

## ANÁLISIS DE CASOS POSITIVOS DE CRIBADO NEONATAL DE ERRORES CONGÉNITOS DEL METABOLISMO EN LA COMUNIDAD DE MADRID

Ana Cambra Conejero (1), Laura Martínez Figueras (1), Alicia Ortiz Temprado (1), Paula Blanco Soto (1), Álvaro Martín Rivada (2), Laura Palomino Pérez (2), Elvira Cañedo Villarroya (2), Consuelo Pedrón Giner (2), Pilar Quijada Fraile (3), Elena Martín-Hernández (3), María Teresa García Silva (3), Silvia Chumillas Calzada (3), Marcello Bellusci (3), Amaya Belanger-Quintana (4), Sinziana Stanescu (4), Mercedes Martínez-Pardo Casanova (4), Ana Moráis López (5), Ana Bergua Martínez (5), Pedro Ruiz-Salas (6), Belén Pérez González (6), Magdalena Ugarte (6) y Miguel L.F. Ruano (1)

(1) Laboratorio de Cribado Neonatal de la Comunidad de Madrid. Servicio de Bioquímica Clínica. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid. España.

(2) Sección de Gastroenterología y Nutrición. Hospital Infantil Universitario Niño Jesús. Madrid. España.

(3) Unidad de Enfermedades Mitocondriales-Metabólicas Hereditarias. Centro de Referencia Nacional (CSUR) y Europeo (MetabERN) en Enfermedades Metabólicas. Hospital Universitario 12 de Octubre. Madrid. España.

(4) Centro de Referencia Nacional (CSUR) en Enfermedades Metabólicas. Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid. España.

(5) Unidad de Nutrición Infantil y Enfermedades Metabólicas. Hospital Universitario La Paz. Madrid. España.

(6) Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares. Universidad Autónoma de Madrid. IdiPAZ. CIBERER. Madrid. España.

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de interés.

### RESUMEN

**Fundamentos:** La tecnología de espectrometría de masas en tándem (MS/MS) en los programas de cribado neonatal ha permitido la detección de gran número de errores congénitos del metabolismo (ECM). En la comunidad de Madrid se implementó en marzo de 2011 incluyendo 13 aminoacidopatías, defectos de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos y acidemias orgánicas. El objetivo de este estudio fue describir nuestra experiencia y analizar los casos positivos de cribado en un periodo de 9 años (2011-2019).

**Métodos:** Durante el periodo de estudio se realizó el cribado mediante MS/MS a 592822 recién nacidos en la Comunidad de Madrid. Se cuantificaron aminoácidos, acilcarnitinas y succinilacetona en todas las muestras que cumplieron los criterios de calidad. Se calcularon medias, medianas, percentiles y desviación típica de los analitos y ratios de interés.

**Resultados:** Se derivaron a las unidades clínicas de seguimiento por sospecha de una ECM un total de 901 (0,15 %) casos. Se confirmaron 230 casos de 30 ECM diferentes (prevalencia 1:2577), 11 de los cuales no eran inicialmente objetivo de detección del programa. El valor predictivo positivo global fue de 25,6 %. Durante este periodo se detectaron dos falsos negativos. Las enfermedades con mayor prevalencia fueron fenilcetonuria/hiperfenilalaninemia y deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena media (1:6444 y 1:13174 respectivamente). 93 % de los casos fueron detectados en fase presintomática.

**Conclusiones:** En estos 9 años de experiencia se han detectado numerosos casos de ECM con un valor predictivo positivo global aceptable. Estos resultados confirman la utilidad del cribado neonatal de ECM como programa de salud pública.

**Palabras clave:** Cribado neonatal ampliado, Errores congénitos del metabolismo, Espectrometría de masas en tándem, Falsos positivos.

### ABSTRACT

#### Newborn Screening Program in the Community of Madrid: evaluation of positive cases

**Background:** Tandem mass spectrometry (MS/MS) is being used for newborn screening since this laboratory testing technology increases the number of metabolic disorders that can be detected from dried blood-spot specimens. In the Community of Madrid, it was implemented in March 2011 and it includes 13 aminoacidopathies, fatty acid oxidation disorders and organic acidemias. The aim of this study was to describe our experience and evaluate the screening positive cases in a period of 9 years (2011-2019).

**Methods:** During the period of the study, a total of 592.822 neonates were screened with this expanded program by MS/MS in the Community of Madrid. Amino acids, acylcarnitines, and succinylacetone were quantified in all samples that met the quality criteria. Means, medians, percentiles and standard deviation of the analytes and ratios of interest were calculated.

**Results:** 901 patients (0,15 %) with a positive screening test were referred to clinical evaluation. 230 patients were diagnosed of 30 different inborn errors of metabolism (prevalence 1:2577), 11 of which were not included as a target in the Community of Madrid newborn screening program. The global positive predictive value was 25,6 %. During this period of time, two false negative cases were detected. The most prevalent disorders were phenylketonuria/hyperphenylalaninemia and medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (1:6444 and 1:13174 respectively). 93 % of the patients were detected in the presymptomatic stage.

**Conclusions:** During the last 9 years a large number of cases of IEM have been detected with an acceptable global positive predictive value. These results confirm the utility of inborn errors of metabolism newborn screening as a public health program.

**Key words:** Expanded newborn screening, Inborn errors of metabolism, Tandem mass spectrometry, False positive.

## INTRODUCCIÓN

Los errores congénitos del metabolismo (ECM) son un grupo heterogéneo de enfermedades causadas por defectos en enzimas, cofactores y otros elementos de distintas vías metabólicas. Se han descrito más de 1.000 ECM diferentes y aunque individualmente son raros, son frecuentes si se consideran conjuntamente<sup>(1,2)</sup>. Estas enfermedades pueden suponer un grave problema de salud que puede evitarse o mitigarse con un diagnóstico temprano y una rápida instauración del tratamiento. Dentro de este gran grupo de los ECM hay enfermedades que cumplen criterios para su inclusión en programas de detección precoz de Salud Pública basados en los establecidos por Wilson y Jungner en 1968 y revisados en 2008<sup>(3)</sup> suponiendo un beneficio directo tanto para el recién nacido afecto como para su familia y la sociedad.

La introducción de la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) en los programas de cribado neonatal en los años 90<sup>(4)</sup> supuso un gran avance en el cribado de los ECM, pues se trata de una técnica con alta especificidad y sensibilidad que permite, en una única muestra de sangre en papel, el análisis de más de 50 metabolitos relacionados con las alteraciones del metabolismo de aminoácidos, de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos y las acidemias orgánicas. En la actualidad se encuentra implementada en la mayoría de los laboratorios de cribado neonatal de países desarrollados<sup>(5)</sup>. En España no existe todavía uniformidad en el número de enfermedades cribadas, pues cada comunidad autónoma define las enfermedades a incluir en el cribado neonatal, aunque en el año 2010 se elaboró un documento consenso por parte de varias sociedades científicas<sup>(6)</sup> que permitió, posteriormente en 2014, que el Sistema Nacional de Salud aprobara una cartera común básica de 7 enfermedades a incluir en los programas nacionales de cribado neonatal, siendo 4 de ellas ECM (fenilcetonuria,

deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena media, deficiencia de 3-hidroxi acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga y acidemia glutárica tipo I)<sup>(7)</sup>.

En la Comunidad de Madrid la tecnología de MS/MS se introdujo en marzo de 2011, de manera que el número total de enfermedades cribadas se amplió de 5 (fenilcetonuria, hipotiroidismo congénito, hiperplasia suprarrenal congénita, enfermedad de las células falciformes, fibrosis quística) a 17 (tabla 1). El panel de metabolitos analizados mediante MS/MS también permite la detección complementaria de otros ECM como homocistinuria, tirosinemias tipo II y III, defectos del ciclo de la urea, que actualmente no están incluidas en el programa de cribado en esta comunidad.

El objetivo de este trabajo fue analizar la eficacia en la detección de ECM desde la implantación de esta tecnología en nuestro laboratorio.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Sujetos de estudio.** Desde el 8 marzo de 2011 hasta el 31 de diciembre de 2019 se analizaron las muestras de sangre seca en papel de un total de 592.822 recién nacidos, lo que supone una cobertura aproximada del 100% de los nacidos en hospitales tanto públicos como privados de la Comunidad de Madrid. Las muestras en sangre seca se obtuvieron mediante punción en el talón a las 48 horas de vida impregnando la sangre en papel Perkin Elmer® 226. Las muestras se secaron a temperatura ambiente y se guardaron a 0-8°C hasta su recepción por el laboratorio. Una vez recibidas se registraron en el sistema informático del laboratorio y fueron revisadas por personal técnico. Se excluyeron las muestras que no superaron los criterios mínimos de calidad como aquellas con sangre insuficiente, muestras sobresaturadas y muestras en mal estado como las excesivamente secas o húmedas o con anillo de suero.

**Tabla 1**  
**Enfermedades incluidas como objetivo de detección mediante cribado neonatal por MS/MS en la Comunidad de Madrid.**

| Grupo de enfermedades                                 | Enfermedad  |
|---|---|
| <b>Aminoacidopatías</b>                               | Fenilcetonuria/hiperfenilalaninurias                            |
|   | Enfermedad de la orina de jarabe de arce                        |
|   | Tirosinemia de tipo I   |
| <b>Defectos de la beta-oxidación de ácidos grasos</b> | Deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena media          |
|   | Deficiencia de 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de cadena larga |
|   | Deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga      |
|   | Deficiencia de transportador de carnitina                       |
| <b>Acidemias orgánicas</b>                            | Aciduria glutárica de tipo I                                    |
|   | Acidemia isovalérica  |
|   | Deficiencia de 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coa liasa              |
|   | Deficiencia de beta-cetotilasa                                  |
|   | Acidemia metilmalónica <sup>(1)</sup>                           |
|   | Acidemia propiónica   |

(1) Incluye formas aisladas (deficiencia de mutasa, cblA, cblB) y combinadas con homocistinuria (cblC y cblD).

**Método analítico.** Para la cuantificación de aminoácidos, acilcarnitinas y succinilacetona se utilizó el kit NeoBase™ non-derivatized MS/MS (PerkinElmer, Turku, Finlandia) según las instrucciones del fabricante durante el periodo de marzo de 2011 hasta agosto de 2018, y el kit NeoBase™ 2 non-derivatized MS/MS (PerkinElmer, Turku, Finlandia) desde ese momento hasta diciembre de 2019. El espectrómetro de masas en tándem utilizado fue un equipo Acquity™ TDQ UPLC/MS (Waters, Milford, MA, EE.UU.). Para la adquisición y procesamiento de datos se utilizaron las aplicaciones MassLynx™ (Waters, Milford, MA, EE.UU.), NeoLynx™ y Specimen Gate MSMS Data Suite™ (PerkinElmer, Turku, Finlandia). Los analitos y ratios analizados

para cada enfermedad fueron seleccionados según las recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*<sup>(8)</sup>.

Las muestras se analizaron individualmente para cada analito, y aquellas con valores más allá del punto de corte (percentil 99,5 o percentil 1 dependiendo del marcador) se volvieron a analizar por duplicado. Dichos puntos de corte se revisan periódicamente. Las muestras con un valor superior o inferior al punto de corte tras el reanálisis fueron consideradas como un resultado alterado. En los casos con alta sospecha de que la alteración se debiera a una interferencia o de que se tratara de una alteración transitoria leve, se solicitó una nueva muestra para observar la evolución del resultado. Los pacientes con

un perfil claramente alterado se derivaron a una de las cuatro unidades clínicas de seguimiento (UCS) pertenecientes a los siguientes centros: Hospital Universitario 12 de Octubre, Hospital Universitario La Paz, Hospital Universitario Niño Jesús y Hospital Universitario Ramón y Cajal, donde se evaluó clínicamente al sujeto y se solicitaron la confirmación bioquímica y el estudio molecular. Las pruebas de confirmación diagnóstica se realizaron en el Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares de la Universidad Autónoma de Madrid.

En esta evaluación no hemos incluido los recién nacidos que presentaban alteraciones en el cribado debido a alteraciones maternas (deficiencia de vitamina B12, deficiencia de transportador de carnitina, metilcrotonilglicinuria, etc.) y que condujeron en algunos casos a un diagnóstico de la madre.

**Cálculos estadísticos.** Los cálculos de medias, medianas, percentiles y desviación típica, así como la significación estadística, se realizaron utilizando el software STATA v15.1. Se consideraron estadísticamente significativos los resultados con  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Durante el periodo de estudio se realizó el cribado a un total de 592.822 recién nacidos. De ellos, 901 (0,15%) obtuvieron un resultado alterado y fueron derivados para confirmación y seguimiento a las UCS. Se derivaron 463 (51,4%) recién nacidos de sexo masculino y 438 (48,6%) de sexo femenino. La media del peso al nacimiento de los casos remitidos fue de  $3.072,4 \pm 625,8$  g y la media de la edad gestacional al nacimiento fue de  $38,3 \pm 2,8$  semanas. Un 16,4% de los casos remitidos fueron niños nacidos pretérmino ( $< 37$  semanas de gestación) o con bajo peso ( $< 2.500$  g). La mediana de las horas de vida en la toma de muestra fue de 48 horas, siendo el percentil 95 de 312 horas.

En 69 casos (7,7%) la primera toma no fue válida debido a causas diversas: mala calidad de la muestra (10 casos con muestra sobresaturada y 15 con muestra insuficiente), toma precoz de la muestra (3 casos), transfusión previa (18 casos) o interferencia por nutrición parenteral (23 casos). Si consideramos únicamente los casos en los que finalmente se diagnosticó un ECM, esta proporción fue menor (3,90%). La mediana de la edad en el momento de la derivación fue de 10 días (rango intercuartil: 8-27 días).

Respecto a las sospechas diagnósticas (riesgo elevado) por las que se derivaron los casos, las más frecuentes fueron acidemias metilmalónica (MMA) y propiónica (PA) en un 21,4% (193/900), deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga (VLCADD) en un 17,3% (156/900), fenilcetonuria/hiperfenilalaninemia (PKU/HFA) en un 13,1% (118/900) y deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena media (MCADD) en un 12,4% (112/900) (tabla 2). Las sospechas de MMA y de PA se han considerado conjuntamente a efectos de cribado neonatal debido a que no se pueden distinguir por emplearse los mismos marcadores para la detección de ambas acidemias. Uno de los casos se encontraba sin diagnóstico definitivo por lo que no se tuvo en cuenta en los cálculos presentados.

El estudio molecular se realizó en aquellos pacientes remitidos en los que se confirmó la alteración bioquímica, diagnosticándose 230 casos correspondientes a 30 ECM diferentes. Se obtuvo, por tanto, una prevalencia al nacimiento de 1:2.577 para el total de ECM detectados y un valor predictivo positivo (VPP) del 25,6% (1:2935 y 22,4%, respectivamente, si excluimos las enfermedades que no eran objetivo de detección en el programa de cribado). Al evaluar los casos confirmados según el kit utilizado, NeoBase™ o NeoBase™ 2, se obtuvo un VPP de 24,5% con el primero y 33% con el segundo. La tabla 2 muestra las prevalencias al

**Tabla 2**  
**Casos derivados a las UCS y confirmados para cada ECM<sup>(1)</sup>.**

| Sospecha diagnóstica | Casos derivados | Porcentaje (%) | Casos confirmados | Prevalencia al nacimiento | VPP (%) |
|----------------------|-----------------|----------------|-------------------|---------------------------|---------|
| <b>CUD</b>           | 85              | 9,4            | 12                | 1:49.402                  | 14,3    |
| <b>GA-1</b>          | 34              | 3,8            | 12                | 1:49.402                  | 35,3    |
| <b>HMG</b>           | 79              | 8,8            | 1                 | 1:592.822                 | 1,3     |
| <b>IVA</b>           | 18              | 2,0            | 0                 | -                         | 0       |
| <b>BKTD</b>          | 2               | 0,2            | 0                 | -                         | 0       |
| <b>LCHADD</b>        | 11              | 1,2            | 2                 | 1:296.411                 | 18,2    |
| <b>MCADD</b>         | 111             | 12,4           | 45                | 1:13.174                  | 40,2    |
| <b>MMA</b>           | 193             | 21,4           | 11                | 1:53.893                  | 8,3     |
| <b>PA</b>            |                 |                | 5                 | 1:118.564                 |         |
| <b>MSUD</b>          | 20              | 2,2            | 4                 | 1:148.206                 | 20,0    |
| <b>OTROS</b>         | 45              | 5,1            | 28                | -                         | -       |
| <b>PKU/HFA</b>       | 118             | 13,1           | 92                | 1:6.444                   | 78,0    |
| <b>TYR-I</b>         | 27              | 3,0            | 3                 | 1:197.607                 | 11,1    |
| <b>VLCADD</b>        | 156             | 17,3           | 15                | 1:37.051                  | 9,6     |
| <b>TOTAL</b>         | 900             | 100            | 230               | 1:2.577                   | 25,5    |

CUD: deficiencia de transportador de carnitina; GA-1: acidemia glutárica de tipo I; HMG: acidemia 3-hidroxi-3-metilglutárica; IVA: acidemia isovalérica; BKTD: deficiencia de beta-cetotilasa; LCHADD: deficiencia de 3-hidroxiacil CoA-deshidrogenasa de cadena larga; MCADD: deficiencia de acilCoA-deshidrogenasa de cadena media; MMA/PA: acidemia metilmalónica y acidemia propiónica; MSUD: enfermedad de la orina de jarabe de arce; OTROS: enfermedades no incluidas en el cribado neonatal de la Comunidad de Madrid; PKU/HFA: fenilcetonuria e hiperfenilalaninemia; TYR-I: tirosinemia de tipo I; VLCADD: deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga.

(1) Se ha eliminado de los cálculos un caso sin diagnóstico definitivo.

nacimiento y el VPP individuales para cada enfermedad. El estudio molecular se encontraba pendiente en 4 casos.

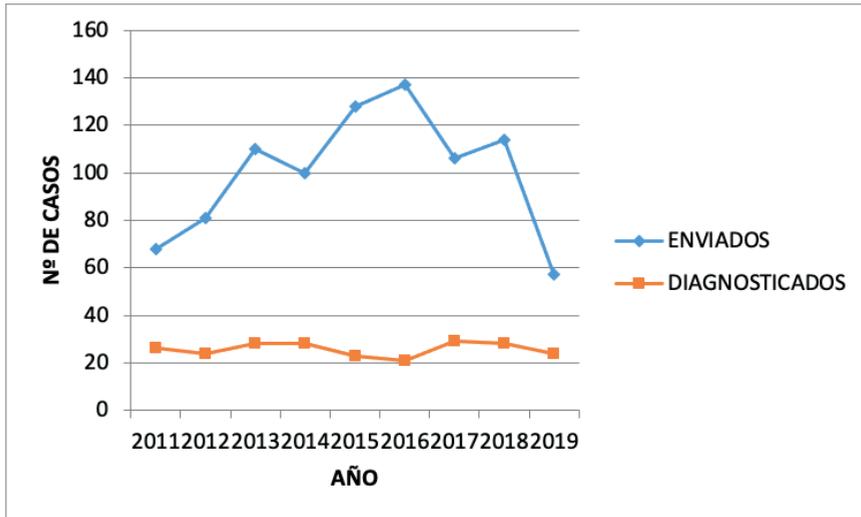
El número de casos diagnosticados se mantuvo con poca variación durante el periodo del estudio, entre 21 y 29 casos anuales. Por el contrario, se observó una tendencia ascendente en el número de casos enviados, truncada con una

gran disminución en el último año de la serie, coincidiendo con el uso del kit NeoBase™ 2 (figura 1).

En el periodo de tiempo del estudio se detectó al menos un caso en 11 de las 13 enfermedades objetivo del programa mediante MS/MS, excepto en acidemia isovalérica y déficit de beta-cetotilasa en las que no se detectó ningún caso.

**Figura 1**  
**Evolución de casos enviados con sospecha a las UCS.**

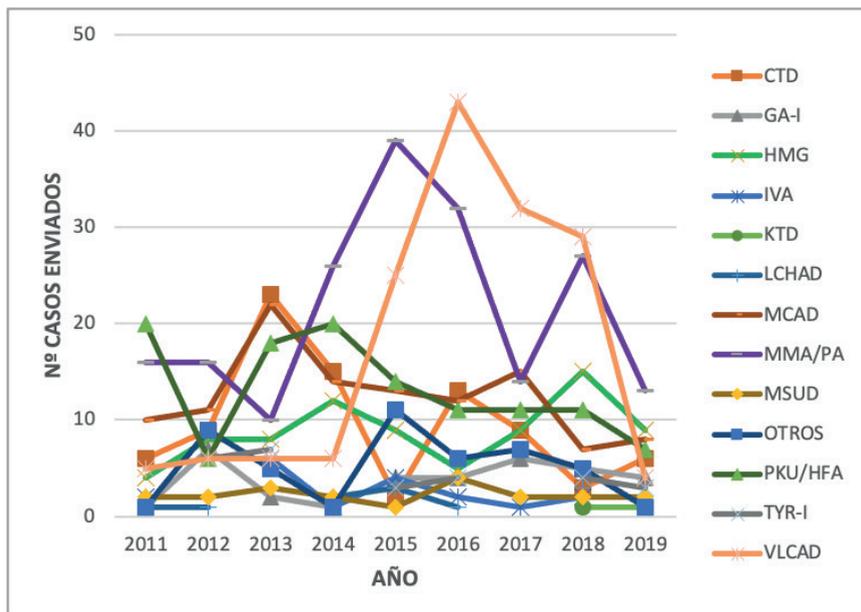
**a) Número de casos enviados y diagnosticados por año.**



(1) El año 2011 recopiló datos desde marzo.

(2) En el año 2019 no se han considerado 1 caso pendiente aún de diagnóstico.

**b) Número de casos enviados por sospecha y por año.**



Además, se detectaron y confirmaron 28 casos con diagnósticos distintos a las 13 enfermedades incluidas en el programa (tabla 2).

Respecto a las aminoacidopatías, se confirmaron 92 hiperfenilalaninemias (54 hiperfenilalaninemias benignas, 33 fenilketonurias clásicas, 3 defectos en DNAJC12 y 2 primapterinurias). También se detectaron 3 casos de tirosinemia de tipo I, 1 caso de tirosinemia de tipo III, 4 casos de enfermedad de la orina de jarabe de arce (MSUD), 2 deficiencias de BCAT-2, 6 hipermetioninemias, 2 homocistinurias, 1 cistinuria, 3 casos de citrulinemia y 1 deficiencia de ornitintrascarbamilasa (OTC).

Dentro del grupo de defectos del metabolismo de los ácidos grasos las alteraciones más frecuentes fueron MCADD con 45 casos, 15 de VLCADD y 12 casos de deficiencia de transportador de carnitina. También se detectaron 2 casos de LCHADD, 1 deficiencia múltiple en acil-CoA deshidrogenasa (MADD), 2 deficiencias de carnitina palmitoiltransferasa II (CPT-II) y 1 deficiencia de carnitina palmitoiltransferasa A1 (CPT-A1).

Los casos confirmados de acidemias orgánicas fueron 12 acidemias glutáricas de tipo I (GA-1), 4 acidemiasmetilmalónicas aisladas (2 MUT-, 1 cblA y 1 cblB), 7 acidemias metilmalónicas con homocistinuria (6 cblC y 1 cblD), 5 acidemias propiónicas, 8 metilcrotonilglicinurias y 1 deficiencia de HMG-CoA liasa.

Sólo 15 pacientes (7%) presentaban manifestaciones clínicas en el momento en que se recibió el resultado del cribado (1 deficiencia de MCAD, 1 deficiencia de LCHAD, 4 PA, 1 deficiencia de CPT-II, 3 MMA, 3 MSUD, 1 deficiencia de OTC y 1 tirosinemia tipo I). Cuatro pacientes fallecieron debido a su patología metabólica (1 citrulinemia, 1 deficiencia de LCHAD, 1 PA y 1 deficiencia de OTC).

En el periodo evaluado se detectaron dos falsos negativos. El primero (mujer, nacida a las 41 semanas de gestación y 3.700 g de peso) fue un caso de MCADD con un valor moderadamente alto de C8-carnitina (0,36  $\mu\text{mol/L}$ ) en la primera muestra tomada a las 48 horas de vida, que presentó una gran disminución en una segunda muestra obtenida a los 32 días de vida (0,18  $\mu\text{mol/L}$ ) con una ratio C8/C10 que se mantuvo normal en ambas muestras (1,20 y 1,19, respectivamente). Aunque a efectos estadísticos de cribado este caso se consideró negativo debido al resultado de los marcadores bioquímicos, el neonato fue sometido a seguimiento desde el nacimiento y diagnosticado al poco tiempo debido a que presentaba historia familiar (hermano mayor afecto de MCADD). El segundo falso negativo (varón, nacido a las 37 semanas de gestación y 3.330 g de peso) fue un caso de GA-1 diagnosticado por la sintomatología clínica a los 8 meses de vida, que presentó un valor normal de C5DC-carnitina (0,07  $\mu\text{mol/L}$ ). Con el estudio realizado se confirmó que se trataba de un “tipo bajo excretor” para GA-1.

En las tablas 3, 4 y 5 se muestran los resultados obtenidos mediante MS/MS de los principales marcadores de cada enfermedad, comparando los obtenidos en los casos verdaderos positivos con los casos falsos positivos. Se utilizó el test no paramétrico de Mann-Whitney-Wilcoxon para todas las comparaciones. El cálculo para acidemia isovalérica, déficit de beta-cetotilasa, deficiencia de LCHAD y deficiencia de 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coa liasa no se realizó por haberse detectado un número bajo o nulo de casos. Se observaron diferencias estadísticamente significativas para la mayoría de marcadores bioquímicos evaluados excepto para tirosina y ratio tirosina/citrulina para la detección de tirosinemia tipo-I, valina y ratio valina/fenilalanina para MSUD, C14-carnitina para la valoración de VLCADD y C3-carnitina para MMA/PA.

**Tabla 3**  
**Comparación de los resultados obtenidos en los principales marcadores seleccionados para la detección de aminoacidopatías.**

| AMINOACIDOPATIAS |                          | Verdaderos positivos |         |                    |        |         |    | Falsos positivos |                    |        |        |        |  | p-valor |
|------------------|--------------------------|----------------------|---------|--------------------|--------|---------|----|------------------|--------------------|--------|--------|--------|--|---------|
|                  |                          | N                    | Mediana | Rango Intercuartil | Mínimo | Máximo  | N  | Mediana          | Rango Intercuartil | Mínimo | Máximo |        |  |         |
| <b>PKU/HFA</b>   | Phe (µmol/L)             | 92                   | 198,95  | 133,1-450,1        | 89,3   | 1.835,9 | 26 | 106,5            | 91,7-138,3         | 65,3   | 503,2  | <0,001 |  |         |
|                  | Phe/Tyr                  | 92                   | 3,35    | 1,88-9,85          | 1,2    | 26,9    | 26 | 1,9              | 1,1-2,3            | 0,6    | 12,1   | <0,001 |  |         |
| <b>TYR-I</b>     | Succinilacetona (µmol/L) | 3                    | 12,9    | 10,3-13,7          | 10,3   | 13,7    | 24 | 0,3              | 0,23-0,49          | 0,09   | 2,0    | 0,0055 |  |         |
|                  | Tyr (µmol/L)             | 3                    | 152     | 96,5-198,4         | 96,5   | 198,4   | 24 | 343,8            | 263,8-463,8        | 33,1   | 1140   | n.s.   |  |         |
|                  | Tyr/Cit                  | 3                    | 8,5     | 5,2-15,7           | 5,2    | 15,7    | 24 | 26,7             | 13,4-34,5          | 3,1    | 77,5   | n.s.   |  |         |
| <b>MSUD</b>      | XLeu (µmol/L)            | 4                    | 724,5   | 320,5-1.242,4      | 281,9  | 1.394,7 | 14 | 273,5            | 196,1-358,5        | 156,7  | 508,5  | 0,044  |  |         |
|                  | Val (µmol/L)             | 4                    | 356,0   | 196,6-535,9        | 137,1  | 615,8   | 14 | 240,3            | 183,2-290,6        | 131,5  | 442,0  | n.s.   |  |         |
| <b>MSUD</b>      | Val/Phe                  | 4                    | 7,9     | 4,6-11,1           | 3,3    | 12,2    | 14 | 3,8              | 3,7-4,4            | 2,3    | 6,1    | n.s.   |  |         |
|                  | XLeu/Phe                 | 4                    | 16,1    | 7,5-25,8           | 6,8    | 27,6    | 14 | 4,6              | 4,2-5,4            | 2,9    | 7,3    | 0,0041 |  |         |
|                  | XLeu/Ala                 | 4                    | 4,6     | 1,9-7,5            | 1,9    | 7,7     | 14 | 0,9              | 0,6-1,2            | 0,4    | 2,0    | 0,0056 |  |         |

Phe: fenilalanina; Tyr: tirosina; Cit: citrulina; XLeu: Leucina+Isoleucina+Prolina-OH; Val: Valina; Ala: Alanina; n.s.: no significativo.

**Tabla 4**  
**Comparación de los resultados obtenidos en los principales marcadores seleccionados para la detección de defectos de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos<sup>(1)</sup>.**

| DEFECTOS DE LA $\beta$ -OXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS | Verdaderos positivos         |         |                    |            |        |       | Falsos positivos |                    |           |        | p-valor |        |
|--|------------------------------|---------|--------------------|------------|--------|-------|------------------|--------------------|-----------|--------|---------|--------|
|  | N                            | Mediana | Rango Intercuartil | Mínimo     | Máximo | N     | Mediana          | Rango Intercuartil | Mínimo    | Máximo |         |        |
| <b>MCADD</b>                                       | C8 ( $\mu\text{mol/L}$ )     | 45      | 4,15               | 0,68-10,57 | 0,13   | 40,54 | 66               | 0,36               | 0,24-0,50 | 0,09   | 11,37   | <0,001 |
|  | C6 ( $\mu\text{mol/L}$ )     | 45      | 0,70               | 0,27-1,60  | 0,10   | 4,14  | 66               | 0,17               | 0,13-0,24 | 0,03   | 2,21    | <0,001 |
|  | C10 ( $\mu\text{mol/L}$ )    | 45      | 0,68               | 0,38-0,93  | 0,06   | 2,61  | 66               | 0,45               | 0,30-0,64 | 0,04   | 1,26    | 0,0045 |
|  | C10:1 ( $\mu\text{mol/L}$ )  | 45      | 0,32               | 0,15-0,62  | 0,05   | 1,27  | 66               | 0,10               | 0,08-0,15 | 0,03   | 1,21    | <0,001 |
|  | C8/C2                        | 45      | 0,27               | 0,03-0,47  | 0,01   | 2,45  | 66               | 0,01               | 0,01-0,02 | 0,01   | 0,41    | <0,001 |
| <b>VLCADD</b>                                      | C8/C10                       | 45      | 10,92              | 1,53-14,06 | 0,65   | 16,29 | 66               | 0,81               | 0,71-1,19 | 0,47   | 14,04   | <0,001 |
|  | C14:1 ( $\mu\text{mol/L}$ )  | 15      | 1,17               | 0,59-2,06  | 0,18   | 5,02  | 140              | 0,64               | 0,52-0,79 | 0,36   | 2,20    | 0,003  |
|  | C14:2 ( $\mu\text{mol/L}$ )  | 15      | 0,12               | 0,09-0,23  | 0,04   | 0,40  | 140              | 0,07               | 0,06-0,09 | 0,04   | 0,22    | <0,001 |
|  | C14 ( $\mu\text{mol/L}$ )    | 15      | 0,74               | 0,42-1,27  | 0,14   | 5,33  | 140              | 0,55               | 0,46-0,70 | 0,20   | 1,70    | n.s.   |
|  | C14:1/C16                    | 15      | 0,40               | 0,18-0,59  | 0,13   | 0,74  | 140              | 0,17               | 0,14-0,23 | 0,08   | 0,41    | <0,001 |
| <b>CUD</b>   | C0 ( $\mu\text{mol/L}$ )     | 12      | 3,67               | 3,10-4,47  | 2,22   | 5,39  | 73               | 4,57               | 3,77-5,71 | 1,84   | 14,73   | 0,017  |
|  | (C0+C2+C3+C16+C18:1+C18)/Cit | 12      | 0,87               | 0,72-0,98  | 0,34   | 6,79  | 73               | 1,19               | 0,91-1,53 | 0,31   | 3,01    | 0,019  |

Cit = citrulina; n.s.: no significativo.

(1) No se han incluido la enfermedad LCHADD por haberse detectado un número bajo de casos.

| Tabla 5<br>Comparación de los resultados obtenidos en los principales marcadores seleccionados para la detección de acidemias orgánicas <sup>(1)</sup> . |                      |                      |         |                    |        |        |     |                  |                    |        |        |         |
|--|----------------------|----------------------|---------|--------------------|--------|--------|-----|------------------|--------------------|--------|--------|---------|
| ACIDEMIAS ORGÁNICAS  |                      | Verdaderos positivos |         |                    |        |        |     | Falsos positivos |                    |        |        | p-valor |
|  |                      | N                    | Mediana | Rango Intercuartil | Mínimo | Máximo | N   | Mediana          | Rango Intercuartil | Mínimo | Máximo |         |
| <b>GA-I</b>  | C5DC+C6OH (µmol/L)   | 12                   | 2,47    | 0,88-4,46          | 0,40   | 5,68   | 22  | 0,43             | 0,29-0,53          | 0,17   | 1,12   | <0,001  |
|  | (C5DC+C6OH)/C5OH     | 12                   | 25,99   | 5,15-29,23         | 3,08   | 32,31  | 22  | 2,11             | 1,03-3,92          | 0,67   | 10,18  | <0,001  |
|  | (C5DC+C6OH)/C8       | 12                   | 56,04   | 16,22-108,5        | 8,0    | 133,3  | 22  | 5,10             | 4,00-9,22          | 1,80   | 25,00  | <0,001  |
|  | (C5DC+C6OH)/C16      | 12                   | 0,94    | 0,29-1,80          | 0,14   | 2,96   | 22  | 0,13             | 0,08-0,31          | 0,04   | 1,21   | <0,001  |
| <b>MMA/PA</b>  | C3 (µmol/L)          | 16                   | 8,71    | 6,40-11,17         | 2,78   | 14,4   | 177 | 6,18             | 4,01-9,25          | 1,29   | 20,0   | n.s.    |
|  | C3/C2                | 16                   | 0,48    | 0,29-0,88          | 0,20   | 2,03   | 177 | 0,20             | 0,17-0,23          | 0,09   | 0,67   | <0,001  |
|  | C3/C16               | 16                   | 3,09    | 2,13-4,41          | 1,48   | 7,25   | 177 | 1,87             | 1,32-2,75          | 0,60   | 7,50   | <0,001  |
|  | C3/Met               | 16                   | 0,70    | 0,37-1,33          | 0,23   | 2,22   | 177 | 0,35             | 0,24-0,48          | 0,04   | 1,61   | <0,001  |
|  | C16:1OH+C17 (µmol/L) | 16                   | 0,13    | 0,07-0,23          | 0,02   | 0,46   | 177 | 0,04             | 0,03-0,05          | 0,01   | 0,15   | <0,001  |

Met: metionina; n.s.: no significativo.

(1) No se han incluido las enfermedades IVA, BKTD y HMG por haberse detectado un número bajo o nulo de casos.

## DISCUSIÓN

En este trabajo describimos y evaluamos los resultados obtenidos en el cribado neonatal de ECM mediante MS/MS en la Comunidad de Madrid. El número de enfermedades incluidas como objetivo de detección se puede considerar medio si se compara con otros programas de cribado del resto de España y Europa<sup>(6,9,10,11,12)</sup> y con el panel uniforme recomendado de cribado en Estados Unidos<sup>(13)</sup>. Al tratarse de enfermedades raras, el gran tamaño de la población analizada aporta gran valor a los resultados obtenidos.

El cribado llevado a cabo en nuestra población ha permitido el diagnóstico de 230 casos de 30 ECM distintos, de los cuales 11 no estaban incluidos como objetivo de detección del programa de cribado neonatal de la Comunidad de Madrid. Entre estos casos se incluyen algunos correspondientes a enfermedades descritas recientemente con muy pocos casos publicados en la literatura, como la hiperfenilalaninemia debida a mutaciones en el gen DNAJC12<sup>(14,15)</sup> y la deficiencia de BCAT-2<sup>(16)</sup>.

El porcentaje de primeras muestras no válidas de los casos en que se confirmó el diagnóstico de un ECM fue algo elevado, aunque prácticamente idéntico al que se suele obtener cada año para el total de recién nacidos cribados en nuestro programa. Sin embargo, si tenemos en cuenta todos los casos enviados, este porcentaje es aproximadamente el doble. Esto se puede explicar por el hecho de que un gran porcentaje de estos casos que finalmente resultaron ser falsos positivos corresponden a niños nacidos prematuros, hospitalizados, sometidos a transfusión, con nutrición parenteral o con tratamientos que presentan mayor probabilidad de dar un resultado anómalo en el cribado neonatal<sup>(17)</sup>. En concreto, el porcentaje de casos prematuros o con bajo peso fue del 14,1% en los falsos positivos respecto al 9,1% en los casos confirmados.

Las enfermedades más frecuentes en nuestra población son las correspondientes al grupo de las aminoacidopatías. A nivel individual, las enfermedades con mayor prevalencia al nacimiento fueron las distintas formas de hiperfenilalaninemia (especialmente fenilcetonuria e hiperfenilalaninemia benigna, prevalencia global: 1:6.444) y la deficiencia de MCAD (prevalencia: 1:13.174), coincidiendo con lo ya descrito por otros autores en trabajos similares al nuestro en cuanto a número de neonatos estudiados y situación geográfica<sup>(9,10,11,12,18,19)</sup>. Entre ambas suponen el 59% de los casos diagnosticados. El resto de enfermedades presentaron una prevalencia al nacimiento inferior a 1:40.000. En dos de las enfermedades incluidas como objetivo del cribado, acidemia isovalérica y deficiencia de beta-cetotiolasa, no se diagnosticó ningún caso. Esto resulta especialmente llamativo en la acidemia isovalérica, para la que se enviaron 18 casos sospechosos a las UCS sin que se confirmase ninguno de ellos. La gran mayoría de dichos casos se asoció al tratamiento con cefditoren pivoxilo de una infección materna poco antes del parto<sup>(20)</sup>.

La mayoría de los casos se beneficiaron del diagnóstico en fase presintomática. Entre los casos que presentaban manifestaciones clínicas, cuando se informó el resultado del cribado, la mitad de ellos fueron diagnósticos de acidemia propiónica o acidemia metilmalónica. Aun así, el cribado neonatal de estos casos aportó un beneficio al orientar el diagnóstico en la mayoría de ellos, ya que las manifestaciones de los ECM suelen ser muy inespecíficas<sup>(21,22)</sup>.

El número de casos diagnosticados de ECM se mantuvo prácticamente constante a lo largo del estudio. No ocurre lo mismo con el número de casos con sospecha de ECM enviados a las UCS, que experimentó una tendencia ascendente hasta el año 2018 con la consiguiente reducción del VPP. Como posible explicación, esta disminución del VPP podría deberse

a un aumento de interferencias que afecten a las muestras dando lugar a un aumento de falsos positivos: prematuridad, nutrición parenteral, medicación, tratamiento de la madre antes del parto, hiperbilirrubinemia, deficiencia materna de vitamina B12, entre otros. En nuestra casuística, entre estas posibles causas hemos podido descartar un aumento de la prematuridad a lo largo del periodo estudiado, ya que no hemos encontrado una correlación significativa entre el peso medio anual de los casos falsos positivos y el VPP (datos no aportados). Sin embargo, al analizar el número de casos enviados a las UCS por enfermedad y año, observamos que hubo un aumento de los casos con sospecha de MMA/PA y de VLCADD que coincide con la subida total de número de casos especialmente en el periodo 2015-2018. Este hecho podría deberse a la utilización de un punto de corte demasiado bajo en determinados analitos. No obstante, en 2019 esta tendencia se rompe de forma brusca con una mejora del VPP del 70%. En agosto de 2018 se sustituyó el kit Neobase™ por el Neobase™ 2 del mismo proveedor. Es posible que dicho cambio explique esta bajada en el número de casos enviados, aunque creemos que es necesario ampliar el número de casos analizados con este último, el kit Neobase™ 2, para confirmar si esta tendencia se mantiene en el tiempo. En general, exceptuando los años 2015 y 2016, hemos obtenido un VPP >20% y una tasa de falsos positivos <0,3% así como una tasa de detección <1:3.000, valores que son considerados por algunos autores como evidencia de calidad analítica<sup>(23)</sup>.

Podemos considerar que la sensibilidad del programa es alta, al haberse detectado únicamente dos falsos negativos de cribado. No obstante, es posible que haya más casos de los que no haya constancia en el programa de cribado neonatal por traslado del niño a otro territorio, por ausencia de diagnóstico o por no haber sido informado.

Respecto al análisis de los marcadores bioquímicos, la mayoría de ellos resultan significativamente más elevados en los casos confirmados respecto a los falsos positivos. Es destacable que el marcador principal para las acidemias metilmalónica y propiónica, C3-carnitina, no es útil para diferenciar ambos grupos de pacientes, en cambio, sí se obtienen diferencias significativas con las ratios C3/C2, C3/metionina, C3/C16 y con C161:OH+C17. La baja sensibilidad de C3-carnitina está ampliamente descrita en la literatura<sup>(24)</sup>, pues es un marcador que presenta gran cantidad de interferencias (prematurnidad, hiperbilirrubinemia, deficiencia de vitamina B12), por lo que está establecida la necesidad de utilizar pruebas de segundo nivel o de marcadores secundarios (C3/C2, C17)<sup>(25,26)</sup> para reducir la tasa de falsos positivos e incluso para el seguimiento de los pacientes<sup>(27)</sup>.

Una posible limitación de este estudio es que se ha asumido una cobertura del programa de cribado del 100% de todos los niños nacidos en la Comunidad de Madrid, lo cual no podemos asegurar por no disponer de datos del número total de niños nacidos en el territorio. En este sentido, hay que tener en cuenta que la población incluida en el estudio no se corresponde necesariamente con los hijos de madres que viven en la Comunidad de Madrid, ya que a ella acuden numerosas mujeres de otras comunidades a dar a luz, al igual que algunas residentes de nuestra comunidad tienen el parto en otra comunidad autónoma.

Además, en el periodo incluido en el estudio, se han utilizado dos kits distintos que no miden necesariamente igual la concentración de cada analito. Debido al escaso número de casos detectados en algunas de las enfermedades, en la estadística de casos de cada una de ellas no hemos distinguido los detectados con el kit Neobase™ de aquellos otros detectados con el kit Neobase™ 2, lo cual probablemente afecte a

la descripción estadística de los marcadores correspondientes a cada uno de ellos.

En conclusión, en la Comunidad de Madrid se viene llevando a cabo el cribado neonatal ampliado de errores congénitos del metabolismo mediante MS/MS desde el año 2011. A lo largo de 9 años se han detectado numerosos casos de las enfermedades incluidas como objetivo del programa, con un valor predictivo positivo global aceptable, aunque diferente para cada enfermedad. Las enfermedades con mayor prevalencia al nacer son las esperadas para nuestra población. La gran mayoría de casos se detectó en situación presintomática, lo que permitió que se beneficiasen de un tratamiento precoz. Los resultados obtenidos confirman la utilidad del cribado neonatal de este tipo de enfermedades como programa de salud pública.

## AGRADECIMIENTOS

Queremos hacer una mención especial a la Dra. Elena Dulín Íñiguez como directora del laboratorio de Cribado Neonatal de la Comunidad de Madrid desde su fundación, incluyendo el periodo en el que se implementó el cribado ampliado para la detección de ECM en la Comunidad de Madrid. También deseamos transmitir nuestro agradecimiento al personal administrativo y técnico de los laboratorios de Cribado Neonatal y del Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares, que ha realizado las pruebas de cribado y diagnósticas para la detección precoz de estas enfermedades. E igualmente al personal de Enfermería de las maternidades y unidades de Neonatología de todos los hospitales de la Comunidad de Madrid y de las unidades clínicas de seguimiento, que ha llevado a cabo la toma de muestras y ha participado en la atención de los casos sospechosos y confirmados.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Ferreira CR, van Karnebeek CDM, Vockley J, Blau N. A proposed nosology of inborn errors of metabolism. *Genet Med.* 2019;21:102-106.
2. Garg U, Dasouki M. Expanded newborn screening of inherited metabolic disorders by tandem mass spectrometry: clinical and laboratory aspects. *Clin Biochem.* 2006;39:315-32.
3. Andermann A, Blancaert I, Beauchamp S, Déry V. Revisiting Wilson and Jungner in the genomic age: a review of screening criteria over the past 40 years. *Bull World Health Organ.* 2008;86:317-9.
4. Millington DS, Kodo N, Norwood DL, Roe CR. Tandem mass spectrometry: a new method for acylcarnitine profiling with potential for neonatal screening for inborn errors of metabolism. *J Inher Metab Dis.* 1990;13:321-4.
5. Therrell BL, Padilla CD, Loeber JG, Kneisser I, Saadallah A, Borrajo GJC *et al.* Current status of newborn screening worldwide: 2015. *Semin Perinatol.* 2015;39:171-87.
6. Programas de Cribado Neonatal en España: Actualización y propuestas de futuro. Documento consenso. Real Patronato sobre Discapacidad. Ministerio de Sanidad y Política Social, 2010.
7. Castiñeiras DE, Couce ML, Marín JL, González-Lamuño D, Rocha H. Situación actual del cribado neonatal de enfermedades metabólicas en España y en el mundo. *An Pediatr (Barc).* 2019;91:128.e1-128.e14.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Newborn Screening by Tandem Mass Spectrometry; Approved Guideline. CLSI document NBS04-AEd2. Wayne, PA: CLSI, 2017.
9. Juan-Fita MJ, Egea-Mellado JM, González-Gallego I, Moya-Quiles MR, Fernández-Sánchez A. Cribado neonatal

- ampliado en la Región de Murcia. Experiencia de tres años. *Med Clin (Barc)*. 2012;139:566-71.
10. Vilarinho L, Rocha H, Sousa C, Marcão A, Fonseca H, Bogas M, Osório RV. Four years of expanded newborn screening in Portugal with tandem mass spectrometry. *J Inherit Metab Dis*. 2010 Dec;33 Suppl 3:S133-8.
11. La Marca G, Malvagía S, Cassetta B, Pasquini E, Donati MA, Zammarchi E. Progress in expanded newborn screening for metabolic conditions by LC-MS/MS in Tuscany: update on methods to reduce false tests. *J Inherit Metab Dis*. 2008;31:S395-404.
12. Loukas YL, Soumelas GS, Dotsikas Y, Georgiou V, Molou E, Thodi G, Boutsini M, Biti S, Papadopoulos K. Expanded newborn screening in Greece: 30 months of experience. *J Inherit Metab Dis*. 2010;33:S341-8.
13. Watson MS, Mann MY, Lloyd-Puryear MA, Rinaldo P, Howell RR and American College of Medical Genetics Newborn Screening Expert Group. Newborn screening: toward a uniform screening panel and system--executive summary. *Pediatrics*. 2006;117:S296-30.
14. Anikster Y, Haack TB, Vilboux T, Pode-Shakked B, Thöny B, Shen N *et al*. Biallelic mutations in DNAJC12 cause hyperphenylalaninemia, hystonia, and intellectual disability. *Am J Hum Genet*. 2017;100:257-266.
15. Gallego D, Leal F, Gámez A, Castro M, Navarrete R, Sanchez-Lijarcio O *et al*. Pathogenic variants of DNAJC12 and evaluation of the encoded cochaperone as a genetic modifier of hyperphenylalaninemia. *Hum Mutat*. 2020;41:1329-1338.
16. Knerr I, Colombo R, Urquhart J, Morais A, Merinero B, Oyarzabal A *et al*. Expanding the genetic and phenotypic spectrum of branched-chain amino acid transferase 2 deficiency. *J Inherit Metab Dis*. 2019 Sep;42(5):809-817.
17. Kronn D. Navigating Newborn Screening in the NICU: A User's Guide. *NeoReviews*, 2019; 20: e280-e291
18. Shoraka HR, Haghdoost AA, Baneshi MR, Bagherinezhad Z, Zolala F. Global prevalence of classic phenylketonuria based on Neonatal Screening Program Data: systematic review and meta-analysis. *Clin Exp Pediatr*. 2020;63:34-43.
19. Rocha H, Castiñeiras D, Delgado C, Egea J, Yahyaoui R, González Y *et al*. Birth prevalence of fatty acid  $\beta$ -oxidation disorders in Iberia. *JIMD Rep*. 2014;16:89-94.
20. Fernández Ruano ML, Besga García B, Montero Plata A, Dulin Íñiguez E. Falsos positivos en cribado neonatal: elevación de C5-carnitina en neonatos por tratamiento parto con cefditoreno pivoxilo. *Rev Esp Salud Publica*. 2018 Jun 4;92:e201806025.
21. Landau YE, Waisbren SE, Chan LMA, Levy HL. Long-term outcome of expanded newborn screening at Boston children's hospital: benefits and challenges in defining true disease. *J Inherit Metab Dis*. 2017;40:209-218.
22. Kwon JM. Testing for Inborn Errors of Metabolism. *Continuum (Minneapolis)*. 2018;24:37-56.
23. Rinaldo P, Zafari S, Tortorelli S, Matern D. Making the case for objective performance metrics in newborn screening by tandem mass spectrometry. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2006;12:255-61.
24. Lindner M, Ho S, Kölker S, Abdoh G, Hoffmann GF, Burgard P. Newborn screening for methylmalonic acidurias--optimization by statistical parameter combination. *J Inherit Metab Dis*. 2008;31:379-85
25. Monostori P, Klinke G, Richter S, Baráth Á, Fingerhut R, Baumgartner MR *et al*. Simultaneous determination of 3-hydroxypropionic acid, methylmalonic acid and methylcitric acid in dried blood spots: Second-tier LC-MS/MS assay for newborn screening of propionic acidemia, methylmalonic acidemias and combined remethylation disorders. *PLoS One*. 2017;12:e0184897.

26. Malvagia S, Haynes CA, Grisotto L, Ombrone D, Funghini S, Moretti E *et al.* Heptadecanoylcarnitine (C17) a novel candidate biomarker for newborn screening of propionic and methylmalonic acidemias. *Clin Chim Acta.* 2015 Oct 23;450:342-8.

27. Stanescu S, Belanger-Quintana A, Fernández-Felix BM, Pérez-Cerdá C, Merinero B, Ruiz-Salas P *et al.* Long-term follow-up with filter paper samples in patients with propionic acidemia. *JIMD Reports.* 2020;1-8.