



Universidad
Zaragoza



**CRIBADO NEONATAL DE FIBROSIS QUÍSTICA:
ANÁLISIS DE LAS CONCENTRACIONES DE TRIPSINA
INMUNORREACTIVA EN RECIÉN NACIDOS CON
CRIBADO POSITIVO A LO LARGO DE 6 AÑOS**

Marta Arrudi Moreno

Médico Interno Residente de Pediatría

Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza

**Máster en Condicionantes Genéticos, Nutricionales y Ambientales del
Crecimiento y Desarrollo**

CURSO ACADÉMICO 2016-2017

DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA, RADIOLOGÍA Y MEDICINA FÍSICA

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

TUTORES:

Dra. Pilar Samper Villagrasa

Dr. Carlos Martín de Vicente

RESUMEN

Introducción: El cribado neonatal de fibrosis quística (FQ) mediante la determinación de tripsina inmunorreactiva (TIR) ha supuesto un aumento de la supervivencia en pacientes afectados. Su principal inconveniente es su baja especificidad y un elevado número de falsos positivos.

Objetivo: Determinar posibles diferencias en los niveles de TIR entre los diferentes grupos de recién nacidos con cribado alterado para FQ según sean sanos, portadores o enfermos y analizar la influencia de otros factores que puedan modificarlos.

Material y métodos: Estudio retrospectivo analítico de las concentraciones de TIR en recién nacidos con cribado neonatal alterado para FQ desde 2011 a 2016.

Resultados: Se han analizado 523 recién nacidos con cribado neonatal positivo para FQ, 87.4% a término, 53% niñas, peso medio al nacimiento 3048 g \pm 28. Ingresados el 14%. El valor medio de TIR fue 79.88 ng/ml (límites 60-367). Se encuentran concentraciones significativamente más elevadas de TIR en afectados de FQ clásica con respecto a CFTR-RD, portadores y sanos ($p < 0.001$). También existen niveles superiores de TIR en muy prematuros ($p = 0.042$). No se observan diferencias por sexo, ingreso o estacionalidad. Existe una correlación directa del 61.1% ($p = 0.001$) entre TIR y el test sudor en afectados de FQ. Mediante curva ROC se calculó el valor de corte de TIR para el diagnóstico de FQ clásica que fue de 81.94 ng/ml ($S = 100\%$, $E = 77,6\%$).

Conclusiones: Los recién nacidos afectados de FQ presentan cifras más elevadas de TIR en cribado neonatal que los sanos. La prematuridad, especialmente los muy prematuros, puede influir. Un mayor valor de TIR se relaciona con una mayor cifra en el test del sudor.

Palabras claves: tripsina inmunorreactiva, cribado neonatal, fibrosis quística.

ABSTRACT

Background: Cystic fibrosis (CF) newborn screening has increased the survival in these patients. Low specificity results in a large number of false screened positive infants.

Objective: To determine differences in immunoreactive trypsin (IRT) concentrations among groups, divided in health, carrier and CF patients, and establish the influence of several features.

Patients and Methods: A retrospective study that analyzes IRT concentrations in hypertrypsinemic neonates between 2011 and 2016.

Results: 523 newborns screened positive were included, 87.4% at term, 53% girls, average weight at birth $3048 \text{ g} \pm 28.81 \text{ gr}$, 14% admitted to hospital. Median IRT was 79.88 ng/ml (range 60-367). We found higher IRT values in CF patients statistically significant among all the other groups ($p < 0.001$). There are also higher IRT values in very preterm newborns ($p = 0.042$). There are no differences by sex, hospitalization or seasonality. IRT values is also correlated with sweat chloride value in CF patients ($R = 0.61$, $p = 0.001$). Immunoreactive trypsin cutoff-level for CF was calculated by ROC curve and it was 81.94 ng/ml (Sensitivity: 100%, Specificity: 77,6%).

Conclusions: Higher immunoreactive trypsin levels are related to the presence or absence of CF. Prematurity is also related. It is suggested that elevated neonatal IRT concentrations are connected with sweat chloride level.

Keywords: immunoreactive trypsin, newborn screening, cystic fibrosis.

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
CBAVD	Agenesia congénita de conductos deferentes
CFTR	Proteína transportadora de Fibrosis Quística
DM	Diabetes Mellitus
EG	Edad Gestacional
FQ	Fibrosis Quística
IM	Íleo meconial
IP	Insuficiencia pancreática
PRN	Peso de Recién nacido
RN	Recién nacido
RNMPT	Recién nacidos muy pretérmino
RNPT	Recién nacido pretérmino
RNT	Recién nacido a término
SP	Suficiencia pancreática
TIR	Tripsina Inmunorreactiva

INDICE	Página
1. ANTECEDENTES y JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO	1
1.1. LA FIBROSIS QUÍSTICA EN NUESTRO MEDIO	1
1.2. ETIOLOGIA Y FISIOPATOLOGIA DE LA ENFERMEDAD	2
1.3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA FIBROSIS QUÍSTICA	4
1.4. DIAGNÓSTICO DE LA FIBROSIS QUÍSTICA	6
1.5. CRIBADO NEONATAL	11
1.6. RELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO	17
2. HIPÓTESIS	18
3. OBJETIVOS	19
3.1. OBJETIVO GENERAL	19
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4. MATERIAL Y MÉTODOS	20
4. 1. POBLACIÓN A ESTUDIO	20
4.2. VARIABLES	21
4.3. ANÁLISIS PREVISTO	22
4.4. CONSIDERACIONES ÉTICO-LEGALES	23

5. RESULTADOS	25
5.1. SELECCIÓN DE LA MUESTRA	25
5.2. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA	25
5.3 ANÁLISIS DE VALORES DE TIR	30
5.4. VALORES DE REFERENCIA	38
6. DISCUSIÓN	40
7. LIMITACIONES Y FORTALEZAS	44
8. LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN	45
9. CONCLUSIONES	46
10. BIBLIOGRAFÍA	47

1. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

1.1. LA FIBROSIS QUÍSTICA EN NUESTRO MEDIO

La fibrosis quística (FQ) es la enfermedad genética grave, de herencia autosómica recesiva, más frecuente en las poblaciones de origen caucásico. Su incidencia en nuestro entorno se estima en torno a un caso de cada 4.500 nacidos vivos, mientras que uno de cada 35 habitantes son portadores sanos de la enfermedad.

Afecta a la mayoría de los órganos, siendo la insuficiencia pancreática (IP) y la enfermedad pulmonar las que determinan su pronóstico y mortalidad. Pese a la gravedad del proceso, la supervivencia de esta enfermedad se ha incrementado espectacularmente en las últimas cuatro décadas. En los años 40 la mediana de supervivencia era inferior al año y, de acuerdo con los últimos datos del registro de “Cystic Fibrosis Foundation” de 2015, el pronóstico de supervivencia actual es de 41.7 años (IC 95% 38.5-44.0), aumento muy superior al de la esperanza de vida de la población general en el mismo periodo de tiempo (1). Esto es, en parte, consecuencia de la implantación de los programas de cribado neonatal de FQ que se han generalizado en el territorio nacional en los últimos años, así como la formación de Unidades multidisciplinarias especializadas en FQ y el mejor conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad (2).

La incidencia de esta enfermedad junto con un método de cribado relativamente simple y fácil de realizar y con una alta sensibilidad justifica, en gran medida, la implantación de un programa de cribado neonatal. Éste tiene como principal objetivo realizar un diagnóstico temprano de la misma antes de que se manifieste la clínica e iniciar, por tanto, un tratamiento precoz.

En España, desde la implementación del programa de cribado en distintas comunidades, se está reconociendo una incidencia inferior a la estimada con anterioridad, siendo 1 / 6,631 en Cataluña; 1/5,007 en Castilla y León, 1/5,853 en Baleares, 1 / 6,160 en Madrid, 1 / 7,700 en País Vasco (3). La incidencia en Aragón desde la introducción del cribado es de 1 de cada 4,405 recién nacidos.

1.2. ETIOLOGIA Y FISIOPATOLOGIA DE LA ENFERMEDAD

1.2.1 Gen CFTR

La FQ es una enfermedad causada por mutaciones en el gen CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), situado en el brazo largo del cromosoma 7 y que se compone de dos alelos situados en los loci (7q31) de cada cromosoma.

1.2.2 Proteína CFTR

Este gen codifica la proteína CFTR cuyo funcionamiento defectuoso ocasiona una alteración del transporte de cloro (Cl^-) y sodio (Na^+) en las células secretoras epiteliales. Su localización en distintos órganos da lugar a la aparición de manifestaciones clínicas multisistémicas, como las del aparato respiratorio (las que más determinan el pronóstico de la enfermedad), del sistema digestivo (insuficiencia pancreática y hepatopatía), la deshidratación por pérdida de iones por el sudor o la infertilidad masculina por atresia o ausencia de los conductos deferentes.

Esta proteína CFTR funciona como un canal de Cl^- regulado por cAMP con distinta función según su localización. En el epitelio respiratorio se localiza en la membrana apical de la célula epitelial. El Cl^- sale a favor de gradiente cuando se abren los canales CFTR arrastrando agua que contribuye a fluidificar las secreciones. En la misma membrana apical existen también canales para Na^+ que permiten la entrada de Na^+ a favor del gradiente electroquímico y que se cierran cuando se estimula la secreción de Cl^- . En la FQ la alteración del canal de Cl^- (CFTR), impide la salida de Cl^- y no se arrastra agua hacia el exterior, produciendo consecuentemente secreciones espesas. Al mismo tiempo aumenta la reabsorción de Na^+ y agua en la membrana apical que contribuye a la deshidratación de las secreciones (figura 1). En el ductus de la glándula sudorípara, se produce el fenómeno inverso al del epitelio respiratorio. El Cl^- en condiciones normales se produce en el acino y se absorbe mediante la proteína CFTR en el conducto excretor hacia el interior celular. En la FQ, la impermeabilidad del conducto excretor al Cl^- hace que no se reabsorba Cl^- ni

Na⁺ dando lugar a un sudor hipertónico que detectamos con la prueba del sudor (4) (figura 2).

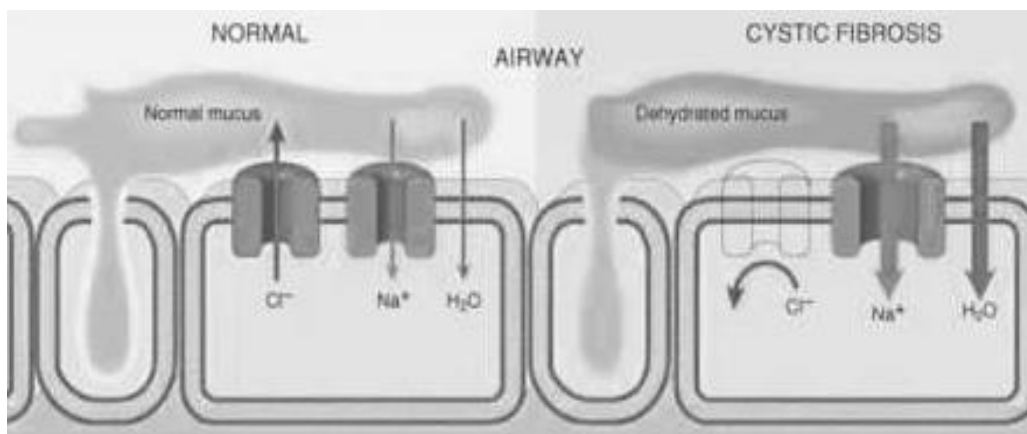


Figura 1 Función normal y en la FQ de la proteína CFTR en el epitelio respiratorio.

Figura tomada de: *Robbins Basic Pathology. Elsevier Saunders, 2013.*

CFTR: proteína transportadora de la fibrosis quística; FQ: fibrosis quística.

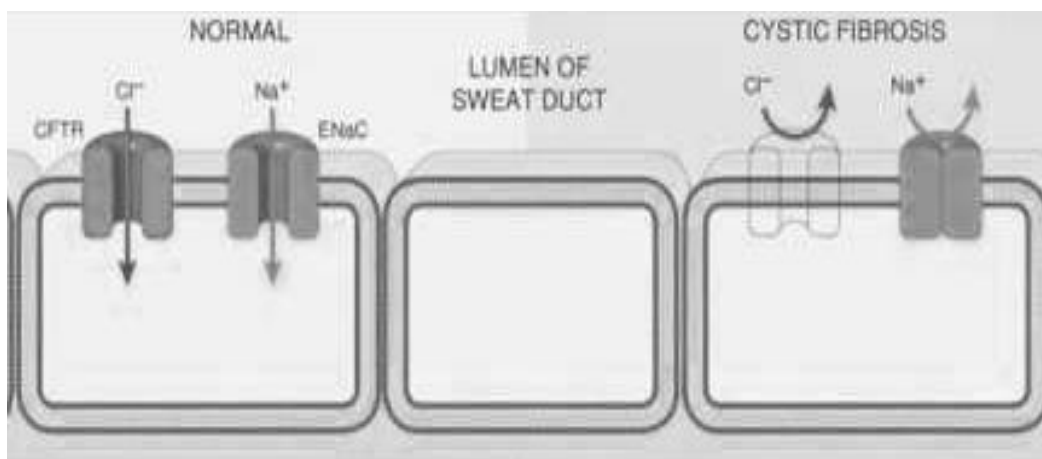


Figura 2. Función normal y en la FQ de la proteína CFTR en la glándula sudorípara.

Figura tomada de: *Robbins Basic Pathology. Elsevier Saunders, 2013.*

CFTR: proteína transportadora de la fibrosis quística; FQ: fibrosis quística

1.2.3 Regulación de la actividad del CFTR

La secreción que recubre el árbol respiratorio procede del epitelio bronquial y de la actividad de las glándulas submucosas. El movimiento de los cilios en la capa hace progresar la secreción hacia los grandes bronquios, ayudando a eliminar las partículas y bacterias retenidas en la capa superior (5). En la FQ el movimiento de los cilios está alterado debido a la elevada viscosidad de las

secreciones, lo cual dificulta una adecuada limpieza y da como resultado la obstrucción de los bronquios y finalmente las infecciones respiratorias.

El transporte defectuoso de iones a través del canal CFTR produce secreciones espesas, no sólo en los pulmones, sino también a nivel de páncreas, hígado, intestino y tracto reproductivo, y a un aumento de contenido de sal en las secreciones de las glándulas sudoríparas. Por tanto, el típico paciente afecto de FQ clásica desarrollará manifestaciones clínicas multisistémicas de la enfermedad.

1.3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA FIBROSIS QUÍSTICA

La FQ se manifiesta en su forma clásica y más habitual por enfermedad pulmonar obstructiva crónica, IP exocrina, elevación de Cl⁻ en sudor e infertilidad en varones por azoospermia obstructiva. Presentaciones más atípicas incluyen pacientes con suficiencia pancreática (SP), que suponen aproximadamente el 15% de los pacientes diagnosticados, incluso casos con niveles normales de electrolitos en sudor y afectación pulmonar leve(6) .

Las complicaciones más frecuentes incluyen el íleo meconial (IM) que está presente en cerca del 10-20% de los pacientes al nacimiento, el síndrome de obstrucción intestinal distal, la pancreatitis, la enfermedad hepática asociada, la diabetes y la poliposis nasal, entre otras (tabla 1).

1.3.1. Manifestaciones clínicas del sistema respiratorio

La principal causa de morbimortalidad en estos pacientes va a ser la afectación pulmonar (2).

En el lactante, las alteraciones respiratorias pueden ser la primera manifestación, con tos, obstrucción bronquial o neumonías de repetición. En esta edad predominan las bronquitis y neumonías de repetición y los cuadros de atelectasia por tapones de moco. En los adolescentes y adultos aparecen complicaciones como aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA) (5%), asma (20%), neumotórax (5%), hemoptisis (7%) o poliposis nasal (15%). En las fases

más avanzadas de la enfermedad están presentes las bronquiectasias, hipertensión pulmonar y cor pulmonale (7).

RESPIRATORIAS	GASTROINTESTINAL	GENITOURINARIO
Tos productiva crónica	Insuficiencia pancreática	Ausencia bilateral de conductos deferentes
Sinusitis	Diabetes	Infertilidad masculina
Bronquiolitis/Asma	Ileo meconial	Disminución fertilidad femenina
Colonización por P. aeruginosa	Síndrome de obstrucción intestinal distal	
Colonización estafilocócica	Déficit vitamínicos	OTROS
Bronquiectasias	Pancreatitis recurrente	Alcalosis hipoclorémica e hiponatrémica
Acropaquias	Ictericia neonatal prolongada	Pseudotumor cerebri
Infección por micobacterias atípicas	Cirrosis biliar con hipertensión portal	Osteoporosis
Aspergilosis broncopulmonar alérgica	Prolapso rectal	
	Vólvulo en época fetal	

Tabla 1: Resumen de manifestaciones clínicas típicas de FQ. Tabla de elaboración propia. FQ: fibrosis quística.

1.3.2. Manifestaciones digestivas y nutricionales

Durante el periodo de lactante suelen aparecer los primeros síntomas de IP con presencia de heces voluminosas, brillantes, adherentes y de olor fétido. Presentan frecuentemente estancamiento ponderoestatural pese a apetito conservado o incluso aumentado. Durante la edad preescolar y escolar, el cuadro clínico es más florido y las manifestaciones digestivas y respiratorias están presentes en el 85% de los casos (8).

En el ámbito digestivo pueden aparecer las crisis de dolor abdominal, que constituyen el síndrome de obstrucción distal o equivalente del IM. No son raros los prolapsos de recto (15%), la infección sinopulmonar recurrente y la esteatorrea con desnutrición.

A partir de la adolescencia puede aparecer diabetes mellitus (DM) (5%) y enfermedad hepática relacionada con la FQ (10-12%).

1.3.3. Diabetes

En la FQ existe una alteración del páncreas exocrino que conlleva en un 85% de los pacientes IP desde etapas muy precoces de la vida. Por otra parte y como consecuencia de la fibrosis pancreática y el reemplazo del tejido normal por tejido graso, se puede ver afectado el páncreas endocrino con una disminución de las células β y consecuentemente, una disminución de la secreción de insulina y diabetes mellitus.

Estas manifestaciones son de aparición tardía en el proceso evolutivo de la enfermedad, generalmente en la segunda década de la vida; entre los 15 y 24 años. Sin embargo, la mayor esperanza de vida hace que el diagnóstico de las alteraciones del metabolismo glucídico sea cada vez más frecuente.

1.4. DIAGNÓSTICO DE LA FIBROSIS QUÍSTICA

En la mayoría de los individuos afectados, existe poca o ninguna dificultad a la hora de establecer el diagnóstico de FQ. Los criterios diagnósticos clásicos son bien conocidos, confirmándose en presencia de una característica fenotípica de FQ (enfermedad sinopulmonar crónica, alteraciones digestivas y nutricionales, síndromes de pérdida de sal, o ausencia bilateral de conductos deferentes) y una concentración de Cl^- en sudor $\geq 60 \text{ mmol/l}$. En estos pacientes generalmente se detectan dos mutaciones graves causantes de la enfermedad en el gen CFTR (88%) aunque, en ocasiones, se encuentra una mutación grave y una leve. Pueden tener o no IP siendo el 85% de pacientes afectados insuficientes pancreáticos (9).

Se establece el diagnóstico de “FQ no clásica o atípica”, o más recientemente conocida como CFTR-RD (related disorders), si se halla al menos una de las características fenotípicas citadas, junto con un test del sudor con resultado borderline (Cl^- 30–60mmol/l) y detección de dos mutaciones causantes de la enfermedad (10). Podemos encontrar tanto dos mutaciones leves como una mutación grave y una leve. Estos pacientes generalmente tienen suficiencia pancreática y enfermedad pulmonar más leve que los que sufren una FQ clásica, y la afección clínica puede ser de uno o varios órganos.

Sin embargo, existe una zona gris en la que la diferenciación de ciertos casos como CFTR-RD y FQ no es fácil. En aquellos muy próximos a cumplir los criterios requeridos para el diagnóstico de FQ se prefiere su categorización como CFTR-RD con un seguimiento clínico estrecho de al menos una vez al año. En algunos de estos pacientes nunca se darán los criterios para el diagnóstico de FQ, mientras que otros podrán progresar y precisar seguimiento más estrecho en Unidades especializadas (11).

Es importante destacar la importancia de la clínica del paciente a la hora de interpretar adecuadamente los resultados obtenidos en el test del sudor y el estudio genético de mutaciones. De ahí la dificultad añadida al diagnóstico realizado a partir del cribado neonatal de FQ, con una historia clínica y sintomatología del recién nacido (RN) muy limitada.

1.4.1. Diagnóstico bioquímico

El test del sudor sigue siendo una prueba fundamental en el diagnóstico. El método descrito por Gibson y Cooke (1959) se basa en la medición del Cl^- en sudor estimulado mediante iontoforesis con pilocarpina.

La afectación de la glándula sudorípara da lugar a una elevada concentración de electrolitos en sudor, que se utilizan desde hace años como prueba diagnóstica para FQ.

Existen dos métodos de determinación siendo de elección el test cuantitativo de iontoforesis con pilocarpina o QPIT. Los intervalos de referencia aceptados universalmente para la concentración de Cl^- en sudor son: >60 mmol/L para considerar un diagnóstico de FQ positivo, 40-60 mmol/L se considera límite, y

<40 mmol/L normal. Así mismo existe el test de conductividad eléctrica de CINA expresado en mmol/L, cuyos valores se consideran positivos > 95, dudoso 50-95 y negativo < 50.

Los resultados de test del sudor pueden variar en función de la clase de mutación que presente el paciente (ver subapartado **1.4.2. Diagnóstico genético**). No se observan diferencias entre los valores de Cl⁻ en sudor de mutaciones pertenecientes a las clases I, II y III, pero estos valores suelen ser límite o incluso normales en pacientes que presentan al menos una mutación perteneciente a la clase IV. Sin embargo, pacientes con mutaciones que causan síntesis reducida o procesamiento parcialmente defectivo de la proteína CFTR normal (clase V) presentan valores de cloro en sudor similares a aquellos de las clases I, II y III (4).

Siempre se ha de tener en cuenta al interpretar los resultados del test del sudor, la posibilidad de falsos positivos o falsos negativos.

1.4.2. Diagnóstico genético

En la actualidad se han identificado más de 2000 mutaciones del gen de la FQ. Un 70% de los casos están causados por el alelo F508, mientras que otras 30 mutaciones explicarían otro 20% más. Esto 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(12).

Las distintas mutaciones se han agrupado en seis clases diferentes (figura 3):

- **Clase I**, alteración de la síntesis de la proteína; dando como resultado ausencia de síntesis de la proteína CFTR, debido a que las mutaciones afectan a zonas de empalme alterando el procesamiento del ARN, a causa de mutaciones de parada que resultan en proteínas CFTR truncadas que son en su mayoría inestables, y por mutaciones que cambian la pauta de lectura (deleciones e inserciones).
- **Clase II**, alteración del procesamiento y transporte de la proteína CFTR; tales como la mutación más frecuente c.1521_1523delcTT (p.Phe508del),

dan como resultado proteínas CFTR que no consiguen madurar y son degradadas.

- **Clase III**, defecto en los mecanismos de regulación de la función de la CFTR; dan como resultado proteínas CFTR que maduran y, por lo tanto, alcanzan la membrana apical de la célula, pero con una alteración en la regulación del canal de Cl⁻.
- **Clase IV**, descenso de la conductancia; originan canales CFTR con propiedades conductoras anormales, debido a mutaciones en el poro de conductividad.
- **Clase V**, se reduce la función de los canales de la CFTR en la membrana apical; producen como resultado una cantidad escasa de proteínas CFTR funcionantes.
- **Clase VI**, descenso de la estabilidad de la proteína y, por lo tanto, alteración de la función transportadora.

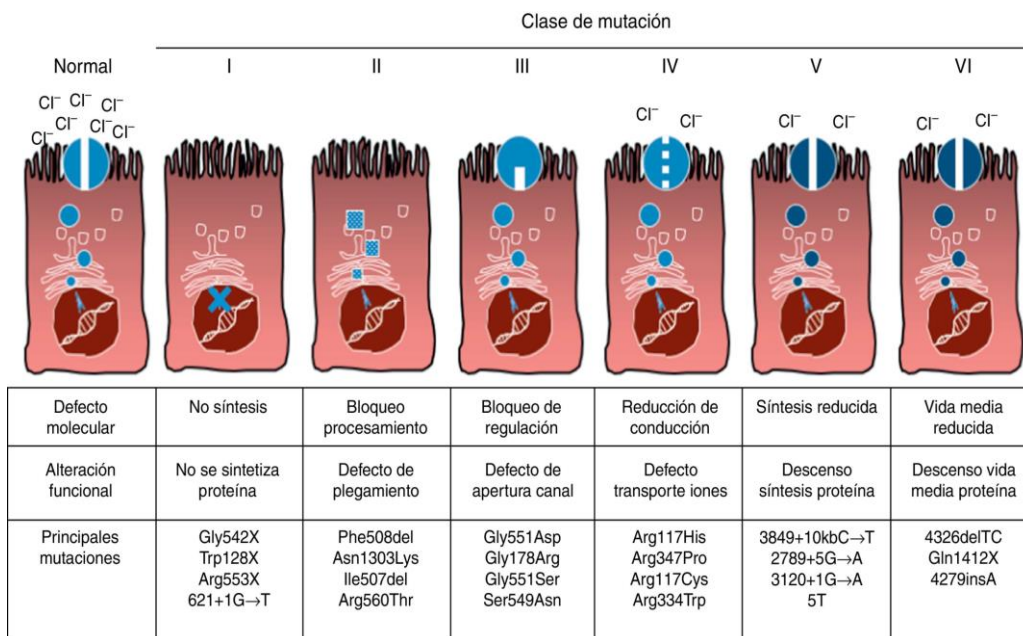


Figura 3: Clasificación de mutaciones en CFTR según defecto en el funcionamiento del canal de cloro. *Tabla Arch Bronconeumol 2014;50: 146-50 -Vol. 50.* CFTR: proteína transportadora de la fibrosis quística.

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% (13).

Un estudio retrospectivo llevado a cabo en 2006 por McKone et al. encontró diferencias significativas en cuanto a la tasa de mortalidad según las distintas clases funcionales de mutaciones. Los pacientes con genotipo de alto riesgo tenían dos veces más riesgo de morir en comparación con los de bajo riesgo (riesgo relativo, 2.25; IC 95% 1.77 -2.84; $p < 0.001$) (14). De esta manera, se diferenciaron dos grupos en cuanto a la influencia del genotipo en la producción de proteína y, como consecuencia, la morbimortalidad:

- Mutaciones clase I,II y III: Genotipos de alto riesgo, mediana de edad supervivencia 24,2 años (rango intercuartílico 18.4 - 32.0 años)
- Mutaciones clase IV y V: Genotipos de bajo riesgo, media de edad supervivencia 37,6 años (rango intercuartílico 28.8-47.9 años)

Esta clasificación puede tener utilidad como herramienta pronóstica para los pacientes diagnosticados mediante cribado neonatal, ya que en el momento del diagnóstico el genotipo suele ser uno de los pocos datos clínicos disponibles.

Tras el éxito de los nuevos moduladores de CFTR como ivacaftor y la combinación de ivacaftor y lumacaftor, muchos esfuerzos y líneas de investigación se han dirigido al desarrollo y ensayo de nuevas moléculas que restauren la función del canal CFTR (15). Ivacaftor está aprobado en varios países como tratamiento en pacientes adultos y pediátricos afectados con mutaciones de clase III como G551D (16). Sin embargo con la aparición de la combinación ivacaftor/lumacaftor activa para la mutación más frecuente en toda la población como es la F508del se estima que los moduladores de CFTR tendrían indicación en aproximadamente el 50-55% de la población con FQ (17). En 2016 la combinación de ivacaftor y lumacaftor (Orkambi®) fue aprobado por la FDA para niños de 6 a 11 años homocigotos para esta mutación (18).

1.5. CRIBADO NEONATAL

1.5.1. Ventajas del cribado neonatal para la fibrosis quística

La incidencia de esta enfermedad junto con un método de cribado relativamente simple y fácil de realizar y con una alta sensibilidad justifica, en gran medida, la implantación de un programa de cribado neonatal. Éste tiene como principal objetivo realizar un diagnóstico temprano de la misma antes de que se manifieste la clínica e iniciar, por tanto, un tratamiento precoz. Desde su implantación a finales de 2002 ha permitido diagnosticar el 95% de los casos.

En la última revisión de la Cochrane en 2009 se incluyen dos ensayos con 1.124.483 RN de los cuales 210 afectados de FQ. El objetivo era determinar si el diagnóstico precoz mediante cribado neonatal previene o reduce el daño en los órganos y mejora los resultados clínicos en la población enferma, todo ello sin incurrir en efectos secundarios inaceptables. El estudio analizado demostraba una disminución en la desnutrición grave en los pacientes diagnosticados mediante cribado, mejores resultados de radiografía de tórax al momento del diagnóstico pese a detectar una colonización más precoz por *Pseudomonas aeruginosa*. Se concluía que los costes del cribado fueron menores que los costes de un diagnóstico tradicional (19).

1.5.2. Determinación de tripsina inmunorreactiva (TIR) del cribado neonatal

En 1979 Crossley et al. demostraron que los valores de tripsina inmunorreactiva (TIR) estaban elevados en las muestras de sangre obtenidas en los niños afectados de FQ. La concentración elevada de TIR en sangre es consecuencia de la obstrucción parcial o completa de los canalículos pancreáticos que produce que refluya dicha enzima hacia la circulación sanguínea. Tras esta publicación, la determinación de la TIR en una gota de sangre seca se impuso como método definitivo por ser un método simple, fiable y de alta sensibilidad (20).

Los protocolos habitualmente empleados incluyen la determinación de TIR en sangre de talón entre el tercer y quinto día de vida, la cual está disponible en la Comunidad de Aragón desde 2008.

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 RN, disminuyendo notablemente a partir de los 20-21 días de vida.

Los valores de 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 una parte, la TIR en muestras muy precoces y en RN con IM afectados de FQ puede ser normal. Por el contrario factores como la prematuridad, el estrés y la asfixia perinatal o la pertenencia a la raza negra pueden elevar los niveles de TIR en RN sanos. El intervalo de referencia de TIR puede variar según el origen étnico de los RN. Los RN afroamericanos residentes en Europa tienen valores más altos de TIR y la mayoría de los RN cribados positivos en esta población podría ser considerada como "falsos positivos".

A pesar de estas consideraciones no se recomienda una estrategia especial para los RN prematuros y/o enfermos aunque puede ser útil registrar el origen étnico del RN.

Existe una situación, el IM, en la cual se realiza directamente el test del sudor, sin determinaciones de TIR por el riesgo de falsos negativos. También existen otros errores posibles derivados de una mala realización de la técnica de recogida de sangre en el papel de filtro o de laboratorio entre las que se incluye la determinación del punto de corte de TIR (21). Todo ello queda recogido en la siguiente tabla (tabla 2):

Falsos positivos	Falsos negativos
Prematuridad	Ileo meconial
Estrés	Técnica de recogida
Asfixia perinatal	Error de laboratorio
Origen étnico (afroamericanos)	Punto de corte de TIR

Tabla 2: Determinación de TIR. Falsos positivos y negativos del cribado neonatal de FQ. TIR: tripsina inmunorreactiva; FQ: fibrosis quística. Tabla de elaboración propia.

Diversos estudios han sugerido que concentraciones elevadas de TIR se relacionen con los niveles obtenidos en el test del sudor y estén igualmente influenciados por el genotipo. Se ha postulado que pacientes portadores sanos tengan cifras más elevadas de TIR y test del sudor con respecto a la población sana (22). Algunos estudios recientes como el de Paracchini et al. muestran diferencias significativas en valores más elevados de TIR en pacientes afectados o portadores de FQ (23). Otro estudio italiano sugiere que RN con 2 mutaciones relacionadas con CFTR (de las cuales una causante de FQ) y cifras de TIR normal tienden a concentraciones en el test del sudor menores que aquellos neonatos con genotipo similar pero TIR elevada en cribado neonatal; lo que podría indicar un menor riesgo de desarrollar FQ (24).

1.5.3. Estrategias del cribado neonatal para la fibrosis quística

Una determinación de TIR elevada, obliga a realizar estudio genético de la misma sangre de talón (protocolo TIR/ADN), con nueva extracción en sangre periférica para análisis genético ampliado en aquellos con detección de, al menos, una mutación para FQ. Otros protocolos establecidos en comunidades como Cataluña incluyen una segunda la determinación de TIR entre los 25-40 días de vida (protocolo TIR/TIR) (25) .

Este sistema de cribado conduce 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 RN situaciones de estrés emocional e incertidumbre. Para ello, se han establecido diferentes protocolos en el cribado neonatal de la FQ, entre los cuales están:

1.5.3.1. Estrategia TIR/TIR

El protocolo TIR/TIR tiene como principal inconveniente el precisar una segunda determinación de TIR en los pacientes, lo cual implica dificultades como contactar con las familias e incrementa la ansiedad generada en los padres en espera del resultado del mismo.

Según una revisión sistemática realizada en 2006 por la Universidad de York que evaluaba y demostraba la costo-efectividad de la introducción del cribado neonatal y comparaba cuatro métodos diferentes de cribado ésta sería la estrategia elegida por un menor coste por año de vida (26)(27).

1.5.3.2. Estrategia TIR/ADN

El protocolo TIR/ADN, por el contrario, se realiza con la misma muestra de sangre de talón. Al aumentar el número de mutaciones estudiadas, aumenta también la detección de portadores sanos, lo cual conlleva una serie de ventajas, como permitir consejo genético, e inconvenientes, por la confusión generada en las familias en especial ante diagnósticos dudosos (28).

Esta estrategia tiene una mayor sensibilidad y especificidad y disminuye el tiempo hasta el diagnóstico con lo que reduce la ansiedad generada en los padres en espera de una segunda determinación de TIR (29).

Existen discrepancias en cuanto a mutaciones estudiadas e indicación de realización del test del sudor en distintos países. Por ejemplo, en EEUU se lleva a cabo el test del sudor únicamente en RN con cifras de TIR elevada y 1 o 2 mutaciones detectadas en el estudio genético. En algunos Estados como Nueva York también se indica el test del sudor en cribados con TIR muy elevadas y 0 mutaciones (30)(31).

Esta estrategia TIR/ADN, con posterior realización de test del sudor, es la empleada en la Comunidad Autónoma de Aragón. En el caso que en el estudio genético inicial presente una mutación en alguno de los alelos y/o presente un test del sudor dudoso o alterado, se amplía el estudio genético mediante la extracción de sangre periférica en el niño y sus progenitores.

1.5.4. Consejo genético y cribado de portadores

El consejo genético ofrecido a familias con mutaciones en heterocigosis en posteriores embarazos ha supuesto una ligera disminución en la incidencia de RN afectos de FQ desde la introducción del cribado.

Por otra parte, se ha propuesto la realización de cribado de portadores con el objetivo de detectar adultos heterocigotos y consecuentemente ofrecer alternativas reproductoras y/o de diagnóstico preimplantacional previo al nacimiento del primer hijo. Este cribado no es de rutina y está restringido por ley en algunos estados, limitado por cuestiones fundamentalmente éticas. Si bien su aplicación en algunas regiones de Italia habría podido suponer una disminución en la incidencia de FQ (32), en modo alguno este cribado de portadores podría reemplazar al cribado neonatal ya que ambos tienen funciones complementarias (33).

1.5.5. Interpretación de resultados

Cuando un RN presenta los dos TIR positivos (estrategia TIR/TIR) o una determinación de TIR positiva una vez sometidos al estudio genético (estrategia TIR/ADN) y a la prueba del sudor, se plantean las siguientes situaciones:

- **Falso positivo:** RN que presenta tanto el estudio genético como el test del sudor normal.
- **Portador:** RN con una sola mutación y test del sudor normal.
- **Diagnóstico de FQ:** RN con dos mutaciones que causan enfermedad y test del sudor alterado se consideran enfermos.
- **No concluyente:** RN con test del sudor dudoso y que presentan un alelo mutado que causa enfermedad y una mutación que no expresa la enfermedad típica, pero que se deben controlar a fin de evaluar la expresión fenotípica de su genotipo.

Este último grupo de RN con una mutación clásica y una prueba del sudor con valores dudosos o incluso normal, en los que se realiza una ampliación del estudio genético y se identifica una mutación leve de fenotipo incierto, son los que presentan un dilema en el diagnóstico. Entre las mutaciones que se incluyen en esta categoría de “leve” o de fenotipo incierto se encuentran la R117H, 3849+10kb, A455E y P67 (34)(35).

Mientras que la mayoría de los pacientes portadores de mutaciones de significado incierto o “varying clinical consequence” no cumple nunca criterios diagnósticos de FQ, una pequeña proporción de ellos lo hace (36).

También se ha publicado un aumento de detección de mutación IVS8-6(5T) conocida como polimorfismo/alelo 5T en pacientes con TIR elevada y portadores. 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. Su presencia en los varones se asocia en ocasiones a un tipo de CFTR-RD como es la agenesia congénita de los vasos deferentes (CBAVD), incluso a alguna forma leve de FQ aunque parecen implicados otros factores genéticos no conocidos (37).

Similar es el caso de la mutación R117H, se trata de una mutación leve con significado clínico variable que afecta a la apertura del canal de Cl⁻ y transporte de iones a través del mismo (tipo III y IV). Acompañada de la mutación 5T en el mismo cromosoma y a otra mutación grave causante de FQ (por ejemplo deltaF508) se puede asociar a enfermedad, aunque ninguna de las dos, de manera aislada, puede considerarse mutación de FQ.

Por el contrario existen mutaciones como I148T que no se ha demostrado su presencia sea causante de la enfermedad.

Con el objetivo de revisar y recopilar información funcional, clínica y pronóstica sobre las mutaciones CFTR, en especial para portadores de mutaciones raras ha surgido el proyecto CFTR2 (The Clinical and Functional Translation of CFTR) (38). Además se ha sugerido que, como parte del estudio genético, se clasifiquen las mutaciones en cuatro grupos según sean: A) causantes de FQ; B) asociadas a CFTR-related disorders; C) no tener consecuencias clínicas; D) significado clínico desconocido o incierto (37).

Existe controversia acerca de si es apropiado incluir en el cribado neonatal las mutaciones relacionadas con formas leves o relacionadas con CFTR o si únicamente deberían incluirse mutaciones claramente causantes de formas clásicas y graves de insuficiencia pancreática (39). Sin embargo, y como se desarrolla más adelante, la correlación genotipo-fenotipo no siempre se ha constatado. En ocasiones, pacientes portadores de mutaciones aparentemente

leves desarrollan en los primeros años de vida síntomas que se beneficiarían de un diagnóstico precoz (40). Por todo ello parece razonable incluir esas mutaciones en el cribado neonatal, incluso cuando esto pueda suponer un problema en la información, manejo y seguimiento clínico que se les da a estos pacientes.

1.6. RELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO

No hay una correlación clara entre el genotipo y el fenotipo. Las distintas mutaciones suponen un amplio espectro de fenotipos, desde FQ clásica caracterizada por IP y test del sudor alterado a formas más leves de la enfermedad con suficiencia pancreática o CFTR related disorders, donde el diagnóstico no puede realizarse por ausencia de cumplimiento de los criterios diagnósticos clásicos (40).

La correlación entre genotipo y fenotipo solo se ha podido constatar para la IP, no así para la gravedad de la enfermedad pulmonar. Se ha postulado la existencia de factores genéticos secundarios, denominados modificadores, que modulan la gravedad de la enfermedad y la influencia de factores epigenéticos.

Las consecuencias fenotípicas de una determinada mutación CFTR, o de un genotipo CFTR, son variables de un enfermo a otro, debido a la acción de genes modificadores y factores ambientales. Por ello no es recomendable en el momento del diagnóstico apoyarse únicamente en el genotipo CFTR a la hora de establecer el pronóstico de la enfermedad(37).

2. HIPÓTESIS

- Valores más elevados de TIR en prueba del talón se corresponden, con mayor probabilidad, a pacientes afectados de FQ clásica, definidos como portadores de 2 mutaciones causantes de manifestaciones clínicas graves.
- Es posible definir puntos de corte de TIR a partir de los cuales sea más probable que el RN no presente ninguna mutación de FQ, sea portador sano, tenga una enfermedad leve (CFTR-RD) o esté afecto de enfermedad clásica.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Analizar si existen diferencias en los niveles de TIR entre los diferentes grupos de recién nacidos con cribado alterado para FQ según sean sanos, portadores o enfermos, diferenciando estos últimos en FQ clásica y no clásica o CFTR related disorder. Los subgrupos quedan definidos posteriormente en la tabla 3 en el apartado de material y métodos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las posibles variaciones de los valores de TIR en función del sexo de los neonatos.
- Evaluar la posible variación de los valores de TIR según la edad gestacional.
- Valorar la influencia de la hospitalización en periodo neonatal en los valores de TIR.
- Evaluar el valor predictivo de TIR.
- Establecer si existe correlación entre la concentración de TIR y la conductancia de cloruro en el test del sudor.
- Determinar un nuevo punto de corte de TIR en función del estudio genético con mayor valor predictivo positivo para FQ clásica.

4. MATERIAL Y MÉTODO

4.1. POBLACIÓN A ESTUDIO

Se han analizado niños nacidos en el Hospital Infantil Miguel Servet de Zaragoza en el periodo de tiempo comprendido entre enero de 2011 y noviembre de 2016, ambos inclusive, con TIR elevada en el cribado neonatal; así como aquellos niños afectados de FQ leve (CFTR-RD) y clásica con cribado neonatal realizado, controlados en la Unidad de FQ pediátrica del Hospital Infantil Miguel Servet de Zaragoza, independientemente del año y de su lugar de nacimiento.

4.1.1. Criterios de inclusión

- RN con cribado neonatal alterado para FQ, definido como cifras de TIR por encima del valor de corte de 60 ng/ml, y nacidos en el Hospital Miguel Servet de Zaragoza durante el periodo de tiempo comprendido entre 2011-2016.
- Niños controlados en la Unidad de FQ pediátrica del Hospital Miguel Servet de Zaragoza con cribado neonatal a FQ realizado que están afectados de enfermedad leve o clásica, independientemente del año y del lugar de nacimiento.

4.1.2. Criterios de exclusión

- RN con cribado para FQ realizado en otros centros de la Comunidad de Aragón.
- RN a término o prematuros con cribado realizado más allá de la tercera semana de vida.
- RN con cribado alterado a los que no se haya realizado posterior test del sudor o no consten datos.

4.2. VARIABLES

- Semanas de edad gestacional.
- Fecha de nacimiento.
- Sexo del recién nacido.
- Peso del recién nacido (g).
- Hospitalización en periodo neonatal.
- Concentración de TIR en ng/ml (primera determinación).
- Días de vida de la determinación de TIR.
- Test de sudor: conductancia de cloruro sódico (CINa) (expresada en mmol/L).
- Estudio genético. Es criterio de inclusión en el estudio ya que se realiza como parte del protocolo TIR/ADN en todas las muestras que superaron el punto de corte establecido previamente de 60 ng/ml de TIR.

Desde la introducción del cribado neonatal para FQ en abril de 2008 hasta octubre de 2011 se utilizó la técnica INNOLIPPA que analizaba 36 mutaciones más frecuentes de CFTR en España. A partir de entonces se instauró el sistema de análisis ELUCIGENE para el rastreo de 50 mutaciones en el gen CFTR. El nivel de detección de este ensayo en cromosomas FQ de la población española es $\geq 80\%$. También se incluye 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, 1078delIT, V520F, L206W, W1282X, R560T, 2347delIG, Q890X, R553X, G551D, S549R(T>G), S549N, M1101K, G542X, 3905insT, Y1092X(C>A), S1251N, 444delA, 1811+1.6kbA>G, 1717-1G>A, R117H, R117C, N1303K, Y122X, 394delITT, 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.

En segundo lugar se definen distintos subgrupos atendiendo a las siguientes variables:

- 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)
- Sexo: niños y niñas.
- Grupo: sano, portador, CFTR-RD y FQ clásica (tabla 3).
- Tipos de mutaciones y polimorfismos más frecuentes.

Grupos de recién nacidos	
1. Sano	0 mutaciones y test sudor normal
2. Portador sano	1 mutación y test sudor normal
3. FQ leve (CFTR-RD)	2 mutaciones, una de ellas como mínimo clasificada como leve; con test del sudor normal, dudoso o alterado
4. FQ clásica	2 mutaciones con test del sudor positivo

Tabla 3: Clasificación por subgrupos de neonatos. FQ: fibrosis quística; CFTR-RD: CFTR related disorder. Tabla de elaboración propia.

4.3. ANÁLISIS PREVISTO

Las variables del estudio serán analizadas mediante técnicas descriptivas y sus resultados presentados mediante tablas o gráficos adecuados para el tipo de variable.

Se estudiará la relación entre las cifras de TIR y las distintas mutaciones estudiadas entre los grupos de estudio descritos previamente (apartado 4.2.).

Posteriormente, para decidir el uso de pruebas paramétricas o no paramétricas se aplicó la prueba de normalidad y bondad de ajuste de Kolmogorov–Smirnov con corrección de Lilliefors. Esta 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 comparaciones entre grupos e intragrupos se realizarán utilizando test paramétricos, siempre que las características distribucionales de los datos lo permitan, en caso contrario, se utilizarán pruebas no paramétricas.

El nivel de significación estadística en los contrastes será del 5 por ciento.

El análisis de los resultados obtenidos se llevará a cabo utilizando el programa estadístico SPSS 15.0 para Windows.

4.4. CONSIDERACIONES ÉTICO-LEGALES

El estudio ha solicitado la aprobación ética del Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón (CEICA).

El desarrollo del ensayo se ajusta a las normas de Buenas Prácticas Clínicas internacionales, a la Declaración de Helsinki en su última enmienda y a las normas y regulaciones internacionales y nacionales.

El nombre del paciente no aparece en ninguna publicación o comunicación de los resultados del estudio. Dado que este estudio es observacional retrospectivo sin ningún seguimiento, y que los datos se recogerán anonimizados, se solicita al CEICA la no necesidad de la recogida de consentimiento informado.

El investigador completa una lista en la que constan los nombres de los pacientes que participen en el estudio, su número de inclusión en el mismo, y su historia clínica. Sólo tendrán acceso a la documentación clínica del participante los investigadores y el personal encargado de garantizar la calidad de los datos y el análisis de los mismos.

La información personal no está disponible al público, cumpliendo con lo establecido en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter personal.

5. RESULTADOS

5.1. SELECCIÓN DE LA MUESTRA

Desde la introducción en abril de 2008 del cribado de FQ en la Comunidad Autónoma de Aragón, se han detectado hasta diciembre de 2016 en el Hospital Miguel Servet de Zaragoza, 941 niños con TIR elevada. Para este trabajo, no se han analizado los nacidos antes de 2011 o en otros centros hospitalarios por la dificultad en la recogida de los resultados de test del sudor. Se excluye un niño con un valor de TIR de 551 ng/ml por considerarlo valor atípico.

Atendiendo a los criterios de inclusión y exclusión, se ha obtenido una muestra de 523 individuos. En la figura 4 se puede comprobar el proceso de selección y obtención de la población a estudio.

5.2. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA

En primer lugar realizamos un análisis descriptivo sobre el total de pacientes incluidos.

5.2.1. DATOS PERINATALES

En cuanto a datos perinatales, la distribución según la edad gestacional fue de 457 RNT (87.4%), considerado como edad gestacional superior o igual a 37 semanas, 26 RNPT (5%), de 32 a 37 semanas, y 25 RNMP (4.8%) con edad gestacional inferior a 32 semanas. Con un rango entre 24 y 42 semanas de edad gestacional. 15 casos fueron datos perdidos (2.9%).

La distribución por sexos fue de 277 mujeres y 245 varones, lo que supone un 53% y 47% respectivamente.

El peso de RN medio fue 3048 g (DE 28), con límites entre 600 y 4500 g.

Ingresaron en periodo neonatal por diferentes motivos, 73 de los 523 niños (14%).

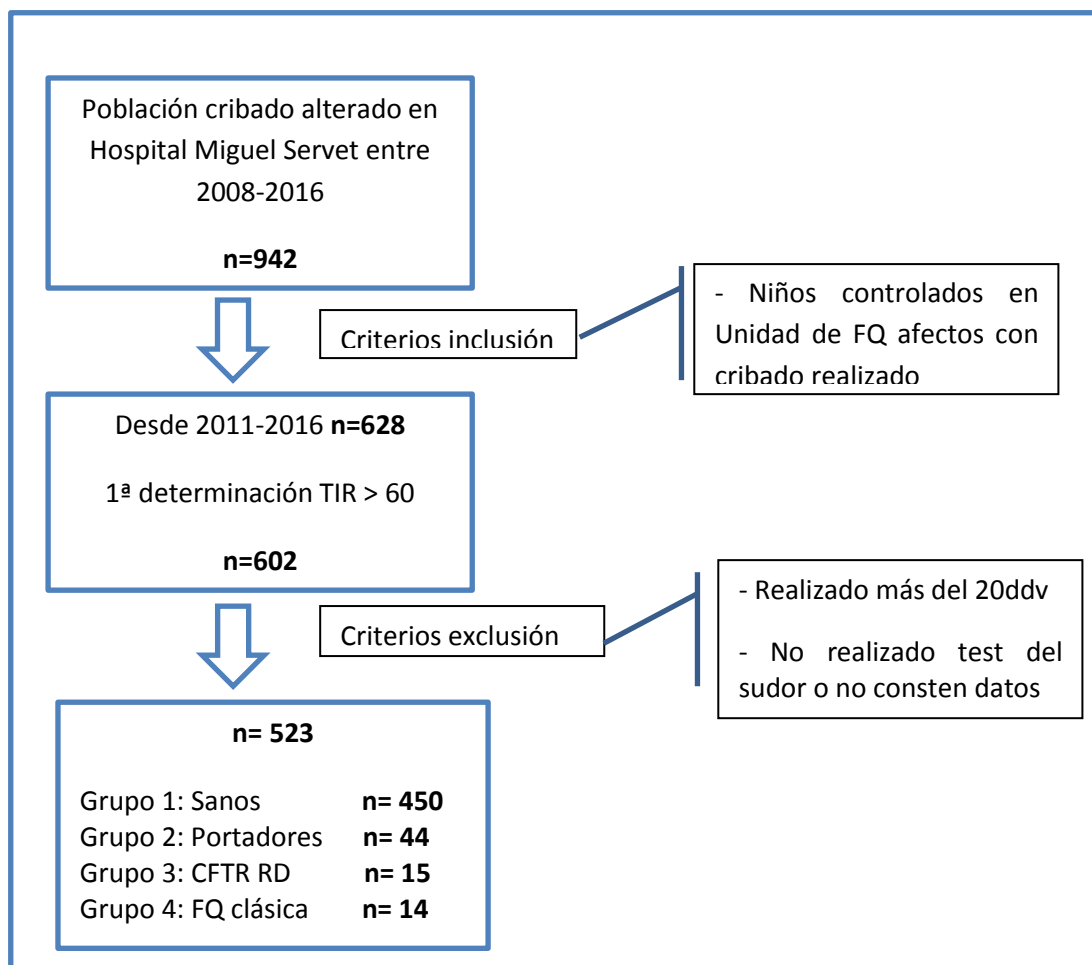


Figura 4: Diagrama de selección de los pacientes del estudio. *CFTR-RD: CFTR-related disorder; FQ: fibrosis quística; n: número de casos. Figura de elaboración propia.*

5.2.2. VALORES DE TIR

El valor medio de TIR fue 79.88 ng/ml (DE 1.34), intervalo de confianza al 95% 77.24-82.52 ng/ml. Valor mínimo 60 y máximo 367. El día de vida medio de la determinación de TIR fue 3.38 (DE 0.058), en ningún caso inferior a los 2 ddv.

5.2.3. TEST DE SUDOR

El valor medio de la conductancia de CIna en sudor fue 31.54 mmol/L (DE 0.82), intervalo de confianza al 95% 29.94-33.14 mmol/L y rango entre 13 y 270 mmol/L. Se muestran los valores agrupados en intervalos de referencia en la tabla 4.

Conductancia ClNa en sudor (mmol/L)	N	Porcentaje
<50 <i>Negativo</i>	496	95%
50-95 <i>Dudoso</i>	11	2.1%
>95 <i>Positivo</i>	15	2.9%

Tabla 4: Valores de conductancia de cloruro en el test del sudor agrupados por resultado. *ClNa*: cloruro sódico; *n*: número de casos.

5.2.4. ESTUDIO GENÉTICO

En 449 pacientes (85.9%) no se encontró ninguna mutación en ninguno de los dos alelos en CFTR responsable de FQ. La mutación más frecuente fue la denominada clásicamente como delF508, encontrada en forma heterocigota en 27 pacientes (5.1%). 7 de los pacientes de la muestra presentaba dicha mutación en homocigosis (1.3%).

En las tablas 5 y 6 se muestran los resultados en relación a las mutaciones y polimorfismos encontrados, ordenados de forma descendente de frecuencia.

Se realiza revisión de las mutaciones encontradas en los pacientes de nuestra muestra consultando la aplicación de CFTR2 database y Cystic Fibrosis Mutation database para dicha revisión y se clasifican según la alteración que provocan en la proteína CFTR en 6 grupos (tabla 7). A su vez se agrupan los tipos 1-3 en mutaciones graves y 4-6 en mutaciones leves.

Alelo 1	N	Porcentaje (%)
Sin mutación	449	85,9
delF508	34	6,5
I148T	3	0,6
I507del	2	0,4
D1152H	2	0,4
N1303K	2	0,4
1811+1,6kbA>G	1	0,2
1811+1,2kbA>G	1	0,2
R334W	1	0,2
S549R(T>GA)	1	0,2
G85E	1	0,2
R117H	1	0,2
c.1826A>G	1	0,2
G542X	1	0,2
712-1G>T	1	0,2
Polimorfismos		
T5TG11	7	1,3
T5TG12	12	2,3
T5TG13	3	0,6

Tabla 5: Mutaciones en CFTR encontradas en alelo 1 y su porcentaje. **CFTR**: proteína transportadora de la fibrosis quística; **n**: número de casos.

Alelo 2	N	Porcentaje (%)
Sin mutación	494	94,5
delF508	7	1,3
D1152H	2	0,4
G85V	2	0,4
R75Q	2	0,4
1811+1,6kbA>G	1	0,2
R334W	1	0,2
2789+5G>A	1	0,2
G1130A	1	0,2
Y1014C	1	0,2
c.1826A>G	1	0,2
G542X	1	0,2
712-1G>T	1	0,2
R347H	1	0,2
3991G>T	1	0,2
L1135F	1	0,2
Gran duplicación CFTR1-3	1	0,2
K95E	1	0,2
125G/C	1	0,2
Polimorfismos		
T5TG12	2	0,4

Tabla 6: Mutaciones en CFTR encontradas en alelo 2 y su porcentaje. **CFTR:** proteína transportadora de la fibrosis quística; **n:** número de casos.

Clase	Nomenclatura clásica	Nombre proteína	Nombre DNA
TIPO 1	G542X	c.1624 G>T	p.Gly542X
TIPO 2	delF508 I507del G85E L206w	c.1521_1523delCTT c.1519_1521delATC c.254G>A c.617T>G	p.Phe508del p.Ile507del p.Gly85Glu p.Leu206Trp
TIPO 3	S549R(T>GA) R117H (3-4)	c.1647T>G c.350 G>A	p.Ser549Arg p.Arg117His
TIPO 4	R334W D1152H	c.1000 C>T c.3454 G>C	p.Arg334Trp p.Asp1152His
TIPO 5	2789+5G>A T5TG12 T5TG13	c.2657 + 5 G>A c.1210-34TG[12]T[5]	
TIPO 6	1811+1,6kbA>G	c.1679+1.6kbA>G	
Non causing	r75Q I148T	c.224G>A c.443T>C	p.Arg75Gln p.Ile148Thr

Tabla 7: Clases de mutaciones más frecuentes y nomenclatura. *Tabla de elaboración propia.*

5.3. ANÁLISIS DE VALORES DE TIR

Los valores de TIR no presentan una distribución normal según la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov con corrección de Lilliefors (**p<0,0001**). Claramente hay una distribución que se alarga hacia valores altos.

La distribución está expresada en las figuras 5 y 6:

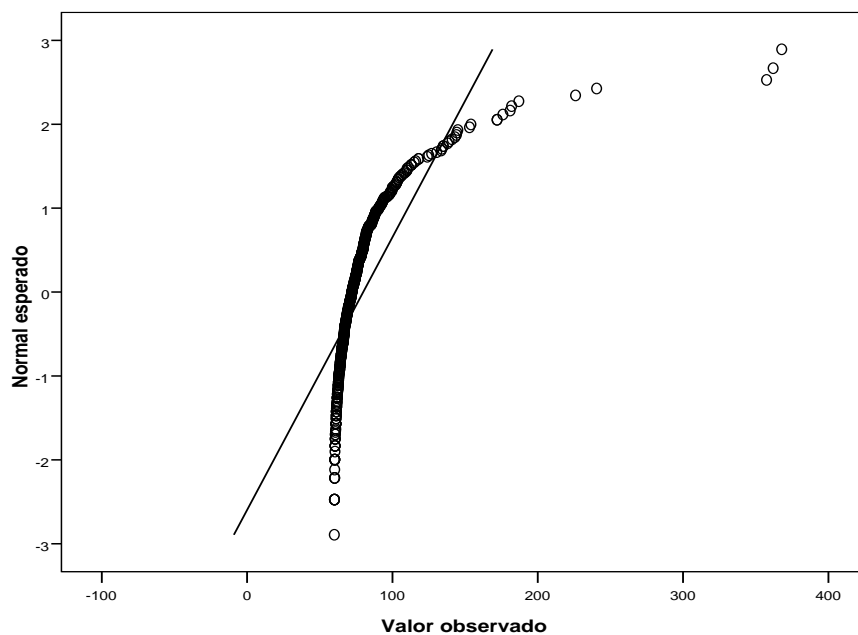


Figura 5: Distribución de los valores de TIR en el total de la muestra (n=523)
 TIR: tripsina inmunorreactiva; n: número de casos.

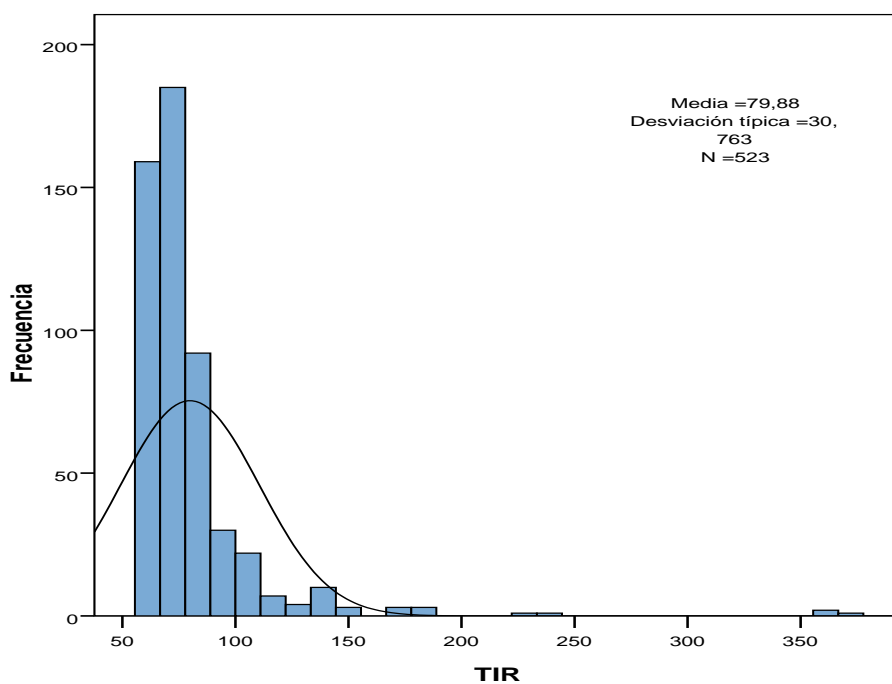


Figura 6: Histograma con curva de normalidad en el total de la muestra (n=523)

5.3.1. Análisis de concentraciones de TIR por subgrupos

a) Según grupos de pacientes

En la muestra y atendiendo a los grupos de pacientes encontramos, 450 sanos, es decir falsos positivos, 44 portadores sanos de mutaciones, 15 CFTR RD y 14 FQ clásicas.

Es decir que en la población de neonatos con elevación de tripsina (n= 523) se detectaron 44 portadores sanos, lo que supone una incidencia de 1/12.

Los valores de TIR entre los cuatro grupos se exponen en la tabla 8. La media de TIR para el grupo de pacientes sanos (grupo 1) fue de 75 ng/ml (límites 60-172), para portadores sanos (grupo 2) 81 ng/ml (61-143), CFTR-RD (grupo 3) fue 99 ng/ml (60-226) y para FQ clásica (grupo 4) 201 ng/ml (82-368).

TIR	n	Media	DE	Min	Max
SANO	450	75.36	0.71	60.0	172
PORTADOR SANO	44	80.98	3.28	60.6	143
CFTR RD	15	98.91	12.19	60.5	226
FQ	14	201.34	25.40	81.98	367

Tabla 8: Media, DE de los valores de TIR (ng/ml) y valores mínimo y máximo según grupos de pacientes. Siglas: TIR: tripsina inmunorreactiva, CFTR-RD: CFTR related disorder, FQ: fibrosis quística. Tabla de elaboración propia.

Al comparar mediante test no paramétricos el valor de TIR entre los cuatro grupos se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Comparando los grupos de dos en dos se encontraron diferencias significativas entre los valores de TIR del grupo 4 con resto de subgrupos ($p < 0.001$) y entre grupo 1 y grupo 3 ($p = 0.028$). Se encontró que los valores no difieren entre grupo 2 y grupo 1 y 3. Dicho análisis queda representado en la tabla 9, en negrita se muestran las diferencias significativas.

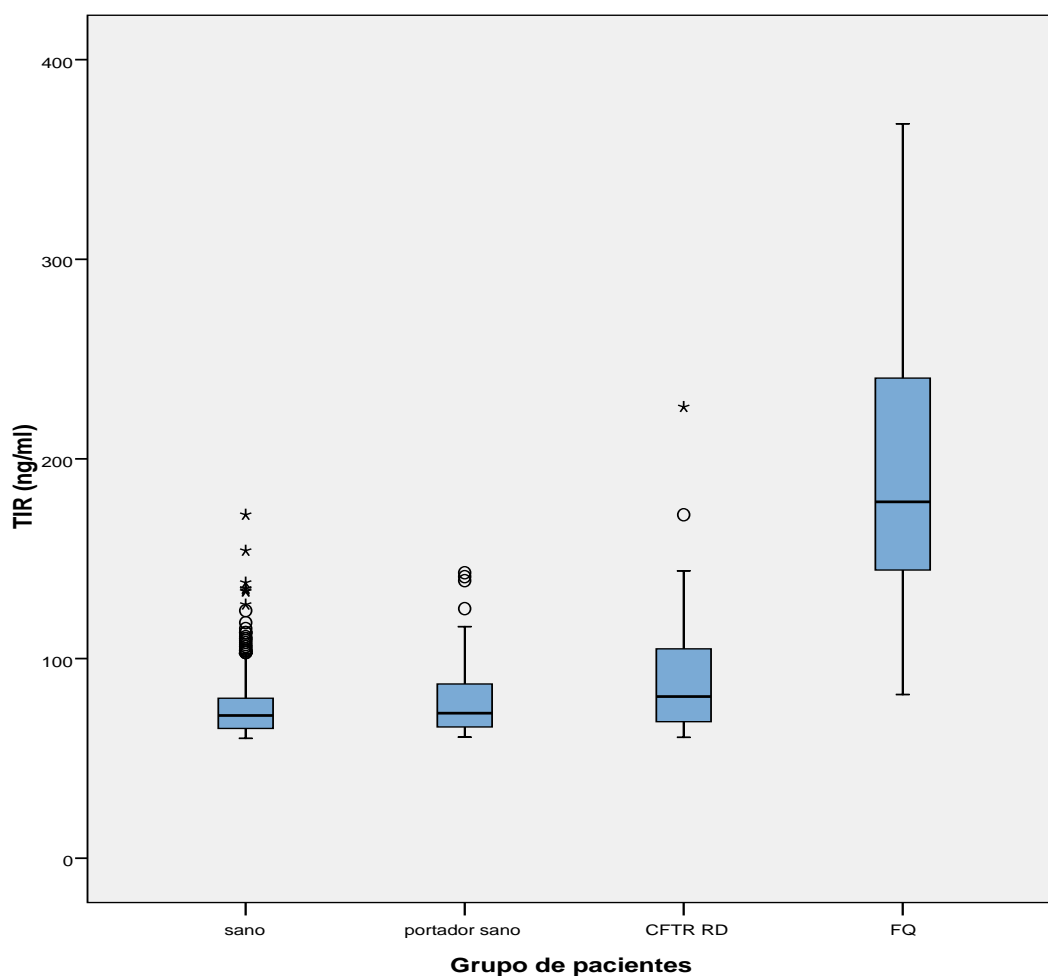


Figura 7: Distribución de los valores de TIR (ng/ml) atendiendo a la clasificación por subgrupos de pacientes. Siglas: TIR: tripsina inmunorreactiva, CFTR-RD: CFTR related disorder, FQ: fibrosis quística. Figura de elaboración propia.

Grupo FQ	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Grupo 1 (Sano)			
Grupo 2 (Portador)	P= 0.177		
Grupo 3 (CFTR-RD)	P= 0.028	P= 0.240	
Grupo 4 (FQ)	P<0.001	P<0.001	P<0.001

Tabla 9: Análisis de TIR por subgrupos (p<0.001). Siglas: TIR: tripsina inmunorreactiva, CFTR-RD: CFTR related disorder, FQ: fibrosis quística. Tabla de elaboración propia.

b) Según semanas de edad gestacional

Se analiza la variación en las concentraciones de TIR en función de las semanas de gestación. Se agrupan los recién nacidos en tres grupos diferenciando recién nacidos muy pretérmino (RNMPT) a los niños con edad gestacional inferior a 32 semanas, pretérmino (RNPT) de 32 a 37 semanas y a término (RNT) los mayor o igual a 37 semanas de edad gestacional.

Para verificar si existe variación respecto a la edad gestacional se ha realizado un análisis descriptivo de los estadísticos media, mediana y percentiles agrupando a los recién nacidos en tres grupos de edad gestacional (tablas 10 y 11). Para dicho análisis no se incluyen los pacientes con genética alterada para evitar incurrir en el sesgo derivado de la mayor concentración de TIR en pacientes afectados de FQ comentado en el apartado previo, además de una distribución no homogénea de los mismos al tratarse todos ellos de RNT.

Se observan niveles superiores de TIR en el grupo de RN muy prematuros frente al grupo de prematuros tardíos o RN a término ($p=0.042$), siendo esta diferencia significativamente mayor entre RNMT y RNT ($p=0.019$).

TIR	n	Media	DE	Mediana
RNT	429	75.62	0.77	71.20
RNPT	25	75.27	2.45	74.10
RNMPT	25	81.78	3.29	77.80

Tabla 10: Media, desviación estándar de los valores de TIR (ng/ml) y mediana según edad gestacional. Siglas: RNMPT: recién nacidos muy pretérmino; RNPT: recién nacidos pretérmino; RNT: recién nacidos a término; TIR: tripsina inmunorreactiva. Tabla de elaboración propia.

Si analizamos con test no paramétricos los valores de TIR entre recién nacidos prematuros (agrupando todos los menor o igual a 36 semanas de edad gestacional) y a término (los mayores de esta edad) encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p= 0.036$). La distribución de TIR según antecedente de prematuridad se muestra en la figura 8.

TIR	Percentiles						
	5	10	25	50	75	90	95
RNT	60,68	61,84	64,80	71,20	80,50	97,95	110,15
RNPT	61,66	62,52	66,00	74,10	81,00	95,60	109,04
RNMPT	61,77	65,44	69,25	77,80	92,65	104,80	125,60

Tabla 11: Percentiles de los valores de TIR (ng/ml) según edad gestacional. *Siglas: RNMPT: recién nacidos muy pretérmino; RNPT: recién nacidos pretérmino; RNT: recién nacidos a término; TIR: tripsina inmunorreactiva. Tabla de elaboración propia.*

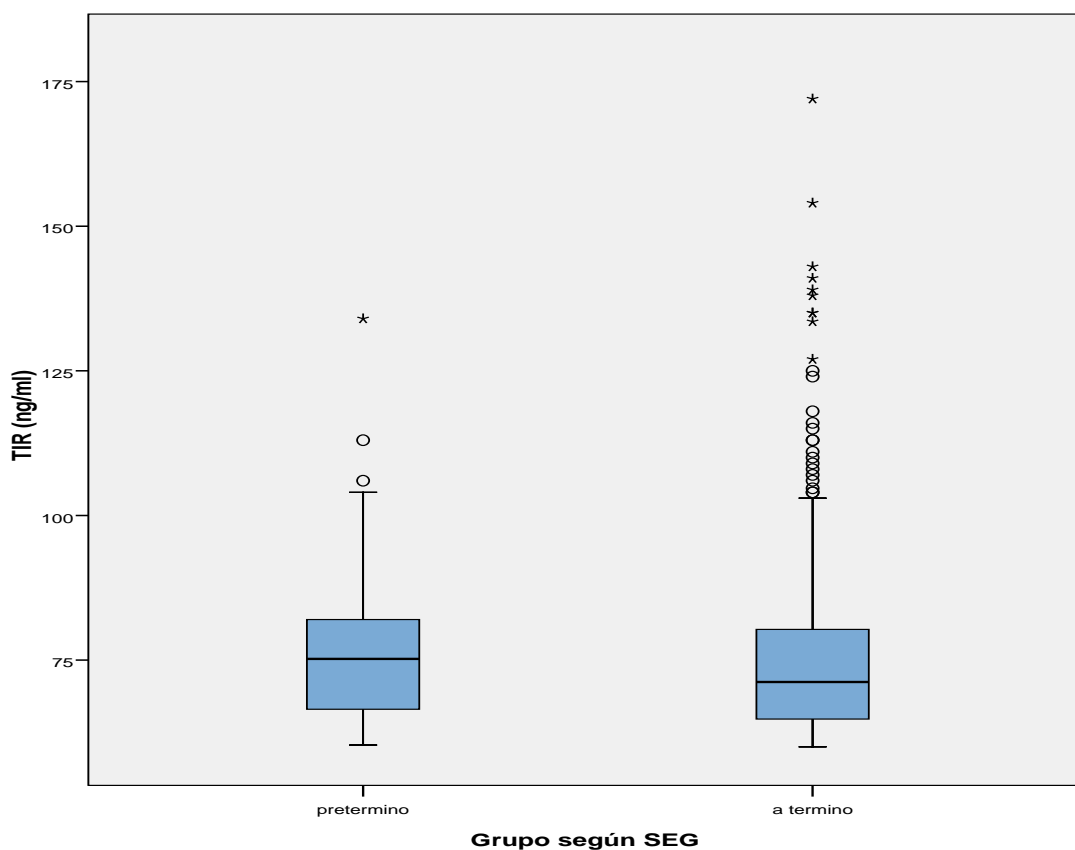


Figura 8: Distribución de los valores de tripsina inmunorreactiva atendiendo a antecedente de prematuridad. *Siglas: SEG: semanas de edad gestacional; TIR: tripsina inmunorreactiva. Figura de elaboración propia.*

c) Según la época del año

Se han analizado las variaciones en la distribución de los valores de TIR según mes y estación de nacimiento. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre ambas variables ($p=0.86$). La media de TIR queda representada en la siguiente figura.

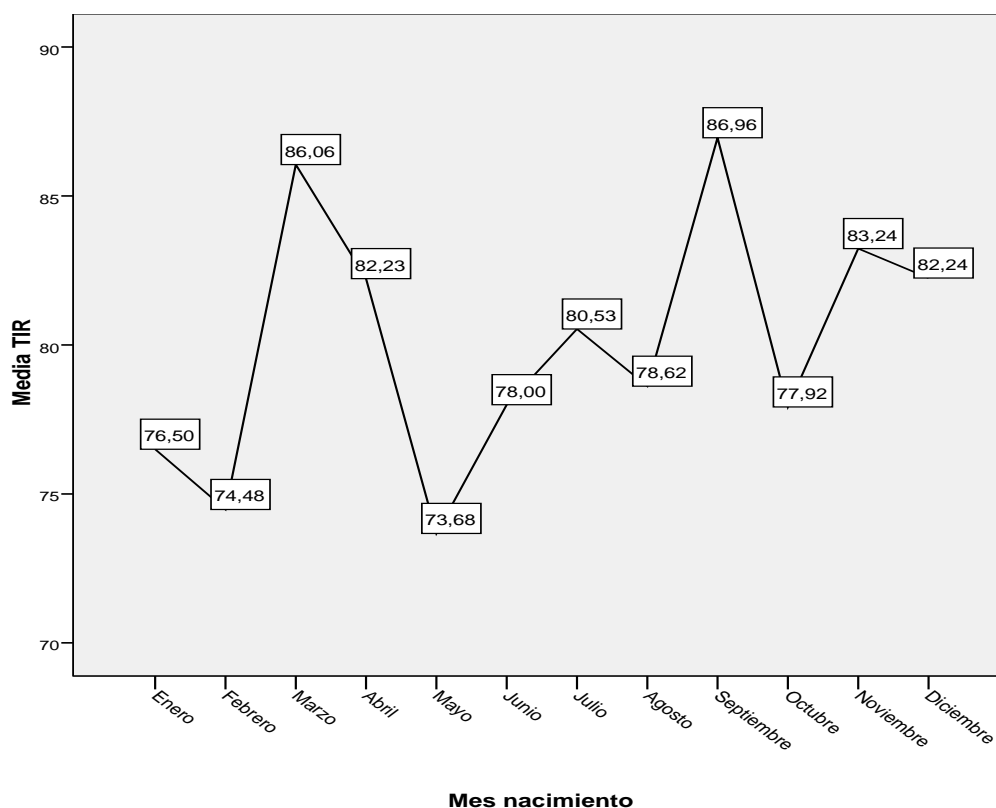


Figura 9: Variación estacional de TIR según mes de nacimiento. *TIR: tripsina inmunorreactiva. Figura de elaboración propia.*

d) Según sexo

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 paramétricos, no encontrando diferencias significativas entre ambos sexos ($p=0,287$). Los valores se expresan en la tabla 12.

TIR	n	Media	DE	Mediana
Femenino	277	79,32	1,88	71,50
Masculino	245	80,53	1,93	72,90

Tabla 12. Media, DE de los valores de TIR (ng/ml) y mediana según sexo. TIR: tripsina inmunorreactiva; n: número de casos; DE: desviación estandar. Tabla de elaboración propia.

e) Según ingreso en periodo neonatal

Se estudia si los valores de TIR se ven influenciados por la hospitalización durante el periodo neonatal, entendiendo este en el momento de la realización del cribado. Encontramos en el grupo de ingresados (n=73), un valor medio de 81.28 (IC 95% 75.83-86.72) y en el de no ingresados (n=449), un valor medio de TIR de 79.65 (IC 95% 76.70-82.61).

Pese a observarse concentraciones mayores de TIR en el grupo de pacientes ingresados estas diferencias no son significativas ($p=0.217$).

5.3.2. Análisis de concentraciones de TIR según el test del sudor

Para estudiar la posible relación entre el valor de TIR y la conductividad de CINA en sudor se realizó el test de correlación de Spearman para muestras no paramétricas encontrando una correlación directa significativa entre ambos valores: $r=0.13$ ($p=0.002$), por lo que podemos concluir que un mayor nivel de TIR se correlaciona con una mayor cifra en el test de sudor (figura 10). Al comparar por subgrupos encontramos una correlación directa mayor en los pacientes afectados de FQ (n=28, incluyendo clásica y CFTR-RD) siendo $r=0.611$ ($p=0.001$) lo que implica una correlación lineal del 61.1% entre ambas variables.

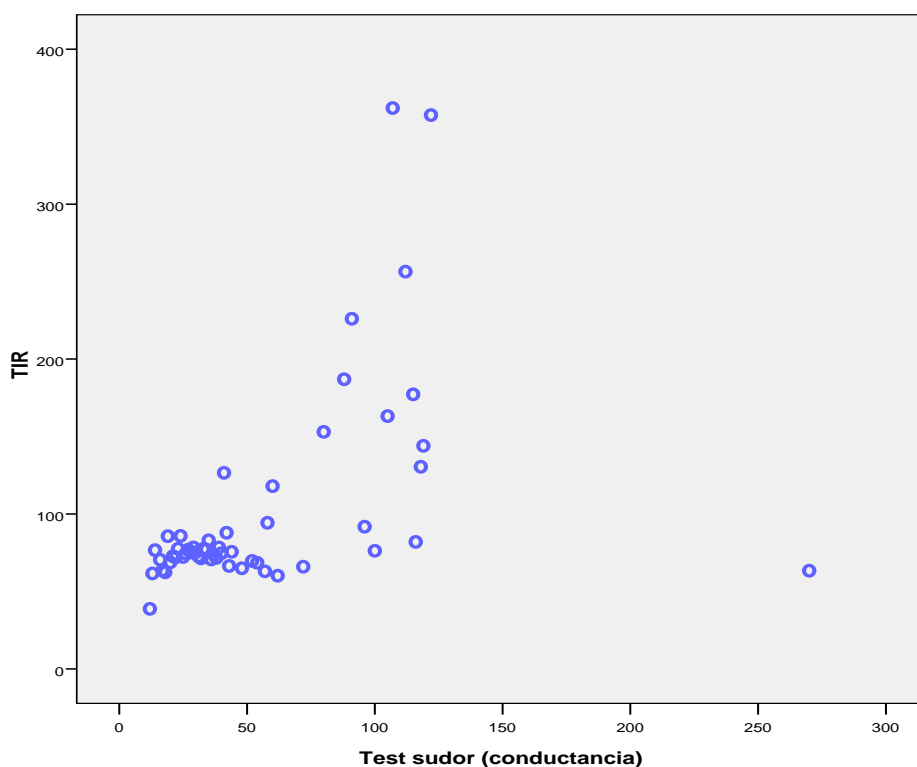


Figura 10: Correlación de valores de TIR con la conductancia de cloruro en sudor. TIR: tripsina inmunorreactiva. Figura de elaboración propia.

5.4. VALORES DE REFERENCIA

Como queda descrito previamente se observan valores significativamente mayores en las concentraciones de TIR en pacientes afectados de FQ clásica. El objetivo de este análisis es optimizar el punto de corte para minimizar los falsos positivos y negativos(41), en especial de FQ clásica ya que por su gravedad exige un diagnóstico más precoz.

Con este fin se realiza la curva COR que se muestra en figura 11 con un área bajo la curva de 0.977 ($p < 0.001$). Mediante curva ROC se calculó valor de corte de TIR para FQ clásica siendo de 81.94 ng/ml con una sensibilidad de 100% y especificidad 77.6%. Permitiendo disminuir los falsos positivos sin perder ningún paciente afecto de FQ clásica en el cribado.

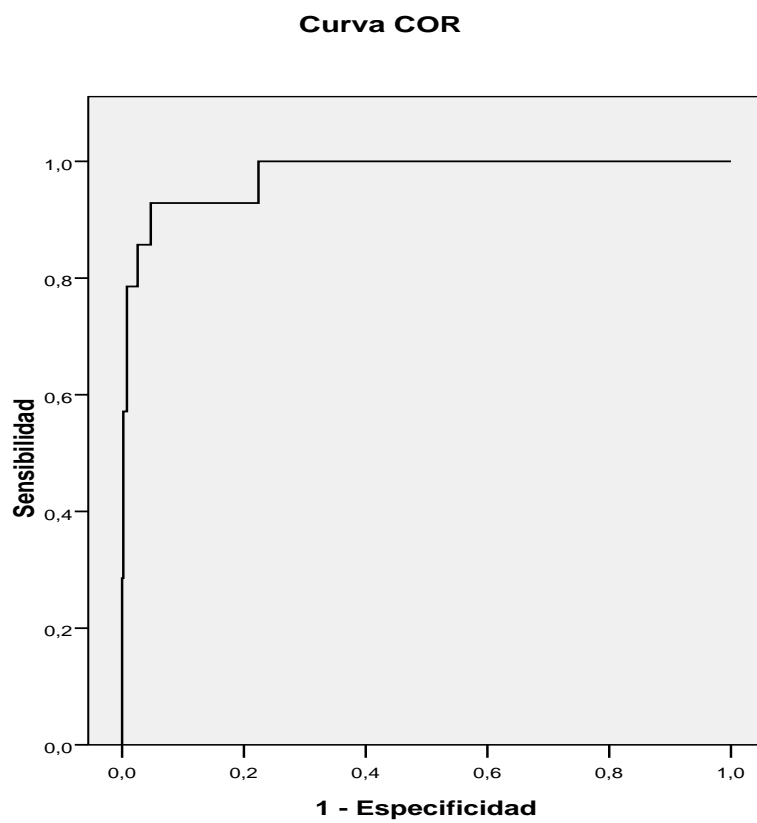


Figura 11: Curva COR de TIR para FQ clásica. Siglas: TIR: tripsina inmunorreactiva. Figura de elaboración propia.

6. DISCUSIÓN

La reciente introducción del cribado neonatal de FQ mediante la determinación de TIR ha supuesto una mejora evidente en la calidad de vida y supervivencia de estos pacientes al permitir un diagnóstico precoz de la enfermedad. Sin embargo, se trata de una prueba de cribado y, como tal, presenta una baja especificidad, lo que se traduce en un elevado número de falsos positivos.

El principal inconveniente derivado de esto es la ansiedad producida en las familias y el elevado coste que supone la realización del estudio genético y el test del sudor a todo RN con cribado alterado. Por otra parte, ha permitido el diagnóstico de portadores sanos y afectados de FQ en su forma no clásica, cuya inclusión como parte del mismo no se encuentra en la actualidad exenta de debate debido al menor beneficio derivado del diagnóstico y mayor estrés provocado en las familias (28).

En relación con lo anteriormente expuesto se deduce la importancia de la determinación del punto de corte en la concentración de TIR establecido en cada hospital.

Por todo ello se plantea en el presente estudio la necesidad de establecer factores que influyan en la concentración de TIR y que puedan condicionar “falsos positivos”. Del mismo modo, determinar un punto de corte que permita detectar con mayor probabilidad paciente afectados de FQ clásica y una actuación y seguimiento más precoz.

Se parte de una muestra de 523 pacientes una vez aplicados los criterios de inclusión y exclusión. Se justifica la inclusión de pacientes afectados de FQ nacidos en otros hospitales desde la introducción del cribado por la escasa muestra obtenida en este subgrupo en un único centro.

Atendiendo a datos demográficos, se encuentra un porcentaje elevado de RN prematuros (10%) frente a término (87.4%) lo que se podría justificar en parte por la mayor concentración de TIR en RN pretérmino. En cuanto a la distribución por sexos, existe un discreto predominio de mujeres (53%) frente a varones (47%). El peso de RN medio al nacimiento es de 3048 con un rango muy amplio entre 600 y 4500gr al incluir en el mismo RNPT. Ingresaron en periodo neonatal por diferentes motivos, 73 de los 523 niños (14%).

No se recogen otras condiciones descritas en la evidencia actual que podrían influir en la concentración de TIR como es la edad materna, origen étnico o tipo de alimentación por dificultades derivadas de la recogida de datos al tratarse de un estudio retrospectivo (42).

Se obtiene un valor medio de TIR de 79.88 ng/ml con rango entre 60 ng/ml, que coincide con el punto de corte establecido del cribado, y valor máximo de 367 ng/ml, en una paciente afectada de FQ clásica portadora de 2 mutaciones graves. El día de vida medio de la extracción del cribado fue 3.38 días, en ningún caso inferior a los 2 ddv.

En el caso del test de conductancia de CINA en sudor, la gran mayoría de determinaciones realizadas (94.8%) fueron normales, es decir, por debajo del punto de corte de 50 establecido, siendo el valor medio de 31.54 mmol/L.

Mediante el estudio molecular se identifican 30 mutaciones y polimorfismos diferentes. Se observa una prevalencia predominante de la mutación del F508, encontrándose de forma heterocigota en hasta el 46% del total de pacientes portadores de alguna mutación en nuestra muestra (1). También se encuentran entre las mutaciones identificadas más frecuentes: G542X y N1303K, así como polimorfismos como T5TG12, que coincide con lo descrito en la bibliografía revisada(3). No obstante, la gran mayoría de mutaciones tiene una frecuencia inferior al 1%, que evidencian la elevada heterogeneidad molecular de la población en estudio.

En el análisis por subgrupos, se encontraron concentraciones de TIR significativamente superiores en el grupo de FQ clásica ($p < 0.001$) en comparación tanto con pacientes sanos y portadores como afectados de CFTR-RD. Así mismo se encontraron diferencias entre CFTR-RD y pacientes sanos ($p = 0.028$). Estos resultados son, por tanto, consistentes con otro estudio llevado a cabo por Parachinni et al (23), en el cual concluyen que valores más elevados de TIR en la prueba del talón se relacionan con mayor probabilidad con estar afecto de FQ. Del mismo modo y al igual que en nuestro estudio, tampoco encontraron diferencias entre el grupo de sanos y portadores.

Sin embargo, algunos estudios de Castellani et al (22) encuentran diferencias significativas entre pacientes sanos y portadores. Si bien este último punto no se demuestra en la muestra analizada, sí se observa mayor concentración de TIR en

el subgrupo de portadores frente a sanos. No obstante la distribución de concentraciones de TIR se solapan ampliamente entre los cuatro grupos establecidos y, en especial entre los tres primeros. En consecuencia, la predicción para clasificar a los pacientes en función de los valores de TIR es baja. Por otra parte, la ausencia de significancia también podría deberse al menor tamaño muestral con respecto a los estudios mencionados previamente.

La incidencia de portadores en nuestra muestra de 1/12 es superior a la de población general descrita en nuestro medio ya que partimos de pacientes con cifras de TIR elevadas, no sobre el total de la población (4).

La prematuridad, como queda comentado en la introducción, puede ser en sí misma una causa de elevación de TIR (43). Esto coincide con los resultados obtenidos ya que se observan niveles superiores de TIR en el grupo de RN muy prematuros (media 81.78 ± 1.54 ng/ml) frente al grupo de prematuros tardíos (75.27 ± 4.9 ng/ml) o RN a término (75.62 ± 6.58 ng/ml), siendo esta diferencia significativamente mayor entre RNMT y RNT ($p=0.019$).

Atendiendo a las concentraciones de TIR en función del sexo, como era de esperar y de acuerdo con la bibliografía revisada no se encuentran diferencias estadísticamente significativas.

Tampoco se encuentran diferencias en la media de TIR según el mes de nacimiento. No obstante, existen algunos estudios como el de Kloosterboer et al (44) donde si encontraron variaciones estacionales en los niveles de TIR del neonato.

Pese a no encontrarse diferencias significativas según el antecedente de ingreso neonatal, la media de TIR en RN hospitalizados es mayor que en aquellos sin este antecedente. Aunque el estrés neonatal está descrito como una causa de elevación de TIR, la ausencia de diferencias encontradas podría explicarse por la no recogida de motivo de ingreso; siendo, por ejemplo, claramente superior el estrés en aquellos RN ingresados en UCI-NN que precisan de ventilación mecánica que aquellos ingresados en cuidados intermedios por una causa potencialmente menos grave (45).

Si bien el estudio realizado detecta una correlación lineal estadísticamente significativa entre los valores de TIR y de CIna en sudor, de acuerdo con lo

descrito por otros autores (24); esta relación es débil $r=0.13$ ($p=0.002$) por lo que podría deberse a otras variables no recogidas. La correlación analizada es mayor en los pacientes afectados de FQ siendo $r=0.611$ ($p=0.001$) lo que implica una correlación lineal del 61.1% entre ambas variables.

Mediante curva ROC, se obtuvo un valor de corte óptimo para el diagnóstico de FQ clásica de 81.94 ng/ml con una sensibilidad de 100% y especificidad 77.6%, lo que supone que, en nuestra población, una concentración plasmática de TIR superior a este valor es indicativa de FQ. El punto de corte establecido, además, presenta una sensibilidad máxima, de forma que, por debajo de este nivel, ningún caso con FQ clásica queda sin identificar.

En cualquier caso, creemos razonable no elevar el punto de corte en los niveles de TIR de detección del cribado ya que portadores y pacientes con formas no clásicas quedarían sin diagnosticar y emplearlo únicamente como un marcador para el diagnóstico precoz. Sería especialmente útil en pacientes con una única mutación identificada en la primera genética en la que esté pendiente el estudio ampliado, siendo más probable que exista otra mutación en aquellos casos con cifras muy elevadas de TIR. Así mismo, es necesario realizar estudios prospectivos con un mayor tamaño muestral para obtener puntos de corte más fiables en los niveles de TIR en relación a esta patología.

7. LIMITACIONES Y FORTALEZAS

Limitaciones en la interpretación de los resultados de este trabajo son principalmente las relacionadas con posibles factores de confusión que puedan influir de forma extrínseca en los niveles de TIR como por ejemplo, variables como el origen étnico, la prematuridad o el estrés neonatal.

Otro hándicap sería el derivado de tratarse de un estudio limitado a un solo centro hospitalario lo cual conlleva variaciones importantes en el número de pacientes de cada subgrupo. Secundario a esto se ha incluido en el estudio todos los RN controlados en la Unidad de FQ lo cual permite aumentar el volumen de pacientes afectos pero puede suponer un sesgo en sí mismo.

Como principal fortaleza del estudio se encuentra un tamaño muestral relativamente grande recogido durante un periodo de tiempo prolongado a lo largo de 6 años.

8. LINEAS DE INVESTIGACIÓN

En la misma línea iniciada con este trabajo se podría ampliar el estudio de las distintas mutaciones detectadas y las variaciones de TIR según el defecto proteico. En este sentido queda por esclarecer el beneficio de detectar no sólo portadores sanos si no también mutaciones no causantes de FQ.

Un seguimiento prospectivo a largo plazo de pacientes afectos de formas no clásicas de FQ o CFTR-RD permitiría contribuir a ampliar el conocimiento de algunas de las más de 2000 mutaciones descritas en la actualidad.

9. CONCLUSIONES

1. Los recién nacidos afectados de FQ clásica presentan cifras significativamente más elevadas de TIR en el cribado neonatal.
2. Así mismo, se han observado concentraciones mayores de TIR en pacientes afectados de CFTR-RD frente al subgrupo de sanos.
3. La prematuridad puede influir en las concentraciones de TIR siendo las concentraciones de TIR claramente superiores en el caso de los muy prematuros, menores de 32 semanas de edad gestacional.
4. El sexo del recién nacido no influye sobre los niveles de TIR.
5. Un mayor nivel de TIR se correlaciona directamente con una mayor cifra en el test de sudor siendo esta correlación mayor en pacientes afectados de FQ clásica.
6. La gran mayoría de mutaciones encontradas tiene una frecuencia inferior al 1%, que evidencian la elevada heterogeneidad molecular de la población a estudio.
7. Un valor de corte óptimo para el diagnóstico de FQ clásica sería de 81.94 ng/ml con una sensibilidad de 100% y especificidad 77.6%.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Marshall B, Elbert A, Petren K, Rizvi S, Fink A, Ostrenga J, et al. Annual Data Report 2015 Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry. 2016.
2. Fajac I, Wainwright CE. New treatments targeting the basic defects in cystic fibrosis. *Presse Med* [Internet]. 2017 Jun;46(6):e165–75.
3. Gartner S, Alonso MJ, Figuerola J, Sirvent J, Mondejar P, Martin C, et al. Newborn screening for cystic fibrosis in Spain. *Eur Respir J* [Internet]. 2016; 48(suppl 60).
4. Salcedo A, Gartner S, Girón RM, García MD. *Tratado de Fibrosis Quística*. MD. 2012. Editorial: Justim SL.
5. Kumar V, Abbas AK, Aster JC, Robbins SL, Stanley L. Robbins basic pathology. 2012 Jun, 910.
6. Barrio Gómez de Agüero MI, García Hernández G, Gartner S. [Protocol for the diagnosis and follow up of patients with cystic fibrosis]. *An Pediatr (Barc)* [Internet]. 2009 Sep 1;71(3):250–64.
7. Escobar H, Sojo A. Fibrosis quística. *Protocolos diagnóstico-terapéuticos de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica SEGHNPAEP*. 2010. 99-110.
8. Katkin JP. Cystic fibrosis: Clinical manifestations and diagnosis - UpToDate.
9. Ong T, Marshall SG, Karczeski BA, Stern DL, Cheng E, Cutting GR. Cystic Fibrosis and Congenital Absence of the Vas Deferens [Internet]. GeneReviews(®). University of Washington, Seattle; 1993.
10. De Boeck K, Vermeulen F, Dupont L. The diagnosis of cystic fibrosis. *Presse Med* [Internet]. 2017 Jun;46(6):e97–108.
11. Bombieri C, Claustres M, De Boeck K, Derichs N, Dodge J, Girodon E, et al. Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders. *J Cyst Fibros* [Internet]. 2011;10:S86–102.

12. Hinzpeter A, Reboul M-P, Callebaut I, Zordan C, Costes B, Guichoux J, et al. The importance of functional tests to assess the effect of a new *CFTR* variant when genotype-phenotype correlation is not possible. *Clin Case Reports* [Internet]. 2017 May 1;5(5):658–63.
13. Chu CS, Trapnell BC, Curristin S, Cutting GR, Crystal RG. Genetic basis of variable exon 9 skipping in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA. *Nat Genet* [Internet]. 1993 Feb 1;3(2):151–6.
14. McKone EF, Goss CH, Aitken ML. *CFTR* Genotype as a Predictor of Prognosis in Cystic Fibrosis. *Chest* [Internet]. 2006 Nov;130(5):1441–7.
15. Zemanick ET, Daines CL, Dellon EP, Esther CR, Kinghorn B, Ong T, et al. Highlights from the 2016 North American Cystic Fibrosis Conference. *Pediatr Pulmonol*. 2016;51(6):650–7.
16. Davies JC, Cunningham S, Harris WT, Lapey A, Regelman WE, Sawicki GS, et al. Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of ivacaftor in patients aged 2-5 years with cystic fibrosis and a *CFTR* gating mutation (KIWI): an open-label, single-arm study. *Lancet Respir Med* [Internet]. 2016 Feb;4(2):107–15.
17. Konstan MW, McKone EF, Moss RB, Marigowda G, Tian S, Waltz D, et al. Assessment of safety and efficacy of long-term treatment with combination lumacaftor and ivacaftor therapy in patients with cystic fibrosis homozygous for the F508del-*CFTR* mutation (PROGRESS): a phase 3, extension study. *Lancet Respir Med* [Internet]. 2017 Feb;5(2):107–18.
18. Ratjen F, Hug C, Marigowda G, Tian S, Huang X, Stanojevic S, et al. Efficacy and safety of lumacaftor and ivacaftor in patients aged 6–11 years with cystic fibrosis homozygous for F508del-*CFTR*: a randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Respir Med* [Internet]. 2017 Jul;5(7):557–67.
19. Southern KW, Mérelle MME, Dankert-Roelse JE, Nagelkerke A. Newborn screening for cystic fibrosis. In: Southern KW, editor. *Cochrane Database of Systematic Reviews* [Internet]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2009
20. Crossley JR, Elliott RB, Smith PA. Dried-blood spot screening for cystic fibrosis in the newborn. *Lancet (London, England)* [Internet]. 1979 Mar 3;1(8114):472–4.

21. Rock MJ, Levy H, Zaleski C, Farrell PM. Factors Accounting for a Missed Diagnosis of Cystic Fibrosis After Newborn Screening. *Pediatr Pulmonol*. 2011 December ; 46(12): 1166–74
22. Castellani C, Picci L, Scarpa M, Dechecchi MC, Zanolla L, Assael BM, et al. Cystic fibrosis carriers have higher neonatal immunoreactive trypsinogen values than non-carriers. *Am J Med Genet Part A [Internet]*. 2005 Jun 1
23. Paracchini V, Seia M, Raimondi S, Costantino L, Capasso P, Porcaro L. Cystic Fibrosis Newborn Screening : Distribution of Blood Immunoreactive Trypsinogen Concentrations in Hypertrypsinemic Neonates. *JIMD Reports* 2012; 4. 113-6
24. Castellani C, Tridello G, Tamanini A, Assael BM. Sweat chloride and immunoreactive trypsinogen in infants carrying two CFTR mutations and not affected by cystic fibrosis. *Arch Dis Child*. 2016;1–3.
25. Hernández GG. Cribado neonatal de fibrosis quística. *An Pediatr Contin [Internet]*. 2014;12(1):34–8.
26. Simpson N, Anderson R, Sassi F, Pitman A, Tu LP, Lannin H. The cost-effectiveness of neonatal screening for cystic fibrosis: an analysis of alternative scenarios using a decision model. *Cost Effectiveness and Resource Allocation* 2005; 3:8
27. van den Akker-van Marle ME, Dankert HM, Verkerk PH, Dankert-Roelse JE. Cost-effectiveness of 4 Neonatal Screening Strategies for Cystic Fibrosis. *Pediatrics [Internet]*. 2006 Sep 1;118(3):896–905.
28. Perobelli S, Zanolla L, Tamanini A, Rizzotti P, Maurice Assael B, Castellani C. Inconclusive Cystic Fibrosis neonatal screening results: long-term psychosocial effects on parents. *Acta Paediatr [Internet]*. 2009 Dec;98(12):1927–34.
29. Massie JH, Curnow L, Armstrong DS, Francis I. Lessons learned from 20 years of newborn screening for cystic fibrosis. *MJA*. 2012 Jan; 196: 67–70
30. Kay DM, Langfelder-Schwind E, Decelie-Germana J, Sharp JK, Maloney B, Tavakoli NP, et al. Utility of a very high IRT/No mutation referral category in cystic fibrosis newborn screening. *Pediatr Pulmonol*. 2015;50(8):771–80.
31. Barben J, Castellani C, Dankert-Roelse J, Gartner S, Kashirskaya N, Linnane B,

- et al. The expansion and performance of national newborn screening programmes for cystic fibrosis in Europe. *J Cyst Fibros* [Internet]. 2017 Mar;16(2):207–13.
32. Castellani C, Picci L, Tamanini A, Girardi P, Rizzotti P, Assael BM. Association Between Carrier Screening and Incidence of Cystic Fibrosis. *JAMA* [Internet]. 2009 Dec 16;302(23):2573.
 33. Castellani C, Massie J, Castellani C. Newborn screening and carrier screening for cystic fibrosis: alternative or complementary?. *Eur Respir J* 2014; 43: 20–23 |
 34. LaRusch J, Jung J, General IJ, Lewis MD, Park HW, Brand RE, et al. Mechanisms of CFTR functional variants that impair regulated bicarbonate permeation and increase risk for pancreatitis but not for cystic fibrosis. *PLoS Genet* [Internet]. 2014 Jul;10(7):e1004376.
 35. Borowitz D, Parad RB, Sharp JK, Sabadosa KA, Robinson KA, Rock MJ, et al. Cystic Fibrosis Foundation practice guidelines for the management of infants with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-related metabolic syndrome during the first two years of life and beyond. *J Pediatr* [Internet]. 2009 Dec;155(6 Suppl):S106-16.
 36. Salinas DB, Sosnay PR, Azen C, Young S, Raraigh KS, Keens TG, et al. Benign and Deleterious Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Mutations Identified by Sequencing in Positive Cystic Fibrosis Newborn Screen Children from California. *PLoS One* [Internet]. 2016;11(5):e0155624.
 37. Castellani C, Cuppens H, Macek M, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros* [Internet]. 2008 May;7(3):179–96.
 38. Sosnay PR, Salinas DB, White TB, Ren CL, Farrell PM, Raraigh KS, et al. Applying Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Genetics and CFTR2 Data to Facilitate Diagnoses. *J Pediatr* [Internet]. 2017;181: S27-S32
 39. Scotet V, Audrezet M-P, Roussey M, Rault G, Dirou-Prigent A, Journal H, et al. Immunoreactive Trypsin/DNA Newborn Screening for Cystic Fibrosis: Should the R117H Variant Be Included in CFTR Mutation Panels? *Pediatrics* [Internet]. 2006 Nov 1;118(5):e1523–9.

40. Ren CL, Borowitz DS, Gonska T, Howenstine MS, Levy H, Massie J, et al. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator-Related Metabolic Syndrome and Cystic Fibrosis Screen Positive, Inconclusive Diagnosis. *J Pediatr* [Internet]. 2017 Feb;181:S45–S51.e1.
41. Smyth AR, Bell SC, Bojcin S, Bryon M, Duff A, Flume P, et al. European Cystic Fibrosis Society Standards of Care: Best Practice guidelines. *J Cyst Fibros* [Internet]. 2014;13:23–42.
42. Cortés E, Roldán AM, Palazón-bru A, Rizo-baeza MM, Manero H, Gil-guillén VF. Differences in immunoreactive trypsin values between type of feeding and ethnicity in neonatal cystic fibrosis screening : a cross-sectional study. 2014;1–7.
43. Massie J, Curnow L, Tzanakos N, Francis I. Markedly elevated neonatal immunoreactive trypsinogen levels in the absence of cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 2006;91:222–5.
44. Kloosterboer M, Hoffman G, Rock M, Gershan W, Laxova A, Li Z, et al. Clarification of Laboratory and Clinical Variables That Influence Cystic Fibrosis Newborn Screening With Initial Analysis of Immunoreactive Trypsinogen. *Pediatrics* [Internet]. 2009;123(2).
45. 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* [Internet]. 1989;6(1):42–8.