

Cribado Neonatal de Fibrosis Quística en la Comunidad Autónoma de Canarias 2009-2012

Concepción Oliva¹, Valle Velasco², Antonio José Aguilar³, Francisco Machado³, Alicia Callejón¹, Gonzalo Cabrera³, Joaquín Martínez⁴, Felicitas Díaz-Flores⁵, Carlos Vázquez⁶, Alfredo Santana⁶, Flora Barroso⁷, Eduardo Domenech⁸. ¹ Unidad de Neumología Pediátrica. Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria (HUNSC). Santa Cruz de Tenerife. ² Unidad de Neumología Pediátrica. Hospital Universitario de Canarias (HUC). Santa Cruz de Tenerife. ³ Unidad de Neumología Pediátrica. Complejo Hospitalario Universitario Insular Materno Infantil de Canarias (CHUIMI). Las Palmas de Gran Canaria. ⁴ Servicio de Análisis clínicos. Unidad de Genética. HUNSC. ⁵ Servicio de Bioquímica. Unidad de Genética. HUC. ⁶ Servicio de Genética. CHUIMI. ⁷ Centro de Cribado Neonatal. Programa de Diagnóstico Precoz de Metabolopatías Congénitas en el Recién Nacido. Departamento de Pediatría. Universidad de La Laguna. Santa Cruz de Tenerife. ⁸ Centro de Cribado Neonatal. Programa de Diagnóstico Precoz de Metabolopatías Congénitas en el Recién Nacido. Departamento de Pediatría. Universidad de La Laguna. Director del Programa. Santa Cruz de Tenerife.

Grupo de Trabajo de Cribado Neonatal de FQ

Mercedes Muros (Servicio de Análisis Clínicos HUNSC), **Luis Peña** (Gastroenterología Pediátrica CHUIMI), **Carmen Rosa Rodríguez** (Pediatra. Gerencia de Atención Primaria de Santa Cruz de Tenerife), **Ángeles Cansino** (Pediatra. Gerencia de Atención Primaria de Las Palmas de Gran Canaria), **Antonio Ramos** (Pediatra. Gerencia de Atención Primaria de las Palmas de Gran Canaria), **Santiago de la Hueriga** (Técnico del Servicio de Atención Primaria. D G de Programas Asistenciales).

Introducción

La Fibrosis Quística (FQ) es la enfermedad genética grave, potencialmente letal, más frecuente en la población de origen caucásico. El patrón de herencia es Autosómico recesivo, con una incidencia variable que oscila entre 1 en 1.800-25.000 nacimientos, dependiendo de la etnia de origen y/o zona geográfica a la que pertenezcan¹.

El diagnóstico de la FQ en etapas precoces de la vida es difícil de establecer, dado que los síntomas están aún ausentes o son inespecíficos, motivando por tanto que el diagnóstico se realice en etapas más avanzadas de la enfermedad, con las implicaciones clínicas y terapéuticas que esto conlleva, siendo fundamental por tanto el diagnóstico precoz de esta patología.

Incidencia

Existe una gran variabilidad en la incidencia de la FQ en los diferentes países del mundo y en las diferentes etnias, estando avaladas en la literatura científica. En Rusia se ha publicado su incidencia en 1/10.080², mientras que en Wisconsin lo es de 4.189³ y en Finlandia sin embargo se sitúa en 1/25.000⁴. En África y Asia la incidencia de la enfermedad parecer ser mucho menor.

Programas de cribado neonatal para la fibrosis quística

La FQ tiene una importante morbimortalidad, relacionada fundamentalmente con la afectación pulmonar y sus complicaciones. El aumento en la supervivencia de estos pacientes ha sido muy importante en las últimas décadas, estimándose ésta en los países europeos desarrollados, que en los nacidos a partir de la década de los 90, la expectativa de vida se sitúa en más de 40 años⁵. Esto es debido a muchos factores, entre los que juegan un importante papel el establecimiento de un diagnóstico precoz a través de los Programas de Cribado Neonatal de Fibrosis Quística (PCN FQ) en el Recién nacido.

Para considerar indicado el cribado de una enfermedad, hay que tener en cuenta las siguientes consideraciones:

- Incidencia importante de la patología.
- Que el método de cribado sea sencillo y de fácil aplicación.
- Sensibilidad y especificidad altas.
- Buena relación costo-beneficio.
- Que su implementación permita iniciar

un tratamiento precoz, que a su vez tenga efectos beneficiosos en el curso de la enfermedad.

La FQ cumple estos requisitos, estando justificado por tanto el PCN FQ^{1,6}. Sin embargo el PCN FQ ha sido motivo de múltiples controversias a lo largo de los años, pero en la actualidad son muchas las publicaciones que avalan sus beneficios en varios aspectos, entre ellos su impacto en la supervivencia⁷ y la mejoría en la función pulmonar y en los aspectos nutricionales, puestos de manifiesto en una revisión Cochrane publicada en 2009⁸.

En la Tabla 1 se detallan los beneficios del PCN FQ.

Además estos programas pueden aportar los siguientes hechos importantes:

- Conocer la Incidencia real de la enfermedad en las distintas zonas geográficas.
- Ofrecer un asesoramiento genético precoz.
- Posibilidad de realizar diagnóstico prenatal o preimplantacional en futuros embarazos.
- Realizar un diagnóstico precoz, para realizar una intervención terapéutica temprana y agresiva, con el objetivo de minimizar en lo posible la progresión de la enfermedad.

En España, de las 17 Comunidades Autónomas que existen actualmente, el PCN FQ se realiza en todas ellas salvo en cuatro, que no lo han incorporado aún: Asturias, Navarra, Castilla-La Mancha y la ciudad autónoma de Ceuta.

En España, como resultado de la implantación de los PCN FQ en las distintas Comunidades Autónomas, se está observando una incidencia de la enfermedad inferior a la estimada previamente, siendo en Cataluña de 1/6.496, en Castilla y León de 1/4.500, Aragón 1/4.800, País Vasco 1/6.000, Galicia 1/4.430, Baleares 1/6.189, Murcia 1/5.376^{1,9}.

En la Comunidad Autónoma Canaria, el PCN FQ se viene realizando desde enero del año 2.009, siendo la octava comunidad del territorio español en implementarlo, y permanece activo en el momento actual.

El protocolo de actuación, ha sido elaborado

Tabla 1.
Cribado Neonatal para la Fibrosis Quística: Beneficios

Respiratorios
- Retrasa Colonización Crónica - Enlentece el deterioro Pulmonar
Nutricionales
Evita
- Retraso póndero-estatural - Déficits: Nutricional y Vitamínico
Familiares
- Proporciona Consejo Genético precoz - Minimiza angustia familiar
Facilita el desarrollo cognitivo
Mejora la calidad de vida
Aumenta la supervivencia
Económicos
Buena relación costo-beneficio
- Diagnóstico - Tratamiento

Tabla 2.
Entidades con Hipertripsinemia del recién nacido no relacionadas con la FQ

1. Muestras recogidas muy precozmente
2. Hipertripsinemia transitoria del recién nacido
3. Sufrimiento fetal
4. Stress perinatal
5. Puntuación baja en test de Apgar
6. Distress respiratorio
7. Hipoglucemia
8. Infecciones congénitas
9. Trisomías 13 y 18
10. Diabetes Insípida Nefrogénica
11. Insuficiencia Renal
12. Atresia intestinal
13. Alteraciones Hepáticas
14. Raza negra

Tabla 3.
Interpretación del Test del Sudor realizado con cuantificación del Cloro en niños menores de 6 meses^{1,4,15-19}

NEGATIVO <30 mmol/L
BORDERLINE 30-59 mmol/L
POSITIVO ≥ 60 mmol/L

... y consensuado por diferentes profesionales responsables en el manejo de esta patología en la Comunidad Autónoma Canaria. Este programa permanece abierto para su reevaluación, por si fuera necesario realizar modificaciones del mismo, en base a sus resultados de sensibilidad, especificidad y costo-beneficio.

Técnicas de cribado neonatal

Tripsina inmunoreactiva. En el año 1.979 se descubrió que en los recién nacidos afectados de FQ, los niveles de la TIR se encontraban elevados en sangre de cordón. Tras la publicación del trabajo de Crossley JR¹⁰, la determinación de la TIR en una gota de sangre seca se utilizó como método definitivo por ser simple, fiable y de alta sensibilidad. En 1.983 la Fundación Estadounidense para la FQ recomendó la determinación de la TIR utilizando una muestra de sangre de talón como método de cribado¹¹. La determinación de TIR se realiza mediante el análisis de sangre seca recogida en tira de Guthrie durante la primera semana de vida. La detección puede realizarse mediante técnicas de radioinmunoensayo (RIA), inmunofluorescencia a tiempo retardado (DELFA) o enzimoimmunoensayo (ELISA). Dependiendo del método utilizado, los valores obtenidos se pueden interpretar de distinta forma en cuanto a valores de normalidad se refiere. Con el método DELFIA®NEONATAL IRT KIT, que es el que se utiliza en el Programa de Cribado neonatal de FQ en la Comunidad Autónoma Canaria, se consideran normales las concentraciones inferiores a 60 ng/ml.

Recientes publicaciones han documentado que la edad gestacional inferior a 28 semanas, el bajo peso al nacimiento (<1.500 gr), la raza de color o asiática, elevan al doble los valores de normalidad de la TIR¹². También los portadores de FQ pueden presentar valores de la TIR más elevados que la población general^{13,14}.

En la Tabla 2 quedan detalladas diferentes entidades que pueden cursar con hipertripsinemia del recién nacido no relacionadas con la FQ, y que pueden originar falsos positivos del programa. Los niveles de la TIR también pueden tener falsos negativos, como es el caso de los recién nacidos afectados de Ileo meconial, Estenosis yeyunal o ileal, que pueden tener niveles normales de la TIR.

Test del sudor. La determinación de los Electrolitos en sudor, continúa siendo la herramienta fundamental para el diagnóstico de

esta enfermedad, y sigue siendo el estándar de referencia desde que se estableció el método de Gibson-Cooke en 1.959.

El único test del sudor válido es el cuantitativo de iontoforesis con Pilocarpina (QPIT), determinando la concentración de cloro en sudor, exclusivamente mediante un cloridrómetro para micromuestras mediante coulometría o coulombimetría, y desde que se implantó el Cribado Neonatal de FQ en la Comunidad Canaria es el método que se utiliza en nuestra Comunidad.

El método de Gibson-Cooke establecido desde 1.959, es aquel que se realiza por personal experto, con estimulación de la sudoración mediante iontoforesis con pilocarpina, y recogida de la muestra mediante uno de los dos procedimientos validados:

- Papel de filtro o gasa prepesado.
- Método "Macroduct", en el que se utiliza un disco cóncavo y un tubo en espiral de plástico para la recogida del sudor.

En ambos casos se debe determinar la concentración de cloro en sudor, mediante un cloridrómetro para micromuestras mediante "Coulometría" o Coulombimetría". La determinación de la conductividad eléctrica del sudor in situ únicamente, no es aceptable para el diagnóstico, si la conductividad supera los 50 mmol/l, se debe medir la concentración de cloro en sudor. Una técnica correcta es fundamental para una buena interpretación de los resultados, siendo requisito imprescindible la obtención de una cantidad de sudor adecuada, considerándose en el procedimiento con el método de Gibson-Cooke de 75 mg y como mínimo de 15 µl si el método de recogida es el Macroduct. La prueba del sudor es conveniente realizarla a partir de la segunda – tercera semana de vida y con un peso mayor de 3 kilos.

En la Tabla 3 queda referida la interpretación del test del sudor realizado con cuantificación del cloro, en niños menores de 6 meses^{1,4,15-19}.

Teniendo en cuenta los resultados descritos, en la Tabla 4 queda referida la actitud a seguir ante los mismos, en niños menores de 6 meses.

Estudio genético molecular. En el año 1.989

se descubrió el gen de la FQ, y desde entonces, la mayoría de los programas de Diagnóstico precoz han incluido su estudio en pacientes con TIR elevado, aumentando así la sensibilidad y la especificidad^{20,21}. La “European Concerted Action on Cystic Fibrosis (ECCACF)” recomienda que el método de detección debe identificar un mínimo de 80% de las mutaciones de la población estudiada, con la finalidad de reducir los falsos negativos^{1,22}. En el momento actual se conocen 1.932 mutaciones del gen CFTR, aunque no todas son responsables de la enfermedad, ya que hay un amplio espectro de fenotipos relacionados con las mutaciones del gen CFTR.

El papel de gen CFTR se extiende también a otras patologías distintas a la FQ clásica, como las Bronquiectasias diseminadas, la ausencia bilateral de Conductos Deferentes (CBVD), la Aspergillosis Broncopulmonar Alérgica (ABPA) y la Pancreatitis Crónica. En estas entidades, con cierta frecuencia se identifica una sola mutación FQ causante de enfermedad. Todo esto apoya la teoría de que aún quedan muchos aspectos por aclarar en esta patología^{23,24}.

Para el estudio de las mutaciones, actualmente se utilizan “Kits” comerciales que incluyen las mutaciones más frecuentes, que varían en su número, desde los que estudian 23, hasta los más completos que aportan 43.

El estudio molecular del gen CFTR de algunas de las mutaciones más frecuentes relacionadas con FQ, se realiza a partir de ADN purificado desde muestras de sangre periférica (QIA-Amp DNA Bood Mini Kit), que es amplificado posteriormente mediante la técnica de PCR y sometido a un ensayo de hibridación inversa de sondas en línea (LiPA) utilizando los kits INNO-LIPA CFTR19 e INNO-LIPA CFTR17+Tn Update. Las mutaciones estudiadas son las

Tabla 4.
Actitud a seguir según resultados del Test del Sudor realizado con cuantificación del cloro en niños menores de 6 meses

COLORO	RESULTADO	ACTITUD A SEGUIR
<30 mmol/L	NEGATIVO	Se descarta el diagnóstico. Si fuerte sospecha clínica, reevaluar por especialista
30-59 mmol/L	BORDERLINE	Repetir el test. Ante fuerte sospecha clínica, derivar al especialista
≥ 60 mmol/L	POSITIVO	Repetir el test para confirmar diagnóstico

referidas en la Tabla 5.

Con este método el nivel de detección en población española es aproximadamente de un 80%^{22,25-27}.

A nivel Nacional e Internacional existen diferentes estrategias en los PCN FQ, teniendo en cuenta la frecuencia existente de las distintas mutaciones y los estudios costo-beneficio. En líneas generales se basan en: Tripsina inunoreactiva (TIR) en distintas combinaciones con el ADN, realizando TIR/TIR, o bien TIR/ADN/TIR o TIR/TIR/ADN.

Cribado neonatal de fibrosis quística en la Comunidad Autónoma de Canarias 2.009-2.012

Protocolo de actuación. El PCN FQ en la Comunidad Autónoma de Canarias se inició en enero del año 2.009, y permanece activo en el momento actual. El programa consiste en realizar en el recién nacido una primera determinación de TIR en la muestra de sangre de talón, que se realiza de manera habitual, entre el 3º y 5º día de vida. Si el resultado es ≥ 60 ng/ml, se lleva a cabo una segunda de-

Tabla 5.

Mutaciones estudiadas en FQ en la Comunidad Autónoma de Canarias

F508del	1717-1G>A	3272-26A>G	I148T	3849+10kbC>T
G542X	R553X	3905insT	3199del6	2183AA>G
N1303K	CFTRdele2,3(21kb)	R560T	3120+1G>A	394deTT
W1282X	I507del	1898+1G>A	Q552X	2789+5G>A
G551D	711+1G>T	S1251N	621+1G>T	R1162X
3659delC	R117H	R334W	R347P	G85E
1078delT	A455E	2143delT	E60X	2184delA
711+5G>A	Polimorfismos 5T/7T/9T			

... terminación de TIR en sangre, entre los 20-22 días de vida. Si el resultado de esta segunda muestra es ≥ 40 ng/ml se considera anormal, enviando en este caso al recién nacido al Hospital de referencia para su estudio. El protocolo de actuación en nuestra comunidad (Figura 1) consiste en realizar de forma simultánea, el Test del Sudor y un Estudio Genético de FQ que abarca las 36 mutaciones más frecuentes, que permite con este método, un nivel de detección en la población española de aproximadamente un 80%^{22,25-27}. En circunstancias concretas, o de dudas diagnósticas, hay que realizar la secuenciación completa del gen CFTR para identificar la segunda mutación. Tras completar el estudio, los recién nacidos quedan clasificados en los siguientes grupos^{19, 28, 29}:

- Enfermos de FQ. Son aquellos que presentan Test del Sudor patológico y Estudio genético con 2 mutaciones de FQ.
- Portadores sanos de FQ. Son aquellos que tienen un Test del Sudor normal y un estudio genético con una sola mutación de FQ. Los portadores sanos, aunque el objetivo del programa de cribado no es identificarlos, si es una consecuencia importante del mismo, ya que en la época adulta pueden producir la enfermedad en su descendencia si su pareja también es portadora.
- Diagnóstico no concluyente. Son aquellos pacientes que presentan un solo alelo mutado, y una variante que no expresa la enfermedad

típica, debiendo ser controlados en Unidades especializadas.

- Falsos positivos del Programa. Son aquellos que presentan Test del Sudor normal y Estudio Genético de FQ negativo.
- Falsos negativos del Programa. Son aquellos niños Enfermos de FQ a los que el cribado neonatal no ha detectado, y que son diagnosticados posteriormente cuando presentan sintomatología clínica compatible. Pueden representar del 1% al 5% de los enfermos.

Resultados. Desde enero de 2.009 hasta diciembre de 2.012 se han analizado un total de 73.260 recién nacidos cribados con el Protocolo de actuación indicado en la Comunidad Autónoma de Canarias. Del total de recién nacidos, 191 han presentado las dos determinaciones de TIR elevadas para el rango de referencia establecido, lo que establece la Frecuencia en 2,6 por mil.

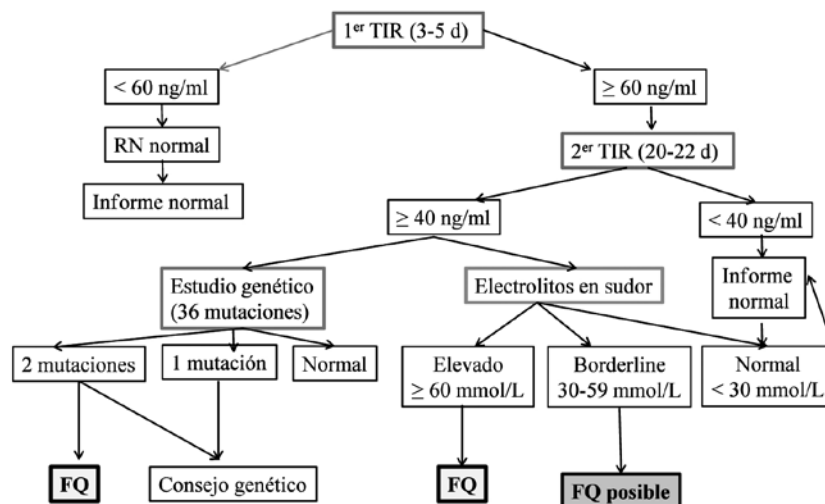
Se han diagnosticado un total de 15 niños afectados de FQ en toda la Comunidad Autónoma de Canarias, lo que se traduce en una incidencia de 1/4.880 recién nacidos vivos, similar a lo descrito en otras comunidades del territorio español^{1,9}.

Los pacientes han sido diagnosticados de la siguiente manera, teniendo en cuenta la Provincia y el Hospital de referencia al que pertenecen.

En la provincia de Santa Cruz de Tenerife, se

Figura 1.

Cribado neonatal de FQ en la Comunidad Autónoma Canaria: Protocolo de actuación.



han diagnosticado un total de ocho pacientes. En su totalidad han sido diagnosticados en el Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria (HUNSC), siendo uno de los pacientes un falso negativo del Programa estudiado a los 12 meses de vida, por presentar sintomatología clínica consistente en fallo de medro, motivo por el cual la envía su pediatra de Atención primaria para estudio. Ha sido el único caso falso negativo del programa conocido hasta el momento actual, lo que sitúa el porcentaje de casos falsos negativos en 0,001%.

En el Hospital Universitario de Canarias (HUC) se ha detectado un caso no concluyente, y difícil de filiar, pudiendo tratarse de una enfermedad FQ no clásica, o una Enfermedad relacionada con el CFTR pero no exactamente FQ, o una portadora. Este paciente presentó dos determinaciones de TIR elevadas, test del sudor cuantitativo con resultado normal (cloro 12 mmol/l) y el siguiente estudio genético-molecular ampliado: L997F/5T-127G. Según indican en el centro de estudios genéticos de referencia (Barcelona), la mutación L997 F no se encuentra asociada a la FQ. Se ha identificado en fenotipos relacionados con el gen CFTR y en la población general. La mutación 5T-127G se asocia con agenesia bilateral de los conductos deferentes y esterilidad en el varón. Se recomienda su seguimiento en unidad especializada^{23,24}.

En la Provincia de Las Palmas de Gran Canaria, en el Complejo Hospitalario Universitario Insular Materno Infantil de Canarias (CHUIMI) se han diagnosticado 7 pacientes.

Características del total de pacientes. Del total de 15 pacientes Enfermos de FQ, 9 fueron mujeres y 6 varones, todos de raza caucásica. Con respecto a la zona geográfica a la que pertenecen, en la Provincia de Santa Cruz de Tenerife, 7 pacientes pertenecen al área metropolitana de Santa Cruz de Tenerife, y uno de ellos, cuyos padres son de ascendencia italiana, corresponde al Municipio de Arona. En la Provincia de las Palmas de Gran Canaria, 5 corresponden a la isla de Gran Canaria, 1 a la isla de Lanzarote y 1 a la isla de Fuerteventura.

Todos presentaron un test del sudor patológico, con niveles de cloro ≥ 60 mmol/l. El bebé que presente dos tests del sudor con concentraciones de cloro ≥ 60 mmol/l se considera afecto de FQ. En el estudio genético molecu-

lar, en 13 niños se identificaron 2 mutaciones para la FQ (86,7%) y en 2 se identificó una sola mutación (13,3%), de ellos, un paciente de la provincia de Santa Cruz de Tenerife y otro de la provincia de las Palmas. El estudio genético molecular queda referido en la Tabla 6.

La mutación más frecuente es la F 508 del, identificada en 18 de los alelos estudiados (60%). La F 508 del en homocigosis, se ha identificado en un total de 6 pacientes, y de estos, cinco corresponden a la provincia de Las Palmas de Gran Canaria. Estos datos coinciden con lo referido en la literatura, considerando esta Mutación la más prevalente en todas las poblaciones, constituyendo un 68% de la media mundial.

De la totalidad de los pacientes, nueve tienen insuficiencia pancreática (60%). En el estudio genético molecular, ocho de ellos tienen identificada la mutación F 508 del (cuatro en homocigosis y cuatro en heterocigosis).

Portadores sanos. En la provincia de Santa Cruz de Tenerife se han estudiado un total de 36.102 recién nacidos, identificándose un total de seis portadores, cuatro de ellos diagnosticados en el HUNSC y dos de ellos en el HUC, lo que establece una Incidencia de 0,17 por mil recién nacidos vivos. Todos obviamente-

Tabla 6.
Estudio Genético Molecular de los pacientes diagnosticados de FQ en la Comunidad Autónoma Canaria 2009 - 2012

PACIENTE	ALELO 1	ALELO 2
1	G 542 X	1.609 del CA
2	F 508 del	3272-26 A>G
3	F 508 del	S 13 F
4	F 508 del	711 + 1 G> T
5	R 334 W	R 334 W
6	F 508 del	R 334 W
7	R 334 W	No conocida
8	F 508 del	F 508 del
9	F 508 del	No conocida
10	F 508 del	F 508 del
11	F 508 del	F 508 del
12	F 508 del	R 143 W
13	F 508 del	F 508 del
14	F 508 del	F 508 del
15	F 508 del	F 508 del