a los 15 días → ↑ especificidad
- > 30 - 35 días → ↓ sensibilidad (Rock MJ (1990) Pediatrics 85:1001-7)
 - atrofia secundaria células acinares → sustituidas por tejido fibrótico → $[IRT]_{FQ} \equiv [IRT]_{no-FQ}$

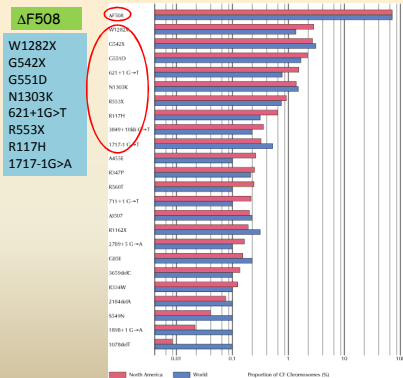
Consideraciones respecto estrategia IRT/IRT

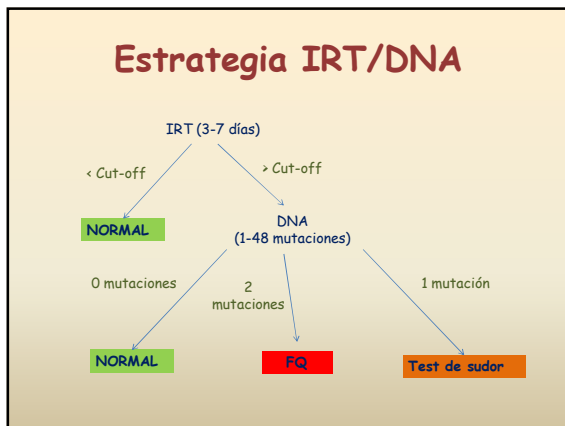
- Establecimiento de dos puntos de corte (fijos o variables):
2 - 20 días
21 - 30 o 21 - 35 días
- Optimización del punto de corte → minimizar los FN y FP (Paediatr Reprod Rev (2003) 4: 272-7):
% de peticiones 2ª muestra ≅ 0.3 - 1 %
VPP 1ª IRT ≅ 3 - 10%
VPP 2ª IRT ≅ 45 - 55%
>95% niños FQ detectados
- Ileo Meconial → directamente a test del sudor

Mutaciones CFTR

- 1989 → identificación del gen CFTR → descripción de la mutación prevalente ΔF508
Riordan JR et al (1989) *Science*, 245: 1066-73
- Incorporación de las mutaciones en los programas de cribado neonatal.
- Se han descrito unas 1000 mutaciones en CFTR.
- European Concerted Action on Cystic Fibrosis → identificar un mínimo de 80% de las mutaciones de la población estudiada → ↓ FN
- La ACGM propone un panel de 25 mutaciones ampliadas en 2004 a 31 + 14 (etias específicas)
Grody WW et al (2001) *Genet Med*, 3:149-54
Watson MS et al (2004) *Genet Med*, 6:387-91

Frecuencia de las mutaciones encontradas





- ### Consideraciones estrategia IRT/DNA
- Punto de corte para IRT mas bajos que IRT/IRT → evitar FN por IRT
 - Se evita una segunda muestra → las IRT+ → se analiza mutaciones en misma muestra → evita ansiedad en padres por FP en IRT
 - Elección del número de mutaciones a detectar → factor que determina los FN y FP (portadores)
 - A más mutaciones ↑sensibilidad (↓FN) pero ↓ selectividad (↑FP)

- ### ¿Qué mutaciones incluir?
- ¿sólo mutaciones prevalentes?
 ¿mutaciones asociadas a fenotipos severos de FQ?
 ¿algunas mutaciones con fenotipo leve o variables?
- Consideraciones a tener en cuenta:
 - Científicas** → conocimiento actual genotipo-fenotipo
 - Utilidad clínica** → beneficios para el niño y familia
 - Prácticas** → coste, asesoramiento genético en portadores

Una mutación ($\Delta F508$) vs panel de mutaciones

(Comeau AM et al (2004) 113:1573-81) (Massachusetts)

- N=323506 rn \rightarrow 112 FQ
- IRT- \rightarrow 304436 \rightarrow 2 FQ \rightarrow 2FN
- IRT+ (movil >p95) \rightarrow 19070 (5.89%) PPV=0.57%

	$\Delta F508$	FQ	Port	Panel 27 mut	FQ	Port
2 mut	55	55	0	82	82	
1 mut	673	41	632	929	25	904
0 mut	18342			18059		
>p99,8	336	8	0	327	3	0
<p99,8	18006	6	0	17732	0	0
TEST SUDOR	1064			1338		
TOTAL		104			110	904
%casos detect		92.86%			98.21%	
VPP	9.77%			8.22%		

Ventajas y desventajas de detección 1 mutación vs panel múltiples mutaciones

- **Ventajas:**
 - ↓FN (se pasa de 8 a 2 FN)
 - ↑Sensibilidad (desde 96 al 98%)
 - ↑% de dos mutaciones (desde 53% al 75%)
- **Desventajas:**
 - ↑test sudor (26% mas de test del sudor)
 - ↑portadores (43% mas de portadores)
- PPV similares (del 9.8% al 8.2%)

Estrategias IRT/IRT vs IRT/DNA

	IRT/IRT	IRT/DNA
Sensibilidad	Buena (>85%) Algunos FN (5-10%)	Muy buena (>95%) Pocos FN (2-7%)
Especificidad	Muchos FP (1º IRT)	Buena
Portadores	Ninguno	Bastantes (>10 cada 10.000 rn)
VPP	IRT ₁ \rightarrow 3-10% IRT ₂ \rightarrow 45-55%	5-15%
Test del sudor	9 cada 10.000 rn	18 cada 1.000 rn
Cribados	Doble muestreo Muestra única \rightarrow 2º sd	Muestra única

Problemática de la detección de portadores

- **A favor:**
 Consejo genético → asesoramiento reproductivo
 Cribado poblacional a parejas (prenatal o preconcepcionalmente) → identificación de portadores → ↓ incidencia de FQ
- **En contra:**
 Se genera ansiedad en los padres (hijo enfermo o no enfermo) → información adecuada y consejo genético.
 % portadores con IRT+ (1/20 - 1/25) > % portadores población (1/30 - 1/35)

Estrategias de cribado: Doble muestreo

- Se recogen dos muestras (2 días y 6-14 días de vida) de forma sistemática
 Detección de HC compensado (basado en T_4)
- **Ventajas:** las IRT+ en 1ª medición se pueden comprobar en la 2ª sin conocimiento de los padres → ↓ ansiedad
 Si se eligen estrategias IRT/IRT se evita la detección de portadores.
 - **Desventajas:** es más costoso
 Se pierde algo de cobertura en las 2ª muestras.
 dificultad para implementar nuevos programas.
 - En España la utilizan 5 CCAA

Estrategias de cribado: Muestra única

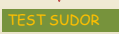
- Se recogen a los 3-6 días de vida
- **Ventajas:**
 Es menos costoso de implantar
 Se consiguen altas coberturas
 - **Desventajas:**
 Ante un positivo en cualquiera de las pruebas se tiene que solicitar muestra de confirmación → ↑ ansiedad en padres → información adecuada para ↓ ansiedad
 - Se prefieren estrategias IRT/DNA

Variaciones estratégicas

- **IRT/IRT/DNA** (*J Pediatr* (2009) 155:618-22)
IRT₁+ → IRT₂+ → DNA₂+ → Test sudor
Cribado doble muestreo
Ventajas de IRT/DNA (sensibilidad >99,5%)
↓ detección portadores (3 cada 10.000 rn)
↓ test sudor (6 cada 1.000)
- **IRT/DNA/IRT** (*J Med Screen* (2002) 9:60-3)
IRT₁+ → DNA₁+ (1 mut) → IRT₂+ → Test sudor
(2 mut) → FQ
cribado única muestra
↓ 92% de 2ª muestras respecto IRT/IRT
↓ 80% de nº test de sudor

Estrategia IRT/PAP

Sartes J et al (2005) *J Pediatr* 147: 302-5

- Pancreatitis associated Protein (PAP) como marcador secundario
- Estrategia IRT/PAP ≅ IRT/DNA
IRT > 50 ng/mL IRT > 100 ng/mL
PAP > 1,8 ng/mL PAP > 1,0 ng/mL

- Ventajas: se evita el análisis genético (consentimiento informado)
- Es mas fácil y barato de implementar

Test del sudor

- Es el "gold standard" para diagnóstico de FQ → Determinación cuantitativa de [Cl⁻] en sudor.
- Se clasifican los positivos del cribado como FP, afectados de FQ o portadores de la mutación.

Test del sudor

Se estimula el sudor de forma localizada en el antebrazo o en el muslo usando la pilocarpina

Procedimiento del test del sudor

- Basado en la iontoforesis cuantitativa con pilocarpina
- El sudor es recogido (en papel de filtro o tubo microbase, según método) y es analizado para la cuantificación de $[Cl^-]$
- Normal $\rightarrow <40$ mmol/L
- Borderline $\rightarrow 40 - 60$ mmol/L
- Patológico $\rightarrow > 60$ mmol/L

Limitaciones del test de sudor

- No se puede realizar de forma exacta en los dos primeros días de vida del bebé
- Puede ser problemática la recogida de cantidad suficiente de sudor (75 mg o 15 μ L) durante las 2-3 semanas de vida del bebé, especialmente en prematuros

Gracias por su atención