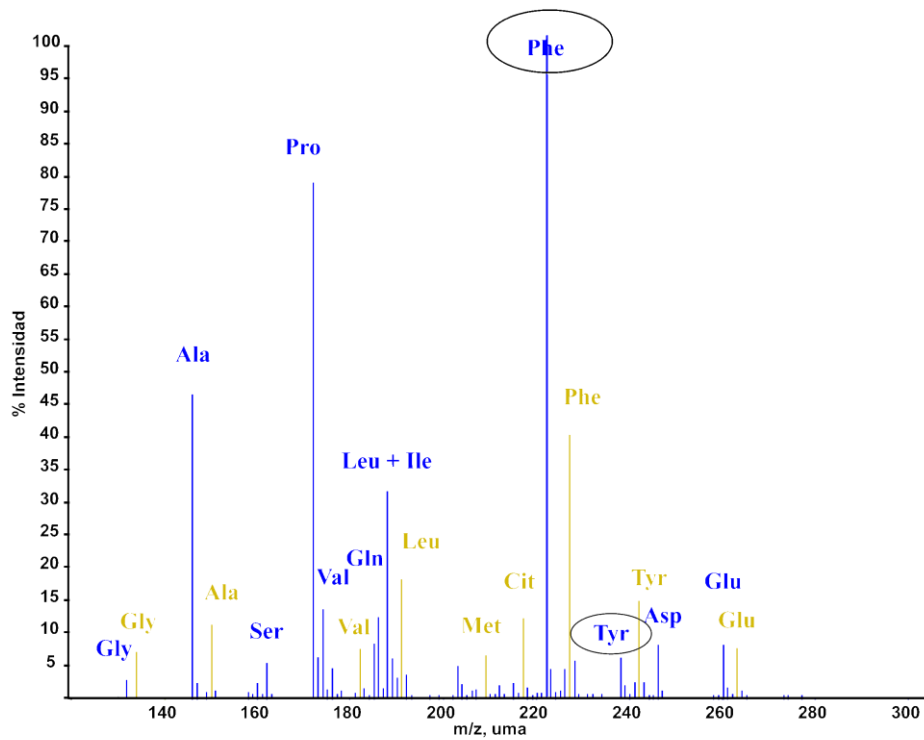


ERRORES CONGÉNITOS DEL METABOLISMO

EN EDAD PEDIÁTRICA



Ana María Baña Souto

Departamento de Pediatría
Universidad de Santiago de Compostela



Departamento de Pediatría
Universidad de Santiago de Compostela

TESIS DOCTORAL:

ERRORES CONGÉNITOS DEL METABOLISMO
EN EDAD PEDIÁTRICA

Dña. Ana María Baña Souto

DIRECTORES:

Prof. Dr. M^a Luz Couce Pico

Profesor Asociado de Pediatría

Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Santiago de Compostela

Prof. Dr. José Ramón Fernández Lorenzo

Profesor Titular de Pediatría

Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Santiago de Compostela

Prof. Dr. José María Fraga Bermúdez

Catedrático de Pediatría

Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Santiago de Compostela

MARIA LUZ COUCE PICO, JOSÉ RAMÓN FERNÁNDEZ LORENZO, Y JOSE MARÍA FRAGA BERMUDEZ, PROFESOR ASOCIADO, PROFESOR TITULAR Y CATEDRÁTICO DE PEDIATRIA RESPECTIVAMENTE DE LA FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA.

CERTIFICAN:

Que la presente tesis titulada: “ERRORES CONGÉNITOS DEL METABOLISMO EN EDAD PEDIÁTRICA”, ha sido elaborada por **Dña. ANA MARÍA BAÑA** bajo la dirección de los abajo firmantes. Así mismo, dicha tesis reúne todos los requisitos pertinentes para su presentación y lectura, a fin de optar al grado de Doctor por la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, firmamos el presente en Santiago a veintiocho de noviembre de dos mil doce.

Prof^a María Luz Couce
Pico

Prof. José Ramón Fdez.
Lorenzo

Prof. José María Fraga
Bermúdez



Dña. ANA MARÍA BAÑA SOUTO CON D.N.I. 44.818.113-Z,
licenciada en Medicina y Cirugía por la Universidad de Santiago de Compostela.

DECLARA:

Ser la autora de la presente tesis titulada “ERRORES CONGÉNITOS DEL METABOLISMO EN EDAD PEDIÁTRICA”, dirigida por los Dres. Dña. María Luz Couce Pico, D. José Ramón Fernández Lorenzo y D. José María Fraga Bermúdez y que es presentada para optar al grado de Doctor por la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, firmo el presente en Santiago a veintiocho de noviembre de dos mil doce.

Ana María Baña Souto

AGRADECIMIENTOS

Con estos agradecimientos se llega al final de un camino y supongo que al principio de otros muchos. Cuando se inició este proyecto parecía no tener final pero aquí está, con los últimos retoques, hubiera sido sin embargo imposible este recorrido sin el apoyo de todos los que me acompañaron en él que son muchos, a todos, gracias por anticipado.

Agradecer en primer lugar su apoyo a los directores de esta tesis, la Dra. Couce; el Dr. Lorenzo y el Dr. Fraga; por sus correcciones y su paciencia. No puedo, sin embargo, dejar de señalar de modo especial el agradecimiento a Mari Luz, sin ella, sin su ánimo y su cariño este proyecto nunca hubiera sido posible.

Al equipo del Laboratorio de Metabolopatías (José A. Cocho, Cristóbal Colón, José R. Alonso, Javier A. Iglesias, M. Dolores Bóveda, Daisy Castiñeiras) por haberme facilitado el trabajo y la obtención de datos, por su amabilidad y su tiempo.

A mis compañeros del servicio de pediatría en especial de la unidad de neonatología donde me siento casi como en casa y cómo no a Alejandro.

Al personal de los Centros de Bioquímica y Genética, el Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares de la Universidad Autónoma de Madrid y el Instituto de Bioquímica Clínica de Barcelona; en especial a sus directores, la Prof. Magdalena Ugarte y la Prof. Antonia Ribes, por habernos ayudado a la valoración metabólica y genética de muchos de estos pacientes.

A José Luis por su paciencia y su compañía en los buenos y malos momentos, a Álvaro que cambió mi vida completamente y con el que cada día aprendo cosas nuevas.

A mis padres y mis hermanos por su cariño y su apoyo incondicional siempre y como no, también en este proyecto y sin los cuales me habría perdido muchas veces en éste y otros caminos.

Sin mucho más que decir porque quienes me conocen saben que no me prodigo en efusividad mil gracias a todos por ayudarme a hacer realidad este proyecto y acompañarme en el camino.

GLOSARIO

3-OH-GA	Ácido 3-hidroxiglutárico
3-MCC	3 metilcrotonilCoAcarboxilasa
17-OH	17-hidroxi-progesterona
ADN	Acido Desoxirribonucleico
BH4	6R-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina
C5DC	Glutarilcarnitina
C5OH	3-hidroxiisovalerilcarnitina
C4	Butirilcarnitina
C0	Carnitina libre
CD	Cociente de desarrollo
CI	Cociente intelectual
CID	Disociación inducida por colisión
CMN	Cribado metabólico neonatal
DC	Corriente continua
ECM	Errores Congénitos del Metabolismo
EI	Impacto electrónico
ESI	Ionización por electrospray
GA	Ácido glutárico
GA-I	Aciduria glutárica tipo I
GALE	UDP-galactosa 4-epimerasa
GALK	Galactokinasa
GALT	Galactosa-1-fosfato uridiltransferasa
HCY	Homocistinuria
HMG def	Deficiencia de 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA liasa

HPA	Hiperfenilalaninemia
HPAB	Hiperfenilalaninemia benigna
LCHAD	3-hidroxi-acilCoA deshidrogenasa de cadena larga
LCHADD	Deficiencia de 3-hidroxi-acilCoA deshidrogenasa de cadena larga
MAT I/III	Metionina adenosiltransferasa I/III
MCAD	AcilCoA deshidrogenasa de cadena media
MCADD	Deficiencia acilCoA deshidrogenasa de cadena media
MCC	Metilcrotonilglicinuria
MMA	Aciduria metilmalónica
MRM	Monitorización de reacción múltiple
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
MSUD	Enfermedad de la orina de jarabe de arce
M/Z	Masa/carga
NTBC	Nitisinona
OMS	Organización Mundial de la Salud
PA	Aciduria propiónica
PDI	Índice de desarrollo psicomotor
PKU	Fenilcetonuria
PKUC	Fenilcetonuria clásica
PKUM	Fenilcetonuria moderada
PKUL	Fenilcetonuria leve
QQQ	Espectrómetro de masas de triple cuadrupolo
RF	Radiofrecuencia

SCAD	AcilCoA deshidrogenasa de cadena corta
SCADD	Deficiencia de acilCoA deshidrogenasa de cadena corta
TYR I	Tirosinemia tipo 1
UE	Unión Europea

ÍNDICE

INDICE

1. JUSTIFICACIÓN	5
2. INTRODUCCIÓN	9
2.1 ERRORES CONGÉNITOS DEL METABOLISMO	11
2.2 CRIBADO NEONATAL DE LOS ERRORES	
CONGÉNITOS DEL METABOLISMO	16
2.2.1 Concepto de Cribado Neonatal	16
2.2.2 Historia del Cribado endocrino-metabólico Neonatal	16
2.2.3 Métodos de Cribado Neonatal	17
2.2.4 Recomendaciones para la toma de muestras	18
2.2.5 Aplicación de la Espectrometría de masas en tándem	
(MS/MS)	20
2.2.5.1 Ionización por electrospray	22
2.2.5.2 Ionización química	23
2.2.5.3 Espectrometría de masas	24
2.2.5.4 Modos de adquisición de datos en MS/MS	26
2.2.6 Cribado Neonatal Ampliado	27
2.2.6.1 Análisis de los aminoácidos por MS/MS	27
2.2.6.2 Análisis de acilcarnitinas por MS/MS	29
2.2.7 Errores Congénitos del Metabolismo que deben	
incluirse en el cribado	31
2.2.8 Situación del Cribado Neonatal en España	38
3. OBJETIVOS	41
4. MATERIAL Y MÉTODO	45
4.1 DISEÑO	47
4.2 SUJETOS	47

4.3 MÉTODO	47
4.3.1 Cribado neonatal	47
4.3.2 Diagnóstico y seguimiento	49
4.3.3 Análisis estadístico	52
5. RESULTADOS	53
5.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS PACIENTES DIAGNOSTICADOS A TRAVÉS DEL CRIBADO	57
5.2 CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES SEGÚN LA ALTERACIÓN DETECTADA	59
5.2.1 Aminoacidopatías	59
5.2.1.1 Hiperfenilalaninemias	59
5.2.1.2 Tirosinemias	67
5.2.1.3 Trastornos del metabolismo de los aminoácidos azufrados	67
5.2.1.4 Enfermedad de la orina de jarabe de arce	69
5.2.1.5 Alcaptonuria	72
5.2.2 Defectos del Ciclo de la urea	73
5.2.2.1 Citrulinemia tipo I	73
5.2.2.2 Aciduria arginino-succínica	74
5.2.2.3 Déficit de arginasa	74
5.2.3 Acidurias orgánicas	75
5.2.3.1 Acidemia propiónica	75
5.2.3.2 Acidemia metilmalónica	76
5.2.3.3 Aciduria glutárica tipo I	78
5.2.3.4 Metilcrotonilglicinuria	81
5.2.3.5 Aciduria 3-OH-3-metilglutárica	82
5.2.4 Defectos congénitos de la β-oxidación de los ácidos grasos	82
5.2.4.1 Déficit de acilCoA deshidrogenasa de cadena media	84

5.2.4.2 <i>Déficit de 3-hidroxiacilCoA deshidrogenasa de cadena larga</i>	86
5.2.4.3 <i>Déficit de acilCoA deshidrogenasa de cadena corta</i>	87
5.2.4.4 <i>Déficit del transportador de carnitina</i>	87
5.2.5 Defectos del metabolismo de los hidratos de carbono.....	88
5.2.5.1 <i>Galactosemia clásica</i>	88
5.2.5.2 <i>Galactosemia por déficit de galactokinasa</i>	88
5.2.5.3 <i>Galactosemia por déficit de epimerasa</i>	89
5.2.6 Trastornos congénitos del metabolismo del glutatión.....	89
5.2.7 Trastornos congénitos del metabolismo de la biotina	90
5.2.8 Defectos de la biosíntesis del colesterol	91
5.2.9 Defectos congénitos del transporte de los aminoácidos.....	92
5.3 FALSOS POSITIVOS, ALTERACIONES TRANSITORIAS Y FALSOS NEGATIVOS	93
6. DISCUSIÓN	95
6.1 FRECUENCIA/PREVALENCIA DE LOS ECM DETECTADOS A TRAVÉS DEL CRIBADO NEONATAL	97
6.2 SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y VALOR PREDICTIVO DEL CRIBADO.....	101
6.3 SINTOMATOLOGÍA AL DIAGNÓSTICO E IMPACTO EN LA UNIDAD NEONATAL	105
6.4 EVOLUCIÓN DE LOS PACIENTES CON ECM.	109
7. CONCLUSIONES.....	117
8. TRABAJOS PUBLICADOS.....	121
8.1 EVALUATION AND LONG-TERM FOLLOW-UP OF INFANTS WITH INBORN ERRORS OF METABOLISM IDENTIFIED IN AN EXPANDED SCREENING PROGRAMME.....	123

8.2 INBORN ERRORS OF METABOLISM IN A NEONATOLOGY UNIT: IMPACT AND LONG-TERM RESULTS	129
8.3 CLINICAL, GENETIC, AND THERAPEUTIC DIVERSITY IN 2 PATIENTS WITH SEVERE MEVALONATE KINASE DEFICIENCY	135
9. BIBLIOGRAFÍA.....	143

1. JUSTIFICACIÓN

1. JUSTIFICACIÓN

Los Errores Congénitos del Metabolismo son considerados enfermedades raras (<5 casos por cada 10.000 personas) desde un punto de vista individual, pero en su conjunto suponen un capítulo relevante de la patología pediátrica con una importante morbilidad y mortalidad y por lo tanto es de interés profundizar en su conocimiento.

La mayoría de estas entidades presentan una evolución natural muy tórpida, estos efectos negativos pueden ser evitados o significativamente disminuidos si se instaura un diagnóstico y tratamiento precoz. El avance en el cribado metabólico neonatal, con la técnica de la espectrometría de masas en tándem (cribado neonatal ampliado), nos permite realizar un perfil metabólico de las alteraciones congénitas más importantes del metabolismo intermediario.

La Unidad de Diagnóstico y Tratamiento de Enfermedades Congénitas del Metabolismo del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela fue pionera en España y de las primeras a nivel europeo en el estudio de los Errores Congénitos del Metabolismo detectados a través del cribado ampliado. El cribado endocrino-metabólico neonatal ampliado se realiza en nuestra comunidad a prácticamente el 100% de la población y tiene la particularidad asimismo de utilizar la muestra de orina en la detección analítica conjuntamente con la muestra de sangre.

Parece por tanto de interés en este contexto profundizar en el estudio de las Enfermedades Congénitas del Metabolismo detectadas a través del cribado ampliado en nuestra unidad desde su inicio y a lo largo de una década (2000-2010); valorando la repercusión de la introducción del cribado neonatal ampliado, la prevalencia de los Enfermedades Congénitas del Metabolismo en nuestra comunidad, la utilidad de la muestra de orina en esa detección, el conocimiento de la historia natural de estas enfermedades a raíz del cribado, y la consiguiente influencia que ha tenido en la evolución de nuestros pacientes tanto en términos de morbilidad, al permitirnos en algunos casos ser también pioneros

en instaurar tratamientos novedosos de eficacia comprobada, como de mortalidad.

2. INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2.1. ERRORES/ENFERMEDADES CONGÉNITOS/AS DEL METABOLISMO

El metabolismo es el conjunto regulado y coordinado de reacciones químicas que tienen lugar en un organismo vivo; para que dichas reacciones químicas se lleven a cabo es necesario el correcto funcionamiento de unas proteínas denominadas enzimas. Estas enzimas pueden actuar a nivel del metabolismo general o de un ciclo particular; como un receptor celular, un transportador de membrana o como parte de una organela celular.

Los errores congénitos del metabolismo (ECM) pueden definirse como enfermedades genéticas en las que se produce un defecto específico en la estructura y/o función de una proteína que provoca a su vez una alteración del normal funcionamiento del ser humano provocando un desorden que afectará al desarrollo y la salud de esa persona. La mayoría de los ECM son enfermedades monogénicas, es decir, afectan a un único gen. En el 95% de los casos el patrón de herencia es autosómico recesivo (los padres son portadores del gen defectuoso y tienen un 25% de probabilidades de transmitirlo a su descendencia, esta probabilidad se repite en cada embarazo)^{1,2}

Son enfermedades raras desde un punto de vista individual, sin embargo, como conjunto son responsables de una significativa morbi-mortalidad pediátrica^{3,4} y suponen un capítulo de la patología pediátrica muy a tener en cuenta. La Unión Europea (UE) define como enfermedades raras a aquellas enfermedades con peligro de muerte o de invalidez crónica que tienen una prevalencia menor de 5 casos por cada 10000 habitantes, lo que equivale a un 6-8% de la población europea. Esto se traduce en una estimación de 29 millones de afectados en la UE y de 3 millones en España⁵.

Los primeros estudios sobre los Errores Congénitos del Metabolismo datan de 1908 cuando Archivald E. Garrod, un profesor de medicina en Oxford, acuña este término y describe cuatro trastornos que tenían en común ser

congénitos, que tendían a aparecer en varios hijos de una misma pareja y todos ellos presentaban una alteración bioquímica marcada⁶. En el año 1934 Ivar Asbjorn Folling describe la fenilcetonuria (PKU) asociada al retraso mental (Imbecillitas Phenylpyruvica). En el 1937, L. Penrose realiza las primeras observaciones dietético-clínicas para la PKU⁷ y en el 1953 H. Bickel publica en Lancet los resultados de la terapia dietética en la PKU⁸. Posteriormente aparecen el “test del pañal húmedo” de Centerwall en 1957 y el test de Guthrie en el 1963. Es a partir de este momento cuando se acelera el conocimiento de estas enfermedades con el desarrollo de nueva tecnología. Así en el momento actual el diagnóstico y el tratamiento a tiempo de las enfermedades metabólicas permiten augurar en la mayoría de los casos una reducción sustancial de la morbilidad y una mejora de las condiciones crónicas que caracterizan la vida longeva. Si no se diagnostican y tratan a tiempo y adecuadamente, la mayoría conllevan muchas secuelas o son mortales.

Existen distintas formas de clasificar las enfermedades congénitas del metabolismo; una de las más importantes es la clasificación en función de la fisiopatología. Las alteraciones que se producen dependen en unos casos del exceso de una sustancia del metabolismo intermediario y en otros casos de la ausencia del producto que deja de sintetizarse por la alteración enzimática. En el primer caso las manifestaciones clínicas dependerán de la potencial toxicidad del producto acumulado y en el segundo del grado de esencialidad del mismo.

Una clasificación muy útil desde el punto de vista fisiopatológico es la realizada por Saudubray, que divide los trastornos metabólicos en 3 grandes grupos⁹:

Grupo I: trastornos tipo intoxicación

Grupo II: trastornos del metabolismo de la energía.

Grupo III: trastornos que afectan a moléculas complejas.

En el Grupo I correspondiente a los Trastornos tipo intoxicación se incluyen los trastornos congénitos del metabolismo intermediario que conducen a

una intoxicación ya sea aguda (vómitos, coma, insuficiencia hepática,...) o crónica (retraso del desarrollo, cardiomiopatía, ectopia del cristalino,...). Pertenecen a este grupo los errores congénitos del catabolismo de los aminoácidos (fenilcetonuria, enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce, homocistinuria, tirosinemia, ...), la mayoría de las acidurias orgánicas (propiónica, metilmalónica, isovalérica..), intoxicaciones por metales (Wilson, Menkes, ...), intolerancia a carbohidratos, y porfirias; también están incluidos en este grupo los errores congénitos de la síntesis y catabolismo de los neurotransmisores (monoaminas, GABA y glicina) y los errores congénitos de la síntesis de los aminoácidos (serina, glutamina y prolina/ornitina). Este grupo de trastornos no afectan al desarrollo embrionario-fetal y presentan un período de tiempo variable libre de síntomas. Así mismo existen una serie de circunstancias capaces de desencadenar crisis metabólicas agudas entre las que se incluyen la fiebre, los procesos infecciosos, la ingesta de alimentos. El diagnóstico de este grupo de trastornos se basa en la determinación y cuantificación de aminoácidos, ácidos orgánicos y acilcarnitinas en plasma y orina. La mayor parte de ellos son tratables y requieren la eliminación urgente de la toxina mediante dietas especiales, procedimientos extracorpóreos o fármacos limpiadores (carnitina, benzoato sódico, fenilbutirato sódico...).

En el Grupo II correspondiente a los Trastornos del metabolismo de la energía se distinguen a su vez dos subgrupos que son los defectos mitocondriales (acidemias lácticas congénitas, trastornos de la cadena respiratoria mitocondrial y defectos de la oxidación de los ácidos grasos y los cuerpos cetónicos) y los defectos citoplasmáticos (trastornos de la glucólisis, trastornos del metabolismo del glucógeno, hiperinsulinismo, anomalías del metabolismo de la creatinina y los errores congénitos de la vía de las pentosas fosfato). Habitualmente entre la patología que presentan estos pacientes se encuentran hipoglucemias, hiperlactacidemia, hepatomegalia, afectación encefálica, hipotonía generalizada, miopatía, cardiomiopatía, insuficiencia cardíaca, colapso circulatorio, muerte súbita del lactante. El diagnóstico se basa en pruebas funcionales y análisis enzimáticos para los que suele ser preciso biopsias o cultivos celulares y análisis

moleculares. Una parte de los trastornos de este grupo no son tratables, especialmente de los que pertenecen al grupo de defectos mitocondriales.

En el Grupo III correspondiente a los Trastornos de moléculas complejas se engloban fundamentalmente las enfermedades lisosomales y peroxisomales, los trastornos congénitos de la glicosilación y los errores congénitos de la síntesis del colesterol. Este grupo de trastornos presenta habitualmente un curso crónico, lentamente progresivo y sin crisis metabólicas agudas. Su despistaje bioquímico requiere investigaciones específicas y no se diagnostican con los análisis metabólicos básicos.

Así pues, la gran diversidad de los ECM y su escasa prevalencia individual constituyen sus 2 principales características y determinan que tanto el diagnóstico de sospecha como el análisis bioquímico-molecular para la confirmación diagnóstica y el tratamiento sean complejos.

De todas formas la capacidad para reconocer y diagnosticar un ECM se ha incrementado enormemente debido al desarrollo de la tecnología analítica, el conocimiento bioquímico en general, el desarrollo de la biología celular y un mayor conocimiento del genoma humano. A ello hay que sumar el desarrollo de la prueba de cribado endocrino-metabólico neonatal o prueba del talón que permite su detección en el período asintomático por marcadores analíticos.

Al igual que la capacidad para reconocer y diagnosticar los ECM, las opciones terapéuticas de estas enfermedades también han aumentado en los últimos años con las nuevas alternativas de tratamiento: perfeccionamiento de la dieta, uso de cofactores, tratamiento enzimático sustitutivo, nuevos quelantes de tóxicos etc.

En el momento actual la mayoría de los ECM son sospechados por el médico ante la aparición de una serie de síntomas y signos compatibles con un trastorno metabólico (Tabla 1). Una vez sospechado el trastorno metabólico deben ponerse en marcha una serie de estudios bioquímicos y de genética molecular para confirmar el diagnóstico, permitiendo realizar un seguimiento clínico y tratamientos adecuados así como ofrecer a la familia consejo genético.

Existen además un grupo de ECM y algunas endocrinopatías que pueden detectarse cuando los pacientes se encuentran todavía asintomáticos mediante los programas de cribado neonatal. El objetivo es identificar pacientes de pocos días de vida mediante pruebas analíticas poco costosas antes de que aparezcan los síntomas de la enfermedad para intervenir precozmente y evitar, en lo posible, importantes secuelas físicas y mentales como consecuencia de la historia natural de la enfermedad.

Síntomas	Alt. Metabólica	Posible Defecto
Intoxicación aguda Intervalos libres de síntomas Relación con la ingesta y con procesos infecciosos	Acumulación de metabolitos tóxicos	-Aminoacidopatías -Defectos del ciclo de la urea -Acidurias orgánicas -Galactosemias -Porfirias -EC de la síntesis y catabolismo de los neurotransmisores. -EC de la síntesis de aminoácidos (serina, glutamina, prolina/ornitina) -Intoxicaciones por metales
Hipotonía generalizada Miopatía Cardiomiopatía Hipoglucemia	Defecto en la producción o utilización de la energía	-Acidosis láctica congénita -Trastornos cadena respiratoria mitocondrial -Defectos β -oxidación de ácidos grasos -Glucogenosis -Hiperinsulinismo -Anomalías del metabolismo de la creatinina -EC vía de las pentosas fosfato
Progresivos No relación con ingesta ni procesos intercurrentes Dismorfias	Síntesis y/o degradación de moléculas complejas	-Enfermedades Lisosomales -Enfermedades Peroxisomales -EC de la síntesis de colesterol -EC de la glicosilación

Tabla1: Presentación clínica de los ECM.

2.2 CRIBADO NEONATAL DE LOS ERRORES CONGÉNITOS DEL METABOLISMO

2.2.1 Concepto de Cribado Neonatal

Una definición muy aceptada de cribado fue publicada en la revista *Journal of Medical Screening* en donde se recoge que el cribado es la aplicación sistemática de una prueba o examen para la identificación de individuos a riesgo de sufrir una enfermedad específica con el objetivo de beneficiarse de investigaciones adicionales o tratamientos entre las personas que no han buscado atención médica a causa de los síntomas de esa enfermedad¹⁰.

El cribado metabólico neonatal (CMN) es por tanto el conjunto de actuaciones encaminadas a la detección sistemática de enfermedades congénitas del metabolismo en edad neonatal¹¹. El objetivo de los programas de detección precoz de ECM es reducir la morbilidad y mortalidad asociadas a estas enfermedades ya que la mayoría de los ECM que cursan con alteraciones clínicas presentan una evolución natural tórpida o catastrófica y estos efectos negativos pueden ser evitados o significativamente disminuidos si se hace un diagnóstico precoz y se instaura un programa terapéutico o preventivo. Por ello el cribado metabólico neonatal ha demostrado ser eficaz, eficiente y efectivo, tanto desde el punto de vista del diagnóstico como desde el de la sanidad pública y del de la rentabilidad económica.

2.2.2 Historia del Cribado endocrino-metabólico Neonatal

La historia del cribado neonatal se remonta al año 1953 en que Horst Bickel⁸ desarrolla una terapia para la fenilcetonuria y observa que sólo en aquellos casos en los que los pacientes iniciaban el tratamiento dietético antes de la aparición de los síntomas, en especial, antes de la aparición de los síntomas neurológicos éste era efectivo¹². En el año 1963 Robert Guthrie utiliza una muestra capilar impregnada en papel para la determinación de la concentración plasmática de la fenilalanina por un método de inhibición bacteriana siendo

posible aplicar este test de una manera eficiente a todos los recién nacidos y sienta así las bases del cribado neonatal universal^{13,14}. En el 1970 Dussault incorpora al cribado neonatal la detección del hipotiroidismo congénito con el desarrollo del radioinmunoensayo y en el 1975 el Comité de Cribado Neonatal para Errores del Metabolismo de la National Academy of Sciences (Washington), postula los principios que debe cumplir una enfermedad para ser incluida dentro de los programas de cribado neonatal, que se basan en las recomendaciones de Wilson y Jugner¹⁵ que se recogen en la tabla 2.

Finalmente a principio de los 90, a raíz de la publicación de Millington¹⁶ se incorpora la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) en algunos programas de cribado convirtiéndose en la herramienta más poderosa que ha aparecido en los últimos 20 años en el campo del diagnóstico neonatal de los ECM por tratarse de un sistema de gran versatilidad, sensibilidad y alta capacidad de análisis que ha permitido expandir el cribado al realizar la medida simultánea de varios metabolitos y hacer casi realidad el concepto ideal para el cribado de : 1 muestra → múltiples diagnósticos¹⁷.

Criterios clásicos para la inclusión dentro del cribado neonatal
Que la enfermedad curse con daño mental y físico grave o riesgo vital en el período neonatal.
Que no exista posibilidad de diagnóstico clínico efectivo en período neonatal.
Que esté disponible un tratamiento efectivo y asequible.
Que la instauración del tratamiento de forma precoz mejore el pronóstico clínico.
Que la enfermedad tenga una incidencia relativamente elevada.
Que exista una metodología analítica rápida, fiable y de coste reducido.

Tabla 2: Criterios para inclusión dentro del cribado neonatal, National Academy of Sciences, Washington, 1975

2.2.3 Métodos de Cribado Neonatal

Los ECM se detectan y/o diagnostican mediante pruebas de laboratorio basadas en el análisis del producto génico metabólico (enzimas y/o metabolitos) y en el análisis de mutaciones del ADN.

Podemos abordar el cribado neonatal a distintos niveles:

1. A través del análisis del fenotipo bioquímico, mediante la detección de metabolitos; se hace así en la fenilcetonuria, enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce, las acidurias orgánicas, los defectos de la β -oxidación de los ácidos grasos, la galactosemia...

Genotipo → metabolitos → cribado convencional

2. Análisis del fenotipo enzimático mediante la determinación de proteínas/enzimas como en el caso de galactosemia, deficiencia de biotinidasa...

Fenotipo enzimático → proteína/enzima → cribado convencional

3. Análisis del genotipo a nivel del ADN, como en la fibrosis quística y en la inmunodeficiencia combinada severa.

Fenotipo bioquímico → ADN → cribado genético

2.2.4 Recomendaciones para la toma de muestras

En la actualidad en la mayoría de los centros de nuestro país se realiza una toma de muestra de sangre del talón en papel secante al tercer día de vida; en 3 centros de nuestro país se recoge además una muestra de orina lo que permite completar la información que obtenemos de la muestra de sangre y ampliar nuevos horizontes diagnósticos¹⁸.

La punción se realiza generalmente en la porción medial o lateral de la superficie plantar del talón en los recién nacidos; así mismo, debe haberse masajeado el pie previamente para aumentar el flujo sanguíneo en la zona y desinfectado con alcohol de 70^o¹⁹.



Para que la muestra sea óptima las manchas de sangre que se obtienen deben contener al menos 75 μL (13 mm de diámetro aproximadamente) y deben dejarse secar a temperatura ambiente y fuera de la luz solar directa. La obtención de la muestra es un proceso sencillo que puede ser realizado por personal no sanitario si se siguen unas normas sencillas^{20,21}.

En algunas ocasiones puede ser necesario repetir la toma de la muestra; el Clinical and Laboratory Standards Institute ha elaborado un documento con recomendaciones para niños de menos de 2000 g o con sospecha de patología al nacimiento en el que se recoge que debe tomarse una muestra al ingreso, otra a las 48-72 horas de vida y otra a los 28 días de vida²². Así mismo en ese documento se recogen una serie de situaciones especiales en las que debe realizarse una segunda muestra:

1. Prematuros y gemelos monocigóticos: Debe repetirse la toma de muestra de sangre para cribado neonatal a partir de los 14 días de vida y antes de los 28 días de nacimiento.
2. Recién nacidos con patología grave al nacimiento: En estos casos, se debe tomar una muestra en el momento de ingreso (antes de que puedan recibir tratamiento antibiótico, alimentación parenteral,...) y repetirla a las 48-72 horas de vida según los resultados, fundamentalmente porque pueden existir elevaciones transitorias de TSH/IRT/17-OHP en la primera muestra.

3. Transfusiones previas al cribado: En este caso se debe repetir la muestra a la semana y al mes de la transfusión.
4. Alimentación parenteral: En aquellos pacientes que estén recibiendo esta nutrición debe practicarse un nuevo cribado a los tres días de haber reiniciado la alimentación enteral normal, con independencia de la edad del niño en ese momento.

En el momento actual existe la posibilidad de utilizar las muestras de sangre en papel con otros fines además de para el cribado de los errores congénitos del metabolismo. Con ligeras modificaciones en las condiciones de conservación o en el tipo de papel se emplean también para la detección de anemias, de enfermedades infecciosas o estudios de ADN.

2.2.5 Aplicación de la Espectrometría de masas en tándem

El desarrollo de la técnica de espectrometría de masas para el diagnóstico de enfermedades congénitas metabólicas comienza en los años 70, pero es en los años 90 cuando se empieza a aplicar esta tecnología para el cribado neonatal. La metodología básica para el cribado neonatal de enfermedades metabólicas por MS/MS fue desarrollada por Millington¹⁶, Chace²³, Rashed²⁴ y sus colaboradores.

La espectrometría de masas es una técnica de separación e identificación múltiple de analitos basada en el patrón específico de fragmentación iónica que produce cada compuesto bajo determinadas condiciones de análisis, y en la separación-detección de cada especie iónica según su relación masa/carga. Es así posible separar, detectar y cuantificar en un mismo ensayo, sin necesidad de un sistema cromatográfico adicional y a partir de un único disco de sangre seca sobre papel de filtro, los aminoácidos y acilcarnitinas que se utilizan como biomarcadores, lo que hace posible la detección de enfermedades congénitas del metabolismo que afectan al ciclo de la urea, aminoácidos, ácidos orgánicos y β -oxidación de los ácidos grasos con alta sensibilidad y especificidad^{14,25,26,27}. El

análisis es muy rápido (2-3 minutos) y solo requiere una limitada preparación de la muestra.²⁸

La aplicación de esta tecnología ha supuesto un avance muy importante en el cribado neonatal y además ha hecho posible ampliar el conocimiento biomédico sobre distintas enfermedades metabólicas, en lo que se refiere a su heterogeneidad genética y fenotípica, ya que ha permitido descubrir deficiencias metabólicas en progenitores asintomáticos al estudiar a los hijos de estos^{29,30}.

La espectrometría de masas es una técnica analítica que proporciona información de las moléculas analizadas previamente convertidas en iones. Las moléculas de interés, forman parte generalmente de una mezcla heterogénea que no requiere necesariamente una separación previa, y se someten en primer lugar a una fuente de ionización donde se ionizan adquiriendo carga negativa o positiva. Los iones atraviesan el analizador de masas hasta que alcanzan diferentes partes del detector de acuerdo con su relación masa/carga (m/z). Una vez en contacto con el detector, se generan señales que son registradas en el sistema informático y representadas en un espectro de masas que muestra la abundancia relativa de las señales en función de su relación m/z .

El análisis por espectrometría de masas comprende básicamente 4 procesos:

- Ionización de la muestra
- Aceleración de los iones por un campo eléctrico
- Dispersión de los iones según su masa/carga
- Detección de los iones y producción de la correspondiente señal eléctrica.

La ionización de la muestra puede llevarse a cabo en diferentes condiciones, según la naturaleza de la propia muestra y lo que se pretenda detectar en el análisis. Puede efectuarse en condiciones de alto vacío, por impacto electrónico, o a presión atmosférica. En este último caso, si se trata de un análisis en fase líquida, se realizará una ionización por electrospray (ESI),

mientras que si es en fase gaseosa, se efectuará una ionización química o bien una fotoionización.

2.2.5.1 Ionización por electrospray

En este caso el analito es introducido en la fuente de disolución bien mediante una bomba inyectora o bien procedente del eluido de un sistema de cromatografía líquida. El analito pasa a través de un tubo capilar de acero inoxidable o de cuarzo sílice, al cual se le aplica una elevada diferencia de potencial habitualmente en el rango de 2.5 a 6 kV. Esto fuerza la nebulización de las gotas cargadas en el capilar, con una carga superficial de la misma polaridad que el propio capilar. Las gotas son repelidas del capilar hacia el cono de la fuente de muestreo del electrodo contador. Con la ayuda de una elevada temperatura en la fuente de ESI y/o de gas nitrógeno, a medida que las gotas atraviesan el espacio entre el capilar y el cono, van reduciendo continuamente su tamaño, por evaporación del solvente, lo que supone un incremento de la densidad de carga superficial conforme disminuye el radio de las gotas. Finalmente, la fuerza del campo eléctrico en las gotas cargadas alcanza un punto crítico en el cual es cinética y energéticamente posible el paso a fase gaseosa para los iones de la superficie. En ese momento, la tensión superficial no es capaz de mantener la carga (límite de Rayleigh), por lo que se produce una “explosión Coulómbica” y la gota se rompe en gotas más pequeñas. El proceso se repite hasta que sólo quedan iones (Figura 1)

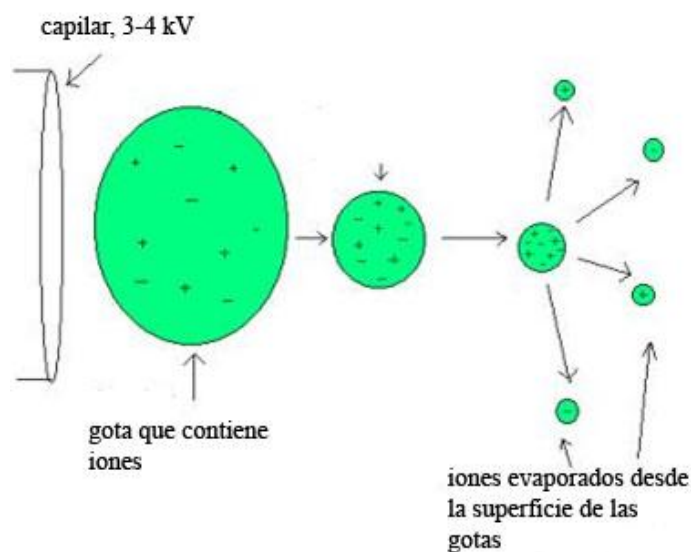


Figura 1: Imagen de ionización por electrospray

La principal desventaja que presenta esta técnica es que produce muy poca o ninguna fragmentación por lo que para estudios en los que es precisa una valoración estructural se hace necesaria la utilización de espectrometría de masas en tándem para conseguir dicha fragmentación.

2.2.5.2 Ionización química

Como características generales es un proceso que utiliza un flujo de inyección grande (0.2-2.0 mL/min) y se aplica a moléculas no polares, compuestos estables térmicamente, normalmente de peso inferior a 1300 uma. Se requiere un gas nebulizador y una descarga de corriente para producir la ionización.

El proceso consta principalmente de 3 pasos (Figura 2):

1. Mediante un alto voltaje, se ioniza el gas nebulizante (aire o nitrógeno) formando los primeros iones.
2. Estos primeros iones reaccionan inmediatamente con las moléculas de disolvente formando iones reactivos.
3. Los iones reactivos reaccionan con las moléculas de analitos formando en modo positivo o negativo.

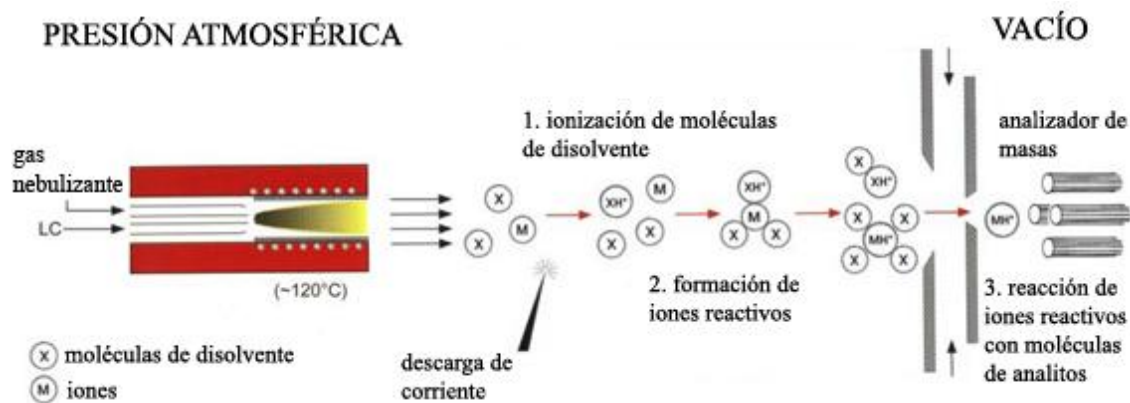


Figura 2: Esquema del proceso de ionización química a presión atmosférica

2.2.5.3 Espectrómetro de masas

El analizador más empleado en los laboratorios clínicos es el cuadrupolar. Un cuadrupolo es un filtro de masas que consta de 4 cilindros metálicos paralelos y equidistantes (Figura 3). Cada par de cilindros opuestos está conectado eléctricamente. Al par de cilindros colocados en diagonal se le aplica un voltaje de corriente continua (DC) de igual magnitud pero de signo contrario, superpuesto con un voltaje de corriente alterna de radiofrecuencia (RF). Como resultado se obtiene un campo eléctrico que origina el movimiento de los iones en la dirección z (que va desde la fuente al detector) pero con una trayectoria oscilatoria simultánea en el plano x-y. La amplitud de la oscilación sólo depende de la relación m/z y puede ser controlada modificando los voltajes DC y RF en una proporción prefijada. Así el movimiento de los iones dependerá de los campos eléctricos de modo que sólo los de una determinada relación m/z estarán en resonancia y por tanto pasarán a través del detector. Los valores m/z que no estén en resonancia con dicha trayectoria chocarán con los cuadrupolos y no se detectarán. El rango de masas y la resolución del instrumento quedan determinados por la longitud y el diámetro de los cilindros.

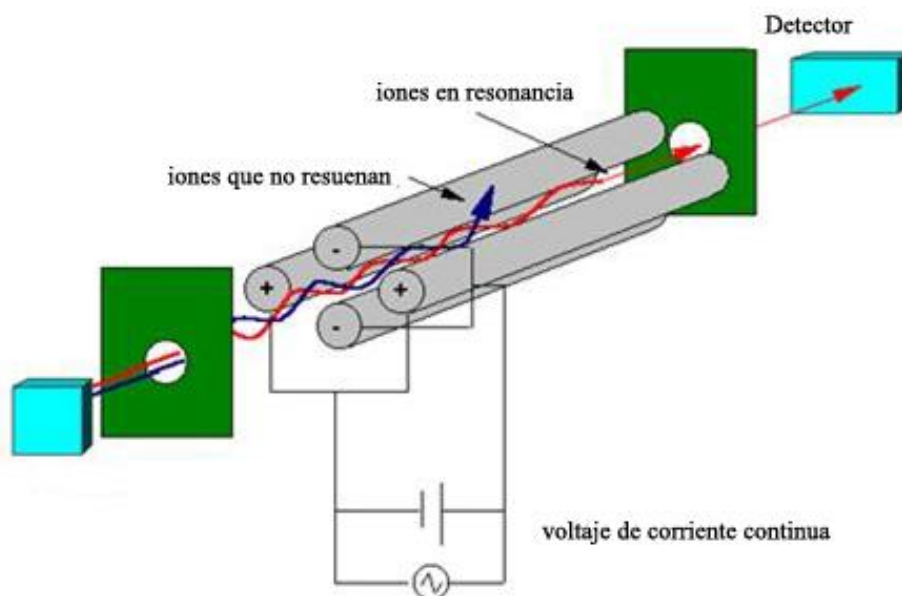


Figura 3: Esquema de un analizador de masas cuadrupolar

Los cuadrupolos pueden configurarse en tándem de tal modo que nos permitan realizar estudios de fragmentación, el más habitual es el espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (QQQ)³¹, fundamento de la MS/MS.

El espectrómetro de masas de triple cuadrupolo consta de tres cuadrupolos dispuestos en línea recta (Figura 4). En el primer cuadrupolo (Q1) se selecciona el ion analito de interés por su masa y se le pone en contacto con un gas de colisión, generalmente Argón, un segundo cuadrupolo (Q2), sometido únicamente a RF, que se usa como celda de colisión para producir la fragmentación del ión precursor. Este proceso recibe el nombre de disociación inducida por colisión (CID).

Los iones “hijos” resultantes de CID están relacionados con la estructura molecular del ión precursor y se escanean en el tercer cuadrupolo (Q3) que será el que proporciona la información estructural de los iones moleculares.

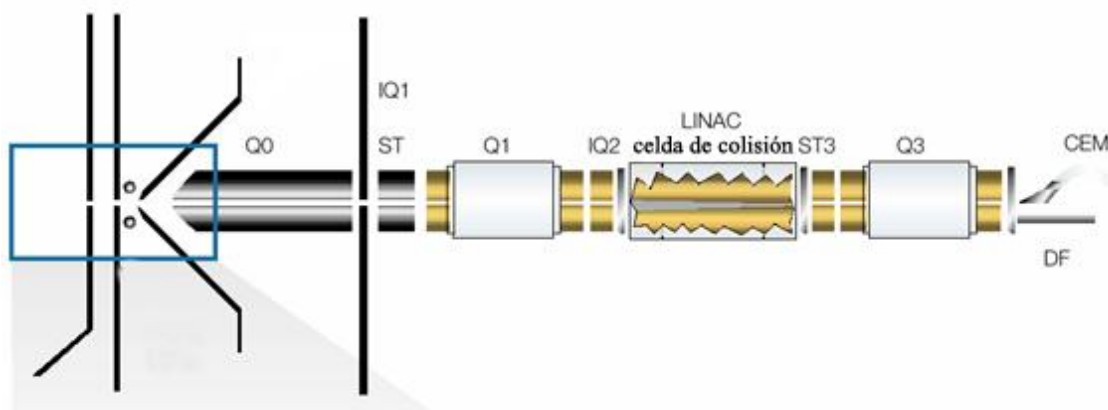


Figura 4: Esquema de un analizador de masas de triple cuadrupolo

2.2.5.4 Modos de adquisición de datos en MS/MS

Existen 4 posibilidades para obtener datos mediante MS/MS:

1. Escaneo del ión producto: Q1 permanece constante permitiendo el paso de un único ión precursor de determinada relación m/z y Q3 escanea los diferentes productos iónicos originados por CID en Q2. Se emplea este modo para el estudio de estructuras moleculares, la validación de métodos y para el estudio de hallazgos inesperados en un cribado neonatal.
2. Escaneo del ión precursor: Q1 escanea sobre un rango de posibles iones precursores mientras que Q3 permanece estático enfocando un único ión producto resultante de la CID de una determinada clase de iones precursores. Nos proporciona así un espectro de iones precursores que dan lugar a un ión producto particular.
3. Escaneo de pérdida neutra: Q1 y Q3 escanean conjuntamente a una diferencia en la relación m/z constante. Nos permite así monitorizar la pérdida de un fragmento neutro para una clase de moléculas obtenidas por CID.
4. Monitorización de reacción múltiple (MRM): Q1 y Q3 están estáticos para un predeterminado par de iones precursor y producto. Nos permite conseguir una elevada especificidad y sensibilidad y se utiliza muy frecuentemente en procedimientos de cuantificación por ESI-MS/MS.

2.2.6 Cribado Neonatal Ampliado

Una de las aplicaciones de la ESI-MS es el cribado de los errores congénitos del metabolismo ya que con este método es posible la detección de múltiples trastornos mediante la cuantificación de aminoácidos y acilcarnitinas en sangre del recién nacido.

El perfil de aminoácidos permite detectar la mayoría de las aminoacidopatías con una elevada especificidad y sensibilidad pero al mismo tiempo deben minimizarse las posibilidades de obtener resultados falsos positivos.

La obtención de resultados falsamente positivos produce un estado de ansiedad en la familia, un gasto adicional en términos de tiempo y esfuerzo profesional para la obtención de nuevas muestras para confirmar el resultado y seguimiento. Los resultados falsos negativos son aún de un coste más elevado ya que retrasan el diagnóstico de pacientes potencialmente tratables.

2.2.6.1 Análisis de los aminoácidos por MS/MS.

El principal biomarcador es el aminoácido que se acumula producto del defecto metabólico. Sin embargo, si se considera el perfil de otros aminoácidos o las razones entre ellos como biomarcadores secundarios se reducen las posibilidades de interpretar de forma errónea los resultados disminuyendo de forma importante la tasa de falsos positivos y también de falsos negativos. Así mismo al valorar globalmente el perfil de aminoácidos se minimiza el riesgo de realizar interpretaciones erróneas en aquellos pacientes que reciben nutrición parenteral o que presentan problemas hepáticos.

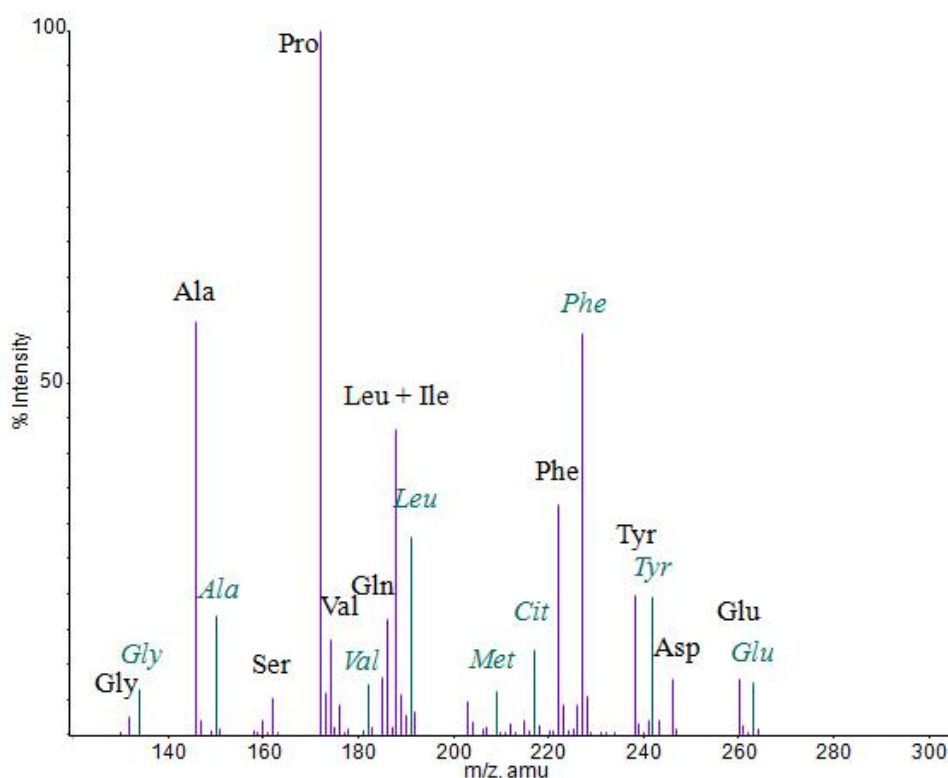


Figura 5: Perfil normal de aminoácidos.

Se ha demostrado que una concentración elevada de fenilalanina junto con una razón fenilalanina/tirosina elevada es un indicador más sensible para el diagnóstico de la fenilcetonuria que la determinación aislada de fenilalanina. Esto permite diferenciar pacientes con hiperfenilalaninemia de tipo no PKU de pacientes con PKU con una sensibilidad del 100%.

También es útil realizar valoraciones conjuntas de metionina/fenilalanina y metionina/ leucina+isoleucina para el diagnóstico de la hipermetioninemia y de la homocistinuria respectivamente; ornitina/citrulina y citrulina/arginina para la citrulinemia; arginina/ornitina para la argininemia y leucina+isoleucina/fenilalanina para la enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce.

El análisis completo del perfil de aminoácidos permite reconocer una elevación generalizada en la concentración de aminoácidos debido a causas iatrogénicas. Una situación que podría constituir una fuente de falsos positivos si

se analizara un solo aminoácido sería la administración de nutrición parenteral total; así en los recién nacidos que reciben dicha nutrición suelen encontrarse elevados los aminoácidos de cadena ramificada (leucina, isoleucina y valina), lo que se utiliza como criterio de la enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce por MS/MS, no obstante el único marcador completamente específico para esa entidad es la alo-isoleucina que no puede determinarse de forma independiente por los métodos tradicionales de cribado por MS/MS.

Un aumento en la concentración de tirosina puede indicar indistintamente la presencia de tirosinemias de tipo I, II o III y por tanto la detección por MS/MS de este aminoácido no permite distinguir al tipo I de mayor prevalencia, del resto. Además la elevación de forma significativa de la concentración de tirosina en muchos pacientes se produce lentamente de tal modo que se pueden encontrar falsos negativos en aquellos laboratorios donde se utilizan muestras tomadas al 2º día de vida. Debe tenerse en cuenta además la posibilidad de falsos positivos en aquellos pacientes con tirosinemia neonatal transitoria que se presenta con frecuencia en el período neonatal y que es una entidad benigna. El único metabolito completamente específico para la Tirosinemia tipo I es la succinilacetona.

2.2.6.2 Análisis de acilcarnitinas por MS/MS

La MS/MS puede ser utilizada para medir carnitina libre y acilcarnitinas en las muestras de sangre impregnada en papel. La carnitina libre hace de transportador, a través de la membrana y hacia el interior de la mitocondria donde tiene lugar la β -oxidación de los ácidos grasos en forma de diferentes ésteres de carnitina. Las posibles alteraciones de las diferentes etapas de este metabolismo producen una acumulación de tioésteres de CoA y un incremento de acilcarnitinas que son medidas por MS/MS y por tanto permiten detectarlas. Aunque suele existir una especie de acilcarnitina clave sobre la cual basar el diagnóstico, también ocurre el incremento de otras especies. Es por tanto importante analizar el perfil completo de acilcarnitinas y las diferentes razones molares que son de interés diagnóstico para el cribado de enfermedades.

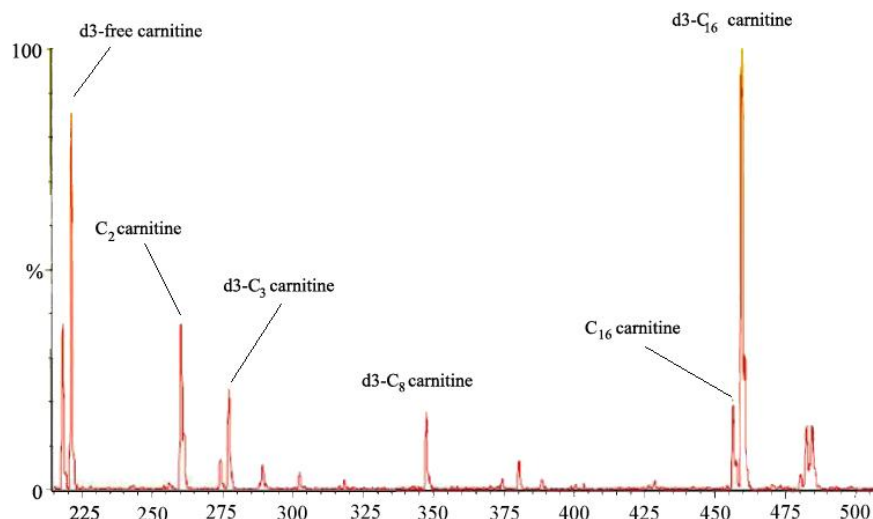


Figura 6: Perfil normal de acilcarnitinas

La carnitina libre y las acilcarnitinas liberan un fragmento común de masa molecular de 85 Da cuando son sometidas a choques moleculares dentro de un espectrómetro de masas lo cual nos permite obtener un espectro muy selectivo de acilcarnitinas en sangre, en el que se recogen desde las de 2 hasta las de 20 carbonos, y que cubre, por tanto, los metabolitos de interés: desde los implicados en el déficit de la β -oxidación de los ácidos grasos de cadena corta hasta los de cadena muy larga.

Uno de los mejores ejemplos de la utilidad del análisis de acilcarnitinas mediante MS/MS, en muestras de sangre impregnada en papel es la alteración en el metabolismo de los ácidos grasos de cadena media. Esta alteración provoca un inesperado aumento de la concentración intramitocondrial de compuestos acil-CoA de cadena media que, una vez transformados por las carnitín palmitoil transferasas en acilcarnitinas, son transportados afuera de la mitocondria, pasan a la sangre y son almacenados en el hígado, el riñón o excretados a través de la orina. Esta acumulación en sangre de acilcarnitinas saturadas e insaturadas de cadena media, simultánea a la acumulación de los ácidos grasos del mismo tipo, produce un perfil muy característico cuando es analizada por MS/MS y permite su detección neonatal de forma muy fiable. A pesar de esto, del mismo modo que ocurría con los aminoácidos si valoramos la relación entre acilcarnitinas y no

éstas de forma aislada se convierten en marcadores más potentes. Esto se debe a que la formación de grandes cantidades de acilcarnitinas suele provocar la disminución en la carnitina no esterificada y, por tanto, aún en el caso de un déficit severo de carnitina por otras causas, el cociente se mantiene elevado. El uso de ratios como indicadores permite evitar falsos positivos.

Así mismo a través de los programas de cribado neonatal se ha podido constatar que las concentraciones sanguíneas de carnitina y acilcarnitinas son más altas en los primeros días de vida y disminuyen rápidamente en las primeras semanas. En el caso de la carnitina libre y la total esta diferencia puede ser hasta del 50% cuando se comparan valores de las primeras 48 horas de vida y los de una semana^{32,33}. Esta variabilidad obliga a adoptar distintas estrategias en la detección de alteraciones incluidas en los programas de cribado neonatal, vinculadas a la medida de perfiles de acilcarnitinas en sangre, en función de la edad en el momento de la toma de la muestra. La precisión de la prueba disminuye cuando no se trata de población neonatal, y puede ser aconsejable recurrir a pruebas complementarias, como el estudio de ácidos orgánicos en orina.

Existe otro grupo de alteraciones potencialmente detectables a partir de los perfiles de acilcarnitinas en sangre en el que se incluyen: el déficit de β -cetotiolasa, la academia isovalérica y las alteraciones que tienen como principal marcador la 3-hidroxisovalerilcarnitina (el déficit de 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa, de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA liasa y de 3-metilglutaconil-CoA hidratasa).

2.2.7 Errores Congénitos del Metabolismo que deben incluirse en el cribado

Existe un consenso generalizado acerca de que la aplicación de las nuevas tecnologías al cribado neonatal de enfermedades supone un claro beneficio sobre la salud de los recién nacidos pero no existe en cambio ese consenso en lo que se refiere a que ECM deben incluirse en los programas de cribado existiendo discrepancias incluso dentro de nuestro propio país.

Debe tenerse en cuenta que los programas de cribado neonatal deben adaptarse a las características genéticas, costumbres y hábitos sociales, condiciones sanitarias y estatus económico del país pero incluso en poblaciones de características similares como las europeas existe gran discrepancia entre los distintos programas de cribado neonatal^{26,34} (Tabla 3). Es por ello necesario establecer unos criterios de mínimos de unificación de los programas de cribado.

Tabla 3 . Variaciones de los programas de cribado neonatal ampliado establecido en diversos países

	España		España		Italia		Francia		Belgica		Portugal		Austria		Dinamarca		Polonia		Suiza	
	EE.UU.	(Galicia)	(Murcia)	Holanda	Alemania	UK	Toscana	Francia	Belgica	Portugal	Austria	Dinamarca	Polonia	Suiza						
Desórdenes del metabolismo de los aminoácidos																				
Fenilcetonuria	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Enfermedad de jarabe de arce	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Tirosinemia	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Cintrolinemia	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Aciduria argininosuccinica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Homocistinuria	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Desórdenes del metabolismo de los ácidos orgánicos																				
Acidemia propionica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Acidemia metilmalónica (Met)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Acidemia metilmalónica (Met, CN A, B)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Acidemia isovalérica (IVA)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Def. 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa (3-MCC)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Def. 3-OH-3-metilglutaril-CoA liasa (HMG)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Def. β -cetoacilasa (BKT)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Acidemia glúctica tipo I (GAI)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Desórdenes del metabolismo de los ácidos grasos																				
MCAD (def. del acil-CoA dehidrogenasa de cadena media)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
VLCAD (def. de acil-CoA dehidrogenasa de cadena muy larga)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
LCHAD (def. de hidroxiril CoA dehidrogenasa de cadena larga)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
TFE (def. de proteína trifuncional)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
MADD (def. múltiple de acil-CoA dehidrogenasa)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
CUD (def. de la captación celular de la carnitina)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Hemofelinopatias	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Otras alteraciones																				
Hipotiroidismo congénito	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Deficiencia de biotinidasa	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Galactosemia clásica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Fibrosis quística	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Hiperplasia adrenal congénita	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Datos modificados a partir de: J. Ibarretxe *Metab. Dis.* 2007; 30:439-44.

1: España; Murcia comienza el cribado ampliado por MSMS en 2007; 2008 País Vasco comienza MCAD; Murcia Comandades tienen cribado comenzado en 2009; 2: Italia; Toscana realiza el cribado expandido por MSMS;

3: Polonia; realiza el cribado expandido por MSMS al 80% de la población; 4: Austria; realiza el cribado ampliado por MSMS.

Con este fin el Maternal and Child Health Bureau (MCHB) de la Health Resources and Services Administration (HRSA) norteamericana, reunió un grupo de expertos que elaboraron un documento “Newborn screening: Toward a uniform screening panel and system” que se publica en marzo 2005 en el que se recogen unos principios básicos y se proponen una serie de criterios en base a los cuales se deben evaluar las alteraciones que deben ser cribadas, haciendo, además, recomendaciones prácticas al respecto³⁵. En dicho documento se recoge que deben ser cribadas las siguientes alteraciones:

- Alteraciones del metabolismo de los ácidos orgánicos
 - Acidemia isovalérica
 - Aciduria glutárica tipo I
 - Aciduria 3-hidroxi-3-metilglutárica
 - Déficit múltiple de carboxilasas
 - Acidemia metilmalónica
 - Deficiencia de 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa
 - Acidemia propiónica
 - Deficiencia de la β -cetotiolasa
- Alteraciones del metabolismo de los ácidos grasos
 - Deficiencia acil-CoA deshidrogenasa de cadena media
 - Deficiencia acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga
 - Deficiencia hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de cadena larga
 - Deficiencia proteína trifuncional
 - Déficit primario de carnitina
- Alteraciones del metabolismo de los aminoácidos
 - Fenilcetonuria
 - Enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce

- Homocistinuria
- Citrulinemia
- Acidemia argininosuccínica
- Tirosinemia tipo I
- Hemoglobinopatías
 - Drepanocitosis
 - Síndrome β -talasemia
 - Hemoglobinopatía tipo SC
- Otras alteraciones
 - Hipotiroidismo Congénito
 - Deficiencia de biotinidasa
 - Hiperplasia adrenal congénita
 - Galactosemia
 - Defectos de audición
 - Fibrosis quística

En este sentido en nuestro país en el año 2006 a través del Consejo Interterritorial de Sanidad se elabora un informe sobre la situación del cribado neonatal en las diferentes comunidades autónomas españolas a partir del cual, un grupo de expertos elabora un documento titulado “Programa de cribado neonatal en España: actualización y propuestas de futuro” en el que se proponen 24 enfermedades endocrinas y metabólicas que deben incluirse en un programa de cribado (Tabla 4); dicho documento está refrendado por la Asociación Española para el Estudio de los Errores Congénitos del Metabolismo, Sociedad Española de Errores Innatos del Metabolismo-Asociación Española de Pediatría y Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular y ha sido publicado recientemente por el Real Patronato sobre Discapacidad del Ministerio de Sanidad y Política Social³⁶.

	Enfermedades	Síntomas clínicos	Prevalencia
Aminoacidopatías	Hiperfenilalaninemia	Retraso mental; espasticidad; convulsiones; hiperactividad; problemas del comportamiento y psiquiátricos; eczemas, pelo ralo	1-9:10000
	Fenilcetonuria		
	Defectos en la biosíntesis del cofactor biopterina	Retraso mental; trastornos del movimiento	<1:100000
	Defectos en la regeneración del cofactor biopterina	Retraso mental; trastornos del movimiento	<1:100000
	Enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce	Rechazo de la alimentación y vómitos ; retraso mental grave; encefalopatía; convulsiones; olor especial	0.4-2: 100.000
	Tirosinemia Tipo I	Enfermedad hepática grave; cirrosis; hematomas; raquitismo	0.05-1:100000
	Homocistinuria	Retraso mental; ectopia lentis; osteoporosis; anomalías esqueléticas, tromboembolismo	0.5-1: 100000
Acidurias Orgánicas	Aciduria Glutárica tipo I	Macrocefalia, encefalopatía; retraso del desarrollo; distonía	0.4-2.5:100000
	Acidemia Isovalérica	Cetoacidosis metabólica, hiperamonemia; rechazo de la alimentación y vómitos; retraso mental y del desarrollo, convulsiones, coma, muerte y olor a sudor	1:100000
	Aciduria 3-hidroxi 3-metilglutárica	Hipoglucemia hipocetósica; acidosis metabólica; síndrome de Reye-like; retraso del desarrollo; convulsiones; coma y muerte	<1:100000
	Deficiencia de la β -cetotilasa	Crisis cetoacidóticas y retraso del desarrollo	Desconocida 60 casos
	Acidemias Metilmalónicas (Cbl A, B,C,D, Mut)	Rechazo de la alimentación, vómitos; hipotonía; retraso mental y del desarrollo; fallo renal progresivo; pancreatitis; coma y muerte.	1.5-2:100000
	Acidemia Propiónica	Cetoacidosis, hiperamonemia; rechazo de la alimentación; vómitos; retraso mental y del desarrollo; hipotonía; convulsiones; coma y muerte	3.75:100000

	Enfermedades	Síntomas clínicos	Prevalencia
Defectos de la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos	Deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena media	Hipoglucemia hipocetósica; vómitos; letargia; convulsiones; colapso cardiorrespiratorio; hepatopatía grasa; muerte súbita	15:100000
	Deficiencia de L-3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de cadena larga	Hipoglucemia hipocetósica; cardiomiopatía hipertrófica; miopatía con fatiga muscular y rabdomiolisis	1-9:100000
	Deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga	Hipoglucemia hipocetósica; cardiomiopatía hipertrófica; miopatía con fatiga muscular; rabdomiolisis	Desconocida >1:100000
	Deficiencia primaria de carnitina	Hipoglucemia hipocetósica; hepatomegalia; cardiomiopatía; debilidad muscular; muerte súbita	1-2:100000
	Deficiencia de carnitina palmito iltransferasa 2	Hipoglucemia hipocetósica; malformaciones estructurales; convulsiones; hepatopatía; cardiomiopatía; fallo renal	Desconocida >300 casos
	Deficiencia de carnitina/acilcarnitina traslocasa	Hipoglucemia hipocetósica; esteatosis hepática; hipertrofia cardíaca	Desconocida 30 casos
Otras enfermedades endocrino-metabólicas	Hipotiroidismo congénito	Retraso mental y del crecimiento grave; macroglosia; hernia umbilical	10-50:100000
	Hemoglobinopatías	Anemia; infecciones recurrentes; crisis de dolor	10-50:100000
	Fibrosis quística	Infecciones broncopulmonares graves; problemas digestivos y esteatorrea; retraso del crecimiento	1-5:100000
	Deficiencia de biotinidasa	Convulsiones; hipotonía; dermatitis seborreica y alopecia; conjuntivitis; sordera neurosensorial; retraso mental	1.6:100000
	Galactosemia	Rechazo de la alimentación; vómitos; depresión neurológica; fallo hepático; diátesis hemorrágica; cataratas	6.6:100000

Tabla 4: Enfermedades recomendadas para introducir en los programas de cribado. Síntomas clínicos más comunes si el paciente no recibe tratamiento y prevalencia o casos publicados según el Informe de Mayo 2011 de Orphanet (www.orpha.net)

2.2.8 Situación del Cribado Neonatal en España

En España el primer programa de cribado neonatal surge en el año 1968 en Granada por iniciativa del Profesor Mayor-Zaragoza. En 1978 se establece el Programa de Detección Precoz Neonatal de Fenilcetonuria e Hipotiroidismo Congénito, y a partir de 1979 se organizó el Plan Nacional de Prevención de la Subnormalidad, con el amparo del Real Patronato de Educación y Atención a Deficientes. En 1982 los programas fueron transferidos a las Comunidades Autónomas.

En el momento actual en España existen 18 laboratorios para el cribado neonatal: dos en Andalucía (Sevilla y Málaga), dos en la Comunidad Valenciana (Alicante y Valencia), y el resto de Comunidades disponen de un único centro (Murcia realiza las pruebas de Melilla, Sevilla las de Ceuta y Aragón las de la Rioja).

Cada Comunidad Autónoma determina que enfermedades incluye en su programa de cribado por lo que existe una gran variabilidad entre los distintos programas de cribado que existen en nuestro país; la situación actual se puede resumir en:

- Las hiperfenilalaninemias y el hipotiroidismo congénito están incluidas en todos los programas de cribado.
- En 8 Comunidades Autónomas se realiza cribado ampliado por MS/MS para la detección de aminoacidopatías, acidurias orgánicas, defectos de β -oxidación de ácidos grasos.
- Se realiza detección precoz de fibrosis quística en los programas de Aragón, Baleares, Canarias, Castilla y León, Cataluña, Extremadura, Galicia, La Rioja, Málaga, Murcia, País Vasco y Sevilla.
- La hiperplasia suprarrenal congénita está incluida en los programas de Aragón, Castilla-La Mancha, Extremadura, Madrid y La Rioja.

- La anemia falciforme y otras hemoglobinopatías se incluyen en los programas de Extremadura, Madrid y País Vasco.
- Extremadura, Navarra y Valencia analizan la orina para la detección de otras aminoacidopatías y Murcia y Galicia para la detección de cistinuria.
- En Galicia se realiza la detección precoz de galactosemia y en Murcia y Galicia también del déficit de biotinidasa.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo ha sido realizar una adecuada caracterización de los pacientes diagnosticados a través del cribado ampliado en nuestra Comunidad y seguidos en la Unidad de Diagnóstico y Tratamiento de Enfermedades Congénitas de Metabolismo del Departamento de Pediatría del Hospital Clínico Universitario de Santiago con el propósito de valorar el impacto de la introducción del cribado neonatal ampliado mediante MS/MS en nuestra comunidad y la repercusión de la aplicación de estas estrategias terapéuticas precoces en la mejora de su calidad de vida. Con este fin se han propuesto los siguientes objetivos concretos:

1. Conocer la incidencia de los Errores Congénitos del Metabolismo en nuestra comunidad tras la introducción del cribado neonatal ampliado.
2. Investigar la sensibilidad, especificidad y valor predictivo del Cribado ampliado con estudio de casos falsos positivos y casos falsos negativos.
3. Valorar la repercusión del diagnóstico y tratamiento precoz de los Errores Congénitos del Metabolismo sobre la morbilidad de los pacientes afectos así como conocer en qué modo altera esa intervención precoz la historia natural de estas enfermedades.
4. Estudiar la evolución mediante evaluación del desarrollo psicomotor de los pacientes seguidos en la Unidad de Diagnóstico y Tratamiento de las Enfermedades Congénitas del Metabolismo de nuestro centro en la última década.
5. Valorar la repercusión del diagnóstico y tratamiento precoz de los Errores Congénitos del Metabolismo sobre la mortalidad de los pacientes afectos.

4. MATERIAL Y MÉTODO

4. MATERIAL Y MÉTODO

4.1 DISEÑO

Estudio observacional descriptivo longitudinal de una serie de pacientes controlados en la Unidad de Diagnóstico y Tratamiento de Enfermedades Congénitas del Metabolismo de nuestro centro en el período comprendido entre julio del 2000 y julio del 2010. Se realizó valoración evolutiva clínica, bioquímica y de su desarrollo psicomotor.

4.2 SUJETOS

En nuestra Unidad se reciben los pacientes diagnosticados a través del cribado neonatal (el porcentaje de población cribado en nuestra comunidad es del 99,9% del total de recién nacidos) y también los de diagnóstico tardío por la sintomatología clínica. En éste estudio se incluyeron aquellos que se detectaron mediante el cribado neonatal.

4.3 MÉTODO

4.3.1 Cribado neonatal

Para la realización del cribado neonatal se recogen muestras de sangre y orina de todos los pacientes en papel Whatman 903; las muestra se recogieron entre el 5º y el 8º día de vida hasta el año 2002 y a partir de ese momento al tercer día (deben haber recibido alimentación al menos durante 48 horas) dado la importancia del diagnóstico y tratamiento precoz. La recogida de muestras de orina se lleva a cabo en nuestra comunidad porque permite completar y ampliar la información obtenida mediante el análisis de la muestra de sangre. Además se realiza de forma rutinaria una segunda determinación cuando se trata de gemelos del mismo sexo, prematuros o niños de bajo peso en la tercera semana de vida siguiendo las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute.

En la muestra de sangre se realiza determinación de aminoácidos, acilcarnitinas y hexosas monofosfato mediante espectrometría de masas en tándem con un equipo de triple cuadrupolo ESI-MS/MS API 2000 (Sciex Applied BioSystems) equipado con una bomba de jeringa integrada para realizar infusiones individuales y una fuente de Turboión Spray. Como gas de colisión y gas cortina se empleó nitrógeno. Las muestras fueron infundidas acoplando un equipo de HPLC compuesto de un muestreador automático para microplacas y una bomba modelo Series 200 (Perkin-Elmer).

En la muestra de orina se estudiaron aminoácidos y acilcarnitinas mediante ionización positiva y acilglicinas y ácidos orgánicos mediante ionización negativa lo que permite obtener gran cantidad de información en un único análisis. Se analizaron también galactosa y cistina mediante el Test de Brand y la actividad de la biotinidasa mediante ensayo colorimétrico específico. Para el corte de las muestras de orina impregnadas en papel y su introducción en las placas de microtitulación se empleó una taladradora automática BSD 700 (BSD tech. Brisbane, Australia). Para la extracción de la orina del papel de filtro se empleó un vórtex de sobremesa para microplacas (SBS). La evaporación a sequedad de las muestras se realizó en un evaporador Micro-DS96 (Porvair Sciences) con nitrógeno.

Estas determinaciones permiten realizar el cribado en todos los neonatos de aminoacidopatías, defectos de la β -oxidación de los ácidos grasos, acidurias orgánicas, galactosemia y déficit de biotinidasa (también de hipotiroidismo y fibrosis quística pero estas patologías no se incluyeron en el grupo de estudio).

Los percentiles de concentraciones de analitos medidos mediante MS / MS en la sangre de los recién nacidos sanos y enfermos se comunicaron periódicamente al proyecto colaborativo “Region-4-Genetics” que es un proyecto internacional para la mejora de la calidad de los resultados obtenidos mediante los programas de cribado por MS/MS en el que participan laboratorios de todo el mundo aportando los datos de los diagnósticos realizados y los niveles de metabolitos en la primera semana de vida, los valores de referencia obtenidos en

la población y los puntos de corte utilizados tanto para acilcarnitinas como para aminoácidos; permitiendo de este modo la validación de los puntos de corte utilizados. En la Tabla 5 se recogen los metabolitos usados como marcadores, el punto de corte de los mismos y el método diagnóstico empleado.

En aquellos casos en los que el resultado del cribado era claramente patológico y sugería trastornos graves, los pacientes fueron remitidos inmediatamente a la unidad clínica; si el resultado se encontraba fuera del rango normal pero sin ser claramente indicativo de afectación severa se realizó una segunda muestra; si ésta resultaba igualmente positiva los pacientes se remitían también a la unidad clínica.

En todos aquellos casos en los que el cribado estaba alterado se realizaron determinaciones analíticas para confirmar o descartar el diagnóstico de sospecha como aminoácidos en plasma, ácidos orgánicos en orina líquida, estudio enzimático y/o genética molecular. Así mismo a todos los pacientes en los que se confirmó el diagnóstico de una metabolopatía se les realizó un seguimiento evolutivo.

4.3.2 Diagnóstico y seguimiento

En el estudio se recogieron variables relacionadas con el diagnóstico y el seguimiento. En relación con el diagnóstico se recogieron las siguientes variables: presencia o no de síntomas, marcadores bioquímicos alterados, diagnóstico, métodos usados para la confirmación diagnóstica y necesidad de usar diálisis u otras técnicas de depuración extrarrenal.

Entre las relacionadas con el seguimiento se incluyeron: necesidad de tratamiento dietético y/o farmacológico, tiempo de seguimiento y desarrollo psicomotor.

Se recogió así mismo el impacto que supone el cribado ampliado en una unidad neonatal valorando el número de pacientes que precisaron ingreso en la unidad, los cuidados que precisaron dichos pacientes y la evolución clínica de los mismos.

El índice de Desarrollo Psicomotor (PDI) o Cociente intelectual (CI) se valoró utilizando la escala de Brunet-Lézine en los niños lactantes; la escala de McCarthy en los niños preescolares y la Wechsler Intelligence Scale for Children (WISC-R) para los niños mayores de 6 años. Se consideraron como valores normales de PDI o CI aquellos que fueron iguales o superiores a 85.

Aquellos casos en los que los marcadores bioquímicos se encontraban alterados en el cribado neonatal pero fueron normales en los test diagnósticos posteriores se consideraron como falsos positivos. Aquellos otros casos en los que los marcadores bioquímicos se encontraban alterados en el cribado pero se normalizaron espontáneamente en muestras sucesivas se consideraron alteraciones transitorias. En estos casos con alteraciones transitorias se realizó cuando era oportuno un estudio de las madres para comprobar si las alteraciones presentadas se relacionaban con un déficit materno.

Si el cribado neonatal fue considerado normal pero se demostró con posterioridad que presentaban enfermedad metabólica se consideraron falsos negativos.

Nombre de la enfermedad	Metabolito marcador Punto de corte en cribado	Método de Diagnóstico	
		Actividad enzimática	Análisis molecular
Fenilcetonuria	Phe= 97-136 μ M		gen PHA
Enfermedad de jarabe de arce	Leu+Ile= 200-250 μ M Val= 140-190 μ M	Decarboxilación de leucina	genes BCKDHA, BCKDHE, DBT, DLD
Homocistinuria	Met= 47-60 μ M	cistationina- β -sintasas	gen CBS
Aciduria argininosuccínica	Citr= 28-31 μ M	Incorporación de citrulina a proteínas	gen ASL
Citrulinemia tipo I	Citr= 28-31 μ M	Incorporación de citrulina a proteínas	gen ASS
Arginemia	Arg= 31-44 μ M	Arginasa	gen ARG1
Tirosinemia tipo I	Tyr= 201-300 μ M Succinilacetona: 5 μ M	γ -ALAD fumarilcetoacetato hidrolasa	gen FAH
Tirosinemia tipo II	Tyr= 201-300 μ M		gen TAT
Tirosinemia tipo III	Tyr= 201-300 μ M		gen HPD
MCAD	C8= 0,21-0,76 μ M C10= 0,27-0,30 μ M C8/C10= 2,57-3,00	Oxidación de octanoico	gen MCAD
LCHAD	C16OH= 0,09-0,15 μ M C16:1-OH=0,10-0,15 μ M C18:1-OH= 0,07-0,10 μ M C18-OH= 0,07-0,10 μ M C16-OH/C16= 0,045-0,072	LCHAD	gen HADHA
VLCAD	C14:2= 0,12-0,15 μ M C14:1= 0,37-0,71 μ M C14= 0,49-0,72 μ M C14:1/C16= 0,13-0,20	Oxidación de palmitoil-CoA	gen ACADVL
SCAD	C4= 0,74-0,99 μ M C4/C2= 0,03-0,04 C4/C3= 0,40-0,50 C4/C8= 14,11-15,00	SCAD	gen ACADS
Aciduria Gltúrica tipo I	C5DC= 0,10-0,17 μ M	Gltaril-CoA deshidrogenasa	gen GCDH
Aciduria 3-OH-metilglútica	C5OH= 0,37-0,66 μ M C6DC= 0,10-0,12 μ M	3-OH-3-metilglutaril CoA liasa	gen HMGCL
Acidemia metilglútica Cbl A, B	C3= 4,63-5,50 μ M C3/C2= 0,17-0,20 C3/C16= 1,70-2,00	14C-propionato con y sin OHcbl	genes MMAA, MMAB
Acidemia metilglútica Cbl C,D	C3= 4,63-5,50 μ M C3/C2= 0,17-0,20 C3/C16= 1,70-2,00	14C-propionato con y sin OHcbl	genes MMACHC, MMADHC
Acidemia metilglútica metilglútil CoA mutasa	C3= 4,63-5,50 μ M C3/C2= 0,17-0,20 C3/C16= 1,70-2,00	Metilglútil CoA mutasa	gen MUT
Acidemia propiónica	C3= 4,63-5,50 μ M C3/C2= 0,17-0,20 C3/C16= 1,70-2,00	Propionil CoA carboxilasa	gen PCCA, PCCB
Metilcrotonilglútica	C5= 0,39-0,48 μ M	Metilcrotonil CoA carboxilasa	genes MCC1, MCC2
Deficiencia de biotinidasa	Actividad biotinidasa: visualización de color tras reacción enzimática	Actividad de biotinidasa en suero	gen BTD
Galactosemia clásica	Gal-1-P= 0,5 mM Actividad GAL T	Actividad Gal-1-P uridiltransferasa	gen GAL T
Galactosemia por déficit de galactokinasa	Galactosa en orina \uparrow Galactosa 1P \rightarrow N	Actividad de galactokinasa	

Tabla 5: Puntos de corte y métodos diagnósticos empleados para los distintos ECM.

4.3.3 Análisis estadístico

Se realizó estadística descriptiva de las variables del estudio. Para las variables cualitativas se emplearon frecuencias relativas y absolutas que se representan mediante diagramas sectoriales y de barras mientras que, para las variables cuantitativas según siguieran o no una distribución normal (tras la aplicación del test de Kolmogorov-Smirnov) se resumieron mediante $Md \pm SD$ (media y desviación estándar) y rango (mínimo y máximo).

El análisis estadístico se ha realizado con el paquete Statistical Package for Social Sciences (SPSS).

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

El Programa de Cribado Neonatal está plenamente establecido en Galicia llevándose a cabo en el 99,9% de los recién nacidos lo que representa un 4,44% de los recién nacidos en España. Desde julio del 2000 se realiza cribado ampliado por espectrometría de masas en tándem.

Durante el período de estudio (julio 2000 a julio 2010) se realizó el cribado metabólico neonatal a 210.165 recién nacidos, detectándose 137 casos con errores congénitos del metabolismo; esto supone una frecuencia de 1/1534 recién nacidos. Si no tomamos en cuenta los 35 pacientes que fueron diagnosticados de hiperfenilalaninemia benigna la frecuencia de Errores Congénitos del Metabolismo sería de 1/2060 recién nacidos tal y como se refleja en la publicación de *Molecular Genetics and Metabolism* adjunta. Si consideramos todo el cribado endocrino-metabólico neonatal, con la fibrosis quística (16) y el hipotiroidismo congénito (211) la frecuencia sería de 1/577 recién nacidos.

La Tabla 6 recoge el número de casos de cada uno de los diagnósticos realizados a través del cribado, la frecuencia de estos diagnósticos en relación a los recién nacidos cribados y a cada millón de recién nacidos.

Enfermedad	Nº casos	Incidencia/10 ⁶ RN	IC 95%	1/Nº RN cribados
HPA benigna	35	166,5	111-221	1/6005
Fenilcetonuria	17	80,8	42-119	1/12363
Tirosinemia tipo I	2	9,5	0-23	1/105082
Homocistinuria	1	4,7	0-14	1/210165
Déficit de MAT I/III	8	38	12-64	1/26271
Enf. Jarabe arce	4	19	0-38	1/52541
Alcaptonuria	2	9,5	0-23	1/105082
Citrulinemia tipo I	1	4,7	0-14	1/210165
Aciduria arginino-succínica	1	4,7	0-14	1/210165
Déficit de arginasa	1	4,7	0-14	1/210165
Aciduria propiónica	2	9,5	0-23	1/105082
Aciduria metilmalónica	3	14,2	0-30	1/70055
Aciduria glutárica tipo I	6	28,5	6-51	1/35027
Metilcrotonilglicinuria	4	19	0-38	1/52541
Aciduria 3-OH-metilglutárica	1	9,5	0-14	1/210165
MCAD	11	52,3	21-83	1/19106
LCHAD	2	9,5	0-23	1/105082
SCAD	4	19	0-38	1/52541
Déficit transportador de carnitina	1	9,5	0-23	1/210165
Galactosemias	11	52,3	21-83	1/19106
Aciduria piroglutámica	1	9,5	0-14	1/210165
Déficit de biotinidasa	Total: 1 Parcial: 6	Total: 9,5 Parcial: 28,5	Total: 0-14 Parcial: 6-51	Total: 1/210165 Parcial: 1/35027
Aciduria mevalónica	1	9,5	0-14	1/210165
Cistinuria	11	52,3	21-83	1/19106

Tabla 6: ECM a través del cribado neonatal en el período julio del 2000 - julio 2010.
(IC: Intervalo de Confianza)

5.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS PACIENTES DIAGNOSTICADOS A TRAVÉS DEL CRIBADO

Las alteraciones detectadas con mayor frecuencia en el cribado neonatal fueron las hiperfenilalaninemias (HPA benigna 1/6005; PKU 1/12363) seguidas de los defectos de la β -oxidación de ácidos grasos de cadena media (MCAD) (1/19106), cistinurias (1/19106) y galactosemias (incluyendo galactosemia clásica por déficit de galactosa-1-fosfato uridiltransferasa (GALT), deficiencia de galactokinasa (GALK) y deficiencia de galactosa-4 epimerasa (GALE) con una frecuencia en total de 1/19106). También se encontró una frecuencia relativamente elevada de la deficiencia de metionina adenosiltransferasa (MAT I/III) con una frecuencia de 1/26271 recién nacidos; que se detectó en todos los casos al realizar el diagnóstico diferencial de homocistinuria. Los casos de alcaptonuria y aciduria mevalónica no se suelen buscar de forma rutinaria en el cribado neonatal pero se han podido diagnosticar al realizar el diagnóstico diferencial de otras entidades con ayuda de la muestra de orina. La aciduria orgánica detectada con mayor frecuencia fue la aciduria glutárica tipo I con una frecuencia de 1/35027 recién nacidos.

Excepto en las cistinurias el diagnóstico fue confirmado en todos los casos mediante estudio enzimático y/o molecular.

Nueve pacientes (dos con enfermedad de jarabe de arce, uno con citrulinemia tipo I, uno con aciduria propiónica, uno con aciduria piroglutámica, uno con aciduria mevalónica, dos con tirosinemia tipo I y uno con aciduria metilmalónica) presentaban síntomas clínicos en el momento de su detección (6,6%); cuatro de ellos (dos pacientes con enfermedad de jarabe de arce, uno con aciduria propiónica y uno con aciduria metilamalónica) precisaron la aplicación de terapias de depuración extrarrenal. De estos cuatro las dos acidurias orgánicas fueron éxitus en el primer año de vida y los dos pacientes con enfermedad de jarabe de arce se encuentran ahora asintomáticos. Los otros cinco pacientes precisaron ingreso pero no depuración extrarrenal; actualmente tres se encuentran asintomáticos y otros dos presentan síntomas clínicos en relación con su

enfermedad de base (un paciente con aciduria piroglutámica y otro con aciduria mevalónica) Tres de estos casos ocurrieron antes del 2003 cuando el cribado se realizaba entre el 5-8 día de vida.

De los 137 pacientes diagnosticados durante el período de estudio cuatro fallecieron (2,9%), tres de ellos presentaban formas severas de acidurias orgánicas (2 acidemias propiónicas y una metilmalónica) y fallecieron en el contexto de cuadros infecciosos a los 2, 4 y 12 meses de edad y el cuarto era un paciente con MCADD que falleció en el contexto de una infección respiratoria grave.

Con un tiempo medio de evolución de 54 meses, 127 de los 133 supervivientes (95,5%) permanecen asintomáticos. Sólo dos pacientes que ya presentaban síntomas en el momento del diagnóstico presentan un cociente de desarrollo por debajo de 85.

De acuerdo con los criterios especificados en el apartado de material y métodos se detectaron 33 casos falsos positivos (15/100000 recién nacidos cribados), 10 casos de elevación transitoria de los marcadores bioquímicos y cuatro casos falsos negativos (1,9/100000 recién nacidos cribados).

Resultado de la prueba	Enfermo	Sano
Positivo	137	33
Negativo	4	209991

Tabla 7: Verdaderos y falsos positivos y negativos de la prueba de cribado.

De acuerdo a estos datos (Tabla 7) nuestro protocolo de cribado presenta una sensibilidad de 97,16%; una especificidad del 99,98% y un valor predictivo de 76,11.

5.2 CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES SEGÚN LA ALTERACIÓN DETECTADA

5.2.1 Aminoacidopatías

En la Tabla 8 se recogen las características de los pacientes diagnosticados de aminoacidopatías a través del cribado neonatal; de cada uno de ellos se recoge la prevalencia, los marcadores bioquímicos analizados, la situación clínica a la detección y necesidad o no de medidas dialíticas, así como el tiempo de seguimiento valorando su evolución clínica y neurológica.

	Nº casos	Prevalencia	Síntomas al dx	Marcadores bqcos alterados (rango medio)	Diálisis o depuración extrarrenal	Tmedio dx (meses)	CI/CD (rango)	Sit. actual
HPA benigna	35	1/6005	No	Phe(s):200µM[150-306] Phe/Tyr:2.4[1.2-5.8]	No	50	95-120	LS
PKU	17	1/2363	No	Phe(s):608µM[188-1418] Phe/Tyr:9,1[4,0-22,1]	No	61	84-121	LS
TYR I	2	1/105082	Si	Tyr(s):662,729µM	No	99	87-91	LS
HCY	1	1/210165	No	Met(s):59µM Hcy(o):22 mmol/molcrea	No	70	104	LS
Def. MAT I/III	8	1/26271	No	Met(s):124µM[50-341]	No	53	88-119	LS
MSUD	4	1/52541	3: Si 1:No	XLeu(Leu+Ile)(s):1484µM [514-3367] Val(s):410µM[244-552]	2/4	77	85-117	LS
Alcaptonuria	2	1/105082	No	Ac. Homogentísico (o): 300,700 mmol/mol crea	No	30	100-116	LS

Tabla 8: Características de los pacientes con aminoacidopatías (s:sangre; o:orina; LS: libre de síntomas)

5.2.1.1 Hiperfenilalaninemias

El punto de corte para considerar un caso positivo de hiperfenilalaninemia en la prueba de cribado se establece con un valor de fenilalanina (Phe) en sangre $\geq 120\mu\text{mol/L}$ (2mg/dl); y valorando además la relación fenilalanina/tirosina que se considera patológica si es ≥ 2 . Utilizando estos criterios se detectaron en nuestro centro 54 pacientes con resultado positivo para hiperfenilalaninemia mediante el cribado durante el período de estudio. En todos ellos tras comprobar un nivel de fenilalanina plasmático aumentado se realizó determinación de dihidropterina reductasa (DHPR) en eritrocitos en muestra de sangre en papel de

filtro y pterinas en orina (de 6-12 horas) para descartar un déficit de cofactor (estos análisis se realizan en el Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares de la Universidad Autónoma de Madrid (CEDEM)). Se completó el diagnóstico con estudio molecular en el gen *PHA*.

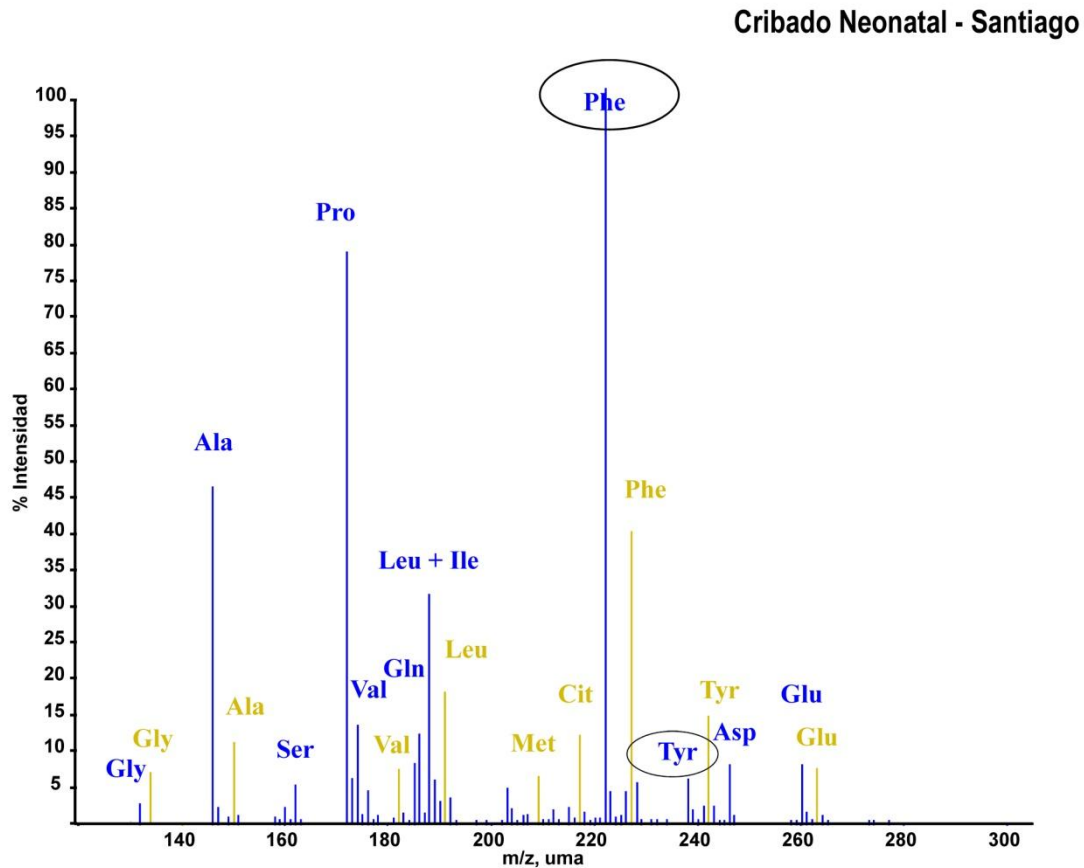


Figura 7: Perfil de fenilcetonuria

Del total de los pacientes diagnosticados de hiperfenilalaninemia, 52 presentaron déficit de fenilalanina hidroxilasa, los otros 2 casos fueron hiperfenilalaninemias transitorias. Esto supone que se presentan entre 2 y 8 pacientes nuevos por año, lo que representa una tasa media de 24,7 pacientes por cada 100.000 nacidos vivos.

En función de las concentraciones plasmáticas de Phe al diagnóstico y la tolerancia a la Phe a los 5 años de edad, nuestros pacientes se distribuyen del siguiente modo (Tabla 9, figura 8):

- 35 Hiperfenilalaninemias benignas (HPAB): niveles de fenilalanina al diagnóstico 150-360 $\mu\text{mol/L}$ (2,5-6 mg/dL). No precisan tratamiento dietético.
- 6 Fenilcetonurias leves (PKUL): niveles de fenilalanina al diagnóstico entre 360 y 600 $\mu\text{mol/L}$ (6-10 mg/dL). Tolerancia de 400-600 mg/día de fenilalanina.
- 2 Fenilcetonurias moderadas (PKUM): niveles de fenilalanina al diagnóstico entre 600 y 1200 $\mu\text{mol/L}$ (10-20 mg/dL). Tolerancia de 350-400 mg/día de fenilalanina.
- 9 Fenilcetonurias clásicas (PKUC): niveles de fenilalanina al diagnóstico $\geq 1200 \mu\text{mol/L}$ ($< 20 \text{ mg/L}$). Tolerancia de fenilalanina $< 350 \text{ mg/día}$.

	Frecuencia	%	Valor medio al diagnóstico	Rango	Tolerancia Phe/día(mg)
HPAB ($> 2 \text{ mg/dL}$)	35	67,3%	3,5 mg/dL (210 $\mu\text{mol/L}$)	2,43-5,05	Dieta Libre
PKUL (6-10 mg/dL)	6	11,5%	7,7 mg/dL (462 $\mu\text{mol/L}$)	6-10,13	400-600
PKUM ($> 10-20 \text{ mg/dL}$)	2	3,8%	12 mg/dL (720 $\mu\text{mol/L}$)	10-14	350-400
PKUC ($> 20 \text{ mg/dl}$)	9	17,3%	26,6 mg/dL (1596 $\mu\text{mol/L}$)	20-34	< 350

Tabla 9: Clasificación de nuestros pacientes con hiperfenilalaninemia

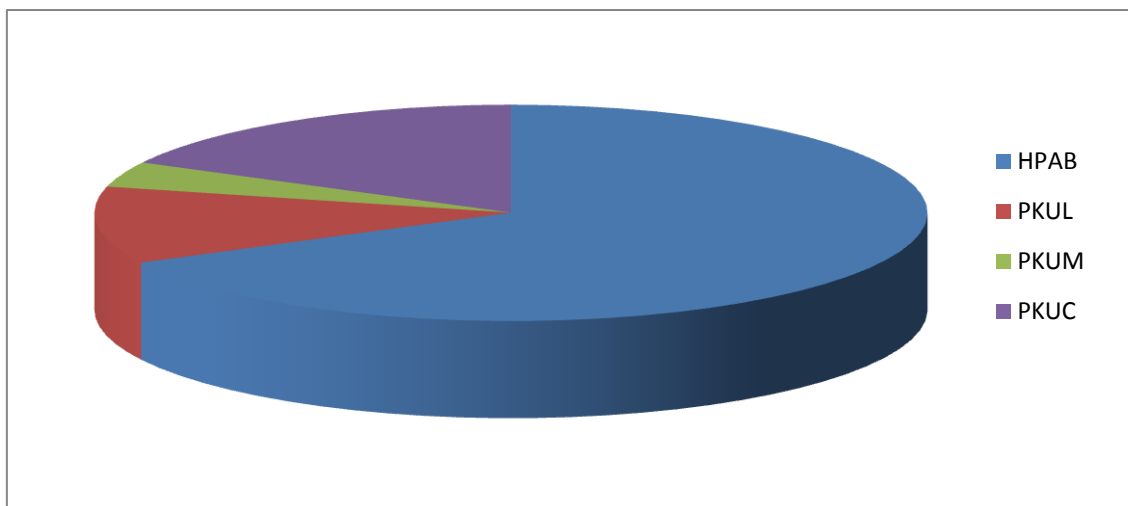


Figura 8: Distribución de los pacientes con hiperfenilalaninemia.

En los pacientes diagnosticados de fenilcetonuria se realizó el estudio molecular para confirmar el diagnóstico. En dos pacientes está pendiente el resultado de este estudio.

Se han observado 33 mutaciones distintas en la población gallega; las que aparecen con mayor frecuencia son: p.R176L, p.R261Q y p.IVS10-11 G>A. En las tablas 10 y 11 se recoge el genotipo encontrado en nuestros pacientes y los fenotipos que presentan. Se describe también la actividad enzimática para cada mutación; estas actividades descritas se corresponden con las que han sido determinadas *in vitro*, publicadas y recopiladas en la página gen *PAH* recopiladas por la *PHA Mutation Analysis Consortium* (www.pahdb.mcgill.ca). Según se indica en esta página, estas actividades *in vitro* se han realizado por distintos métodos y no siempre coinciden exactamente unos resultados con otros. Así mismo, hay mutaciones cuya actividad residual parece baja, pero se activa con rapidez en presencia BH₄ y tiene finalmente una actividad prácticamente del 100%.

Alelo 1	Act. %	C. Mut.	Dominio	Alelo 2	Act. %	T. Mut.	Dominio	FG
p.R176L c.527G>T	21-42	Miss	Catalítico	p.R261Q c.782G>A	27-47	Miss	Catalítico	3
p.E280K c.838G>A	0-12	Miss	Catalítico	p.T380M c.1139C>T	?	Miss	catalítico	2
p.R176L c.527G>T	21-42	Miss	Catalítico	p.R243X c.727C>T	<1	Non	Catalítico	2
p.R176L c.527G>T	21-42	Miss	Catalítico	p.L48S c.143C>T	0-39	Miss	Regulador	2
p.A403V c.1208C>T	32-100	Miss	Catalítico	p.Y417H c.1249T>C	?	Miss	Tetramerización	1
p.A403V c.1208C>T	32-100	Miss	Catalítico	p.R420M c.1259 G>T	?	Miss	Catalítico	1
p.A313V c.938C>T	?	Miss	Catalítico	p.IVS10-11G>A c.1066-11G>A	0	Spli	-	1
p.A300S c.898G>T	31	Miss	Catalítico	p.A300S c.898G>T	31	Miss	Catalítico	1
p.A300S c.898G>T	31	Miss	Catalítico	p.R158Q c.473G>A	3-29	Miss	Catalítico	1
p.A300S c.898G>T	31	Miss	Catalítico	p.IVS10-11G>A c.1066-11G>A	0	Spli	-	1
p.F55Lfs c.165delT	?	Del	Regulador	p.K42E c.124A>G	?	Miss	Regulador	1
p.I65T c.194T>C	21-60	Miss	Regulador	p.V388M c.1162G>A	15-43	Miss	Catalítico	1
p.R176L c.527G>T	21-42	Miss	Catalítico	p.V388M c.1162G>A	15-43	Miss	Catalítico	1
p.R176L c.527G>T	21-42	Miss	Catalítico	p.Y277D c.754C>T	?	Miss	Catalítico	1
p.R176L c.527G>T	21-42	Miss	Catalítico	p.F39del c.115-117delTTC	20-83	Del	Regulador	1
p.R176L c.527G>T	21-42	Miss	Catalítico	p.Y414C c.1241A>G	20-80	Miss	Tetramerización	1
p.R176L c.527G>T	21-42	Miss	Catalítico	No detectada	-	-	-	1
p.R243Q c.728G>A	10-18	Miss	Catalítico	p.V388M c.1162 G>A	15-43	Miss	Catalítico	1
p.R243X c.727C>T	<1	Non	Catalítico	p.R261Q c.782G>A	27-47	Miss	Catalítico	1
p.S87R c.261C>A	25-82	Miss	Regulador	p.R261Q c.782G>A	27-47	Miss	Catalítico	1
p.S87R c.261C>A	25-82	Miss	Regulador	p.IVS10-11G>A c.1066-11G>A	0	Spli	-	1
p.V230I c.688G>A	52-63	Miss	Catalítico	p.Y198fs c.593_614del22	?	Del	Catalítico	1
p.V230I c.688G>A	52-63	Miss	Catalítico	p.A403V c.1208C>T	32-100	Miss	Catalítico	1
p.V177M c.529G>A	?	Miss	Catalítico	p.V388M c.1162G>A	15-43	Miss	Catalítico	1
p.Y417H c.1249T>C	?	Miss	Tetramerización	No detectada	-	-	-	1

Tabla 10: Genotipos y actividad enzimática de los pacientes con hiperfenilalaninemias benignas. (FG: Frecuencia de genotipos; Act: Actividad; T. Mut: Tipo Mutación; Non: Nonsense; Miss: Missense; Del: Delección; Spli: Splicing)

Alelo 1	Act. %	C. Mut.	Dominio	Alelo 2	Act. %	T. Mut.	Dominio	FG	Fen.
p.Y277D c.754C>T	?	Miss	Catalítico	p.L48S c.143T>C	0-39	Miss	Regulador	2	PKUL PKUM
p.F55Lfs c.165delT	?	Del	Regulador	p.R261Q c.782G>A	27-47	Miss	Catalítico	1	PKUC
p.IVS10-11G>A c.1066-11G>A	0	Spli	-	p.R270K c.809G>A	?	Miss	Catalítico	1	PKUC
p.IVS10-11G>A c.1066-11G>A	0	Spli	-	p.I65T c.194T>C	21-60	Miss	Regulador	1	PKUC
p.IVS10-11G>A c.1066-11G>A	0	Spli	-	p.R68S c.204A>T	18-98	Miss	Regulador	1	PKUM
p.P211T c.631C>A	72	Miss	Catalítico	p.IVS10-11G>A c.1066-11G>A	0	Spli	-	1	PKUL
p.R243Q c.728G>A	10-18	Miss	Catalítico	p.E390G c.1169A>G	70-85	Miss	Catalítico	1	PKUL
p.R243Q c.728G>A	10-18	Miss	Catalítico	p.IVS10-11G>A c.1066-11G>A	0	Spli	-	1	PKUC
p.R261Q c.782G>A	27-47	Miss	Catalítico	p.D415N c.1243G>A	72	Miss	Catalítico	1	PKUL
p.R261Q c.782G>A	27-47	Miss	Catalítico	p.IVS10-11G>A c.1066-11G>A	0	Spli	-	1	PKUC
p.R68S c.204A>T	18-98	Miss	Regulador	p.F39del c.115-117delTTC	20-83	Del	Regulador	1	PKUL
p.R176X c.526C>T	?	Non	Catalítico	p.R261Q c.782G>A	27-47	Miss	Catalítico	1	PKUC
p.R243X c.727C>T	<1	Non	Catalítico	p.V388M c.1162G>A	15-43	Miss	Catalítico	1	PKUC
p.V388M c.1162G>A	15-43	Miss	Catalítico	p.E280K c.838G>A	0-12	Miss	Catalítico	1	PKUC

Tabla 11: Genotipos, fenotipos y actividad enzimática de los pacientes con fenilcetonuria. (FG: Frecuencia de genotipos; Act: Actividad; T. Mut: Tipo Mutación; Non: Nonsense; Miss: Missense; Del: Delección; Spli: Splicing; Fen: Fenotipo)

De los 39 genotipos encontrados sólo 5 de ellos se repiten en más de una ocasión. Tres de estos genotipos corresponden a familiares: p.L48S/p.Y277D son hermanas gemelas y p.R176L/p.R261Q y p.T380M/p.E280K son hermanos. Las dos hermanas gemelas que presentan el mismo genotipo fenotípicamente se comportan uno como una fenilcetonuria leve y la otra como una fenilcetonuria moderada, en los otros casos hay concordancia fenotipo/genotipo. No se han detectado mutaciones nuevas.

La terapia con tetrahydrobiopterina (BH4) (Laboratorios Schirks, Suiza) desde 2004 a 2009, y desde 2009 con dihidrocloruro de sapropterina (Kuvan®; Merck Serono, Suiza) ha supuesto un avance en el tratamiento de la fenilcetonuria porque permite en los pacientes respondedores incrementar la tolerancia a las proteínas naturales manteniendo adecuados niveles de fenilalanina. Para valorar que pacientes presentan respuesta al tratamiento con

este cofactor realizamos un test de sobrecarga durante 24 horas administrando una dosis de sapropterina (BH4) de 20 mg/kg y midiendo los niveles de fenilalanina en situación basal y a las 4, 8, 12 y 24 horas tras la administración del cofactor. En nuestra unidad se empezó a realizar este test a los pacientes diagnosticados a través del cribado neonatal en el año 2002. Se considera que la respuesta es positiva cuando se produce un descenso de los niveles de fenilalanina en sangre $\geq 30\%$ a las 24 horas.

El 29,4% (5/17) de los pacientes con fenilcetonuria tuvieron respuesta positiva a la prueba de sobrecarga y fueron tratados con BH4/sapropterina (en todos ellos se realizó previamente el test de sobrecarga de BH4 en el primer mes de vida) a una dosis de entre 5-20 mg/kg por día, la dosis se ajustó en función de la tolerancia en la dieta y de los niveles de fenilalanina en sangre (Tabla 12).

De los pacientes que reciben tratamiento tres presentan fenilcetonuria leve y dos presentan fenilcetonuria moderada con niveles de fenilalanina en el momento de realizar el test de sobrecarga entre 403 y 1066 $\mu\text{mol/L}$ observándose un descenso $\geq 30\%$ a las 8 horas y mayor del 57-64 % a las 24 horas. No presentó respuesta ninguno de los pacientes con fenilcetonuria clásica. Ninguno de ellos presentó efectos secundarios en relación con el tratamiento farmacológico.

A continuación se recogen las características de los pacientes que reciben tratamiento con BH4/ Kuvan desde el período neonatal y los datos sobre la evolución de los mismos (Tabla 12).

Paciente	Fenotipo	Genotipo	% red. Phe 24 h	Edad actual	CD	Niveles de Phe ($\mu\text{mol/L}$) y tolerancia (mg/day)post-BH4			BH4 dosis mg/kg/d	Duración tto.
						Media \pm SD	Mediana	Tolerancia Phe		
1	PKUS	p.P211T (c.631C>A) p.IVS10-11G>A (c.1066-11G>A)	64.2	4a 11m	88	192 \pm 84	182	880	8,9	4a 10m
2	PKUS	No realizado	64.2	1a 3m	110	135 \pm 35	127	1100	10	1a 2m
3	PKUS	p.Y277D (c.829T>G) p.L48S (c.143T>C)	60	4a 5m	103	170 \pm 111	139	800	10,4	4a 4m
4	PKUM	p.R68S (c.204A>T) p.IVS10-11G>A (c.1066-11G>A)	60	2a	93	195 \pm 142	179	565	10	1a 11m
5	PKUM	p.Y277D (c.829T>G) p.L48S (c.143T>C)	57.1	4a 5m	97	164 \pm 118	127	750	10	4a 4m

Tabla 12: Características de los pacientes respondedores a BH4. (CD: cociente de desarrollo; PKUS: PKU suave; PKUM: PKU moderada)

5.2.1.2 Tirosinemias

Durante el período de estudio se detectaron 2 pacientes con elevación de la tirosina en la muestra de sangre (valor medio de tirosina 662,729 μM); en los que se confirmó el diagnóstico de tirosinemia tipo I; lo que supone que esta patología presenta una frecuencia de 1/105082 recién nacidos.

En el momento de la detección al persistir la tirosina elevada ambos presentaban alteraciones de la coagulación (índice de Quick del 16% el paciente nº1 y del 25% el paciente nº2) y marcada elevación de α -fetoproteína (media 215000 ng/ml). Además el paciente nº1 presentaba disfunción tubular renal con nefrocalcinosis y elevación de las transaminasas. En ambos casos la succinilacetona estaba elevada en sangre y orina y también los 4-hidroxifenilderivados, los dos presentaron la misma mutación de splicing IVS12+5 G>A (c.1062+5G>A) en homocigosis.

Recibieron desde el mes de vida tratamiento con nitisinona (NTBC) iniciándola a 1 mg/kg/día en dos dosis que se ajustó posteriormente de acuerdo con niveles plasmáticos de nitisinona (se consideraron niveles plasmáticos adecuados entre 30-60 $\mu\text{mol/L}$). También recibieron tratamiento con dieta restringida en fenilalanina y tirosina para mantener unos niveles de tirosina en sangre por debajo de 400 $\mu\text{mol/L}$ y de fenilalanina entre 35-120 $\mu\text{mol/L}$. Ambos presentan, con un tiempo medio de seguimiento de 99 meses, buena evolución clínica con buen cumplimiento del tratamiento, uno de ellos presenta déficit de atención recibiendo tratamiento con metilfenidato durante 6 meses.

5.2.1.3 Trastornos del metabolismo de los aminoácidos azufrados.

Una elevación significativa de metionina (el percentil 99 en nuestra comunidad es de 48 $\mu\text{mol/L}$) se detectó en el período de estudio en 9 pacientes; de estos 1 fue diagnosticado de homocistinuria clásica (déficit de cistationina β -sintasa) y los otros 8 de deficiencia de metionina adenosiltransferasa (déficit de MAT I/III).

El paciente diagnosticado de homocistinuria clásica presentaba en la muestra de sangre del cribado metionina elevada, con un valor de 59 $\mu\text{mol/L}$ y homocistina en orina de 22 mg/g de creatinina. Se confirmó el diagnóstico mediante el estudio genético presentando en homocigosis la mutación p.T257M. Recibe tratamiento con betaína, dieta restringida en metionina y suplementos de ácido fólico y vitaminas B6 y B12. A los 5 años de edad presenta muy buena evolución clínica manteniendo los niveles de homocisteína por debajo de 40 $\mu\text{mol/L}$.

Los ocho pacientes diagnosticados de déficit de MAT I/III presentaron en la primera muestra de cribado (recogida en todos los casos en los primeros cinco días de vida) valores elevados de metionina (rango 50-341 $\mu\text{mol/L}$). En el estudio posterior de aminoácidos plasmáticos presentaron valores medios de metionina de 188,5 $\mu\text{mol/L}$ y la homocisteína normal, excepto en el paciente nº1 que presentaba en el momento de confirmar el diagnóstico una marcada elevación de la metionina (573 $\mu\text{mol/L}$) y homocisteína ligeramente elevada (22,8 $\mu\text{mol/L}$). Se confirmó en todos los pacientes el diagnóstico mediante estudio genético presentando todos ellos en heterocigosis la mutación de fenotipo dominante p.R264H (c.791g/a) en el gen *MAT1A*. Estos ocho casos suponen una frecuencia de déficit de MAT I/III en nuestra comunidad de 1/26271 recién nacidos (Tabla 13).

Paciente	1	2	3	4	5	6	7	8
Edad Actual	5a 4m	5a 2m	5a 2m	5a 1m	3a 11m	1a 6m	1a 3m	2a 8m
Sexo	Mujer	Varón	Mujer	Varón	Varón	Mujer	Mujer	Mujer
Metionina (μM) En cribado	50	100	88	141	100	115	106	292
Confirmación diagnóstica	Met573 tHc22,8	Met189 tHc8,9	Met341 tHc9,7	Met331 tHc12,4	Met180 tHc9,3	Met180 tHc9,3	Met131 tHc15	Met295 tHc10
Mutación	p.R264H	p.R264H	p.R264H	p.R264H	p.R264H	p.R264H	p.R264H	p.R264H

Tabla 13: Características de los pacientes con déficit de MAT I/III. (Met: metionina; tHc: homocisteína)

Se determinaron los niveles plasmáticos de metionina en los padres de 7 de los 8 pacientes (uno de los padres no autorizó realizar la determinación) encontrándose como era previsible elevación de la metionina en uno de los padres, dado la herencia autosómica dominante de la mutación p.R264H. Los progenitores están asintomáticos con excepción del padre del paciente nº4 que presenta cardiopatía no relacionada con la hipermetioninemia y moderada elevación de las enzimas hepáticas que se relaciona con el tratamiento farmacológico que recibe. Además se diagnosticó un caso más de déficit de MAT I/III en una niña de 7 años hermana de uno de los pacientes diagnosticado por cribado que presentaba unos niveles de metionina de 124 $\mu\text{mol/L}$ y que no había sido detectada en el período neonatal por no aplicarse todavía en aquel momento el cribado ampliado.

Todos los pacientes detectados a través del cribado se mantienen con niveles de metionina inferiores a 300 $\mu\text{mol/L}$, con una dieta sin exceder los requerimientos recomendados de proteínas para su edad. Con un tiempo medio de seguimiento de 53 meses se encuentran asintomáticos con un desarrollo antropométrico y neurológico adecuado y un cociente de desarrollo en rango normal.

5.2.1.4 Enfermedad de la orina de jarabe de arce (MSUD)

Se diagnosticaron durante el período de estudio 4 casos; 2 formas clásicas (con una actividad decarboxilante inferior al 2% respecto al control) y 2 formas intermedias (actividad entre el 3 y el 30%). Los 2 pacientes con la forma clásica diagnosticados entre el 5º y 7º día de vida presentaban a su detección clínica de encefalopatía aguda grave y concentraciones de leucina superiores a 2000 $\mu\text{mol/L}$ (2500 y 2269 respectivamente).

En los de la forma intermedia, uno de los pacientes fue detectado en el cribado metabólico con una concentración de leucina+isoleucina de 1467 $\mu\text{mol/L}$ en la muestra de sangre tomada a los 7 días de vida; en el momento de la confirmación diagnóstica, a los 14 días de edad, presentaba clínica de vómitos y

succión lenta con pérdida de peso, su concentración de leucina plasmática en ese momento era de 1682 $\mu\text{mol/L}$. El otro paciente estaba asintomático a su detección.

Todos los pacientes eran hijos de padres no consanguíneos, de etnia caucásica, a término y con un embarazo y un parto sin incidencias destacables.

En los 2 niños con presentación neonatal grave, síntomas de encefalopatía-coma y concentraciones de leucina plasmática al ingreso superior a 2000 $\mu\text{mol/L}$, se indicó inicialmente fluidoterapia iv con alto aporte de glucosa y lípidos, manteniendo el sodio entre 140-145 meq/L y suplemento de tiamina (aunque ninguno de ellos presentó respuesta a ésta). Se llevó a cabo además, depuración artificial mediante diálisis peritoneal, y en ambos casos se consiguieron en 24 horas valores en torno a 1000 $\mu\text{mol/L}$.

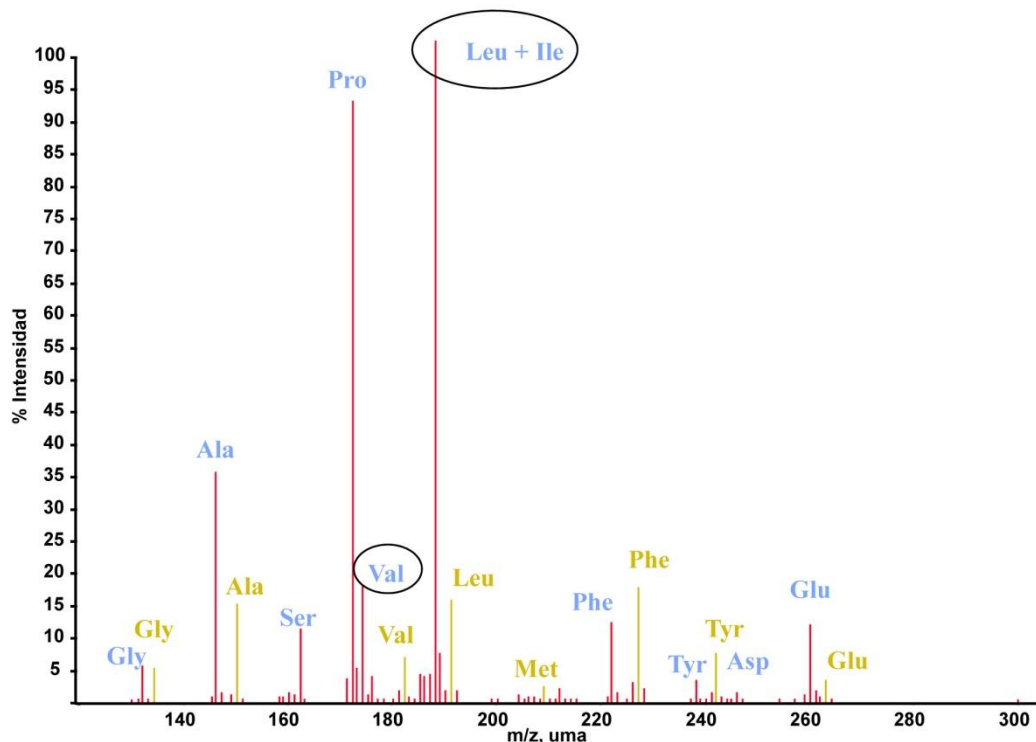


Figura 9: Perfil de la enfermedad de la orina de jarabe de arce.

En los pacientes con formas clásicas se observó una decarboxilación de leucina en fibroblastos muy deficiente (1,3 y 1,2% con respecto al control) y en

los pacientes con formas intermedias del 4% y 26% con respecto al control. En los análisis de complementación genética los pacientes con formas clásicas pertenecen al grupo de complementación E1b del gen *BCKDHB* con los genotipos p.K116fs/p.G172W y p.I214K/p.I214K y los pacientes con formas intermedias pertenecen uno también al grupo E1b del gen *BCKDHB* con el genotipo p.I214K/p.A311H y el otro al grupo E1a del gen *BCKDHA* con el genotipo p.A285P/p.A220V.

Todos ellos mantuvieron un adecuado control metabólico con concentraciones medias de leucina evolutivas $<240 \mu\text{M}$ (220, 177, 252 y 121 $\mu\text{mol/L}$ respectivamente) excepto durante los períodos de descompensación. Excepto el paciente 4 que se mantuvo asintomático, los otros tres presentaron descompensaciones metabólicas moderadas que precisaron ingreso hospitalario en relación con infecciones víricas y/o bacterianas (infección respiratoria y otitis fueron las más frecuentes). Durante estas descompensaciones, la concentración plasmática de leucina sólo superó esporádicamente los 1000 $\mu\text{mol/L}$ en dos de los pacientes. El tratamiento fue siempre dietético, con suplementos de isoleucina, valina y también glutamina, alanina y tiamina; en dos de los casos se administró nutrición parenteral con una mezcla de aminoácidos exenta de leucina, valina e isoleucina.

Evolutivamente todos ellos presentan unos parámetros antropométricos normales y un cociente de desarrollo normal (con puntuaciones de 85, 94, 117, 110) aunque es superior en los pacientes con formas intermedias (Tabla 14). El tiempo medio de seguimiento es de 77 meses y todos ellos se encuentran en el momento actual asintomáticos.

	Fenotipo	Edad actual	Gen	Mutación	Activ. Enzimát	Nº Ing	CD/CI
1	Clásica	7 años	E1b/BCKDHB	p.K116fs(c.348delA) p.G172W(c.514G>)	1,2%	6	85
2	Clásica	5a 4m	E1b/BCKDHB	p.I214K(c.641T>A) p.I214K(c.641T>A)	1,3%	2	94
3	Intermedia	8 años	E1a/BCKDHA	p.A285P(c.853G>C) p.A220V(c.659C>T)	4%	5	117
4	Intermedia	2a 7m	E1b/BCKDHB	p.I214K(c.641T>A) p.A311H (c.931G>C)	26%	0	110

Tabla 14: Características de los pacientes con Enfermedad de Jarabe de Arce

5.2.1.5 Alcaptonuria

En nuestro grupo de estudio se detectó elevación de ácido homogentísico en orina en 2 pacientes (p.1: 4715 mmol/mol de creatinina y p.2: 300mmol/mol de creatinina) en la muestra del cribado. En muestras de orina líquidas obtenidas al mes y 3 semanas en el paciente nº1 y al mes de vida en el nº2 los valores obtenidos fueron mucho más elevados (p.1: 11752 mmol/mol de creatinina y p.2: 900 mmol/mol de creatinina).

El genotipo del paciente nº1 presenta en el gen *HGD* las mutaciones p.V300G (c.1066T>G)/c.1355+1G>A y el del nº2 p.D18V(c.53A>T)/p.S45QfsX66 (c.133delT).

Los dos pacientes reciben tratamiento con dieta sin exceso de proteínas animales y suplemento de vitamina C. Con un tiempo medio de seguimiento de 30 meses se encuentran asintomáticos como era de esperar.

5.2.2 Defectos del ciclo de la urea

Se han detectado por cribado aquellos defectos con citrulina/arginina elevadas en la muestra de sangre en papel de filtro.

	Citrulinemia tipo I	Aciduria arginino-succínica	Déficit de arginasa
Nº casos	1	1	1
Prevalencia	1/210165	1/210165	1/210165
Síntomas al dx	Si	No	No
Marcadores bqcas alterados (rango medio)	Citrulina(s): 1096µM Ac. orótico(o):80mmol/molcrea	Phe(s):608µM[188-1418] Phe/Tyr:9,1[4,0-22,1]	Tyr(s):662,729µM
Diálisis o depuración extrarrenal	No	No	No
Tmedio dx (meses)	24	26	44
CI/CD (media)	85	86	98
Situación actual	CS	LS	LS

TABLA 15: Características de los pacientes con trastornos del ciclo de la urea (s: sangre; o: orina; LS: libre de síntomas; CS: con síntomas).

5.2.2.1 Citrulinemia tipo I

Se detectó un paciente, el cual a las 48 horas de vida inicia clínica de vómitos y distensión abdominal e ingresa en su hospital de referencia con sospecha inicial de pseudobstrucción intestinal. Presenta un rápido empeoramiento del estado general con hipotonía, deterioro neurológico y crisis convulsivas precisando intubación y ventilación mecánica. Al quinto día de vida en las pruebas endocrino-metabólicas se objetiva elevación de citrulina en sangre (2400 µmol/L), de glutamina (2811 µmol/L) y del orótico en orina (1435 µmol/L). Estos hallazgos de cribado facilitaron su diagnóstico más rápido; fue trasladado a nuestro centro con un valor de amonio en ese momento de 680 µmol/L; se inició entonces tratamiento con benzoato sódico y fenilacetato sódico intravenoso consiguiendo la normalización de las cifras de amonio a las 12 horas

de iniciar el tratamiento. El diagnóstico fue confirmado por estudio genético presentando la mutación p.Gly122Val (c.365G>T) en homocigosis.

Evolutivamente se mantiene con dieta restringida en proteínas naturales y fenilbutirato oral. Tras 24 meses de seguimiento, no ha tenido episodios de descompensación graves y presenta un cociente de desarrollo del 85%.

5.2.2.2 Aciduria arginino-succínica

En nuestra unidad se recibió un paciente que a pesar de encontrarse asintomático presentaba en el cribado neonatal elevación de la citrulina (116 $\mu\text{mol/L}$) y ácido arginino-succínico (103 $\mu\text{mol/L}$) lo que sugería el diagnóstico de aciduria arginino-succínica. En el estudio enzimático se puso de manifiesto una incorporación muy disminuida de citrulina a las proteínas (33% respecto al control) y presenta las mutaciones p.R379C/p.R456Q. Tras un período de seguimiento de 26 meses con tratamiento dietético con aporte de 20 g de proteínas naturales al día el paciente se encuentra asintomático.

5.2.2.3 Déficit de arginasa

Un caso fue detectado tras presentar en el cribado neonatal elevación de arginina (196 $\mu\text{mol/L}$) en sangre y de orótico (693 mmol/mol de creatinina) en orina. El diagnóstico se confirmó por estudio enzimático (43% de actividad con respecto al control). Tras 44 meses de seguimiento se encuentra asintomático.

5.2.3 Acidurias orgánicas

En la Tabla 16 se recogen las características generales de los pacientes con acidurias orgánicas seguidos en nuestra unidad clínica.

	Nº casos	Prevalencia	Síntomas al dx	Marcadores bqcos alterados (rango medio)	Diálisis o depuración extrarrenal	Tmedio dx	CI/CD (media)	Situación actual
PA	2	1/105082	Si	C3(s):[11.5-14.6]µm C3/C2(o):[1.59-1.43] C3/C16(s):[7.41-5.33]µM	Si	8		Éxito
MMA (Mutase def)	2	1/105082	1:Si 1:No	Ac.metilmalónico(o): 874-4987 mmol/molcrea C3(s):5.2-13 µM C3/C2(s):0.68-0.73	1:Si 1.No	18	89	1:Éxito 1:LS
MMA (CblC)	1	1/210165	No	C3(s):10.1 µm Ac.metilmalónico(o):827mmol/molcrea Homocistina(o):57.3 mmol/molcrea	No	9	87	LS
GA-1	6	1/35027	No	Glutarilcarnitina(s):1.62µM [0.27-4.23] Glutarilcarnitina(o):52.9mmol/molcrea [14.5-132]	No	50	90	LS
3-MCC	4	1/52541	No	C5OH(s):1.89µM [0.55-5.3] 3OH ac.isovalérico(o):970mmol/molcrea [85-3521]	No	56	118	LS
HMG def	1	1/210165	No	C5OH(s):0.93 µM 3metilglutarilcarnitina(s):0.54 µM	No	97	95	CS

Tabla 16: Características de los pacientes con acidurias orgánicas. (s: sangre; o: orina; LS: libre de síntomas; CS: con síntomas)

5.2.3.1 Aciduria Propiónica

Durante el período de estudio se detectaron en el cribado valores elevados de propionilcarnitina y de los cocientes C3/C2 y C3/C16 en 2 pacientes (p.1: C3 11,5 µmol/LC3/C2 1,59 µmol/L y C3/C16 7,41 µmol/L y en p.2: C3 14,6 µmol/L C3/C21,43 µmol/L y C3/C16 5,33 µmol/L). Los dos pacientes fueron diagnosticados de forma neonatal severa de acidemia propiónica, ya que ambos presentaban en el momento de detectarse en el cribado neonatal síntomas clínicos severos precisando hemodiafiltración en el período neonatal.

Los dos fueron éxitos en el primer año de vida (a los 4 meses y un año respectivamente) en relación con descompensaciones metabólicas graves en el contexto de cuadros sépticos.

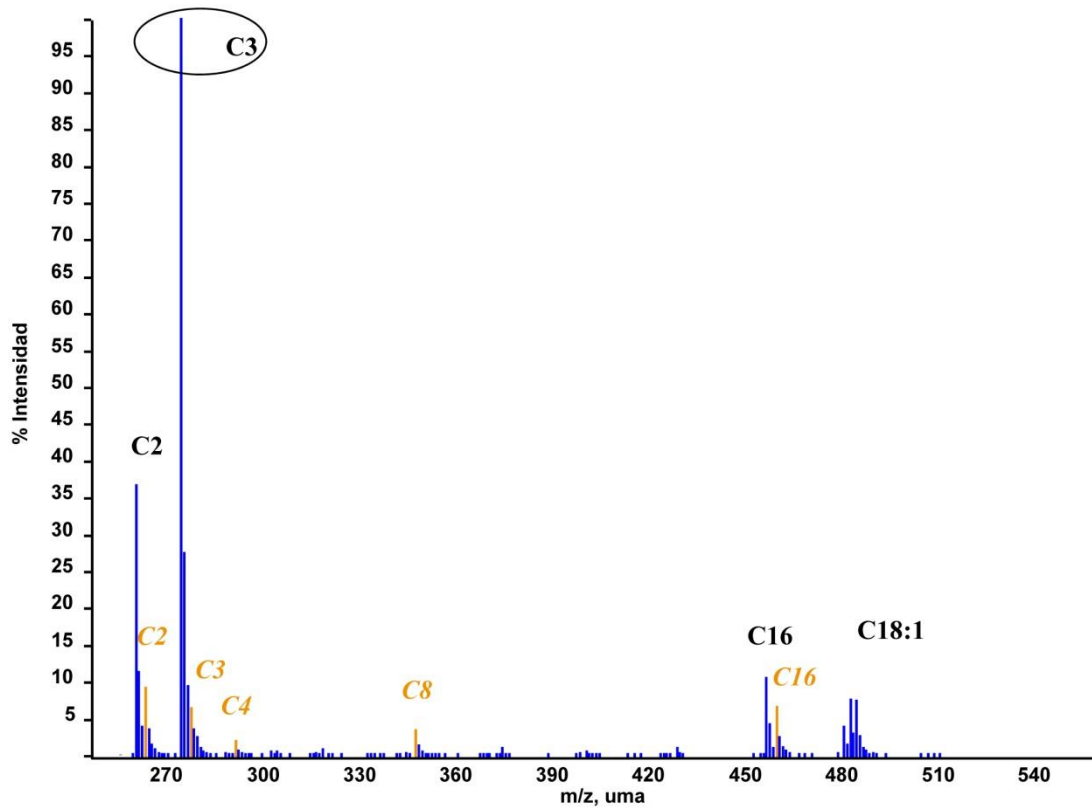


Figura 10: Perfil de la Aciduria Propiónica.

5.2.3.2 Aciduria metilmalónica

En nuestra Unidad de Enfermedades Congénitas del Metabolismo se recibieron durante el período de estudio tres pacientes con un resultado en el cribado compatible con aciduria metilmalónica.

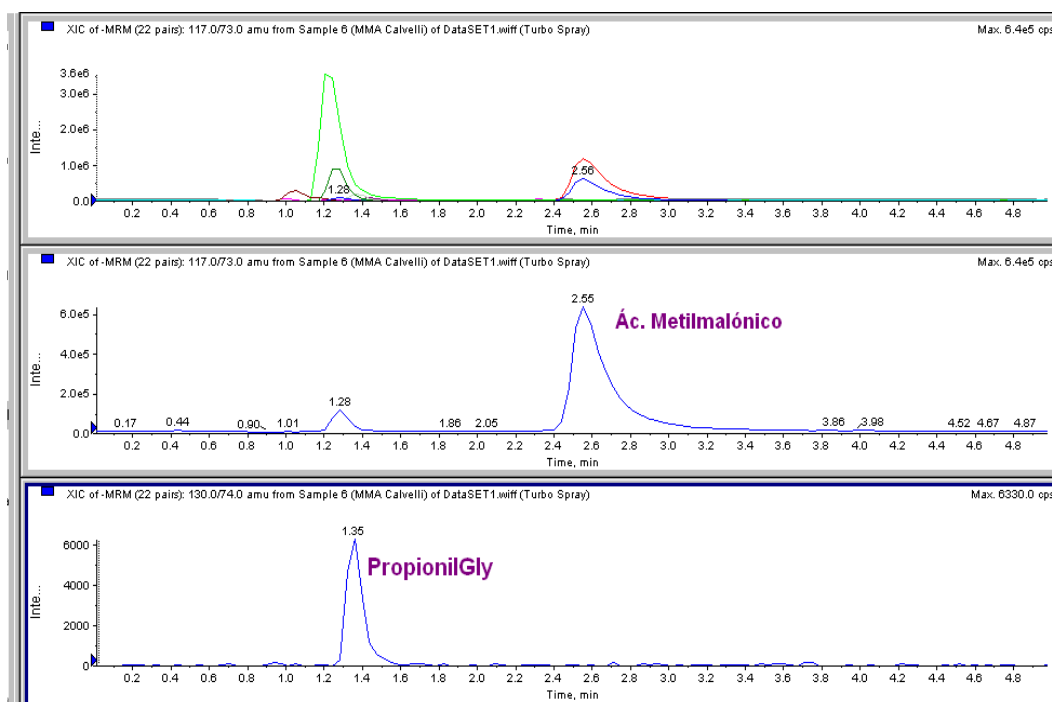


Figura 11: Perfil de la aciduria metilmalónica.

Dos de ellos presentaban en el cribado neonatal elevación de ácido metilmalónico (874-4987 mmol/molcrea), propionilcarnitina (5,2-13 μ M) y del cociente C3/C2 (0,68-0,73) y en ambos se confirmó el diagnóstico de aciduria metilmalónica clásica por estudio enzimático poniéndose de manifiesto una actividad indetectable de la metilmalonil CoA mutasa; esto supone una frecuencia de 1/105082 recién nacidos. Evolutivamente uno de los pacientes, que había precisado hemodiafiltración en el período neonatal, fue éxitus a los 2 meses de edad en relación con una descompensación metabólica severa motivada por una sepsis por estafilococo aureus; el otro paciente presenta macrocefalia aislada encontrándose por lo demás asintomático tras 89 meses de seguimiento. En este segundo paciente se llevó a cabo el estudio genético presentando las mutaciones p.R174P/p.N219Y.

El tercer paciente presentaba en las pruebas de cribado neonatal elevación en sangre del ác. metilmalónico (827 mmol/mol crea) y de propionilcarnitina (10,13 μ mol/L) y en orina elevación de homocistina (57,3 μ mol/mol crea) confirmándose posteriormente que se trata de una acidemia metilmalónica con

homocistinuria. Tras 9 meses de seguimiento el paciente se encuentra asintomático.

5.2.3.3 Aciduria glutárica tipo I

En nuestra comunidad se detectaron mediante cribado seis pacientes con aciduria glutárica tipo I lo que supone una frecuencia de esta enfermedad de 1/35027 recién nacidos. Ninguno era hijo de padres consanguíneos y todos son de origen caucásico.

Todos ellos presentaron en el cribado neonatal elevación de glutarilcarnitina (C5DC) en sangre (media 1,65 μ M; rango 0,27-4,23; punto de corte 0,13 μ M) y en orina (media: 49,7 mmol/mol creatinina; rango: 14,4-132 control < 1,9). También se objetivó elevación de ácido 3-hidroxiglutárico (3OH-GA) en todos los pacientes y del ácido glutárico (GA) en 4 de los seis pacientes (Tabla 17).

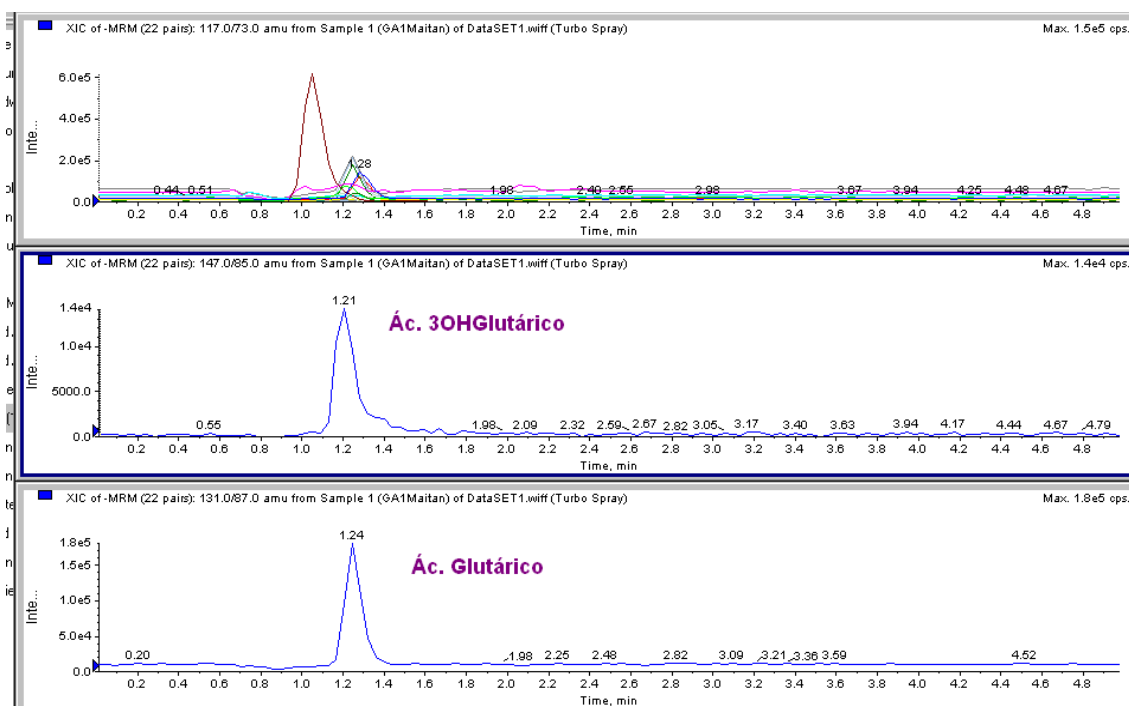


Figura 12: Perfil de la aciduria glutárica tipo I.

El diagnóstico se confirmó por estudio genético identificándose 7 mutaciones diferentes en el gen *GCDH*, siendo tres de ellas nuevas (p.R88H, p.Y398C, p.D220N), con alta frecuencia de homocigosis (3/6).

A su detección estaban asintomáticos aunque 4 de ellos mostraban macrocefalia y en las pruebas de imagen (RNM o ecografía) aumento del espacio subaracnoideo fronto-temporal; en tres de ellos persiste la macrocefalia pero sin presentar otros síntomas clínicos acompañantes, el cuarto paciente presenta un trastorno por déficit de atención. Recibieron tratamiento con suplementos de carnitina y riboflavina y dieta con restricción de lisina y triptófano. Durante los procesos infecciosos o situaciones de estrés fisiológico todos los pacientes recibieron tratamiento estricto retirando o disminuyendo el aporte proteico al 50% durante al menos 24 horas; dependiendo de la gravedad de la descompensación, proporcionando un elevado aporte energético a expensas de glucosa y lípidos y duplicando la dosis de carnitina. Durante el primer año todos precisaron elevado aporte energético para mantener un adecuado estado nutricional; los pacientes 5 y 6 precisaron nutrición enteral por SNG durante 5 y 4 meses respectivamente para lograr un adecuado incremento ponderal. En la Tabla 18 se recogen los datos relativos a los pacientes con aciduria glutárica tipo I.

Durante el seguimiento los niveles de triptófano (5-57 μM) y lisina (77-181 μM) se mantuvieron en rango apropiado, con lisina en algunas ocasiones en límite inferior. Los niveles de carnitina libre se mantuvieron por encima de 30 μM en todos los casos; los niveles de C5DC persistieron elevados en sangre en todos los pacientes excepto el n°3. En orina también se observó persistencia de la elevación de C5DC en todos los casos, presentando incremento de GA y 3OH-GA en 4 de ellos (pacientes n° 2, 3, 5 y 6). El paciente n°2 presentó un episodio de descompensación a los 2 años de edad con rechazo de la ingesta e hipoglucemia. Tras un tiempo medio de seguimiento de 56 meses todos se encuentran asintomáticos con un desarrollo motor y cognitivo normal; persiste macrocefalia en el paciente n°2 que fue diagnosticado de un déficit de atención a los 6 años de edad.

Paciente	1	2	3	4	5	6
Sexo	varón	mujer	varón	Mujer	mujer	mujer
Edad dx	11 días	19 días	15 días	20 días	11 días	18 días
Síntomas al dx	No	Macrocefalia	No	Macrocefalia	Macrocefalia	Macrocefalia
C5DC en sangre	0.48	0.58	0.53	0.27	3.86	4.23
C5DC en orina	43.1	17.5	15.9	14.5	132	68
3OH-GA en orina	238	1267	70	176.3	368	574
GA en orina	412	86	82	40	5160	3509
Estudio Molecular	p.R227p/ p.S305L	p.R88C/ p.Y398C	p.D220N/ p.R402W	p.R227P/ p.R227P	p.R88H/ p.R88H	p.R88H/ p.R88H
Cambio nucleótido	c.716G>C/ c.950C>T	c.298C>T/ c.1229A>G	c.694G>A c.1124C>T	c.716G>C/ c.716G>C	c.299G>A c.299G>A	c.299G>A c.299G>A
Imagen al dx (RNM/Eco)	N	A	N	A	A	A

Tabla 17: Características clínicas y bioquímicas de los pacientes con aciduria glutárica tipo I al diagnóstico. (N: normal; A: aumento del espacio subaracnoideo fronto-temporal)

Paciente	1	2	3	4	5	6
Edad actual	9 a 9m	9a 7m	3a6m	2a 2m	23m	16m
Síntomas	Asintomático	Déficit atención	Asintomático	Asintomático Macrocefalia	Asintomático Macrocefalia	Asintomático Macrocefalia
Tratamiento	L-carnitina	L-carnitina	L-carnitina	L-carnitina	L-carnitina B12	L-carnitina B12
Dieta	Restringida en lisina y triptófano	Restringida en lisina y triptófano	Restringida en lisina y triptófano	Restringida en lisina y triptófano	Restringida en lisina y triptófano	Restringida en lisina y triptófano
Lisina: media (rango)	72.8 (37-102)	85.6 (34.8-173)	40 (23.8-68.1)	81.6 (44.4-120)	89.1 (61.1-139)	58.9 (19.9-92)
Triptófano: media (rango)	41.9 (35.7-49.3)	48.5 (33.1-86.8)	46.7 (23.1-70.7)	49.2 (38.9-60.8)	41.5 (31.8-48.8)	45.4 (28.1-59.8)
Carnitina: media (rango)	41.4 (34.0-59.0)	50.4 (41.7-60.0)	66.1 (49.3-93.2)	60.6 (35.9-122)	65.2 (43.5-82.2)	74.8 (51.3-93.0)
C5DCsangre:media (rango)	0.20 (0.14-0.29)	0.80 (0.56-0.92)	0.10 (0.03-0.28)	0.20 (0-0.44)	5.5 (3.60-8.09)	3.5 (1.84-7.18)
Discapacidad Motora	No	No	No	No	No	No
Cociente Desarrollo	105	85	95	100	110	100
Lenguaje	Fluido	Fluido	Fluido	Fluido	Fluido	Fluido

Tabla 18: Seguimiento de los pacientes con diagnóstico de Aciduria Glutárica Tipo I.

5.2.3.4 Metilcrotonilglicinuria

En nuestra unidad se recibieron cuatro pacientes con sospecha de metilcrotonilglicinuria en el cribado neonatal; todos ellos estaban asintomáticos y presentaban niveles elevados de 3-hidroxiisovalerilcarnitina (C5OH) en sangre (media 1,89 μ M y un rango 0.55-5.3) y de 3OH isovalérico en orina (media 970 mmol/mol crea y un rango 85-3521). Se confirmó el diagnóstico por estudio enzimático demostrándose actividad deficiente de la 3 metilcrotonilCoAcarboxilasa (MCC) y se realizó también estudio genético; identificándose en tres de ellos los genotipos p.F546fs (c.1635dupT)/p.F546fs (c.1635dupT), p.A160T (c.478G>A)/p.I441T (c.1321T>C) en el gen MCCC2 y p.P464H(c.A1528C)/p.A456A en el MCCC1. El resultado del estudio genético del otro paciente está pendiente de resultado.

Con un tiempo medio de seguimiento de 56 meses presentan un buen control clínico, recibiendo dieta con moderada restricción proteica y suplementos de biotina y carnitina. Uno de los pacientes precisó ingreso en relación con una hipoglucemia cetósica y ese mismo paciente está diagnosticado de déficit de atención e hiperactividad.

Paciente	1	2	3	4
C5-OH	5.3	0.93	0.55	0.79
3OH isovalérico en orina	3521	189	87	85
Estudio genético	p.F546fs/p.F546fs c.1635dupT/c.1635dupT	Pendiente de resultado	p.A160T/p.I441T c.478G>A/c.1321T>C	p.P464H/p.A456A c.A1528C/--
Gen	MCCC2		MCCC2	MCCC1
Edad actual	1a 11m	5a 5m	2a 7m	6a 9m
Clínica	Asintomático	Déficit atención	Asintomático	Asintomático

Tabla 19: Características de los pacientes con metilcrotonilglicinuria.

Dos nuevos casos fueron detectados en este período al diagnosticar dos madres metilcrotonilglicinuria por las alteraciones observadas en el cribado de sus hijos.

5.2.3.5 Aciduria 3-OH-3-metilglutárica

Un único paciente fue diagnosticado por cribado de este error congénito del metabolismo lo que supone una frecuencia de 1/210165 recién nacidos. Presentaba elevación en sangre de 3-OH-isovalerilcarnitina (0,93 μM) y 3-metilglutarilcarnitina (0,54 μM) y en orina de los ácidos 3-OH-isovalérico, 3-metilglutárico, 3-OH-3-metilglutárico y 3-metilglutacónico. El estudio enzimático en cultivo de fibroblastos confirmó una actividad indetectable de la 3-OH-3-metilglutaril CoA Liasa y en el estudio molecular se confirmó la presencia en homocigosis de la mutación p.E37X (c.109A>T) en el gen *HMGCL*. Recibe tratamiento con dieta restringida en proteínas y grasas y suplementos de carnitina con buena evolución clínica. En la actualidad tiene 7 años y 5 meses y se encuentra asintomático presentando un único episodio de descompensación a los 4 años por gastroenteritis con hipoglucemia, insuficiencia renal aguda y elevación de las transaminasas que precisó ingreso en UCI pediátrica.

5.2.4 Defectos congénitos de la β -oxidación de los ácidos grasos

Como punta de partida la Tabla 20 recoge el resumen de las características de los pacientes con este tipo de trastornos que seguimos en nuestra unidad clínica.

	Nº casos	Prevalencia	Síntomas al dx	Marcadores bqcos alterados (rango medio)	Diálisis o depuración extrarrenal	Tmedio dx (meses)	CI/CD (rango)	Situación actual
MCAD	11	1/19106	No	C8(s):3.3µM[0.84-9.4] C8/C10(s):7.79µM[1.64-13.2]	No	41	87-142	10 LS 1 Éxitus
LCHAD	2	1/105082	No	C16OH(s):0.79,0.68 µM C18OH(s):1.4, 0.7µM C18-1OH(s):0.97, 0.51µM	No	69	95-107	LS
SCAD	4	1/52541	No	C4(s):1.57µM[1.1-2.16] Ac.etilmalónico(o):1783mmol/molcrea [367-2539]	No	53	100-112	LS
Déficit transportado carnitina	1	1/210165	No	Carnitina(s):2.3µM	No	39	103	LS

Tabla 20: Características de los pacientes con trastornos de la β-oxidación. (s: sangre; o: orina; LS: libre de síntomas)

5.2.4.1 Déficit de acil coenzima A deshidrogenasa de cadena media (MCADD)

Se identificaron mediante cribado neonatal 11 casos de este ECM lo que supone una frecuencia de 1/19106 recién nacidos; confirmándose que se trata del trastorno de la β -oxidación más frecuente. Se sospechó este diagnóstico en aquellos pacientes en los que se objetivó en el cribado una elevación específica de acilcarnitinas C6, C8, C10, C10:1 por encima del percentil 99 de la población de estudio. Los puntos de corte fueron $C8 > 0.52 \mu\text{M}$, $C6 > 0.43 \mu\text{M}$, $C10 > 0.50 \mu\text{M}$, $C10:1 < 0.33 \mu\text{M}$, $C8/C2 > 0.02 \mu\text{M}$, $C8/C10 > 1.85$. La octanoilcarnitina (C8) y los cocientes C8/C2 y C8/C10 se mostraron como los mejores marcadores para el diagnóstico de este trastorno, ya que, todos los pacientes presentaron elevación de C8 (valor medio de $3,22 \mu\text{mol/L}$), C8/C2 (valor medio $0,32 \mu\text{mol/L}$) y sólo uno no presentó elevación del cociente C8/C10 (valor medio de $7,79 \mu\text{mol/L}$) (Tabla 21).

Paciente	Nº1	Nº2	Nº3	Nº4	Nº5	Nº6	Nº7	Nº8	Nº9	Nº10	Nº11	Media±DS
Edad dx(días)	6	4	7	6	10	23	6	4	4	4	5	7.18±5.28
C6	0.44	0.28	0.34	0.25	0.65	0.63	0.46	1.67	0.93	1.24	0.90	0.70±0.42
C8	1.72	1.31	1.23	0.84	3.06	5.82	1.9	9.4	4.57	5.19	1.26	3.22±2.55
C10:1	0.61	0.27	0.20	0.33	0.66	0.47	0.22	0.97	0.55	0.56	0.39	0.47±0.21
C8/C2	0.22	0.12	0.11	0.06	0.34	0.67	0.08	0.74	0.55	0.6	0.12	0.32±0.25
C6/C2	0.06	0.03	0.03	0.01	0.07	0.05	0.02	0.13	0.11	0.14	0.1	0.06±0.04
C8/C10	7.53	6.62	7.33	1.64	7.94	10.3	11	13.2	11.4	6.38	2.45	7.79±3.42

Tabla 21: Valores de acilcarnitinas en MS/MS en pacientes con MCADD

Entre las características que presentan los pacientes cabe destacar que ocho de ellos eran caucásicos y tres de etnia gitana; todos ellos además eran recién nacidos a término con peso normal al nacimiento y se encontraban asintomáticos a su detección.

La mutación más frecuentemente encontrada fue p.K329E (c.985A>G) en el gen *ACADM* que se encontró en homocigosis en siete pacientes y en heterocigosis en otros tres; uno de los pacientes no presentó esta mutación. Se

encontraron 2 nuevas mutaciones p.D181G (c.542A>G) y p.W82S (c.245G>C). Los genotipos de nuestros pacientes se recogen en la Tabla 22.

Después del diagnóstico todos los pacientes recibieron tratamiento dietético; cinco de ellos precisaron además tratamiento con suplementos de L-carnitina por presentar niveles en plasma de carnitina por debajo de 12 μ M. Evolutivamente con un tiempo medio de seguimiento de 41 meses todos mostraron un desarrollo físico y neurológico normal y se mantuvieron asintomáticos. El paciente 6 murió a los 2 años de edad en otro hospital en relación con una infección respiratoria severa. Este paciente era homocigoto para la mutación más frecuente y al diagnóstico presentaba valores muy elevados de C8 y de los cocientes C8/C2 y C8/C10. Los otros pacientes no presentaron episodios de descompensación.

Todos los pacientes presentan cocientes de desarrollo normales; de hecho dos de ellos heterocigotos para la mutación más frecuente presentaron cocientes de desarrollo elevados (pacientes nº1 y 4).

Paciente	E. Molec.	Cambio Nucleó.	CD/CI	Estado actual
Nº1	p.K329E p.W82S	c.985A>G c.245G>C	142	LS
Nº2	p.K329E p.K329E	c.985A>G c.985A>G	104	LS
Nº3	p.K329E p.K329E	c.985A>G c.985A>G	98	LS
Nº4	p.K329E p.Y67H	c.985A>G c.199T>C	128	LS
Nº5	p.K329E p.K329E	c.985A>G c.985A>G	87	LS
Nº6	p.K329E p.K329E	c.985A>G c.985A>G	No	Éxitus
Nº7	p.K329E p.K329E	c.985A>G c.985A>G	105	LS
Nº8	p.K329E p.K329E	c.985A>G c.985A>G	90	LS
Nº9	p.K329E p.K329E	c.985A>G c.985A>G	88	LS
Nº10	p.G267R p.D181G	c.799G>A c.542A>G	92	LS
Nº11	p.K329E p.I416T	c.985A>G c.1247T>C	100	LS

Tabla 22: Estudio genético y seguimiento de los pacientes con MCADD

5.2.4.2 Déficit de 3-hidroxiacil coenzima A deshidrogenasa de cadena larga (LCHADD)

En nuestra unidad se realiza seguimiento de 2 pacientes con esta entidad cuya detección fue realizada a través del cribado neonatal; esto supone una frecuencia de 1/105082. En ambos casos se objetivó en el cribado elevación de C16OH (0.79; 0.68 μM); C18-1OH (0.97; 0.51 μM); C18OH (1.4; 0.7 μM). Ambos pacientes se encontraban asintomáticos en el momento del diagnóstico.

Se confirmó el diagnóstico mediante estudio molecular siendo ambos homocigotos para la misma mutación: p.Q510E en el gen *EOAG*.

Evolutivamente con un tiempo medio de seguimiento de 69 meses los dos se encuentran asintomáticos, aunque ambos precisaron hospitalizaciones por episodios de rabdomiolisis. Reciben tratamiento con restricción de triglicéridos de cadena larga al 10% de la energía total, suplementación con triglicéridos de cadena media (MCT) al 10-20 % de la energía total, aporte de ácidos grasos

esenciales linoleico y linolénico del 3-4% y 0,5-1%, respectivamente, del total calórico. Suplementos con riboflavina, coenzima Q10 y ácido docosahexaenoico.

5.2.4.3 Déficit de acil coenzima A deshidrogenasa de cadena corta (SCADD)

En la unidad se realiza seguimiento de cuatro pacientes diagnosticados de SCADD a través del cribado neonatal en el período de estudio. En el cribado neonatal se observó que presentaban elevación en sangre de butirilcarnitina (C4) (media 1.57 μ M, rango 1.1-2.16) y en orina de ác. etilmalónico (media 1783 mmol/mol creatinina, rango de 367-2539).

En todos ellos se realizó estudio molecular y todos son heterocigotos para distintas mutaciones en el gen *ACADS*. El paciente 1 con las mutaciones p.R171W (c.511C>T) y c.47-36X>G en el exón 1, no descrita previamente en la base de datos Human Genetic Mutation Database. El paciente 2 p.L88R (c.263T>G); p.Q311X (c.931C>T) y el polimorfismo p.625G>A; el paciente 3 p.M1T (c.2T>C) y p.R383C (c.1147 C>T) y el paciente 4 p.R22W (c.136C>T) y p.R306H (c.989G>A).

Evolutivamente tras un tiempo medio de seguimiento de 53 meses con tratamiento con dieta moderadamente restringida en grasas y suplementos de riboflavina todos ellos han presentado un adecuado desarrollo psicomotor y se encuentran asintomáticos en el momento actual.

5.2.4.4 Déficit del transportador de carnitina

En nuestra unidad se realizó este diagnóstico a través del cribado neonatal en un paciente lo que supone en una frecuencia de 1/210165 recién nacidos. La alteración que se objetivó en el cribado fueron unos niveles séricos anormalmente bajos de carnitina libre (C0) (2.3 μ M). Recibe tratamiento con suplementos con carnitina realizándose controles periódicos de ésta y con un tiempo de seguimiento de 5 años y 10 meses se encuentra asintomático.

5.2.5 Defectos del metabolismo de los hidratos de carbono

Se diagnosticaron de galactosemia en nuestro centro a través del cribado neonatal en el período de estudio un total de once pacientes lo que supone una frecuencia de 1/19105 recién nacidos; de estos cinco presentaron galactosemia clásica (1/42033), cuatro presentaron galactosemia por déficit de GALK (1/52541) y los otros dos galactosemia por déficit de GALE (1/105082)

5.2.5.1 Galactosemia clásica

Estos pacientes presentaron en el cribado elevación de galactosa 1P en sangre con un valor medio de 2.36 mM y rango 0.95-4 (punto de corte <0.5 mmol/L) con galactosa en orina normal. En el momento del diagnóstico cuatro de ellos se encontraban asintomáticos y el quinto presentaba una opacidad ocular incipiente que remitió tras tratamiento de base con la exclusión de la lactosa de la dieta.

En todos ellos se confirmó el diagnóstico midiendo la actividad enzimática de la galactosa 1 fosfato uridiltransferasa que en cuatro pacientes fue prácticamente indetectable y en el quinto muy deficiente.

En tres se realizó estudio molecular; dos de los pacientes son homocigotos para p.R148Q y el otro, que es el que presenta actividad enzimática residual, es heterocigoto para la mutación p.Q188R/alelo Duarte 2. En los otros dos está pendiente de realizar el estudio genético.

Con un tiempo medio de seguimiento de 34 meses los pacientes no presentan lesiones hepáticas, renales ni opacidad del cristalino. Todos ellos presentan un desarrollo neurológico normal pero dos de ellos presentan peso en el percentil 10.

5.2.5.2 Galactosemia por déficit de galactokinasa

En el cribado de estos pacientes se puso de manifiesto un aumento de galactosa en orina pero con galactosa 1P en sangre normal. En el momento de su detección tres estaban asintomáticos pero uno con distocia social y detección

tardía (a los 2 meses) presentaba ya catarata bilateral, que no remitió con dieta y precisó intervención. El estudio enzimático puso de manifiesto una actividad deficiente de la galactokinasa en todos ellos.

Reciben tratamiento con dieta sin lactosa y con un tiempo medio de seguimiento de 48 meses todos presentan un cociente de desarrollo normal y se encuentran asintomáticos.

5.2.5.3 Galactosemia por déficit de epimerasa

Los dos pacientes con este diagnóstico presentaron en el cribado elevación moderada de la galactosa 1P en sangre (media 1.39 mM) y de galactosa en orina. Ambos se encontraban asintomáticos en el momento del diagnóstico. El estudio enzimático puso de manifiesto una actividad deficiente de la UDP-galactosa 4-epimerasa.

Con un tiempo medio de seguimiento de 67 meses y una dieta libre pero sin abuso de lácteos ambos se mantienen asintomáticos.

5.2.6 Trastornos congénitos del metabolismo del glutatión

Controlamos un paciente diagnosticado de aciduria piroglutámica, lo que supone una frecuencia de 1 /210165 recién nacidos. A las 16 horas de vida ingresó en la Unidad Neonatal por anemia con ictericia generalizada (sin incompatibilidad Rh ni de grupo) y acidosis metabólica con elevación del anión GAP; presentaba además en la ecografía cerebral múltiples septos en los ventrículos laterales con calcificaciones lineales en el tálamo. El diagnóstico se orientó a la aciduria piroglutámica al objetivarse en el cribado neonatal niveles elevados en sangre de glutamato (1703 μM) y de ácido piroglutámico (300 μM) y niveles elevados en orina de oxiprolina.

El estudio de la actividad enzimática de la glutatión sintetasa presentaba en este paciente una actividad del 9% con respecto al control y presentó en homocigosis la mutación p.G374A en el exón 5 del gen de la glutatión sintetasa que se encuentra localizado en el cromosoma 20q11.2.

Desde el diagnóstico recibió tratamiento con bicarbonato a altas dosis, N-acetilcisteína, vitaminas C y E y ácido lipoico. Presentó varios episodios de descompensación en relación con procesos infecciosos y múltiples crisis hemolíticas tras las cuales precisó transfusión de concentrado de hematíes que últimamente se han espaciado más. Con un tiempo de seguimiento de 78 meses el paciente presenta síntomas clínicos relacionados con su enfermedad y un cociente de desarrollo bajo con una puntuación de 68.

5.2.7 Trastornos del metabolismo congénito de la biotina

En nuestra unidad se diagnosticaron durante el tiempo de estudio siete pacientes con déficit de biotinidasa; seis pacientes con un déficit parcial y uno con un déficit total.

Todos se encontraban asintomáticos a su detección. La actividad de biotinidasa fue indetectable en el paciente con deficiencia total y en los pacientes con deficiencia parcial la actividad media fue de 18,7% con un rango entre 13,6 y 25%.

En todo ellos se realizó estudio genético, siendo el genotipo más frecuente p.A171T;D444H/p.D444H, presente en cinco de los pacientes con déficit parcial. El paciente con déficit total es homocigoto para la mutación p.R211C (c.631C>T) (Tabla 23).

Paciente	Alelo1	Alelo2	A. enzimática	Edad
Nº1	p.A171T;D444H	p.D444H	19%	7 a 1 m
Nº2	p.A171T;D444H	p.D444H	24%	6 a 6 m
Nº3	p.A171T;D444H	p.D444H	13,6%	9 a 5m
Nº4	p.A171T;D444H	p.D444H	14%	5 a 7 m
Nº5	p.D444H	p.D444H;A171T	25%	8 a 3 m
Nº6	p.D444H	--	16,8%	7 a 3 m
Nº7	p.R211C	p.R211C	Indetectable	3 a 7 m

Tabla 23: Características de los pacientes con déficit de biotinidasa.

Todos los pacientes con déficit parcial presentan con un tiempo medio de seguimiento de 90 meses buena evolución clínica con tratamiento con biotina a 5mg/semana; el paciente 1 presentó crisis mioclónicas que cedieron tras la administración de biotina. El paciente con déficit total recibe 10 mg/día de biotina y también se encuentra asintomático.

5.2.8 Defectos de la biosíntesis del colesterol

Un paciente fue diagnosticado de aciduria mevalónica durante el período de estudio y es seguido en nuestra unidad; se trata de un varón hijo de padres no consanguíneos, con 2 hermanas sanas y con el antecedente de un feto muerto a las 31 semanas. Nuestro paciente nace a las 32 semanas de gestación mediante cesárea por crecimiento intrauterino retardado presentando un peso de 1385g y un Apgar de 9/10/10. En el período neonatal presenta fallo de medro, crisis febriles recurrentes con vómitos, hepatoesplenomegalia, linfadenopatía y marcada elevación de reactantes de fase aguda. En la exploración física a los 2 meses destaca prominencia frontal, orejas de implantación bajas, catarata bilateral y lenticono. En ese momento se realiza una segunda determinación para el cribado metabólico en la que se pone de manifiesto una marcada elevación de ácido mevalónico en orina (11600 mmol/ mol creatinina; rango normal <11 mmol/mol creatinina) que sugiere el diagnóstico; éste se confirma mediante estudio molecular encontrándose en el gen *MVK* la mutación en homocigosis p.Ile-268-Thr (c.803T>C). Datos adicionales sobre este paciente están recogidos en la publicación de *Pediatrics* que se adjunta (Case report 1).

Tras su diagnóstico recibió tratamiento con corticoides en las crisis febriles, antioxidantes, vitamina C y coenzima Q10 y precisó de forma ocasional nutrición enteral por sonda nasogástrica y transfusión de concentrado de hemáties. Dado la persistencia de crisis febriles se inició tratamiento con anakinra (antagonista del receptor de la interleukina-1) a una dosis de 1 mg/kg/día que se incrementó de forma progresiva hasta 8 mg/kg/día observando beneficios evidentes incluyendo mejor ganancia ponderal, desaparición de las crisis febriles y mejoría de la situación neurológica.

Tras un año de tratamiento con anakinra volvió de nuevo a presentar crisis febriles periódicas muy frecuentes (2-3/mes) y tras utilizar etanercept sin respuesta, se decidió tras consenso con la familia realizar trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos médula (realizado hace 2 semanas). El paciente presenta hipotonía axial marcada, retraso del desarrollo, atrofia cerebral y pérdida de agudeza visual siendo intervenido quirúrgicamente de cataratas. Presenta un cociente de desarrollo de 61%.

5.2.9 Defectos congénitos del transporte de los aminoácidos

Fueron diagnosticados de cistinuria clásica durante el período de estudio un total de 11 pacientes con un valor medio de cistina de 672 mg/g creatinina y un rango entre 460 y 1347. Todos ellos presentan buena evolución clínica con un tiempo medio de seguimiento de 114 meses y tratamiento con abundantes líquidos y en algunos casos alcalinización de la orina con citrato potásico. Ninguno de ellos ha presentado cálculos hasta el momento.

5.3 FALSOS POSITIVOS, ALTERACIONES TRANSITORIAS Y FALSOS NEGATIVOS

A pesar de que nuestro programa de cribado neonatal ha demostrado presentar elevada sensibilidad y especificidad se han detectado en el período de estudio 33 casos falsos positivos (15,7/100000 recién nacidos cribados) (Tabla 24). En estos casos el marcador bioquímico que se encontró elevado con mayor frecuencia sin que resultara ser patológico fue la citrulina que se detectó elevada en 13 pacientes en los que finalmente no se confirmó el diagnóstico. En todos ellos se excluyó el diagnóstico de citrulinemia realizando determinaciones de amonio, aminoácidos en plasma y orina y ácidos orgánicos en orina (incluido ácido orótico).

Los 10 casos de alteraciones transitorias (4,7/100000 recién nacidos cribados) incluyeron un paciente con elevación de citrulina (71 μ M), cinco pacientes con elevación de ácido metilmalónico en orina (media 113 mmol/mol creatinina); otros dos con elevación de 3OH isovalerilcarnitina por paso a través de la placenta de metabolitos maternos (estos resultados permitieron el diagnóstico de las madres de deficiencia de 3-metilcrotonil CoA carboxilasa que había pasado desapercibido) y otros dos presentaron elevación de octanoilcarnitina (C8:1,28 \pm 0,44 μ M) confirmándose posteriormente que ambos eran heterocigotos para el MCAD.

De los cuatro pacientes con resultados falsos negativos en el cribado, uno fue una tirosinemia tipo I que debutó con fallo hepático al mes de vida y que había presentado en la primera muestra del cribado un valor de tirosina de 162 μ M (punto de corte 175 μ M). Otro fue un paciente con Aciduria Glutárica tipo I bajo excretor, que tenía una concentración de glutarilcarnitina en sangre de 0.13 μ M en el cribado (punto de corte 0.18 μ M) y a los 8 meses de edad presentó un cuadro de encefalopatía que orientó al diagnóstico; al realizarse un análisis retrospectivo de glutarilcarnitina en orina en la muestra de cribado se objetivó un valor de 18.2 mmol/mol creatinina (punto de corte 2.48 mmol/mol creatinina). El tercer paciente es un déficit múltiple de acilCoA deshidrogenasa que debutó a los

13 días de vida con un cuadro de miocardiopatía y acidosis metabólica pero que posteriormente presentó evolución favorable y en el momento actual se encuentra asintomático. Finalmente el cuarto caso falso negativo fue una niña que presentó un cribado neonatal normal y retrospectivamente se diagnosticó de hiperfenilalaninemia benigna a los 6 años al tener en ese momento una hermana que se diagnosticó por cribado.

Nº casos	Marcadores bioquímicos alterados
4	3 Hidroxiisovalerilcarnitina (s): 2.57µM [0.81-7.39]
2	Butirilcarnitina (s): 1.11 µM [0.94-1.29]
3	Actividad biotinidasa (s): 0.12 Aus [0.09-0.16]
2	Metilmalonilcarnitina (s): 1.03 µM [0.88-1.18] Propionilcarnitina/acetilcarnitina(s): Normal
1	Galactosa1fosfato(s): 2.40 mM;galactosa (o): normal*
3	Galactosa1fosfato (s): normal;galactosa(o): elevada*
13	Citrulina (s): 106 µM [36-265]
1	Ácido piroglutámico(s): 212 µM;glutamato(s): 2719 µM
2	Carnitina libre (s): 5.4 µM
2	Tetradecanoilcarnitina (s): 1.66 µM [0.72-2.6] Tetradecenoilcarnitina (s): 1.46 µM [1.23-1.7] Tetradecadienoilcarnitina (s): 0.20 µM [0.14-0.26]

Tabla 24: Casos evaluados en nuestra unidad clínica por resultado anormal en el cribado (s: sangre; o:orina; Aus: unidades de absorbancia; *:resultado cualitativo).

6. DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

6.1 FRECUENCIA/PREVALENCIA DE LOS ECM DETECTADOS A TRAVÉS DEL CRIBADO NEONATAL

En la comunidad de Galicia la frecuencia de Errores Congénitos del Metabolismo detectados a través de nuestro programa de cribado ampliado es de 1/1534 recién nacidos y de 1/2060 recién nacidos si excluimos las hiperfenilalaninemias benignas. El programa incluye los trastornos recomendados para cribado por la American College of Medical Genetics³⁷, además de la cistinuria. La frecuencia con respecto a los trastornos más frecuentemente detectados en los programas de cribado (aminoacidopatías excepto hiperfenilalaninemias benignas, defectos de la β -oxidación de los ácidos grasos, acidurias orgánicas y defectos del ciclo de la urea) es de 1/2960 recién nacidos, frecuencia que es similar a la reportada en Portugal³⁸ (1/2396), Alemania³⁹ (1/2712) y Austria⁴⁰ (1/2855) y es algo mayor que la encontrada en otros lugares como Carolina del Norte¹⁸ (1/4300) o en otros países del entorno europeo²⁶ tales como Francia, Suiza o Irlanda. Además, la frecuencia global de 1/2060 recién nacidos es más alta que en otras poblaciones; ello es probablemente debido a la realización de análisis de orina de forma rutinaria⁴¹ en el programa de cribado, que permiten detectar entidades que no se expresan en las muestras de sangre como la cistinuria, la galactosemia por déficit de galactokinasa, la aciduria mevalónica y la alcaptonuria. De éstas, la cistinuria y la galactosemia se buscan de forma rutinaria en el cribado mientras que la alcaptonuria y la aciduria mevalónica se pueden detectar en el proceso de exclusión de otras entidades. La recogida rutinaria de la muestra de orina puede también facilitar la detección de otros ECM (con mínimos costes y escaso equipamiento) como sucede en los defectos del ciclo de la urea, acidurias orgánicas, galactosemia por déficit de epimerasa y aciduria piroglutámica.

Los ECM detectados en nuestra población con mayor frecuencia son las hiperfenilalaninemias, MCADD y las galactosemias.

En las hiperfenilalaninemias distinguimos dos grandes grupos: las hiperfenilalaninemias benignas con una frecuencia de 1/6005 y las PKU con una frecuencia de 1/12363. La incidencia global de la PKU recogida en la literatura es de aproximadamente 1/10000 recién nacidos⁴² aunque puede variar de 1/4000 a 1/100000 recién nacidos dependiendo de las regiones geográficas⁴³; así por ejemplo en zonas como Túnez presenta una elevada frecuencia con 1/7631 recién nacidos⁴⁴ y en otros lugares como Zheijang (China) la frecuencia es mucho menor con 1/25001 recién nacidos⁴⁵.

La segunda alteración más frecuentemente detectada es la MCADD, con una frecuencia de 1/19106 recién nacidos, lo cual era esperable ya que, desde la implantación del cribado ampliado el número de casos detectados se ha elevado considerablemente en los países donde se lleva a cabo dicho cribado^{39,40}. Si comparamos esta frecuencia con lo recogido en la literatura de la detección por cribado de esta entidad, esta tasa es mayor que la recogida por Kasper⁴⁰ y cols de 1/24900 recién nacidos pero menor que la recogida por otros autores como Vilarinho³⁸ o Harms³⁹ que refieren una frecuencia de 1/10000 recién nacidos.

Desde 1979 nuestro programa de cribado incluye de forma sistemática la determinación de alteraciones del metabolismo de carbohidratos mediante una prueba de dos etapas, en la cual las muestras de orina que han sido positivas para azúcares reductores son examinadas mediante cromatografía de capa fina⁴¹ y desde 2002 se emplea rutinariamente MS/MS para la determinación en sangre de hexosas monofosfato⁴⁶. La determinación de galactosa total (galactosa libre, galactosa 1P y UDP-galactosa) en muestras de sangre impregnada en papel es cara e innecesaria para la detección de galactosemias si la muestra de orina es recogida de forma sistemática. La proporción de recién nacidos detectados con galactosemia en nuestra comunidad es de 1/19106, esta frecuencia es elevada en comparación con la estimada para esta patología a nivel mundial que es de 1/50000 recién nacidos de raza caucásica. Debe tenerse en cuenta, que esta frecuencia puede estar subestimada al realizar diagnóstico tardío porque el cribado neonatal de galactosemia no se practica de modo universal y por la gran variabilidad en la expresión clínica de esta patología⁴⁷.

Dentro del grupo de las aminoacidopatías, debe destacarse así mismo la relativa elevada incidencia del déficit de MAT I/III (1/26271), detectado en el diagnóstico diferencial de homocistinuria, y de enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce. Esta última patología presenta en nuestro medio una frecuencia de 1/52541 recién nacidos, que es muy superior a la frecuencia mundial recogida de 1/85000 recién nacidos, aunque existen grupos étnicos con mayor incidencia^{48,49}. Con frecuencias mucho menores fueron detectados dos casos de tirosinemia tipo I (1/105082) y uno de homocistinuria clásica (1/210165). La frecuencia de tirosinemia es similar a la recogida en la literatura de 1/100000 recién nacidos⁵⁰ y también la de homocistinuria clásica basada en el cribado neonatal, ya que está recogida una frecuencia de 1/200000-300000 recién nacidos con variaciones entre los distintos países, así es más frecuente en lugares como Irlanda y Nueva Gales del Sur (Australia) donde es de 1/65000 recién nacidos y mucho menos frecuente en otros como Japón donde se estima una frecuencia de 1/900000 recién nacidos⁵¹.

La aciduria glutárica tipo I es la aciduria orgánica más frecuentemente detectada en nuestro medio, con una incidencia de 1/30023 recién nacidos (1/35027 recién nacidos a través del cribado) lo que representa una frecuencia mucho mayor de la recogida en la literatura, sean detectadas o no a través del cribado^{18,38,52}. El caso del paciente falso negativo con aciduria glutárica tipo I bajo excretor en el cribado en el 2003 (glutarilcarnitina en sangre en rango normal y ácido glutárico en orina < 100mmol/mol de creatinina) llevó a utilizar la glutarilcarnitina en orina como marcador desde entonces.

No se confirma en nuestro medio lo recogido en la literatura de que la metilcrotonilglicinuria sea la aciduria orgánica más frecuente⁵³, aunque si presenta una frecuencia significativa afectando a 1/52541 recién nacidos.

Detectamos en esta década tres pacientes con defectos del ciclo de la urea (una citrulinemia, una aciduria arginino-succínica y una deficiencia de arginasa) lo que supone una frecuencia global de 1/70055. Este hallazgo indica que se detectaron las 3 patologías del ciclo de la urea que es posible detectar al presentar

citrulina elevada a través del cribado. Sólo hallamos descritos previamente 6 casos de deficiencia de arginasa mediante cribado por MS/MS^{38,54}, el nuestro sería el séptimo caso.

Se detectaron asimismo 7 casos de déficit de biotinidasa; uno con deficiencia total (1/210165) y seis con deficiencia parcial (1/35027), lo que representa una incidencia combinada de 1/28563 recién nacidos. Ello supone más de dos veces la frecuencia combinada reflejada a nivel mundial por Wolf⁵⁵ que es de 1/60089 recién nacidos, sin embargo, si desglosamos los pacientes en aquellos que presentan una deficiencia total y los que presentan una deficiencia parcial se observan diferencias ya que en nuestro medio la deficiencia total presenta una frecuencia menor que la reflejada en este estudio de 1/112271 pero la de la deficiencia parcial es mucho mayor que la recogida de 1/129281 recién nacidos. La incidencia combinada observada en nuestro estudio es sin embargo similar a la observada en otros lugares como Hungría Occidental⁵⁶ donde se detecta deficiencia de biotinidasa en 1/20000 recién nacidos.

El cribado ampliado nos ha permitido por tanto conocer la prevalencia de las principales enfermedades congénitas del metabolismo intermediario en nuestra comunidad.

6.2 SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y VALOR PREDICTIVO DEL CRIBADO

La calidad y fiabilidad de nuestro programa de cribado neonatal se confirma con los elevados valores que presenta de sensibilidad (97,16%), especificidad (99,98%) y valor predictivo (76,11%). Debemos puntualizar que este valor predictivo, es considerablemente más elevado que el recogido en otros estudios, como el de Schulze⁵⁷ (58%), el de Vilarinho³⁸ (38%), el de Juan-Fita⁵⁸ (20,25%) o el de Huang⁵⁹ (2,10%); esto puede ser debido a que en nuestro centro se solicitan a menudo segundas muestras a los recién nacidos antes de remitirlos a la unidad clínica, lo que reduce el número de falsos positivos. También contribuye a este elevado valor predictivo el hecho de recoger de forma rutinaria la muestra de orina que permite completar la información obtenida en aquellos pacientes que presentan anomalías bioquímicas antes de remitirlos a la unidad clínica⁶⁰ (lo que reduce la tasa de falsos negativos y aumenta la certeza de los casos de alta sospecha diagnóstica).

Por otra parte, al igual que otros centros, cumplimos el protocolo de analizar de forma rutinaria una segunda muestra en aquellos niños que son prematuros o que reciben transfusiones o nutrición parenteral de forma prolongada^{61,62}.

La búsqueda de una mayor calidad del programa quedó reflejada entre otros aspectos en la disminución de resultados falsamente positivos por la elevación de citrulina, que se encontró elevada inicialmente en 13 pacientes sin que luego se confirmara dicha alteración, pero disminuyó considerablemente el envío a consulta de estos pacientes al incluir en los análisis de confirmación inicial de cribado la determinación de ácido orótico y ácido arginino-succínico⁶³.

También permitió mejorar el valor predictivo de nuestro programa de cribado la inclusión de glutarilcarnitina en orina^{64,65} gracias a lo cual es posible evitar que la gran mayoría de los pacientes con aciduria glutárica tipo I bajo excretores queden sin diagnóstico, como nos ocurrió en 2003 con un paciente, y

la determinación de succinilacetona en orina que facilita el diagnóstico de la tirosinemia⁶⁶ ya que la tirosina elevada es un marcador poco fiable en el período neonatal por la elevada incidencia de tirosinemia neonatal transitoria (0,2-10%), además pueden presentar en ocasiones valores en el límite superior de la normalidad.

En dos casos con elevación transitoria del marcador bioquímico C5OH en el cribado neonatal, que llevaron al diagnóstico en sus madres de metilcrotonilglicinuria; casos similares también fueron presentados por otros autores como Vilarinho³⁸ y Frazier¹⁸. Es por este motivo recomendable que se realice estudio de ácidos orgánicos y acilcarnitinas en las madres de estos niños.

En resumen, el hecho de realizar de forma rutinaria una muestra de orina conjuntamente con la de sangre permite ampliar de forma fácil y sencilla la información obtenida a través del cribado, mejorar la fiabilidad del mismo y así aumentar su valor predictivo positivo.

Nuestro programa de cribado ampliado presenta una elevada especificidad (99,98%); al igual que la observada en los programas recogidos en los estudios de Schulze⁵⁷ (99,95%), Juan-Fita⁵⁸ (99,9%) o Huang⁵⁹ (99,72%), es decir, en este sentido no existen diferencias significativas como sucedía con el valor predictivo. En la década recogida de nuestro programa de cribado se detectaron cuatro pacientes con resultados falsos negativos (0,001% de los pacientes cribados) entre los que se incluyen una tirosinemia tipo I que se diagnóstico al mes de vida por presentar un fallo hepático agudo, una aciduria glutárica tipo I en un paciente bajo excretor que debutó con un cuadro de encefalopatía severa y en el que se comprobó posteriormente que la determinación de glutarilcarnitina en orina al cribado estaba elevada, una deficiencia múltiple de acil-CoA deshidrogenasa que debutó a los 13 días de vida con un cuadro de miocardiopatía y acidosis metabólica severa cuyo diagnóstico se confirmó por medición de la flavoproteína transportadora de electrones en fibroblastos y un último caso de una paciente con hiperfenilalaninemia benigna que presentara en el cribado un valor de fenilalanina de 1,9 mg/dl y cociente de Phe/Tyr de 1,5 cuyo diagnóstico se hizo

al diagnosticarse su hermana en el cribado. Debemos considerar que con las modificaciones introducidas en el programa de cribado al añadir la determinación en la muestra de orina de succinilacetona y glutarilcarnitina los pacientes con tirosinemia tipo I y aciduria glutárica tipo I ya no hubieran pasado desapercibidos en el momento actual, con lo que los falsos negativos se reducirían a dos casos (0,0005% de los pacientes cribados).

6.3 SINTOMATOLOGÍA AL DIAGNÓSTICO E IMPACTO EN LA UNIDAD NEONATAL

El principal objetivo del cribado neonatal sistemático es la detección de los pacientes afectados cuando todavía se encuentran asintomáticos, permitiendo así un diagnóstico y un tratamiento precoz que sin ninguna duda va a mejorar la evolución y pronóstico a largo plazo de estos pacientes.

Así, muchos de los pacientes con patologías detectadas a través del cribado neonatal se benefician de forma clara de iniciar un tratamiento dietético y/o farmacológico de forma inmediata^{67,68,69,70}, y nuestros pacientes no fueron una excepción a este hecho. Este es el caso de fenilcetonuria, tirosinemia tipo 1, aciduria glutárica tipo 1, homocistinuria, trastornos β -oxidación de los ácidos grasos (MCAD, LCHAD), galactosemias y déficit total de biotinidasa.

En otras entidades puede parecer más controvertido la utilidad de un cribado precoz, que aunque no se busquen directamente entran en el diagnóstico diferencial de determinadas patologías, por ejemplo en la metilcrotonilglicinuria, déficit de MAT I/III, SCADD o la deficiencia parcial de biotinidasa dado que además en todas ellas la presentación clínica es muy variable habiendo incluso individuos que se encuentran asintomáticos^{71,72,73}. En nuestro estudio, un paciente con déficit parcial de biotinidasa presentó convulsiones mioclónicas que cedieron tras la administración de biotina, desde entonces todos nuestros pacientes, al igual que recomiendan otros autores, reciben 5 mg de biotina a la semana⁷⁴. Se plantean más dudas con respecto al tratamiento en el déficit de MAT I/III, el SCADD o la metilcrotonilglicinuria, que son usualmente condiciones benignas en las que como se refleja anteriormente los pacientes pueden encontrarse asintomáticos. Sin embargo, debe valorarse que niveles altos de metionina ($>1000\mu\text{M}$) pueden inhibir el transporte de otros aminoácidos neutros en el cerebro y causar efectos neurotóxicos⁷⁵. Además, Ficioglu y cols documentaron un paciente diagnosticado de metilcrotonilglicinuria por screening neonatal que sufrió descompensación metabólica aguda al abandonar su tratamiento de base⁷⁶, y por otra parte también conocemos que la prevención de hipoglucemia

siguiendo a la detección de SCADD por cribado ampliado previene consecuencias adversas⁷⁷. Son necesarios estudios a largo plazo para una adecuada optimización de los recursos en estas entidades y conocer cuál es su verdadera evolución clínica.

En algunos casos, sin embargo, a pesar de realizar el cribado neonatal los pacientes ya presentan síntomas en el momento de su detección, como sucede a veces en las formas graves con sintomatología tipo intoxicación, y así tuvo lugar en nuestros pacientes con acidurias orgánicas graves (propiónica, metilmalónica), las formas clásicas de la enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce, citrulinemia tipo I, aciduria mevalónica y aciduria piroglutámica. No obstante el cribado facilitó una más rápida detección, un diagnóstico más precoz y un tratamiento mejor orientado.

Las 2 formas clásicas de la enfermedad de orina con olor a jarabe de arce, se diagnosticaron ambas cuando el cribado se realizaba a partir del 5º día de vida y ya presentaban a su detección cuadros de encefalopatía aguda con concentraciones de leucina superiores a 2000 µmol/L. Por ello subrayamos la importancia al igual que otros autores de recoger las muestras del cribado por MS/MS de forma precoz al tercer día de vida, tras 48 horas de alimentación^{78,79}.

También presentaban síntomas en el momento de confirmarse el diagnóstico por cribado el paciente con citrulinemia tipo I, que había debutado al 2º día de vida con un cuadro de vómitos seguido de crisis comiciales y encefalopatía y el cribado facilitó una mayor rapidez en su tipificación diagnóstica, y el paciente con aciduria piroglutámica con anemia hemolítica y acidosis metabólica severa desde las 24 horas de vida. Así mismo, el paciente con aciduria mevalónica, que presentaba episodios febriles repetidos con elevación de reactantes y estancamiento ponderal, presentó en las segundas pruebas de cribado realizadas al 15 día de vida elevación en orina de ácido mevalónico que facilitó su detección.

Finalmente también presentaba síntomas clínicos de fallo hepático uno de los pacientes con tirosinemia tipo I que fue un falso negativo del cribado dado

que en aquel momento no se realizaba en nuestra comunidad succinilacetona en orina, que se incorporó al programa en el año 2008⁸⁰. Igualmente los otros 2 pacientes, detectados por la tirosina elevada, se les indicó inicialmente vigilancia y vitamina C; fue al persistir la tirosina elevada cuando acudieron a nuestra Unidad y en ese momento presentaban leve afectación hepática.

Estos trastornos metabólicos, aunque son raros individualmente, en su conjunto suponen un capítulo importante de la patología pediátrica y tienen repercusión en las unidades neonatales. Durante la década del estudio ingresaron en nuestra unidad neonatal 4370 pacientes de los cuales 38 fueron diagnosticados de ECM y de estos 22 precisaron cuidados intensivos. Muchos de ellos precisaron medidas de depuración extrarrenal y ventilación mecánica; siendo el grupo de trastornos más frecuentemente diagnosticado las aminoacidopatías. Este impacto en la unidad neonatal está recogido de forma minuciosa en el artículo de *Pediatrics International* que se adjunta.

La incidencia de ECM en nuestra unidad de cuidados intensivos neonatales durante el período de estudio fue de 1,59%; esta cifra es mayor que la reportada por Tu⁸¹ en China del 1,1% pero menor que la reportada por Jouvét⁸² del 2,2%. La menor incidencia con respecto al estudio de Jouvét probablemente se encuentre en relación con el hecho de que en Galicia desde el 2002 se realiza la muestra de cribado en el tercer día de vida lo que disminuye el número de pacientes que se encuentran sintomáticos en el momento del diagnóstico y permite realizar en más casos un tratamiento ambulatorio.

El tratamiento de estos pacientes que precisan cuidados intensivos incluye con frecuencia las terapias de depuración extrarrenal, de éstas, la más frecuentemente usada por su eficacia es la hemofiltración veno-venosa. En nuestro estudio 5 pacientes precisaron la aplicación de éstas técnicas; 3 precisaron hemofiltración veno-venosa (2 de ellos con el diagnóstico de aciduria propiónica y uno con el diagnóstico de aciduria metilmalónica) y 2 diálisis peritoneal (ambos se diagnosticaron de enfermedad de jarabe de arce). También con frecuencia estos pacientes presentan fallo respiratorio siendo preciso iniciar

soporte ventilatorio, 8 de los pacientes con ECM admitidos en nuestra unidad de cuidados intensivos precisaron este tipo de soporte. En algunas ocasiones el tratamiento farmacológico puede ser una alternativa a las terapias de depuración extrarrenal ya que en los neonatos pueden existir limitaciones técnicas para realizar diálisis que retrasen el inicio del tratamiento. De hecho en nuestro grupo de estudio, el paciente con citrulinemia tipo I tuvo una muy buena respuesta a tratamiento farmacológico con fenilacetato y benzoato sódico intravenoso, por lo que pese a haber ya previamente realizado canalización de la vía femoral, no fue necesario la hemofiltración veno-venosa, siendo el primer paciente de España documentado con este tratamiento precoz neonatal⁸³.

6.4 EVOLUCIÓN DE LOS PACIENTES CON ECM.

De los 137 pacientes diagnosticados durante el período de estudio fueron éxitos 4; esto supone una mortalidad de 2,92%, porcentaje similar al 3,1% observado por Frazier¹⁸ en un estudio donde se siguieron pacientes con trastornos metabólicos detectados a través de cribado con MS/MS durante 8 años. Sin embargo, existe una notoria diferencia con la mortalidad encontrada por Hoffmann⁸⁴ (36%) en un estudio en pacientes con acidurias orgánicas y trastornos de la β -oxidación que presentaron síntomas clínicos después de la primera semana de vida o con el estudio de Jouvét⁸² donde se recoge una mortalidad en pacientes con ECM que precisaron ingreso en una unidad de cuidados intensivos del 28,6%; esta diferencia se justifica probablemente por incluirse en estos dos últimos estudios pacientes que ya presentaban manifestaciones clínicas severas en el momento del diagnóstico. Esto subraya la importancia de realizar el cribado neonatal precozmente para disminuir la mortalidad en este grupo de pacientes. De los 4 pacientes que fallecieron, tres de ellos estaban diagnosticados de acidurias orgánicas (1 aciduria metilmalónica y 2 acidurias propiónicas) de presentación neonatal severa precisando, como ya mencionamos anteriormente, medidas de depuración extrarrenal al diagnóstico; todos fallecieron en relación con procesos infecciosos graves en el primer año de vida; a los 2, 4 y 12 meses. El cuarto paciente que falleció estaba diagnosticado de un trastorno de la β -oxidación de los ácidos grasos de cadena media que se mantenía asintomático con recomendaciones dietéticas encaminadas a evitar el ayuno prolongado y con alto aporte de hidratos de carbono de absorción lenta pero que a los 21 meses de vida presentó una descompensación metabólica secundaria a una infección respiratoria grave.

Evolutivamente todos los pacientes supervivientes (133), excepto dos, tienen un CD/CI \geq 85 después de una media de seguimiento de 54 meses.

De modo global todos los pacientes con hiperfenilalaninemia presentaron buena evolución. A aquellos que presentaban fenilcetonuria se les realizó evaluación del desarrollo psicomotor y cognitivo con un índice general cognitivo

y/o cociente de desarrollo de $103 \pm 15,2$. Sólo uno de los pacientes, pretérmino de 30 semanas, presentó un cociente de desarrollo en el límite inferior del rango normal (84%) y dos pacientes presentaron déficits neuropsicológicos menores a pesar de buen control dietético, siendo esto concordante con lo objetivado en otros estudios^{85,86,87,88}.

Es destacable, la gran variabilidad genética que presentaron nuestros pacientes al realizar el estudio genotípico de los pacientes con hiperfenilalaninemia en nuestra población de estudio; ya que encontramos 38 mutaciones distintas; siendo las más frecuentes IVS10-11G>A (9) R176L (8), R261Q (7) y que representan el 63,1% de las mutaciones encontradas. Desviat et al⁸⁹, describen el genotipo de los pacientes con hiperfenilalaninemia en España, indicando los más prevalentes, en las distintas áreas geográficas: IVS10-11G>A, I65T y V388M. En dicho estudio se objetivó que la IVS10-11G>A es la mutación más frecuente en el territorio nacional pero su distribución, no es homogénea. En Galicia constituye el 11,5%, en la Cuenca Mediterránea el 12,5% mientras que por ejemplo en Andalucía supone el 8,3% de la población. Otro dato de interés es que aunque en la mayoría de los pacientes se produce, como era previsible, la concordancia fenotipo-genotipo no siempre es así y de hecho 2 pacientes con el mismo genotipo (p.Y277D/p.L48S) con una actividad in vitro del 39%, fenotípicamente se comportan uno como una fenilcetonuria suave y el otro como una fenilcetonuria moderada. Esto concuerda con las teorías de Dipple⁹⁰ y Scriver⁹¹ que defienden que pueden influir múltiples factores en las variaciones fenotípicas de la fenilcetonuria, como las variaciones interindividuales de la absorción intestinal, el metabolismo hepático de la fenilalanina, el ratio de absorción de la fenilalanina en las proteínas, el gradiente de fenilalanina a través de la barrera hematoencefálica, la relación de las mutaciones con BH4, así como las interacciones del gen PHA con otros loci.

Otro aspecto relevante en relación con la fenilcetonuria es la introducción desde 2004, del test de sobrecarga con BH4 y posterior tratamiento en los responsivos. El 29,4% (5/17) de los pacientes con fenilcetonuria tuvieron respuesta positiva a este test y fueron tratados con BH4 con una dosis media \pm

10mg/kg/día (con BH4 Shircks Laboratories, Switzerland y desde 2009 con clorhidrato de sapropterina (Kuvan ®, Merck Serono, Switzerland)). Este tratamiento permitió que 3 de nuestros pacientes respondedores puedan realizar una dieta libre desde el período neonatal. Esto nos lleva a confirmar la utilidad y seguridad de realizar este test en el momento del diagnóstico en el período neonatal e iniciar el tratamiento si la respuesta al mismo es positiva, como hemos publicado recientemente⁹² y también lo recogen algunos autores en la literatura^{93,94}.

Los pacientes con Tirosinemia tipo 1 detectados por cribado presentan ambos una buena evolución con tratamiento con NTBC y dieta restringida en fenilalanina y tirosina; por el contrario el que se diagnosticó al mes de vida al debutar con un fallo hepático agudo fue éxitus coincidente con la realización de trasplante hepático en otro centro. Uno de los pacientes detectados a través del cribado presenta un cuadro de déficit de atención; este trastorno aparece con frecuencia reflejado en la literatura en estos pacientes, sin saber con seguridad si se podría relacionar con la enfermedad en si (niveles elevados de tirosina y disminuidos de fenilalanina) o con el tratamiento farmacológico⁹⁵. Si comparamos la evolución de nuestros pacientes con la presentada por otros grupos en la literatura observamos que al igual que en nuestro caso en el estudio chileno⁹⁶ todos los pacientes presentaron también buen control metabólico tras el inicio de tratamiento con NTBC y evolución a largo plazo variable dependiendo en gran medida de si el diagnóstico se realizó de forma precoz. Sin embargo en el estudio de Thimm⁹⁷ observan que un porcentaje elevado de pacientes con Tirosinemia tipo 1 y tratamiento a largo plazo con NTBC presentan un desarrollo intelectual anormal, en especial, en aquellos casos en los que se mantienen concentraciones elevadas de tirosina en plasma a pesar del tratamiento. En ningún caso se encontraron reacciones adversas al tratamiento. Así mismo queda patente en la literatura que los pacientes diagnosticados más tardíamente presentan un mayor riesgo de presentar alteraciones en el desarrollo cognitivo y de desarrollo a largo plazo de hepatocarcinoma a pesar de recibir tratamiento con NTBC^{98,99}.

Dentro de las alteraciones del metabolismo de los ácidos grasos los pacientes con MCADD y SCADD suelen presentar buen pronóstico e incluso algunos de ellos se mantendrían asintomáticos sin tratamiento, pero, dado que el ajuste dietético en éstos pacientes cuando se detectan por cribado y están asintomáticos es relativamente sencillo y permite en la mayoría de las ocasiones que no surjan descompensaciones con repercusión clínica^{100,101} se recomienda que se mantengan incluidos en los programas de cribado. En nuestro estudio, como era de esperar según lo recogido anteriormente, todos los pacientes con MCADD y SCADD se encuentran asintomáticos con un tiempo medio de seguimiento elevado (41 meses) y presentan cocientes de desarrollo en rango normal con excepción del paciente que fue éxitus en relación con una infección respiratoria grave ya mencionado.

Esta buena evolución clínica no se observó sin embargo en los 2 pacientes diagnosticados de LCHADD que presentaron varias descompensaciones metabólicas en los primeros años con rabdomiolisis y afectación hepática que requirieron ingreso, todas ellas en relación con procesos infecciosos y/o actividad física, pero ninguno de ellos presentó miocardiopatía ni otras alteraciones clínicas graves. En la literatura hasta el 50% de los pacientes diagnosticados de LCHADD por cribado presentan sintomatología clínica a su detección y son muy frecuentes los episodios de rabdomiolisis¹⁰².

Esto refuerza la importancia de realizar un diagnóstico precoz de estos defectos a través del cribado neonatal; aunque implique detectar también formas moderadas de la enfermedad¹⁰³.

Nuestros pacientes con trastornos congénitos del metabolismo de los hidratos de carbono, concretamente con galactosemia clásica, detectados a través del cribado presentan en el momento actual evolución favorable encontrándose libres de alteraciones neurológicas, hepáticas y renales. No obstante, sin embargo debemos vigilar la aparición de alteraciones tardías tales como alteraciones del habla, alteraciones motoras, disfunción ovárica, osteoporosis o retraso del

crecimiento y del desarrollo cognitivo que pueden verse en éstos pacientes a pesar de recibir tratamiento dietético correcto desde el período neonatal^{104,105}.

El tratamiento precoz permitió igualmente que tres de los cuatro pacientes con galactosemia por defecto de la galactokinasa no presentaran cataratas; el cuarto ya las presentaba en el momento de su detección al realizarse ésta en la quinta semana de vida por distocia social, precisando finalmente tratamiento quirúrgico.

En nuestro programa de cribado se incluye también la deficiencia de biotinidasa ya que se trata de una patología fácilmente detectable y que con un tratamiento sencillo como es la administración diaria de biotina oral previene un daño neurológico irreversible^{106,107}. Todos nuestros pacientes presentan una evolución satisfactoria con tratamiento, excepto como se mencionó anteriormente, uno de nuestros pacientes con un déficit parcial que presentó crisis mioclónicas que cedieron cuando se administró biotina por lo que al igual que otros autores recomendamos el tratamiento en todos los pacientes, tanto en el déficit total como parcial¹⁰⁸. Todos nuestros pacientes presentan una evolución satisfactoria con este tratamiento.

Buena evolución clínica presentaron también, como era de esperar, los pacientes con déficit de MAT I/III por tratarse de una entidad benigna⁷⁵. En relación con esta patología cabe resaltar que todos ellos presentan la mutación de fenotipo dominante p.R264H que además es la misma que presentaron los pacientes del estudio realizado en nuestro país vecino Portugal³⁸.

La evolución no fue tan favorable en otros pacientes con formas de presentación neonatal grave como en algunas acidurias orgánicas clásicas; tres de los cuales como ya se mencionó fallecieron; uno con aciduria metilmalónica y dos con aciduria propiónica. De los pacientes con aciduria metilmalónica que sobreviven uno presenta una epilepsia parcial y los otros se encuentran asintomáticos. También encontramos manifestaciones clínicas severas en la paciente con aciduria piroglutámica, que presenta un CI de 68, aunque los episodios de crisis hemolíticas han disminuido con la edad. En la literatura no

hay ningún caso publicado al respecto al no ser habitual la recogida de orina en las muestras de cribado. Con respecto a los pacientes con aciduria glutárica tipo I es reseñable la gran diferencia evolutiva entre los pacientes diagnosticados a través del cribado (5) y los diagnosticados tardíamente tras crisis encefalopática y que acudieron a nuestra unidad clínica en ese período, cuyo nacimiento fue previo a que se instaurara el cribado (3); ya que éstos últimos han presentado una evolución tórpida presentando 2 de ellos tetraparesia espástica en el momento actual frente a los asintomáticos por cribado. Estos hallazgos refuerzan lo descrito en la literatura de que en los pacientes con aciduria glutárica tipo I diagnosticados en el período neonatal la lesión del estriado que se encuentra como correlato neuropatológico puede prevenirse con el adecuado tratamiento metabólico; y que sin embargo, iniciar el tratamiento después de la aparición de los síntomas clínicos generalmente no previene la aparición de daño permanente^{109,110,111}.

El paciente con aciduria mevalónica presenta manifestaciones clínicas relevantes tales como: fallo de medro, retraso psicomotor, episodios febriles recurrentes y catarata que precisó ser intervenida. Tras el diagnóstico inició tratamiento con corticoides y antioxidantes (vitamina C, E y coenzima Q10) y ocasionalmente transfusión de concentrado de hematíes, a pesar de lo cual, persistieron episodios febriles por lo que se decidió iniciar tratamiento anakinra^{112, 113} (antagonista del receptor de la interleukina-I) alcanzando una dosis máxima de 8 mg/kg/día al que inicialmente presenta buena respuesta, aunque después de un año ésta disminuye y reaparecen las crisis febriles cada vez más continuadas (2-3 episodios al mes, con una duración media cada uno de cinco días). Tras posterior tratamiento con etanercept (inhibidor TNF- α) y de nuevo falta de respuesta, en el momento actual acaba de realizarse, en consenso con la familia, un transplante de progenitores hematopoyéticos, del que hay descritos muy pocos casos en la literatura con este tratamiento pero con buena respuesta, al volver a la normalidad los marcadores de inflamación postransplante y desaparecer las crisis^{114,115}.

Finalmente mencionar la evolución de los pacientes con defectos del ciclo de la urea. Se trata de tres pacientes; uno de ellos con citrulinemia tipo I presentó un cuadro encefalopático con hiperamonemia que precisó tratamiento de depuración urgente⁸³ y en el momento actual su situación clínica es bastante buena a pesar de precisar nutrición por sonda de gastrostomía y presentar un leve retraso del lenguaje. Los otros dos pacientes con aciduria arginino-succínica y déficit de arginasa se encontraban asintomáticos en el momento del diagnóstico y han presentado una evolución favorable con su tratamiento de base presentando ambos un cociente de desarrollo normal (86 y 98 respectivamente) y encontrándose en el momento actual asintomáticos.

7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. El cribado neonatal ampliado incluyendo la aplicación de la técnica por MS/MS ha supuesto una auténtica revolución en el estudio de las Enfermedades Congénitas del Metabolismo permitiendo realizar el diagnóstico de múltiples enfermedades con un único análisis y demostrando ser eficaz, eficiente y efectivo. Nuestro programa de Cribado presenta con una década de seguimiento una sensibilidad del 97,16 %, una especificidad 99,98 % y un valor predictivo positivo de 76,11 %.
2. Nuestra Unidad de Diagnóstico y Tratamiento de Enfermedades Congénitas del Metabolismo ha sido pionera en España en la aplicación de esta tecnología a la práctica clínica y en la actualidad el cribado se realiza de forma sistemática en nuestra comunidad al 99,9 % de la población.
3. La aplicación del cribado neonatal ampliado permite la detección precoz de Enfermedades Congénitas del Metabolismo Intermediario, y por tanto una intervención terapéutica precoz de estas entidades. Ello ha representado en nuestros pacientes una evolución significativamente más favorable tanto en términos de morbilidad como de mortalidad, ya que con una década de seguimiento el 95,5% de estos pacientes se encuentren asintomáticos; el 98,6% presenta un CI \geq 85% y la mortalidad fue del 2,9%.
4. La recogida sistemática de una muestra de orina conjuntamente con la de sangre permite complementar la información obtenida en el cribado y facilita la realización de pruebas de segundo nivel que disminuyen de manera significativa los resultados falsos negativos y la necesidad de segundas muestras. Esto se ha puesto de manifiesto en nuestro estudio al permitir realizar pruebas más específicas en entidades como la tirosinemia, la homocistinuria o la aciduria glutárica; además permitió la detección de aciduria mevalónica, alcaptonuria, cistinuria y galactosemia por déficit de galactokinasa, al aportar biomarcadores para estas entidades no disponibles a nivel sanguíneo.

5. El cribado neonatal ampliado nos ha permitido conocer la prevalencia real de los ECM en nuestro medio, así como mejorar nuestro conocimiento acerca de la historia natural de estos trastornos. La frecuencia de ECM detectados a través del cribado es de 1/1534 recién nacidos en nuestra Comunidad. Los más frecuentemente detectados fueron las hiperfenilalaninemias con una frecuencia de 1/4041 recién nacidos (1/6005 en las HPA y 1/12363 para la PKU), los trastornos de la β -oxidación de los ácidos grasos de cadena media, las cistinurias y las galactosemias con una frecuencia cada uno de ellos de 1/19106 recién nacidos.
6. Los pacientes diagnosticados de Enfermedades Congénitas del Metabolismo son pacientes complejos que en las formas clásicas precisan con cierta frecuencia ingreso en las unidades neonatales y cuidados específicos como la aplicación de terapias de depuración extrarrenal y/o soporte ventilatorio; de todos modos, debe tenerse en cuenta que con la detección precoz aumenta el número de pacientes que puede ser tratados ambulatoriamente. En la década analizada en este trabajo ingresaron en nuestra unidad neonatal 38 pacientes de los detectados a través del cribado, de los cuales 22 precisaron cuidados intensivos (de éstos 5 precisaron medidas de depuración extrarrenal y 8 precisaron soporte ventilatorio).
7. La aplicación del cribado neonatal ampliado nos ha permitido también detectar ECM en las madres a través de los resultados encontrados en los hijos. Esto se ha puesto de manifiesto en nuestro estudio al diagnosticar dos madres con metilcrotonilglicinuria tras presentar sus hijos una alteración transitoria en el cribado.

8. TRABAJOS PUBLICADOS



Evaluation and long-term follow-up of infants with inborn errors of metabolism identified in an expanded screening programme

M^a Luz Couce*, Daisy E. Castiñeiras, M^a Dolores Bóveda, Ana Baña, José A. Cocho, Agustín J. Iglesias, Cristobal Colón, José R. Alonso-Fernández, José M. Fraga

Unidad de Diagnóstico y Tratamiento de Enfermedades Metabólicas Congénitas, Departamento de Pediatría, Hospital Clínico Universitario de Santiago, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 July 2011
Received in revised form 15 September 2011
Accepted 16 September 2011
Available online 22 September 2011

Keywords:

Expanded newborn screening
Inborn errors of metabolism
Tandem mass spectrometry
Dried urine samples
Psychomotor Development Index

ABSTRACT

Newborn screening (NBS) by tandem mass spectrometry started in Galicia (Spain) in 2000. We analyse the results of screening and clinical follow-up of inborn errors of metabolism (IEM) detected during 10 years. Our programme basically includes the disorders recommended by the American College of Medical Genetics. Since 2002, blood and urine samples have been collected from every newborn on the 3rd day of life; before then, samples were collected between the 5th and 8th days. Newborns who show abnormal results are referred to the clinical unit for diagnosis and treatment.

In these 10 years, NBS has led directly to the identification of 137 IEM cases (one per 2060 newborns, if 35 cases of benign hyperphenylalaninemia are excluded). In addition, 33 false positive results and 10 cases of transitory elevation of biomarkers were identified (making the positive predictive rate 76.11%), and 4 false negative results. The use of urine samples contributed significantly to IEM detection in 44% of cases. Clinical symptoms appeared before positive screening results in nine patients (6.6%), four of them screened between days 5 and 8. The death rate was 2.92%; of the survivors, 95.5% were asymptomatic after a mean observation period of 54 months, and only two had an intellectual/psychomotor development score less than 85. Compared to other studies, a high incidence of type I glutaric aciduria was detected, one in 35,027 newborns.

This report highlights the benefits of urine sample collection during screening, and it is the first study on expanded newborn screening results in Spain.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Most cases of inborn errors of metabolism (IEMs) occurring with clinical symptoms result in serious consequences to the affected infants, including mild to severe irreversible mental retardation, lifelong disability, physical handicaps, coma, and early death [1]. These effects can be prevented or significantly reduced in many

cases if the IEM is diagnosed early: as a public health measure, newborn screening (NBS) has proved to be diagnostically effective and economically efficient.

As new technologies have emerged, public health authorities have incorporated them in expanded NBS programmes. In particular, tandem mass spectrometry (MS/MS) has gradually been adopted by many countries following the work of Millington et al. [2]. In a single 2–3 minute test, MS/MS can determine over 30 analytes in blood samples impregnated in paper, including amino acids and acylcarnitines. Consequently, it allows the detection of many inborn errors of intermediary metabolism, such as aminoacidopathies, galactosaemia (by measurement of hexose monophosphate [3]), organic acidurias, and disorders related to the oxidation of free fatty acids (FFAs). Otherwise, Pitt et al. reported the first study of urine profiling by MS/MS including a great range of metabolites [4]. Metabolic disorders for which other analytical techniques have been introduced include biotinidase deficiency (BD), screened for by a colorimetric assay [5].

Several studies have examined the long-term outcome and effects of expanded NBS for specific disorders, including classical organic acidurias [6], type I glutaric aciduria (GA-1) [7], maple syrup urine disease (MSUD) [8], and medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency (MCADD) [9,10]. Others, most of them very recent, have

Abbreviations: BD, biotinidase deficiency; CIT 1, type I citrullinaemia; FFA, free fatty acid; GA-1, type I glutaric aciduria; GALE, classical galactosaemia; GALK, galactokinase deficiency; HPA, hyperphenylalaninaemia; IEM, inborn errors of metabolism; IQ, Intellectual Quotient; MADD, multiple acyl CoA dehydrogenase deficiency; MAT I/III, methionine S adenosyltransferase deficiency; MCADD, medium chain acyl coenzyme A dehydrogenase deficiency; 3 MCC, 3 methylcrotonyl CoA carboxylase; MMA, methylmalonic aciduria; MSCA, McCarthy Scales of Psychomotor Skills; MS/MS, tandem mass spectrometry; MSUD, maple syrup urine disease; MVA, mevalonic aciduria; NBS, newborn screening; PROP, propionic aciduria; PDI, Psychomotor Development Index; PGA, pyroglutamic aciduria; SCADD, short chain acyl CoA dehydrogenase deficiency; TYR 1, type I tyrosinaemia; WISC R, Wechsler Intelligence Scale for Children Revised.

* Corresponding author at: Unidad de Diagnóstico y Tratamiento de Enfermedades Metabólicas Congénitas, Departamento de Pediatría, Hospital Clínico Universitario de Santiago, A Choupana s/n, 15706 Santiago de Compostela, Spain.

E-mail address: maria.luz.couce.pico@sergas.es (M.L. Couce).

investigated the overall impact of expanded NBS programmes, including long-term outcomes [1,11–14].

In Galicia (N.W. Spain), where NBS is performed on 99.9% of newborns and has long used both blood and urine samples, an expanded NBS programme incorporating MS/MS was begun in July 2000. In this paper we report follow-up findings of the patients that were referred to clinical unit for diagnosis and treatment from the NBS programme over a period of 10 years. Our programme has the peculiarity of receiving blood and urine samples simultaneously of all newborns. This is the first such study concerning an expanded screening programme in Spain.

2. Patients and methods

In our NBS programme, all newborns with abnormal NBS results suggestive of IEMs are referred for evaluation in the Diagnosis and Treatment of Congenital Metabolic Disease Unit of the University Clinical Hospital, Santiago de Compostela (henceforth “the clinical unit”), regardless of whether they present clinical symptoms. Included in this study were all those so referred from the NBS programme between July 1, 2000 and July 1, 2010. Only patients referred from the NBS programme were included.

2.1. Newborn screening

Samples of blood and urine impregnated on Whatman 903 paper were collected between the 5th and 8th days of life up to and including 2002, and on the 3rd day thereafter. (For readers unfamiliar with the use of urine for newborn screening, urine samples are collected by placing a paper slip between the diaper and the dry genitals – free of creams, talcs, etc. – and, once impregnated with urine, allowing it to dry at room temperature; care must be taken to avoid contamination by faeces.)

Amino acids, acylcarnitines and hexoses monophosphate in blood samples were determined by MS/MS in an Applied Biosystems Sciex API 2000 apparatus [3,15], and biotinidase activity by a colorimetric assay [5]. Urine samples were analysed for galactose [16] and cystine (by the Brand test) When a positive result was found, repeat or additional analyses were performed on the urine samples: MS/MS for amino acids, acylcarnitines, organic acids and acylglycines [4,17], and thin layer chromatography for galactose [16]. Thus all newborns were screened for amino acid disorders, fatty acid disorders, organic acidurias, galactosaemia, and BD (hypothyroidism and cystic fibrosis were also screened for, but are not the object of this study). Percentiles of MS/MS-measured analyte concentrations in the blood of healthy and diseased newborns were periodically reported to the Region 4 Genetics Collaborative Project [18] achieving clinical validation of our cutoffs.

If the results of the above analyses were clearly aberrant and suggestive of a severe disorder, the patient was immediately referred to the clinical unit. If the results lay outside the reference range but were not so aberrant as to constitute clear proof of severe disease, a second sample was requested by the NBS laboratory; if this second sample also tested positive, the patient was referred to the clinical unit.

2.2. Diagnosis and follow-up

For the present study the following variables concerning the situation of each patient at diagnosis were analysed: presence or absence of clinical symptoms, biochemical markers suggesting diagnosis, diagnosis, diagnosis confirmation methods, and whether dialysis techniques or other detoxification measures were employed. The variables considered in regard to the patient's situation at follow-up examinations were age, the use of dietary and/or pharmacological treatment, follow-up time, and progress.

Cases in which biochemical markers were abnormal at NBS but normal upon diagnostic testing were considered as false positives. Cases in which biochemical markers remained altered at first post-NBS evaluation but later became normal spontaneously were considered transitory.

The Psychomotor Development Index (PDI) or Intellectual Quotient (IQ) of survivors were evaluated using the Brunet Lézine Scale for infants, the McCarthy Scales of Psychomotor Skills (MSCA) for preschool children, and the revised Wechsler Intelligence Scale for Children (WISC-R) for children over the age of 6 years. PDIs and IQs above 85 were considered normal.

The study was approved by our hospital's ethics committee.

3. Results

In Galicia, NBS programme is carried out in 99.9% of all newborns; this represents 4.44% coverage for newborns in Spain. During the study period we identified 137 cases of IEM as a direct result of screening 210,165 newborns, i.e. one case per 2060 newborns if the 35 cases of benign HPA are ignored. For each IEM detected, Table 1 lists the proportion of newborns in which it was detected together with data on the corresponding biochemical marker and on the patients' situation at diagnosis and at the last or latest follow-up examination.

The IEMs detected most often as the result of screening were the hyperphenylalaninaemias (benign HPA, 1/6005; PKU, 1/12,363), followed by MCADD, cystinuria and galactosaemia (comprising GALE, GALK and galactose-4 epimerase deficiency) (1/19,106 in each case). As we have reported previously [19], methionine S-adenosyltransferase (MAT I/III) deficiency was also detected relatively often (1/26,271 newborns), in all cases in the course of differential diagnosis for suspected homocystinuria. The cases of alkaptouria and mevalonic aciduria (MVA), which are not regularly screened for by NBS programmes, were likewise detected in the course of differential diagnosis for other entities using urine tests. The most frequently diagnosed organic aciduria was GA-1 (1/35,027). In 44% of the 137 cases (all except the cases of HPA, PKU, MSUD, BD, and FFA disorders other than short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (SCADD)), urinary biochemical markers were of significant value in enabling or completing positive detection. Except for cystinuria, diagnoses were confirmed by enzyme and/or molecular studies (in one case of SCADD these results are currently pending).

Clinical symptoms were already shown at screening time by nine patients (6.6%), four of whom (two with MSUD, one with PROP and one with MMA) required extracorporeal removal therapy at this time. Three of these latter four cases occurred before 2003, when screening samples were collected at age 5–8 days; these three, and a further case of PROP (likewise pre-2003), were diagnosed at screening time. In the rest of the nine cases, the screening results were not conclusive but nevertheless expedited diagnosis.

Of the 137 IEM patients, four (2.9%) had died by the time the study data were analysed. Three of these four had severe infantile-onset organic acidurias (one MMA and two PROP), requiring extracorporeal removal therapy at diagnosis; these three died from acute infections at the ages of 2, 4 and 12 months. The fourth deceased patient, a case of MCADD, had remained asymptomatic thanks to dietary treatment until an acute respiratory infection caused metabolic decompensation and death.

At the time of data analysis, after a mean observation time of 54 months, 127 of the surviving 133 patients (95.5%) remained asymptomatic. Only two, both of whom already showed symptoms at diagnosis, had PDI/IQs below 85. Dietary and/or pharmacological treatment was being received by 89 of the 102 patients with IEMs other than benign HPA (87%).

According to the criteria specified in the Patients and methods section, there were 33 cases of false positive NBS results (Table 2)

Table 1

Characteristics of 137 IEM cases detected through NBS of 210,165 newborns and followed up in a metabolic disorders unit.

Diagnosis	No. of subjects	Prevalence (live births)	CS at diagnosis	Abnormal biochemical markers (median [range]) (NBS results)	Dialysis therapy or other detoxification measures	Follow-up mean (months)	PDI/IQ (mean)	Present status
<i>Amino acid disorders</i>								
Benign HPA	35	1/6005	No	Phe (b): 200 μ M [150–306] Phe/Tyr: 2.4 [1.2–5.8]	No	50	109	FS
PKU	17	1/12,363	No	Phe (b): 608 μ M [188–1418] Phe/Tyr: 9.1 [4.0–22.1]	No	61	103	FS
TYR I	2	1/105,082	Yes	Tyr (b): 662, 729 μ M	No	99	89	FS
HCY	1	1/210,165	No	Met (b): 59 μ M Hcy (u): 22 mmol/mol crea	No	70	104	FS
MAT def	8	1/26,271	No	Met (b): 124 μ M [50–341]	No	53	95	FS
MSUD	4	1/52,541	3: Yes 1: No	XLeu (Leu+Ile) (b): 1484 μ M [514–3367] Val (b): 410 μ M [244–552]	2/4	77	101	FS
Alkaptonuria	2	1/105,082	No	Homogentisic acid (u): 300, 7000 mol/mol crea	No	30	108	FS
<i>Urea cycle disorders</i>								
CIT I	1	1/210,165	Yes	Citrulline (b): 1096 μ M Orotic acid (u): 80 mmol/mol crea	Yes	24	85	CS
ASL def	1	1/210,165	No	Citrulline (b): 62 μ M arginin succinic acid (u) elevated	No	26	86	FS
AG def	1	1/210,165	No	Arginine (b): 35 μ M Orotic acid (u): 639 mmol/mol crea	No	44	98	FS
<i>Organic acidurias</i>								
PROP	2	1/105,082	Yes	C3 (b): [11.5–14.6] μ M C3/C2 (b): [1.59–1.43] C3/C16 (b): [7.41–5.33] μ M	Yes	8	n.d.	Exitus
MMA (mutase def.)	2	1/105,082	1: Yes 1: No	Methylmalonic acid (u): 874–4987 mmol/mol crea C3 (b): 5.2–13 μ M C3/C2 (b): 0.68–0.73	1: Yes 1: No	18	89	1 Exitus 1 FS
MMA (Cbl C)	1	1/210,165	No	C3(b): 10.1 μ M; Methylmalonic acid(u): 827 mmol/mol crea Homocystine (u): 57.3 mmol/mol crea	No	9	n.d.	FS
GA-1	6	1/35,027	No	Glutaryl carnitine (b): 1.62 μ M [0.27–4.23] Glutaryl carnitine (u): 52.9 mmol/mol crea [14.5–132]	No	50	90	FS
3MCC def	4	1/52,541	No	C5OH (b): 1.89 μ M [0.55–5.3] 3OH isovaleric acid (u): 970 mmol/mol crea [85–3521]	No	56	118	FS
HMG def	1	1/210,165	No	C5OH (b): 0.93 μ M 3methylglutaryl carnitine (b): 0.54 μ M	No	97	95	CS
<i>Fatty acid disorders</i>								
MCAD def	11	1/19,106	No	C8 (b): 3.3 μ M [0.84–9.4] C8/C10 (b): 7.79 μ M [1.64–13.2]	No	41	109	10 FS 1 Exitus
LCHAD def	2	1/105,082	No	C16OH (b): 0.79, 0.68 μ M C18-10H (b): 0.97, 0.51 μ M C18OH (b): 1.4, 0.7 μ M	No	69	101	CS
SCAD def	4	1/52,541	No	C4 (b): 1.57 μ M [1.1–2.16] Ethylmalonic acid (u): 1783 mmol/mol crea [367–2539]	No	53	107	FS
CTD	1	1/210,165	No	Carnitine (b): 2.3 μ M	No			FS
<i>Galactosemias</i>								
GALE	5	1/42,033	No	Galactose 1P (b): 2.36 mM [0.95–4] Elevated galactose (u)	No	34	91	FS
GALK	4	1/52,541	No	Galactose 1P (b): N Elevated galactose (u)	No	48	99	FS
GALED	2	1/105,082	No	Galactose 1P: 1.39 mM Elevated galactose (u)	No	67	n.d.	FS
<i>Disorders of glutathione metabolism</i>								
PGA	1	1/210,165	Yes	Pyroglutamic acid (b): 300 μ M Glutamate (b): 1703 μ M Oxoproline (u) \uparrow	Yes	78	68	CS
<i>Disorders of biotin metabolism</i>								
BD	Total: 1 Partial: 6	1/210,165 1/35,027	No	Biotinidase activity: Total : not detectable Partial : 18.7% [13.6–25]	No	90	115	FS
<i>Disorders of cholesterol metabolism</i>								
MVA	1	1/210,165	Yes	Mevalonic acid (u): 11,600 mmol/mol crea	No	27	58	CS
<i>Transport defects of amino acids</i>								
Cystinuria	11	1/19,106	No	Cystine (u): 672 mg/g creat [460–1347]	No	114	n.d.	FS

Table 2
Characteristics of 33 cases of false positive NBS results.

No. of cases	Abnormal biochemical marker	Cutoff ^a
4	3 Hydroxyisovalerylcarnitine (b): 2.57 μ M [0.81–7.39]	0.46 μ M
2	Butyrylcarnitine (b): 1.11 μ M [0.94–1.29]	0.94 μ M
3	Biotinidase activity (b): 0.12 Aus [0.09–0.16]	0.20 Aus
2	Methylmalonylcarnitine (b): 1.03 μ M [0.88–1.18]	0.7 μ M
	Propionylcarnitine/acetylcarnitine (b): Normal	0.2
1	Galactose1phosphate (b): 2.40 mM; galactose (u): normal ^b	0.7 mM
3	Galactose1phosphate (b): normal; galactose (u): elevated ^b	0.7 mM
13	Citrulline (b): 106 μ M [36–265]	31 μ M
1	Pyroglutamic acid (b): 212 μ M; glutamate (b): 2719 μ M	65 μ M; 703 μ M
2	Carnitine (free) (b): 5.4 μ M	9.5 μ M
2	Tetradecanoylcarnitine (b): 1.66 μ M [0.72–2.6]	0.65 μ M
	Tetradecenoylcarnitine (b): 1.46 μ M [1.23–1.7]	0.38 μ M
	Tetradecadienoylcarnitine (b): 0.20 μ M [0.14–0.26]	0.11 μ M

b: blood; u:urine; Aus: absorbance units.

^a As of June 2010; cutoffs are re-evaluated every 6 months.

^b Qualitative findings.

and 10 cases of transitory elevation of biochemical markers. Four cases of false negative results were also identified in the course of time. Thus, when all 137 cases identified as a direct result of NBS are counted as true positive results, and the 10 transitory elevations as false positives, the sensitivity of our NBS protocol for IEM was 97.16%, its specificity was 99.98%, and its positive predictive value was 76.11%.

The biochemical marker for which elevated values were most often not pathological was citrulline (Cit), with 13 false positives and one transitory elevation (71 μ M) among the 16 cases of elevation. In the 13 false positive cases, citrullinaemia was ruled out by tests that included determination of ammonium, amino acids in plasma and urine, and urinary organic acids (including orotic acid). In all, 10 cases of transitory biomarker elevation were found: the Cit case already noted; five concerning methylmalonic acid in urine (mean 113 mmol/mol creatinine); two concerning elevation of 3OH isovalerylcarnitine (C5OH) due to placental transfer of maternal metabolites (these results led to diagnoses of previously undetected 3-methylcrotonyl CoA carboxylase (3-MCC) deficiency in the mothers); and two concerning octanoylcarnitine (C8; $1.28 \pm 0.44 \mu$ M) in patients who proved to be heterozygous for MCADD. Persistent elevated butyrylcarnitine (C4(s)) was detected in five cases (mean 1.62 μ M, range 1.0–2.6 μ M), in none of which was any other alteration observed (in particular, urinary ethylmalonic acid concentrations were normal).

Of the four patients with false negative screening results, one with type I tyrosinaemia (TYR 1) had a tyrosine (Tyr) concentration of 162 μ M at screening time (cutoff 175 μ M); the patient was identified following acute liver failure at age 1 month. Another was a low-excreting GA-1 patient with a blood glutarylcarnitine concentration of 0.13 μ M at screening time (99.9th percentile 0.18 μ M); clinical onset occurred with acute encephalopathy at age 8 months, when retrospective determination of glutarylcarnitine in the urine screening sample found a concentration of 18.2 mmol/mol creatinine (99.9th percentile 2.48 mmol/mol creatinine). A third, with multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MADD), was admitted to

hospital at age 13 days with cardiomyopathy and acute metabolic acidosis. The fourth patient received a diagnosis of benign HPA at age 6 years after a newborn sister screened positive for this IEM; by then the older sibling's phenylalanine (Phe) concentration was 315 μ M (Phe/Tyr ratio 4.2), whereas the Phe concentration observed at screening was 141 μ M (the then current Phe cutoff having been 150 μ M) and the Phe/Tyr ratio 1.6 (then current cutoff 2.0).

4. Discussion

In our community, IEMs other than benign HPA, have been diagnosed in 1/2060 newborns as a direct result of screening by our current NBS programme, which basically seeks the abnormalities for which screening is recommended by the American College of Medical Genetics [20], plus cystinuria and GALK. The metabolic disorders most commonly screened for (amino acid disorders other than benign HPA, fatty acid disorders, organic acidurias and urea cycle disorders) were detected through NBS in 1/2960 newborns (71/137), a rate that is similar to those reported for Portugal (1/2396) [12], Germany (1/2712 without counting hypothyroidism and adrenogenital syndrome) [21] and Austria (1/2855) [22], and is higher than in North Carolina (1/4300) [23]. However, the overall rate of 1/2060 is higher than in other populations. This seems likely to be due to the use of urine tests, which enable detection of nosological entities that are not biochemically expressed in the blood, such as cystinuria, GALK, MVA and alkaptonuria. Of these, cystinuria and GALK are direct targets of our NBS programme, while the detection of MVA and alkaptonuria in patients whose blood had shown elevated tyrosine was accelerated by having the routinely collected newborn urine samples already to hand. Other conditions, the diagnosis of which can be similarly facilitated through routine newborn urine sample collection (and at minimal cost in fungibles and fixed assets), include urea cycle disorders, organic acidurias, GALE and PGA.

The case of the low-excreting GA-1 patient who in 2003 provided false negative NBS samples (blood glutarylcarnitine within the normal range, urinary glutaric acid < 100 mmol/mol creatinine [24]) led to our using urinary glutarylcarnitine as our biomarker of GA-1 thereafter. In these 10 years, GA-1 has had an incidence of 1/30,023 and has been detected by NBS in 1/35,027 newborns, both of which rates are much higher than those reported in the literature, whether detected through NBS or not [12,21,23,25].

As might be expected, MCADD was one of the three conditions with the second highest incidence, 1/19,106. This rate is somewhat higher than the 1/24,900 reported for MCADD by Kasper et al. [22], but is lower than the 1/10,000 mentioned by other authors [12,21,26,27].

The three cases of urea cycle disorders that were detected (one case each of CIT 1, argininosuccinic aciduria and arginase deficiency) make a total incidence of 1/70,055. We have found only six previous reports of arginase deficiency diagnosed through MS/MS-based screening programmes [12,28].

Since 1979 our NBS programme has sought disorders of carbohydrate metabolism by means of a two-stage test in which urine samples that have tested positive for reducing substances are examined by thin-layer chromatography [16,29] and since 2002 uses routinely MS/MS for determination of blood hexose monophosphate [3];

Notes to Table 1:

CS: clinical symptoms; (b): dried blood sample; (u): urine; n.d.: not done; PDI/IQ: Psychomotor Development Index/Intellectual Quotient; FS: free of symptoms; HPA: benign hyperphenylalaninaemia; PKU: phenylketonuria; TYR 1: tyrosinaemia type I; HCY: homocystinuria (CBS def.); MAT I/III def: methionine S-adenosyltransferase deficiency; MSUD: maple syrup urine disease; CIT 1: citrullinaemia type I; ASL def: argininosuccinate lyase deficiency; ARG def: arginase deficiency; PROP: propionic aciduria; MMA: methylmalonic aciduria; GA-1: glutaric aciduria type I; 3-MCC def: 3-methylcrotonyl CoA carboxylase deficiency; HMG def: 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase deficiency; MCADD: medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency; LCHADD: long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency; SCADD: short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency; CTD: carnitine transporter defect; GALE: classical galactosaemia; GALK: galactokinase deficiency; GALEd: galactose-4 epimerase deficiency; PGA: pyroglutamic aciduria; BD: biotinidase deficiency; MVA: mevalonic aciduria.

the determination of total galactose (free galactose, galactose-1-P and UDP-galactose) in dried blood sample is expensive, and is unnecessary for detection of galactosaemias if newborn urine samples are routinely collected. The proportion of newborns with NBS-detected galactosaemia, 1/19,106, may be compared with the estimated worldwide incidence of approximately 1/50,000 among Caucasian live-born infants; but it must be borne in mind that this latter estimate is very uncertain, because neonatal screening for galactosaemia is not a universal practice, and because the clinical expression of galactosaemia is highly variable [30].

Total biotinidase deficiency was found in one of the 210,165 infants screened, and partial deficiency in 1/35,027 of them, making a combined incidence of 1/28,563 [31]. This is more than twice the world incidence stated by Wolf [32].

The quality of our NBS protocol for IEMs is shown by its high sensitivity, specificity and positive predictive rate. However, we must point out that the positive predictive rate, 76.11%, which is considerably greater than those reported in some other studies (e.g. the 58% of Schulze et al. [11]), seems to be due largely to second samples being requested of the infant's carers before referral to the clinical unit; this will have reduced the false positive rate. Furthermore, the false positive rate has also benefited from our having made confirmatory analyses (those performed on the original urine sample after observation of an abnormal biomarker but before referral to the clinical unit) as comprehensive as possible (primarily in order to reduce the false negative rate). Thus the frequency of one of the commonest false positives, elevated citrulline, has declined in recent years following the introduction of tests for orotic and argininosuccinic acids at the confirmatory analysis stage.

Despite prompt diagnosis, patients with classic organic aciduria, MSUD, CIT 1, MVA and PGA displayed clinical signs before screening results were available. This supports previous suggestions that samples for MS/MS-based screening must be obtained early [33–35].

In many of the pathologies that were detected through screening, immediate initiation of dietary and/or pharmacological treatment is clearly beneficial [6,7,14,36], and our patients were no exception. This was the case of PKU, TYR 1, GA-1, homocystinuria, MSUD, CIT 1, PROP, MMA, MCADD, LCHADD, GALE, GALK, PGA, total BD and MVA. Other entities (3-MCC deficiency, partial BD, MAT I/III deficiency and SCADD) are more controversial, since they can be diagnosed through more moderate forms of screening.

In this study a patient with partial BD suffered myoclonic seizures that resolved after biotin administration; since then, we recommend that all these patients receive biotin (5 mg/week), as do other authors [31]. More doubts surround MAT I/III deficiency, 3-MCC deficiency and SCADD, which are usually benign conditions. High levels of methionine (>1000 µM) may inhibit the transport of other neutral amino acids into the brain, with neurotoxic effects [37]. However, there has been a report of a patient with NBS-diagnosed 3-MCC deficiency who suffered acute metabolic decompensation after failure to adhere to treatment [38]; and it has also been reported that prevention of hypoglycaemia following detection of SCADD by NBS prevents adverse consequences [39]. Long-term studies are needed for adequate assessment of these entities.

The death rate in our population was 2.92% (4/137), close to the 3.1% (7/219) observed by Frazier among patients followed up for 8 years after diagnosis of disorders detected by MS/MS-based NBS [23]. By contrast, Hoffmann et al. [40] reported a death rate of 36% among infants with organic acidurias and β -oxidation deficiencies who showed clinical symptoms after the first week of life. This highlights the importance of early newborn screening for these disorders. Although four patients required dialysis following to NBS results, all but two of the 133 survivors had normal IQ/PDI results (≥ 85) after a mean follow-up of 54 months.

Finally, we note that there were two cases in which transitory abnormalities observed upon screening led to diagnoses of previously

undetected MCC deficiency in the mothers. Similar cases have been reported by others [12,23].

Our data show the importance of:

- Expanded NBS programmes based on MS/MS.
- Early treatment of inborn errors of intermediary metabolism.
- The establishment of interdisciplinary clinical and biochemical teams allowing the benefit of early detection to be maximised and risks minimised.
- Early sample collection to allow prompt diagnosis of neonatal-onset intoxications due to IEMs.
- The use of urine samples enables the development of second-tier strategies with the inclusion of more specific biomarkers than those found in blood; furthermore contains biomarkers for pathologies that are not biochemically expressed in the blood (MVA, GALK, alkaptonuria and cystinuria).

For a better understanding of the advantages of NBS for certain entities, there should be long-term studies of cases diagnosed in populations or communities in which these entities are not screened for at birth. Clinical follow-up of the evolution of cases diagnosed during the neonatal period is very important for acquiring more knowledge of the behaviour and phenotype of these disorders.

References

- [1] Y.L. Loukas, G.S. Soumelas, Y. Dotsikas, V. Georgiou, E. Molou, G. Thodi, M. Boutsini, S. Biti, K. Papadopoulos, Expanded newborn screening in Greece: 30 months of experience, *J. Inherit. Metab. Dis.* (2011). doi:10.1007/s10545-010-9181-8.
- [2] D.S. Millington, N. Kodo, D.L. Norwood, C.R. Roe, Tandem mass spectrometry: a new method for acylcarnitine profiling with potential for neonatal screening for inborn errors of metabolism, *J. Inherit. Metab. Dis.* 13 (1990) 321–324.
- [3] U.G. Jensen, N.J. Brandt, E. Cristensen, F. Skoubye, B. Norgard-Pedersen, H. Simonsen, Neonatal screening for galactosemias by quantitative analysis of hexose monophosphates using tandem mass spectrometry. A retrospective study, *Clin. Chem.* 47 (2001) 1364–1372.
- [4] J.J. Pitt, M. Eggington, S.G. Kahler, Comprehensive screening of urine samples for inborn errors of metabolism by electrospray tandem mass spectrometry, *Clin. Chem.* 48 (2002) 1970–1980.
- [5] G.S. Heard, J.R. Secor McVoy, B. Wolf, A screening method for biotinidase deficiency in newborns, *Clin. Chem.* 30 (1984) 125–127.
- [6] C. Dionisi-Vici, F. Deodato, W. Röscher, W. Rhead, B. Wilcken, "Classical" organic acidurias, propionic aciduria, methylmalonic aciduria and isovaleric aciduria: long-term outcome and effects of expanded newborn screening using tandem mass spectrometry, *J. Inherit. Metab. Dis.* 29 (2006) 383–389.
- [7] S. Bjarnia, V. Wiley, K. Carpenter, J. Christodoulou, C.J. Ellaway, B. Wilcken, Glutamic aciduria type I: outcome following detection by newborn screening, *J. Inherit. Metab. Dis.* 31 (2008) 503–507.
- [8] E. Simon, R. Fingerhut, J. Baumkötter, V. Konstantopoulou, R. Ratschmann, U. Wendel, Maple syrup urine disease: favourable effect of early diagnosis by newborn screening on the neonatal course of the disease, *J. Inherit. Metab. Dis.* 29 (2006) 532–537.
- [9] M.L. Couce, D.E. Castiñeiras, J.D. Moure, J.A. Cocho, P. Sánchez-Pintos, J. García-Villoria, D. Quelhas, N. Gregersen, B.S. Andresen, A. Ribes, J.M. Fraga, Relevance of expanded neonatal screening of medium-chain acyl co-A dehydrogenase deficiency: outcome of a decade in Galicia (Spain), *J. Inherit. Metab. Dis.* 1 (2011) 131–136. doi: 10.1007/9904_2011_28.
- [10] L.A. Prosser, C.Y. Kong, D. Rusinak, S.L. Waisbren, Projected costs, risks, and benefits of expanded newborn screening for MCADD, *Pediatrics* 125 (2010) e286–e294.
- [11] A. Schulze, M. Lindner, K. Kohlmüller, K. Olgemöller, E. Mayatepek, G.F. Hoffmann, Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry: results, outcome and implications, *Pediatrics* 111 (2003) 1399–1406.
- [12] L. Vilarinho, H. Rocha, C. Sousa, A. Marcao, H. Fonseca, M. Bogas, R. Vaz Osorio, Four years of expanded newborn screening in Portugal with tandem mass spectrometry, *J. Inherit. Metab. Dis.* (2010). doi:10.1007/s10545-010-9048-z.
- [13] B. Wilcken, V. Wiley, J. Hammond, K. Carpenter, Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry, *N. Engl. J. Med.* 348 (2003) 2304–2312.
- [14] B. Wilcken, M. Haas, P. Joy, V. Wiley, F. Bowling, K. Carpenter, J. Christodoulou, D. Cowley, C. Ellaway, J. Fletcher, E.P. Kirk, B. Lewis, J. McGill, H. Peters, J. Pitt, E. Ranieri, J. Yapliito-Lee, A. Boneh, Expanded newborn screening: outcome in screened and unscreened patients at age 6 years, *Pediatrics* 124 (2009) 241–248.
- [15] D.H. Chace, T.A. Kalas, E.W. Naylor, Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns, *Clin. Chem.* 49 (2003) 1797–1817.
- [16] J.R. Alonso-Fernández, M.D. Bóveda, C. Parrado, J. Peña, J.M. Fraga, Continuous thin-layer chromatography of sugars of clinical interest in samples of urine impregnated on paper, *J. Chromatogr.* 217 (1981) 357–366.

- [17] M. Rebollido, J.A. Cocho, D.E. Castiñeiras, M.D. Boveda, J.M. Fraga, Aplicación de la Espectrometría de Masas en Tándem al análisis de aminoácidos, acilcarnitinas, acilglicinas y ácidos orgánicos en muestras de orina en papel, *Quím. Clin.* 25 (2006) 64–74.
- [18] D.M. McHugh, C.A. Cameron, J.E. Abdenur, M. Abdulrahman, O. Adair, S.A. Al Nuaimi, H. Ahlman, J.J. Allen, I. Antonozzi, S. Archer, S. Au, et al., Clinical validation of cutoff target ranges in newborn screening of metabolic disorders by tandem mass spectrometry: a worldwide collaborative project, *Genet. Med.* 13 (2011) 230–254.
- [19] M.L. Couce, M.D. Bóveda, D.E. Castiñeiras, F.J. Corrales, M.I. Mora, J.M. Fraga, S.H. Mudd, Hypermethioninaemia due to methionine adenosyltransferase I/III (MAT I/III) deficiency: diagnosis in an expanded neonatal screening programme, *J. Inherit. Metab. Dis.* 31 (2008) 467–468. doi:10.1007/s10545-008-0811-3.
- [20] American College of Medical Genetics Newborn Screening Expert Group, Newborn screening: toward a uniform screening panel and system- executive summary, *Pediatrics* 117 (2006) S296–S307.
- [21] E. Harms, B. Olgemöller, Neonatal screening for metabolic and endocrine disorders, *Dtsch. Aerztebl. Int.* 108 (2011) 11–22.
- [22] D.C. Kasper, R. Ratschmann, T.F. Metz, T.P. Mechtler, D. Möslinger, V. Konstantopoulou, C.B. Item, A. Pollak, K.R. Herkner, The national Austrian newborn screening program – eight years experience with mass spectrometry. Past, present, and future goals, *Wien. Klin. Wochenschr.* 122 (2010) 607–613.
- [23] D.M. Frazier, D.S. Millington, S.E. McCandless, D.D. Koeberl, S.D. Weavil, S.H. Chaing, J. Muenzer, The tandem mass spectrometry newborn screening experience in North Carolina: 1997–2005, *J. Inherit. Metab. Dis.* 29 (2006) 76–85.
- [24] S. Tortorelli, S.H. Hahn, T.M. Cowan, T.G. Brewster, P. Rinaldo, D. Matern, The urinary excretion of glutarylcarbitine is an informative tool in the biochemical diagnosis of glutaric acidemia type I, *Mol. Genet. Metab.* 84 (2005) 137–143.
- [25] S. Köllker, E. Christensen, J.V. Leonard, C.R. Greenberg, A.B. Burlina, A.P. Burlina, M. Dixon, M. Duran, S.I. Goodman, D.M. Koeller, E. Müller, E.R. Naughten, E. Neumaier-Probst, J.G. Okun, M. Kyllerman, R.A. Surtees, B. Wilcken, G.F. Hoffmann, P. Burgard, Guideline for the diagnosis and management of glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency (glutaric aciduria type I), *J. Inherit. Metab. Dis.* 30 (2007) 5–22.
- [26] T.G. Derks, T.S. Boer, A. van Assen, T. Bos, J. Ruiten, H.R. Waterham, J.M. Rondeel, J.G. Loeber, L.P. Ten Kate, G.P. Smit, D.J. Reijngoud, Neonatal screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency in The Netherlands: the importance of enzyme analysis to ascertain true MCAD deficiency, *J. Inherit. Metab. Dis.* 31 (2008) 88–96.
- [27] B. Wilcken, M. Haas, P. Joy, V. Wiley, M. Chaplin, C. Black, J. Fletcher, J. McGill, A. Boneh, Outcome of neonatal screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in Australia: a cohort study, *Lancet* 369 (2007) 37–42.
- [28] F. Scaglia, B. Lee, Clinical, biochemical, and molecular spectrum of hyperargininemia due to arginase I deficiency, *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* 142C (2006) 113–120.
- [29] J.R. Alonso-Fernandez, M.I. Carpintero, J. Baleato, J. Fidalgo, Vertical sandwich-type continuous/evaporative TLC with fixed mobile phase volume for separating sugars of clinical relevance in paper-borne urine and blood samples in newborn screening, *J. Clin. Lab. Anal.* 24 (2010) 106–112.
- [30] G.T. Berry, S. Segal, R. Gitzelmann, Disorders of galactose metabolism, in: J. Fernandes, J.M. Saudubray, G. Van den Berghe, J.H. Walter (Eds.), *Inborn Metabolic Diseases. Diagnosis and treatment*, Springer, Heidelberg, 2006, pp. 121–130.
- [31] M.L. Couce, C. Pérez-Cerdá, M.T. García Silva, A. García Cazorla, E. Martín-Hernández, D. Castiñeiras, M. Pineda, R. Navarrete, J. Campistol, J.M. Fraga, B. Pérez, M. Ugarte, Clinical and genetic findings in patients with biotinidase deficiency detected through newborn screening or selective screening for hearing loss or inherited metabolic disease, *Med. Clin.* (Jul. 11 2011) ([Epub ahead of print]).
- [32] B. Wolf, Worldwide survey of neonatal screening for biotinidase deficiency, *J. Inherit. Metab. Dis.* 14 (1991) 923–927.
- [33] O.A. Bodamer, G.F. Hoffmann, M. Lindner, Expanded newborn screening in Europe 2007, *J. Inherit. Metab. Dis.* 30 (2007) 439–444.
- [34] M.L. Couce, A. Baña, M.D. Bóveda, A. Pérez-Muñuzuri, J.R. Fernández-Lorenzo, J.M. Fraga, Inborn errors of metabolism in a neonatology unit: impact and long-term results, *Pediatr. Int.* 53 (2011) 13–17.
- [35] J.H. Walter, Arguments for early screening: a clinician's perspective, *Eur. J. Pediatr.* 162 (2003) S2–S4.
- [36] U. Spiekerkoetter, M. Lindner, R. Santer, M. Grotzke, M.R. Baumgartner, H. Boehles, A. Das, C. Haase, J.B. Hennermann, D. Karall, H. de Klerk, I. Knerr, H.G. Koch, B. Plecko, W. Röschinger, K.O. Schwab, D. Scheible, F.A. Wijburg, J. Zschocke, E. Mayatepek, U. Wendel, Management and outcome in 75 individuals with long-chain fatty acid oxidation defects: results from a workshop, *J. Inherit. Metab. Dis.* 32 (2009) 488–497.
- [37] M.L. Couce, M.D. Bóveda, D.E. Castiñeiras, F.J. Corrales, M.I. Mora, J.M. Fraga, S.H. Mudd, Hypermethioninaemia due to methionine adenosyltransferase I/III (MAT I/III) deficiency: diagnosis in an expanded neonatal screening programme, *J. Inherit. Metab. Dis.* 31 (2008) 467–468. doi:10.1007/s10545-008-0811-3.
- [38] C. Ficioglu, I. Payan, 3-Methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: metabolic decompensation in a noncompliant child detected through newborn screening, *Pediatrics* 118 (2006) 2555–2556.
- [39] S.E. Waishren, H.L. Levy, M. Noble, D. Matern, N. Gregersen, K. Pasley, D. Marsden, Short-chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD) deficiency: an examination of the medical and neurodevelopmental characteristics of 14 cases identified through newborn screening or clinical symptoms, *Mol. Genet. Metab.* 95 (2008) 39–45.
- [40] G.F. Hoffmann, R. Von Kries, D. Klose, M. Lindner, A. Schulze, A.C. Muntau, W. Röschinger, B. Liebl, E. Mayatepek, A.A. Roscher, Frequencies of inherited organic acidurias and disorders of mitochondrial fatty acid transport and oxidation in Germany, *Eur. J. Pediatr.* 163 (2004) 76–80.



Original Article

Inborn errors of metabolism in a neonatology unit: Impact and long-term results

M^a Luz Couce,¹ Ana Baña,² M^a Dolores Bóveda,³ Alejandro Pérez-Muñuzuri,² José Ramón Fernández-Lorenzo² and José M^a Fraga¹

¹Unit of Neonatology, Diagnosis and Treatment Unit of Metabolic Diseases, Department of Pediatrics, ²Unit of Neonatology, ³Laboratory Metabolopathies, Clinic University Hospital of Santiago, Santiago de Compostela, Spain

Abstract *Background:* Inborn errors of metabolism (IEM) have greater repercussions in neonatology units. The goal of our study was to evaluate the impact of IEM in a neonatology unit and the outcome of these neonates. *Methods:* All patients with IEM admitted in our unit were evaluated during an 8-year period for specific diagnosis, clinical features, therapy and long-term neurodevelopment. *Results:* The study group was comprised of 31 infants, 18 of which required admission to the neonatal intensive care unit (NICU) (1.63% of income) due to severe symptoms. Twenty-two of the 31 had an earlier diagnosis and treatment due to expanded newborn screening, made from the third day of life. The most frequent diagnosis in the NICU, representing 66.66% (12/18), was diseases that cause an endogenous intoxication. Despite the diagnosis by tandem mass spectrometry, many of these patients had severe clinical symptoms prior to the screening results. Aggressive support was often necessary (extracorporeal removal therapy, mechanical ventilation). Death occurred generally in the first year of life (5/6). The death rate in the NICU was 10.3%. The survivors presented higher scores on the Psychomotor Development Index if the diagnosis of the disease was either made or helped by screening. This also depends on the type of disease. *Conclusion:* Earlier diagnosis by expanded newborn screening and earlier treatment is essential in order to be able to prevent neurological sequelae.

Key words expanded newborn screening, inborn errors of metabolism, neonatal intensive care, neonates.

Introduction

Individually inborn errors of metabolism (IEM) are rare. However, collectively, they represent an important area as they are increasingly being described. Over 25% of metabolic diseases are present in the neonatal period, and making an early diagnosis and treatment is essential to reduce morbidity and mortality.¹⁻³

Recent advances, such as expanded newborn screening (NBS) programs by tandem mass spectrometry (MS/MS),⁴⁻⁷ have allowed for diagnosing and treating metabolic diseases even when patients are asymptomatic. Early symptoms occasionally require immediate action, even before making tests or waiting for screening results, and sometimes the diagnosis is only possible to make through the clinical symptoms and biochemical, enzymatic and/or molecular genetic tests. Staff with specific experience in metabolism and advanced neonatology intensive care are required to care for these neonates.

Correspondence: M^a Luz Couce, PhD, Servicio de Neonatología, Unidad de Diagnóstico y Tratamiento de Enfermedades Metabólicas, Departamento de Pediatría, Hospital Clínico Universitario de Santiago, Trav. Choupana s/n, 15706 Santiago de Compostela, Spain. Email: maria.luz.couce.pico@sergas.es

Received 2 November 2009; revised 30 December 2009; accepted 28 April 2010.

As yet, there are hardly any studies published reflecting the impact of IEM in neonatology services and the assessment of the factors involved in its early diagnosis and therapeutic intervention.⁸ We conducted a retrospective analysis of patients admitted to our Neonatology Service from July 2000 (when NBS by MS/MS was introduced) to December 2008, and compared the neonatal screening and clinical diagnosis, as well as studied the long-term development.

Patients and methods

Infants admitted with an IEM in the Neonatology Unit of Clinical University Hospital of Santiago de Compostela, Spain, were studied for an 8-year period (from July 2000 to December 2008). During this period, an average of 411 patients each year were admitted in our Neonatal Service, 130 of which were admitted to the Neonatal Intensive Care Unit (NICU). Our hospital works as referral center for metabolic diseases in Galicia (north west Spain). We evaluated the neonates that were admitted because of clinical symptoms as well as those diagnosed by metabolic screening for whom hospitalization was recommended (according to our protocol) even when they have no symptoms.

In Galicia, the commencement of NBS by MS/MS was in July 2000, and blood samples and urine-impregnated filter paper were collected for metabolic screening between the 5th and the 8th day

of life until 2001. This recommendation changed in 2002 to start the collection on the third day of life after 48 h of milk intake, highlighting the importance of early diagnosis and prompt intervention.

We evaluated the age and year of admission, family history (if there was consanguinity or not), obstetric history (abortions or other children affected), reason for admission (clinical symptoms, newborn screening, or both), biochemical markers suggesting diagnosis, if admission was in the NICU, and if mechanical ventilation and/or dialysis techniques were needed. The data collected included the specific diagnosis as well as the long-term development.

Each diagnosis was classified in one of the four major groups of IEM: Group I, including aminoacidopathies that do not lead to an acute intoxication; Group II, including disorders by endogenous intoxication; Group III, IEM due to an abnormal energy production and utilization; and Group IV, covering other disorders, in our case IEM caused by transport defects, according to a previously described pathophysiological classification.¹

We reassessed the Psychomotor Development Index (PDI) or Intellectual Quotient (IQ) of survivors using the Brunet Lézine Scale in infants, the McCarthy Scales of Psychomotor Skills (MSCA) in preschool children and the Wechsler Intelligence Scale for Children Revised (WISC-R) in children older than 7 years. The overall index score of cognitive and/or developmental quotient is considered in the normal range when it is above 85. The statistical study was performed by analysis of variance (ANOVA) with the average PDI/IQ related to the diagnostic method (screening and/or symptoms). Informed consent of their parents was obtained for all the patients. The study was made with the approval of our hospital ethics committee.

Results

There were 3496 infants admitted during the study period and 31 (0.89% of admissions) were diagnosed with an IEM. The number of diagnosed patients requiring admission to the NICU was 18 (1.63% of 1105 admitted to the NICU). Table 1 reflects the characteristics of neonates with IEM that were referred at diagnosis, the need for dialysis and mechanical ventilation, and changes that occurred in the neonatal period.

In general, the family history of consanguinity was not frequent. Except in two patients, we did not find any siblings or other relatives with similar pathology. The frequency of previous spontaneous abortions was higher in organic acidurias (4/9, including maple syrup urine disease (MSUD)), in the other diseases there was just one abortion in 22 cases. The average age at admission was 12.23 ± 8.78 days, and in all cases except for those with phenylketonuria (PKU) and homocystinuria (HCY), admission to the NICU for a period of 8.11 ± 7.07 days was required.

The most frequent diagnosis, representing 41.93% of the diagnosed patients (13/31) was Group I, aminoacidopathies that do not lead to an acute intoxication. The diagnosis was made by screening all patients of this group, and all of them were completely asymptomatic at diagnosis and remain asymptomatic with dietary treatment and/or drug.

In group II (12/31), intermediary metabolism diseases that cause an endogenous intoxication pattern, elevation of tyrosine in the screening of two patients alerted us to the diagnosis of tyrosinemia (TYR I). Both had abnormal clotting, elevated transaminases, and one of them had renal tubular dysfunction.

Screening for early diagnosis allowed a more rapid action in the five newborns diagnosed with organic aciduria, the four with MSUD and the one with citrullinemia I (CIT I); most of them were at home at the moment of screening, although clinical symptoms were detected at admission. Many patients (5/10) needed extracorporeal removal therapy and 30% (3/10) required respiratory support with mechanical ventilation. The patient diagnosed with CIT I had an excellent response to treatment with benzoate + sodium phenylacetate IV and dialysis was not necessary, even though venous access had been obtained.

The four patients belonging to Group III (abnormal energy production or utilization) and two patients in Group IV (transport defects) were diagnosed after severe clinical symptoms and needing NICU admission. The patients with lactic acidosis (LA) were admitted because encephalopathic symptoms, ventricular bleeding and coma. The patient with multiple Acyl CoA dehydrogenases deficiency (MADD) had a clinical diagnosis of acidosis, cardiomyopathy and coma. The reason for presentation of the patient with hemochromatosis (HE) was a hepatic failure and of the patient with Glut-1 deficit it was convulsions. The results of NBS in all these patients were normal. All of them except for one presented with respiratory failure, and support with mechanical ventilation was provided.

Veno-venous continuous eodifiltration was performed as a dialysis technique in organic acidurias (except for with pyroglutamic aciduria (PGA), in which the patient received exchange transfusion), and maintained for an average time of 17 h (range 10–36 h). Peritoneal dialysis was performed in the two MSUD patients over a period of 24 h.

Two of the patients with IEM progressed badly, resulting in death a few days after admission (3 and 4 days) due to multi-organ failure and severe ventricular bleeding, respectively. They represent 11.11% (2/18) of admissions in the NICU. General neonatal mortality in our hospital NICU was 5.25% during that period. Another four patients died, as reflected in Table 2, after 60 days, 62 days, 4 months and 1½ years due to acute metabolic decompensation in relation to sepsis. The PDI/IQ (Table 3) is above 85 in 84% of survivors (21/25). The four patients with values less than 85 already had symptoms at diagnosis. The average PDI/IQ was 106.84 ± 12.95 if the initial diagnosis was made by screening ($n = 13$); 73.6 ± 22.73 if it was made with clinical findings ($n = 5$) and 93.85 ± 12.87 ($n = 7$) if screening and clinical diagnosis was made. The differences were significant ($P < 0.002$), but also depending on the type of disease.

Discussion

The incidence of IEM in our NICU was 1.63% during the studied period, lower than the 2.2% reported by Jouvett *et al.*⁸ in ICUs (pediatric and neonatal). We hypothesize that this finding is

Table 1 Characteristics of neonates admitted in the neonatology service for the suspicion of inborn errors of metabolism (IEM) for an 8-year period

Disease	Patients (n)	Consanguinity family history (n)	Obstetric history [Previous abortions (n)]	Reason for admission (NBS/CS)	Age at admission (days, mean [range])	Biochemical markers (mean [range])	NICU stay (days per patient)	Mechanical ventilation (n)	ECRT (n)	Early death (n)
Aminoacidopathies without acute intoxication										
PKU	12	0	1	NBS	10,7 [8–15]	Phe: 1382 µmol/L [624–2060]	0	0	0	0
HCY	1	0	0	NBS	27	Met: 1086 µmol/L tHcy: 148 µmol/L	0	0	0	0
Endogenous intoxication										
TYR I	2	0	0	NBS + CS	24,4 [19–30]	Tyr: 677, 543 µmol/L APTT 85 s; Phosphorus 2.8 mg/dL	2, 2	0	0	0
MSUD	4	1	1	NBS + CS (3); CS (1)	12 [7–19]	Leu: 1608 µmol/L [263–2347] Ileu: 343 µmol/L [99,1–511] Hb: 7,9 g/dL; pH: 7,05 Bicarbonate 11 mmol/L	14, 4, 10, 8	1	2	0
PGA	1	0	0	CS	1	NH3: 700 µmol/L APTT 66s	3	0	1	0
PA	2	0	1	NBS + CS	9 [8–10]	NH3: 868 µmol/L; coagulopathy	5, 7	1	1	1
MMA	1	0	1	NBS + CS	4	Urine mevalonic acid: 11600 mmol/mol creat.	4	1	1	0
MVA	1	0	1	CS	30	Cit: 2400 µmol/L; Gln: 2800 µmol/L; NH3: 680 µmol/L	10	0	0	0
CIT I	1	1	0	NBS + CS	9		15	1	0	0
Abnormal energy production or utilization										
LA	3	0	0	CS	19,3 [0–30]	Lactate: 20 mmol/L pH 6,75; Bicarbonate: 6 mmol/L	4, 9, 3	2	0	1
MADD	1	0	0	CS	13	Ferritin 7978 mg/mL Iron 239 mg/dL Glycorrhachia/ Glycemia <0.2	15	1	0	0
Transport defects										
HE	1	0	0	CS	1		5	1	0	1
Glut-1	1	0	0	CS	30		8	0	0	0

CIT I, type I citrullinemia; CS, clinical symptoms; ECRT, extracorporeal removal therapy; Glut-1, Glut-1 deficit; HCY, homocystinuria (CBS def.); HE, hemochromatosis; LA, congenital lactic acidosis; MADD, multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency; MMA, methylmalonic acidemia; MSUD, maple syrup urine disease; MVA, mevalonic aciduria; NBS, newborn screening; PA, propionic acidemia; PGA, pyroglutamic aciduria; PKU, phenylketonuria; TYR I, type I tyrosinemia.

Table 2 Age and cause of death in patients admitted for suspected IEM during the study period

Disease	Patients (n)	Age at death	Cause of death
Endogenous intoxication			
PA	2	18 m; 4 m	Cardiogenic shock; septic shock
MMA	1	2 m	Sepsis with multiorgan failure
Abnormal energy production or utilization			
LA	2	4 d; 2 m	Massive intracranial hemorrhage; refractory metabolic acidosis
Transport defects			
HE	1	6 d	Fulminant hepatic failure

d, days; m, months.

probably related to the NBS on the 3rd day of life, which has been performed in Galicia since 2002. This early screening could allow for early diagnosis and treatment of a group of patients in an asymptomatic period, who otherwise would have needed admission. At the same period of time, many patients were diagnosed without clinical symptoms using the NBS. They were treated, no admission was needed and they were ambulatory controlled: two classical galactosemia, one defect of the long-chain 3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, one methylmalonic aciduria mut0, and one argininosuccinic aciduria. Also, we have other patients diagnosed by NBS who probably could have developed later clinical symptoms (medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency, glutaric aciduria type I, ...).

The IEM more frequently diagnosed were aminoacidopathies and organic acidurias, as expected and consistent with the

literature.⁹⁻¹¹ The NBS contributed to a faster diagnosis in all cases except for three. One of these patients had MSUD, which was diagnosed prior to 2002, and was admitted at 7 days old without any screening sample. The other patients were affected with PGA and mevalonic aciduria (MVA), who were admitted with severe symptoms at 24 h and 30 days of life, respectively. Despite this prompt diagnosis, patients with classic organic aciduria, MSUD and CIT I displayed clinical signs prior to the screening results. This evidence supports the performance of a sample for extended tandem mass spectrometry screening 24 h after starting feeding, as suggested by some authors.^{4,12}

It is assumed that elevation of tyrosine is not a good biochemical marker for the detection of TYR I because of the high incidence of transient neonatal tyrosinemia (ranging from 0.2 to 10% of newborns). Two patient with TYR I were receiving a diet of moderate protein restriction and ascorbic acid supplements, but

Table 3 Index score of psychomotor development index (PDI) or intellectual quotient (IQ) in survivors

Patient	Diagnosis	Reason for admission (NBS/CS)	Age at evaluation (years)	PDI/IQ (%)
1	Classic PKU	NBS	7	113
2	Classic PKU	NBS	7	127
3	Classic PKU	NBS	7	91
4	Classic PKU	NBS	5	110
5	Classic PKU	NBS	8	119
6	Classic PKU	NBS	5	86
7	Classic PKU	NBS	0.5	94
8	Classic PKU	NBS	0.5	101
9	Classic PKU	NBS	8	115
10	Classic PKU	NBS	3	126
11	Classic PKU	NBS	2	107
12	Mild PKU	NBS	3	100
13	HCY	NBS	4	100
14	TYR I	NBS + CS	6	88
15	TYR I	NBS + CS	6	80
16	MSUD, classic form	NBS + CS	4	94
17	MSUD, intermediate form	NBS + CS	1	105
18	MSUD, intermediate form	NBS + CS	7	117
19	MSUD, classic form	CS	6	87
20	PGA	CS	4	52
21	MVA	CS	0.5	48
22	CIT I	NBS + CS	0.5	86
23	LA	CS	0.5	88
24	MADD	CS	2	100
25	Glut-1	CS	2	80

CIT I, type I citrullinemia; CS, clinical symptoms; Glut-1, Glut-1 deficit; HCY, homocystinuria (CBS def.); LA, congenital lactic acidosis; MADD, multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency; MSUD, maple syrup urine disease; MVA, mevalonic aciduria; NBS, newborn screening; PGA, piroglutamic aciduria; PKU, phenylketonuria; TYR I, type I tyrosinemia.

they both had coagulation disorders and one had renal tubular dysfunction at admission. In addition, we had a false negative for TYR I despite having the cut-off of tyrosine at 220 $\mu\text{mol/L}$. In Galicia, the urine succinylacetone screening was added to the tyrosine determination for diagnosis of TYR I in 2008.¹³

The clinical presentation as well as biochemical alterations were very important for diagnosis in all patients with energy deficit and transport defects (they presented with neurological, cardiac and hepatic symptoms depending on the type and respiratory failure in 66.6%). The screening of acylcarnitines was very useful in a patient diagnosed with MADD. This screening alerted us to a possible defect in the β -oxidation of fatty acids, although further studies were conducted to make the MADD diagnosis (acylcarnitines produced from the oxidation of palmitate deuterium (16^{-2}H_3 - palmitate) in cultured fibroblasts).

Treatment of our patients frequently included extracorporeal removal therapy, especially if they had endogenous intoxication (50%). This finding is similar to other series published (30% or more).^{8,14,15} The most frequent technique used was veno-venous co-diafiltration, which has proved efficacy.

These therapies could be avoided in some cases by using drugs. This becomes even more important when technical and methodological limitations to perform effective dialysis in the neonate delays the start of treatment. We reported one hyperammonemic patient with severe CIT I who responded well to treatment with intravenous phenylacetate and benzoate, and did not require more aggressive measures. Another patient that we followed for Propionic Aciduria had an episode of metabolic decompensation with hyperammonemia, and responded to *N*-carbamoylglutamate.

Death occurred generally in the first year of life (5/6), two of them in first days of life. All of them were initially admitted to the NICU, representing a 33.3% (6/18) rate of mortality in this group (initial NICU admission and IEM). This figure is similar to other published numbers for patients with these circumstances.^{8,16}

We frequently observed a good neurological outcome between survivors, especially if the diagnosis was made, or helped by NBS. The early diagnosis with proper and immediate action is vital for a good subsequent neurological outcome.¹⁷⁻¹⁹

We think it must be taken into consideration to perform expanded newborn screening 24 h after milk intake and this screening must be improved in some pathologies with new biochemical markers that increase the sensibility and specificity of the screening.

Acknowledgments

This study was made in cooperation with María Gallego, psychologist of the University Clinical Hospital of Santiago, Spain.

References

- 1 Saudubray JM, Nassogne MC, de Lonlay P, Touati G. Clinical approach to inherited metabolic disorders in neonates: An overview. *Semin. Neonatol.* 2002; **7**: 3-15.
- 2 Sanjurjo P, Aldámiz-Echevarría L, Ojembarrena E, Aquino L. Enfermedades congénitas del metabolismo: Generalidades, grupos clínicos y algoritmos diagnósticos. In: Sanjurjo P, Baldellou A (eds). *Diagnóstico Y Tratamiento De Las Enfermedades Metabólicas Hereditarias 2th*. Ergón, Madrid, 2006; 63-98.
- 3 Leonard JV, Morris AA. Diagnosis and early management of inborn errors of metabolism presenting around the time of birth. *Acta Paediatr.* 2006; **95**: 6-14.
- 4 Bodamer OA, Hoffmann GF, Lindner M. Expanded newborn screening in Europe 2007. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2007; **30**: 439-44.
- 5 Waisbren SE. Newborn screening for metabolic disorders. *JAMA* 2006; **296**: 993-5.
- 6 Wilcken B, Wiley V, Hammond J, Carpenter K. Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. *N. Engl. J. Med.* 2003; **348**: 2304-12.
- 7 Han LS, Ye J, Qiu WJ, Gao XL, Wang Y, Gu XF. Selective screening for inborn errors of metabolism on clinical patients using tandem mass spectrometry in China: A four-year report. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2007; **30**: 507-14.
- 8 Jouvét P, Touati G, Lesage F *et al.* Impact of inborn errors of metabolism on admission and mortality in a pediatric intensive care unit. *Eur. J. Pediatr.* 2007; **166**: 461-5.
- 9 Joshi SN, Venugopalan P. Clinical characteristics of neonates with inborn errors of metabolism detected by Tandem MS analysis in Oman. *Brain Dev.* 2007; **29**: 543-6.
- 10 Tan IK, Gajra B, Lim MSF. Study of inherited metabolic disorders in Singapore - 13 years experience. *Ann. Acad. Med. Singapore* 2006; **35**: 804-13.
- 11 Frazier DM, Millington DS, McCandless SE *et al.* The tandem mass spectrometry newborn screening experience in North Carolina: 1997-2005. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2006; **29**: 76-85.
- 12 Walter JH. Arguments for early screening: A clinician's perspective. *Eur. J. Pediatr.* 2003; **162**: S2-4.
- 13 Rebolledo M, Cocho JA, Castiñeiras DE, Bóveda MD, Fraga JM. Aplicación de la Espectrometría de masas en tandem al análisis de aminoácidos, acilcarnitinas, acilglicinas y ácidos orgánicos en muestras de orina en papel. *Quím Clin.* 2006; **25**: 64-74.
- 14 Lai YC, Huang HP, Tsai JJ, Tsau YK. High-volume continuous venovenous co-filtration as an effective therapy for acute management of inborn errors of metabolism in young children. *Blood Purif.* 2007; **25**: 303-8.
- 15 Daschner M, Schaefer F. Emergency dialysis in neonatal metabolic crises. *Adv. Ren. Replace. Ther.* 2002; **1**: 63-9.
- 16 Dionisi-Vici C, Rizzo C, Burlina AB *et al.* Inborn errors of metabolism in the Italian pediatric population: A national retrospective survey. *J. Pediatr.* 2002; **140**: 321-7.
- 17 Bachmann C. Long-term outcome of patients with urea cycle disorders and the question of neonatal screening. *Eur. J. Pediatr.* 2003; **162**: S29-33.
- 18 Hoffmann B, Helbing C, Schadewaldt P, Wendel U. Impact of longitudinal plasma leucine levels on the intellectual outcome in patients with classic MSUD. *Pediatr. Res.* 2006; **59**: 17-20.
- 19 Bruggink JL, Van Spronsen FJ, Wijnberg-Williams BJ, Bos AF. Pilot use of the early motor repertoire in infants with inborn errors of metabolism: Outcomes in early and middle childhood. *Early Hum. Dev.* 2009; **85**: 461-5.

PEDIATRICS®

OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS

Clinical, Genetic, and Therapeutic Diversity in 2 Patients With Severe Mevalonate Kinase Deficiency

Angeles Ruiz Gomez, María Luz Couce, Judit Garcia-Villoria, Angeles Torres, Ana Baña Souto, Jordi Yagüe, María Antonia Vilaseca, Antonia Ribes and Juan I. Aróstegui

Pediatrics 2012;129:e535; originally published online January 23, 2012;
DOI: 10.1542/peds.2010-2192

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://pediatrics.aappublications.org/content/129/2/e535.full.html>

PEDIATRICS is the official journal of the American Academy of Pediatrics. A monthly publication, it has been published continuously since 1948. PEDIATRICS is owned, published, and trademarked by the American Academy of Pediatrics, 141 Northwest Point Boulevard, Elk Grove Village, Illinois, 60007. Copyright © 2012 by the American Academy of Pediatrics. All rights reserved. Print ISSN: 0031-4005. Online ISSN: 1098-4275.

American Academy of Pediatrics

DEDICATED TO THE HEALTH OF ALL CHILDREN™



Clinical, Genetic, and Therapeutic Diversity in 2 Patients With Severe Mevalonate Kinase Deficiency

AUTHORS: Angeles Ruiz Gomez, MD,^a María Luz Couce, MD, PhD,^b Judit Garcia-Villoria, MD,^c Angeles Torres, MD,^a Ana Baña Souto, MD,^b Jordi Yagüe, MD, PhD,^d María Antonia Vilaseca, MD, PhD,^e Antonia Ribes, MD, PhD,^f and Juan I. Aróstegui, MD, PhD^g

^aMetabolic Diseases Unit, Pediatric Neurology Department, Hospital Universitario Son Dureta, Palma de Mallorca, Spain; ^bMetabolic Diseases Unit, Pediatrics Department, Hospital Clínico Universitario, Santiago de Compostela, Spain; ^cInherited Metabolic Disorders Department, and ^dImmunology Department, Centro de Diagnóstico Biomédico/Institut D'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Hospital Clínic, Barcelona, Spain; and ^eMetabolic Diseases Unit, Hospital Sant Joan de Déu, Esplugues, Spain

KEY WORDS

Mevalonic aciduria, hyper-IgD and periodic fever, HIDS, mevalonate kinase deficiency, autoinflammatory diseases, metabolic diseases, anti-IL-1 therapy

ABBREVIATIONS

HIDS—hyper-IgD with periodic fever syndrome
IL—interleukin

MA—mevalonic aciduria

MKD—mevalonate kinase deficiency

OMIM—Online Mendelian Inheritance in Man

Drs Gomez, Couce, Ribes, and Aróstegui made substantial contributions to conception and design; Drs Gomez, Couce, Garcia-Villoria, Torres, Souto, Yagüe, Vilaseca, Ribes, and Aróstegui made substantial contributions to acquisition of data or to analysis and interpretation of data; Drs Gomez, Couce, Ribes, and Aróstegui drafted the article; and all authors revised the article critically for important intellectual content and provided final approval for submission and publication.

www.pediatrics.org/cgi/doi/10.1542/peds.2010-2192

doi:10.1542/peds.2010-2192

Accepted for publication Oct 13, 2011

Dr Torres's current affiliation is Pediatrics Department, Singleton Hospital, Swansea, Wales.

Address correspondence to Juan I. Aróstegui, MD, PhD, Immunology Department, Hospital Clínic, Villarroel, 170, 08036—Barcelona, Spain. E-mail: jiaroste@clinic.ub.es

PEDIATRICS (ISSN Numbers: Print, 0031-4005; Online, 1098-4275).

Copyright © 2012 by the American Academy of Pediatrics

FINANCIAL DISCLOSURE: The authors have indicated they have no financial relationships relevant to this article to disclose.

abstract

Mevalonic aciduria (MA) represents the severest form of mevalonate kinase deficiency due to recessively inherited, loss-of-function *MVK* mutations. MA is an early-onset disorder characterized by a marked failure to thrive, diverse neurologic symptoms, dysmorphic features, and recurrent febrile episodes. However, significant clinical differences have been reported in the few cases published to date. Here we describe 2 unrelated Spanish patients with MA, emphasizing the clinical heterogeneity observed. One patient presented with the severe classic MA phenotype due to the homozygous p.Ile-268-Thr *MVK* genotype, with a poor response to conventional treatments. However, the anti-interleukin 1 agent anakinra in this patient resulted in improvement in many clinical and laboratory parameters. The second patient presented with an atypical milder phenotype because of an older age at disease onset, mild neurologic symptoms, absence of febrile episodes and dysmorphic features, and moderate-to-good response to conventional treatments. The novel p.Arg-241-Cys *MVK* mutation, associated with the already known p.Ser-135-Leu mutation, detected in this patient expands the genetic diversity of mevalonate kinase deficiency. This atypical presentation of MA suggests that it should be included in the differential diagnosis of unclassified patients with psychomotor retardation, failure to thrive or ataxia, even in the absence of febrile episodes. *Pediatrics* 2012;129:e535–e539

Mevalonic aciduria (MA; Online Mendelian Inheritance in Man [OMIM] 251170) is a severe, early-onset disease characterized by failure to thrive, neurologic manifestations, cataracts, dysmorphic features, and recurrent febrile episodes.¹ It represents the first identified disorder of the biosynthetic pathway of cholesterol and nonsterol isoprenoids, with <50 patients reported to date.¹ MA is consequence of recessively inherited, loss-of-function *MVK* mutations, associated with extremely reduced mevalonate kinase (MK) activity.² Interestingly, *MVK* mutations were subsequently identified in the hyper-IgD with periodic fever syndrome (HIDS; OMIM 260920), which is characterized by recurrent acute inflammatory episodes similar to those observed in MA, although without the most severe MA clinical features, such as neurologic symptoms and dysmorphic features.³⁻⁵ The term "mevalonate kinase deficiency" (MKD) was proposed to denote the shared molecular basis of both diseases, and they should represent opposing ends of a continuum of disease severity, with MA at the severe end.^{6,7} Despite progress into the genetic basis of MKD, several questions concerning pathophysiologic mechanisms and treatments remain. Herein we describe 2 Spanish patients with MA, emphasizing the clinical diversity observed, as one patient presented with a severe classic form, and the other with an atypical milder phenotype, and the different outcomes of the treatments administered.

CASE REPORTS

Patient 1

Patient 1 was an 18-month-old boy born to healthy, unrelated parents, who also have 2 healthy daughters and referred to the history of a stillbirth at 31 weeks of gestation. The patient was born at 32 weeks by cesarean section because of intrauterine growth retardation. Birth

weight was 1385 g, length was 39 cm, head circumference was 29.5 cm (all less than third percentile), and Apgar score was 9/10/10. From the neonatal period, failure to thrive and short (3–5 days), recurrent febrile crises with vomiting, hepatosplenomegaly, lymphadenopathies, and an intense acute-phase reaction were observed. Mild face anomalies including frontal bossing, low-set ears, bilateral cataracts, and posterior lenticonus were detected at 2 months. As the patient aged, skin rashes, a marked axial hypotonia, developmental delay, cerebral atrophy, and progressive loss of visual acuity were also detected. He emitted vocalizations and could not sit down. His neuropsychological evaluation, using the Brunet-Lezine scale,⁸ showed a low overall development quotient (61%). Ultrasonography revealed uniform hepatosplenomegaly, and brain MRI showed cavities at frontal and parietal periventricular white matter. Laboratory investigations at diagnosis are summarized in Table 1. A metabolic screening performed at 2 months revealed an increased urinary excretion of mevalonic acid (11.600 mmol/mol creatinine; normal range: <11 mmol/mol creatinine), supporting the MKD diagnosis. *MVK* mutational analysis (performed after obtaining the parents' written informed consent and approval by a medical ethics committee) revealed the homozygous transition c.803T>C, encoding for the p.Ile-268-Thr variant. Patient's parents and sisters were heterozygous for this variant, confirming a recessive inheritance pattern.

Before the MKD diagnosis, broad-spectrum antibiotics and antifungal agents showed poor responses. After MKD diagnosis, corticosteroids and antioxidant medication (vitamins C and E and coenzyme Q10) were administered, as was occasional enteral feeding and red blood cell transfusion. He also underwent surgical

removal of cataracts. Because of the persistence of febrile crises as well as successful experiences with interleukin (IL)-1 blockade in HIDS, off-label treatment with the anti-IL-1 agent anakinra was begun (1 mg/kg every 24 hours, subsequently increased up to 8 mg/kg every 24 hours). At the 3-month follow-up, the benefits were evident, including weight gain, cessation of febrile episodes, and a marked improvement of social behavior and overall neurologic status, which persisted at present (Table 2). However, the observed response to anakinra was slightly slower than that observed in other autoinflammatory diseases (see Table 1).^{9,10}

Patient 2

Patient 2 was a 7-year-old boy born to healthy unrelated parents after an uneventful pregnancy. Birth weight was 3.465 g, length was 49 cm, head circumference was 34 cm (50th percentile), and Apgar score was 9/10. Normal psychomotor development was observed, with no dysmorphic features. At age 2.5 years, the patient began to experience recurrent 24- to 72-hour episodes of headache, vomiting, axial ataxia, and vegetative symptoms, and their frequency had recently increased. Fever, hepatosplenomegaly, and lymphadenopathies were not detected during these episodes. Neurologic examination revealed hypoactive patellar and aquilian reflexes, a mild bilateral cavus deformity, and a negative Babinsky sign. The ataxia rating scale between episodes was 6 out of 34 in posture and gait disturbances, and 11 out of 52 in kinetic limb coordination. MRI revealed progressive cerebellum atrophy (see Fig 1). Spectroscopic MRI did not detect evidence of neuroaxonal dysfunction in the central nervous system areas studied. A mild creatine and energetic metabolism deficiency on white matter and cerebellum were detected by abnormal quotient factors. No signs of demyelination activity were found.

TABLE 1 Summary of Laboratory Investigations at MKD Diagnosis and During Treatment

	Patient 1				Patient 2			Normal Values
	Before Anakinra		Anakinra		Before Statins	Simvastatin		
	Febrile Episode	Interepisode	15 d	1 min		(10 mg/24 h) 4 min	(5 mg/24 h) 7 min/12 min/18 min	
Leukocytes ($\times 10^9/L$)	38 \pm 2.2	11.1 \pm 1.1	44.9	29.2	10.3 \pm 0.7	8.56	8.76/13.34/6.80	5–17
Neutrophils ($\times 10^9/L$)	28.5 \pm 1.5	5.7 \pm 0.5	19.3	6.5	5.6 \pm 0.4	4.71	4.27/8.67/3.12	1.7–8.5
Platelet count ($\times 10^9/L$)	502 \pm 15.8	300 \pm 8.7	359	454	310 \pm 7.6	385	358/321 /289	125–400
Haemoglobin (g/dL)	8.2 \pm 0.9	10.1 \pm 0.7	11.2	11.4	11.5 \pm 0.5	13.3	13.2/13.7 /13.8	10.5–14.5
ESR (mm/h)	70.25 \pm 4.25	15.3 \pm 1.8	NA	NA	14.7 \pm 1.3	13	NA/10/NA	0–20
C-reactive protein (mg/dL)	2.6	0.4	9.46	0.81	1.1	0.2	NA/0.2/0.1	0–0.5
IgD (U/mL)	24	13	NA	NA	43	NA	NA/NA/NA	<100
CK (U/L)	140	89	NA	NA	NA	4866	185/2894/768	29–160
Cholesterol (mg/dL)	91	105	NA	110	138	103	105/106/106	<200
HDL-cholesterol (mg/dL)	39	43	NA	NA	59	44	NA/49/56	>35
LDL-cholesterol (mg/dL)	45	53	NA	NA	69	45	NA/43/40	<120
MA (mmol/mol creatinine)	11 600	9500	NA	NA	3547/757	1048	176/130/531	<11

NA indicates not available.

TABLE 2 Clinical, Biochemical, and Genetic Features of and Treatment of Patients With MA

	Patient 1	Patient 2
Age at disease onset	Neonatal period	30 mo
Febrile episodes	Yes	No
Vomiting	Yes	Yes
Failure to thrive	Yes	No
Neurologic manifestations		
Axial hypotonia	Yes	No
Axial ataxia	No	Yes
Loss of visual acuity	Yes	No
Headache	Yes	Yes
Cerebral atrophy	Yes	No
Cerebellar atrophy	Yes	Yes
Others		Hypoactive reflexes, vegetative symptoms
Psychomotor delay	Yes	No
Cataracts	Yes	No
Facial dysmorphism	Yes	No
MA (mmol/mol creatinine)	11.600	3.547
<i>MVK</i> genotype	Homozygous p.I268T	Compound Heterozygous p.S135L – p.R241C
Treatments (outcome)		
Antibiotics/antifungals	Yes/unsuccessful	Occasional
Enteral feeding	Yes	No
Blood transfusions	Occasional	No
Corticosteroids + antioxidant drugs	Yes/partial response	Only antioxidant drugs, associated with statins
Anakinra (dose increased from 1 up to 8 mg/kg/day)	Yes/moderate to good clinical response during the past 11 mo	No
Simvastatin	No	Yes/moderate to good clinical response during the past year

Laboratory investigations at diagnosis are summarized in Table 1. Metabolic screening revealed a high urinary excretion of mevalonic acid (3.547 mmol/mol creatinine; normal range:

<11 mmol/mol creatinine), suggesting MKD diagnosis. *MVK* mutational analysis was performed after obtaining the parents' written informed consent and approval by a medical ethics



FIGURE 1 Head magnetic resonance image of patient 1 revealing cerebellum atrophy.

committee. Analysis revealed the heterozygous transitions c.404C>T and c.721C>T, which cause the already known p.Ser-135-Leu variant and the novel p.Arg-241-Cys, respectively. The parents' *MVK* analyses revealed that each was a carrier of 1 variant, thus confirming that the patient was a *MVK* compound heterozygote.

Antioxidant (vitamins D, E, C, and Coenzyme Q10) and creatine treatments were then started. On the basis of previous reports of increased MK activity upregulation using HMG-CoA reductase inhibitors, simvastatin (10 mg/day) was also begun. Increased creatine phosphokinase plasma levels detected

3 months later required a reduction of the dosage to 5 mg/day. During follow-up, the frequency of episodes remained the same, but ataxia had disappeared, and vomiting had occurred only rarely. Interestingly, urinary excretion of mevalonic acid remained at low levels (range: 530–176 mmol/mol creatinine). Headache episodes lasting <6 to 8 hours persisted but responded well to ibuprofen.

DISCUSSION

In recent years, both classic and atypical MA patients have been reported. The differences between the 2 include age at disease onset, diversity and severity of clinical manifestations, outcome of treatments, and prognosis.^{6,7} The patients described here were confirmed to have MA on the basis of their clinical, biochemical, and genetic data. However, marked differences can be observed between them. Patient 1 represents the classic severe MA phenotype first described by Hoffman et al, characterized by an early-onset of recurrent febrile episodes, dysmorphic traits, severe neurologic features, and a marked failure to thrive.² In contrast, patient 2 represents an atypical, milder MA phenotype, with relatively late onset, absence of dysmorphic traits, mild neurologic symptoms, and a moderate-to-good response to conventional treatments. However, the presence of neurologic symptoms, the absence of recurrent febrile episodes, and a permanently increased urinary excretion of mevalonic acid can reasonably rule out HIDS diagnosis in this patient.

Since the discovery of the genetic basis of MKD, it has been shown that patients with *MVK* genotypes leading to permanent and undetectable MK activity should

suffer from MA, whereas those patients with *MVK* genotypes leading to residual, but not absent, MK activity should suffer from HIDS.^{2–4,11} This hypothesis has been verified both biochemically, because urinary excretion of mevalonic acid is 100- to 1000-fold higher in MA than in HIDS, and genetically, because of the overrepresentation in HIDS of the mild p.Val-377-Ile *MVK* mutation, which retains a residual MK activity (~1%–7%).^{1,11} Nevertheless, the relationship between specific *MVK* genotypes and the occurrence of classic or atypical MA phenotypes remains to be demonstrated. In this sense, we must note that patient 1 carries the homozygous p.Ile-268-Thr *MVK* genotype that has been previously identified in classic MA phenotypes with poor prognosis,¹² whereas patient 2 carries a mutation first detected in a HIDS patient (p.Ser-135-Leu) associated with a novel variant (p.Arg-241-Cys). The absence of this novel variant in 500 control Spanish chromosomes and in the 1000 Genome project, its probable damaging nature according to bioinformatics analyses using both PolyPhen and SIFT software, and the highly conserved p.Arg-241 residue among different species support that this novel variant could be a deleterious *MVK* mutation rather than a rare polymorphism. However, additional research concerning the residual MK activity conferred by this novel mutation is warranted.

MKD pathophysiologic mechanisms remain poorly understood. As in any enzymatic deficiency, the clinical features may be a consequence of precursor toxicity, end-product deficiency, or both. The normal or slightly decreased plasma levels of cholesterol and steroid hormones

in MKD patients suggest that it could result from nonsterol isoprenoids deficiency. Interestingly, some isoprenoids have recently been identified as negative regulators of inflammasome, a cytosolic multiprotein complex that generates the active forms of caspase-1, IL-1 β , IL-18, and IL-33.^{13–15} Thus, the isoprenoids deficiency might increase the inflammasome activity, which could be the basis of febrile crises. Moreover, previous positive responses with the anti-IL-1 agent anakinra in patients with HIDS and MA support the role of this cytokine in the pathophysiology of these febrile crises.^{16–18} The positive clinical response to anakinra observed in patient 1 suggests that IL-1 blockade could be an alternative therapeutic option for some clinical symptoms of MKD patients. Moreover, a recent report of clinical improvement of febrile crises in MA patients who underwent allogeneic hematopoietic stem cell transplantation opens this option for those patients with life-threatening febrile crises refractory to other therapeutic approaches.^{18,19}

In conclusion, we expand the clinical and genetic diversity observed in MA by the description of 2 novel cases. Drawing from these as well as from other previously reported cases, we suggest that MA should be included in the differential diagnoses of unclassified patients with psychomotor retardation, failure to thrive, or ataxia, even in the absence of febrile episodes.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grant FIS-PS09/01182 from Ministerio de Sanidad y Consumo (JY).

We thank the patients and their families for their cooperation in this study.

REFERENCES

1. Haas D, Kelley RI, Hoffmann GF. Inherited disorders of cholesterol biosynthesis. *Neuropediatrics*. 2001;32(3):113–122
2. Hoffmann GF, Gibson KM, Brandt IK, Bader PI, Wappner RS, Sweetman L. Mevalonic aciduria—an inborn error of cholesterol and nonsterol isoprene biosynthesis. *N Engl J Med*. 1986;314(25):1610–1614

CASE REPORT

3. Houten SM, Kuis W, Duran M, et al. Mutations in MVK, encoding mevalonate kinase, cause hyperimmunoglobulinaemia D and periodic fever syndrome. *Nat Genet.* 1999; 22(2):175–177
4. Drenth JP, Cuisset L, Grateau G, et al; International Hyper-IgD Study Group. Mutations in the gene encoding mevalonate kinase cause hyper-IgD and periodic fever syndrome. *Nat Genet.* 1999;22(2):178–181
5. van der Hilst JCH, Bodar EJ, Barron KS, et al; International HIDS Study Group. Long-term follow-up, clinical features, and quality of life in a series of 103 patients with hyperimmunoglobulinemia D syndrome. *Medicine (Baltimore).* 2008;87(6):301–310
6. Simon A, Kremer HPH, Wevers RA, et al. Mevalonate kinase deficiency: Evidence for a phenotypic continuum. *Neurology.* 2004; 62(6):994–997
7. Haas D, Hoffmann GF. Mevalonate kinase deficiencies: from mevalonic aciduria to hyperimmunoglobulinemia D syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 2006;1:13
8. Brunet O, Lezine I. *Le Développement Psychologique de la Première Enfance*. 5th ed. Paris, France: Editions Scientifiques et Psychologiques; 1983
9. Hawkins PN, Lachmann HJ, McDermott MF. Interleukin-1-receptor antagonist in the Muckle-Wells syndrome. *N Engl J Med.* 2003; 348(25):2583–2584
10. Goldbach-Mansky R, Dailey NJ, Canna SW, et al. Neonatal-onset multisystem inflammatory disease responsive to interleukin-1 β inhibition. *N Engl J Med.* 2006;355(6): 581–592
11. Cuisset L, Drenth JPH, Simon A, et al; International Hyper-IgD Study Group. Molecular analysis of MVK mutations and enzymatic activity in hyper-IgD and periodic fever syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2001;9(4):260–266
12. Houten SM, Romeijn GJ, Koster J, et al. Identification and characterization of three novel missense mutations in mevalonate kinase cDNA causing mevalonic aciduria, a disorder of isoprene biosynthesis. *Hum Mol Genet.* 1999;8(8):1523–1528
13. Frenkel J, Rijkers GT, Mandey SHL, et al. Lack of isoprenoid products raises ex vivo interleukin-1 β secretion in hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome. *Arthritis Rheum.* 2002;46 (10):2794–2803
14. Montero MT, Matilla J, Gómez-Mampaso E, Lasunción MA. Geranylgeraniol regulates negatively caspase-1 autoprocessing: implication in the Th1 response against Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol.* 2004; 173(8):4936–4944
15. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . *Mol Cell.* 2002;10 (2):417–426
16. Bodar EJ, van der Hilst JCH, Drenth JPH, van der Meer JWM, Simon A. Effect of etanercept and anakinra on inflammatory attacks in the hyper-IgD syndrome: introducing a vaccination provocation model. *Neth J Med.* 2005;63(7):260–264
17. Cailliez M, Garaix F, Rousset-Rouvière C, et al. Anakinra is safe and effective in controlling hyperimmunoglobulinaemia D syndrome-associated febrile crisis. *J Inheret Metab Dis.* 2006;29(6):763
18. Neven B, Valayannopoulos V, Quartier P, et al. Allogeneic bone marrow transplantation in mevalonic aciduria. *N Engl J Med.* 2007;356 (26):2700–2703
19. Arkwright PD, Abinun M, Cant AJ. Mevalonic aciduria cured by bone marrow transplantation. *N Engl J Med.* 2007;357 (13):1350

Clinical, Genetic, and Therapeutic Diversity in 2 Patients With Severe Mevalonate Kinase Deficiency

Angeles Ruiz Gomez, María Luz Couce, Judit Garcia-Villoria, Angeles Torres, Ana Baña Souto, Jordi Yagüe, María Antonia Vilaseca, Antonia Ribes and Juan I. Aróstegui

Pediatrics 2012;129:e535; originally published online January 23, 2012;
DOI: 10.1542/peds.2010-2192

Updated Information & Services	including high resolution figures, can be found at: http://pediatrics.aappublications.org/content/129/2/e535.full.html
References	This article cites 18 articles, 3 of which can be accessed free at: http://pediatrics.aappublications.org/content/129/2/e535.full.html#ref-list-1
Permissions & Licensing	Information about reproducing this article in parts (figures, tables) or in its entirety can be found online at: http://pediatrics.aappublications.org/site/misc/Permissions.xhtml
Reprints	Information about ordering reprints can be found online: http://pediatrics.aappublications.org/site/misc/reprints.xhtml

PEDIATRICS is the official journal of the American Academy of Pediatrics. A monthly publication, it has been published continuously since 1948. PEDIATRICS is owned, published, and trademarked by the American Academy of Pediatrics, 141 Northwest Point Boulevard, Elk Grove Village, Illinois, 60007. Copyright © 2012 by the American Academy of Pediatrics. All rights reserved. Print ISSN: 0031-4005. Online ISSN: 1098-4275.

American Academy of Pediatrics

DEDICATED TO THE HEALTH OF ALL CHILDREN™



9. BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

-
- ¹Blau N, Thöny B, Cotton RGH, Hyland K. Disorders of tetrahydrobiopterin and related biogenic amines. In: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS (eds). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8ªEd. New York: McGraw-Hill; 2001. p.1667-1724.
- ²Ruiz Desviat L, Pérez González B, Ugarte Pérez M. Bases moleculares de las enfermedades metabólicas hereditarias. En: Sanjurjo P, Baldellou A (eds). *Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias*. 3ªEd. Madrid: Ergon; 2010. p.1-11.
- ³Nassogne MC, Héron B, Touati G, Rabier D, Saudubray JM. Urea cycle defects: Management and outcome. *J Inherited Metab Dis* 2005; 28: 407-414.
- ⁴McBryde KD, Kershaw DB, Bunchman TE, Maxwold NJ, Mottes TA, Kudelka RN, Brophy PD. Renal replacement therapy in the treatment of confirmed or suspected inborn errors of metabolism. *J Pediatr* 2006; 148: 770-778.
- ⁵Estrategias en Enfermedades Raras del Sistema Nacional de Salud. Ministerio de Sanidad y Política Social. Sanidad, 2009.
- ⁶Galton DJ, Archibald E, Garrod (1857-1936). *J Inherited Metab Dis* 2008; 31: 561-566.
- ⁷Penrose L, Quastel JH. Metabolic studies in Phenylketonuria. *Biochem J* 1937; 31: 266-274.
- ⁸Bickel H, Gerrard J, Hickmans EM. Influence of phenylalanine intake of phenylketonuria. *Lancet* 1953; 265:812-813.
- ⁹Saudubray JM, Sedel F. Enfermedades metabólicas hereditarias: generalidades, grupos clínicos y algoritmos diagnósticos. En: Sanjurjo P, Baldellou A (eds). *Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias*. 3ªEd. Madrid: Ergon; 2010. p.63-112.
- ¹⁰Wald NJ. *Journal of medical screening*. *J Med Screen* 1994; 1: 1-2
- ¹¹Cocho de Juan JA, Castiñeiras Ramos DE, Bóveda Fontán MD, Colón Mejeras C, Fraga Bermúdez JM. Cribado neonatal de los errores congénitos del metabolismo. En: Sanjurjo P, Baldellou A (eds). *Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias*. 3ªEd. Madrid: Ergon; 2010. p.43-60.

-
- ¹²Armstrong MD, Low NL and Bosma JF. Studies on phenylketonuria. IX. Further observations on the effect of phenylalanine-restricted diet on patients with phenylketonuria. *Am J Clin Nutr* 1957; 5: 543-554.
- ¹³Lesser AJ. Phenylketonuria and the Guthrie test. *Pediatrics* 1963; 32: 940.
- ¹⁴Guthrie R, Susie A. A simple method for detecting Phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* 1963; 32: 338-343.
- ¹⁵Wilson JM, Jungner G. Principles and practice of screening for disease. Geneva: World Health Organisation; 1968.p.26-39.
- ¹⁶Millington 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 Inherit Metab Dis* 1990; 13:321-324.
- ¹⁷Saudubray JM, Desguerre I, Sedel F, Charpentier C, Wilcken B, Touvati G, Huber J, Prietsch V, Ogier de Bauluy H, Walter J, Wraith J. Diagnosis and Treatment: general principles. In: Fernandes, Saudubray, Vandenberghe, Walter (eds). *Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment*. 4^a Ed. Heidelberg: Springer, 2006. p.1-97.
- ¹⁸Frazier DM, Millington DS, McCandless SE, Koeberl DD, Weavil SD, Chaing SH, Muenzer J. The tandem mass spectrometry newborn screening experience in North Carolina: 1997-2005. *J Inherit Metab Dis* 2006; 29:76-85.
- ¹⁹American Academy of Pediatrics, Committee on Genetics: Issues in newborn screening. *Pediatrics* 1992; 89:345-349.
- ²⁰NCCLS. Obtención de sangre sobre papel de filtro en programas de cribado neonatal; Normativa aprobada. LA4-A3.Octubre, 1997.
- ²¹NCCLS. Blood Collection on Filter Paper for Newborn Screening Program; Approved Standars-Fifth Edition. LA4-A5. November, 2003.
- ²²Newborn Screening Guidelines for Premature and/or Sick Newborns; Propodes Guideline. CLSI document I/LA31-P. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
- ²³Chace DH, DiPerna JC, Naylor EW. Laboratory integration and utilization of tandem mass spectrometry in neonatal screening: a model for clinical mass spectrometry in the next millennium. *Acta Paediatr* 1999; 88 (432): 45-47.
- ²⁴Rashed MS, Ozad PT, Bucknall MP, Little D. Diagnosis of inborn errors of metabolism from blood spots by acylcarnitines and aminoacids profiling using automated electrospray tandem mass spectrometry. *Pediatr Res* 1995; 38: 324-331.

-
- ²⁵Fraga JM, Cocho JA, Castiñeiras DE, Couce ML, Bóveda MD, Iglesias AJ, Alonso Fernández JR. Aspectos actuales en el cribado neonatal, aplicación de la espectrometría de tándem masas al diagnóstico precoz de los Errores Congénitos del Metabolismo. *An Esp Pediatr* 2000; 53 (S2): 81-86.
- ²⁶Bodamer OA, Hoffmann GF, Lindner M. Expanded newborn screening in Europe 2007. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30: 439-444.
- ²⁷Waisbren SE. Newborn Screening for Metabolic Disorders. *JAMA* 2006; 296: 993-995.
- ²⁸Chace DH, Kalas TA, Naylor EW. Use of Tandem Mass Spectrometry for Multianalyte Screening of Dried Blood Specimens from Newborns. *Clin Chem* 2003; 49:1797-1817.
- ²⁹Walter JH, Patterson A, Till J, Besley GTN, Fleming G, Henderson MJ. Bloodspot acylcarnitine and amino acid analysis in cord blood samples: efficacy and reference data from a large cohort study. *J Inherit Metab Dis* 2009; 32: 95-101.
- ³⁰Wilcken B. The consequences of extended newborn screening programmes: Do we know who needs treatment?. *J Inherit Metab Dis* 2008; 31:173-177.
- ³¹Yost RA, Enke CG. Triple quadrupole mass spectrometry for direct mixture analysis and structure elucidation. *Anal Chem* 1979; 51: 1251-1264.
- ³²Chace DH, Pons R, Chiriboga CA, McMahon DJ, Tein I, Naylor EW, De Vivo DC. Neonatal blood carnitine concentrations: normative data by electrospray tandem mass spectrometry. *Ped Res* 2003; 53: 823-829.
- ³³Cavedon CT, Bourdoux P, Mertens K, Van Thi HV, Herremans N, De Laet C, Goyens P. Age-related variations in acylcarnitine and free carnitine concentrations measured by tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2005; 51: 745-752.
- ³⁴Klein J. Newborn screening from an international perspective- different countries, different approaches. *Clin Biochem* 2011; 44: 471-472.
- ³⁵Newborn screening: toward a uniform screening panel and system. *Genet Med* 2006; 81: S1-S252.
- ³⁶Marín JL, Aldamiz L, Castiñeiras D, Dalmau J, Fernández A, González-Lamuño D, Juan MJ, Jiménez L, Pérez-Cerdá C. Programas de cribado neonatal en España: Actualización y Propuestas de Futuro. Documento de consenso. Real Patronato sobre discapacidad, Ministerio de Sanidad y Política Social. Gobierno de España. Madrid; 2010; p. 9-13.

-
- ³⁷American College of Medical Genetics Newborn Screening Expert Group. Newborn screening: toward a uniform screening panel and system-executive summary. *Pediatrics* 2006; 117: S296-S307.
- ³⁸Vilarinho L, Rocha H, Sousa C, Marcao A, Fonseca H, Bogas M, Vaz Osorio R. Four years of expanded newborn screening in Portugal with tandem mass spectrometry. *J Inherit Metab Dis* 2010. DOI:10.1007/s10545-010-9048-z.
- ³⁹Harms E; Olgemöller B. Neonatal screening for metabolic and endocrine disorders. *Dtsch Aerztebl Int* 2011; 108: 11-22.
- ⁴⁰Kasper DC, Ratschmann R, Metz TF, Mechtler TP, Möslinger D, Konstantopoulou V, Item CB, Pollak A, Herkner KR. The national Austrian newborn screening program-eight years experience with mass spectrometry. Past, present, and future goals. *Wien Klin Wochenschr* 2010; 122: 607-613.
- ⁴¹Alonso-Fernandez JR, Carpinteiro MI, Baleato J, Fidalgo J. Vertical sándwich-type continuous/evaporative TLC with fixed mobile phase volume for separating sugars clinical relevance in paper-borne urine and blood samples in newborn screening. *J Clin Lab Anal* 2010; 24: 106-112.
- ⁴²Blau N, Bélanger-Quintana A, Demirkol M, Feillet F, Giovannini M, MacDonald A, Trefz FK, Van Spronsen F; European PKU centers. Management of phenylketonuria in Europe: Survey results from 19 countries. *Mol Genet Metab* 2010; 99: 109-115.
- ⁴³Blau N, Van Spronsen FJ, Levy HL. Phenylketonuria. *Lancet* 2010; 376: 1417-1427.
- ⁴⁴Khemir S, Siala H, Taieb S, Cherif W, Azzouz H, Kéfi R, Abdelhak S, Khouja N, Tebib N, Massaoud T, Ben Dridi MF, Kaabachi N. Screening of three Mediterranean phenylketonuria mutations in Tunisian families. *J Genet* 2012; 91: 91-94.
- ⁴⁵Maitusong R, Japaer R, Zheng-yan Z, Ru-lai Y, Xiao-lei H, Hua-qing M. Newborn screening in Zhejiang, China. *Chin Med J* 2012; 125: 702-704.
- ⁴⁶Jensen UG, Brandt NJ, Christensen E, Skovby F, Norgaard-Pedersen B, Simonsen H. Neonatal screening for galactosemia by quantitative analysis of hexose monophosphates using tandem mass spectrometry: a retrospective study. *Clin Chem* 2001; 47: 1364-1372.
- ⁴⁷Berry GT, Segal S, Gitzelmann R. Disorders of galactose metabolism. In: Fernandes J, Saudubray JM, Van den Berghe G, Walter JH (eds). *Inborn metabolic diseases. Diagnosis and treatment*. 4^a Ed. Heidelberg: Springer; 2006.p.121-130.

-
- ⁴⁸Dalmau Serra J, Fernández Sánchez A, Sánchez-Valverde Visus F, Vitoria Miñana I. Enfermedad de orina de jarabe de arce. En: Sanjurjo P, Baldellou A (eds). Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias. 3ª Ed. Madrid. Ergón; 2010. p.487-498.
- ⁴⁹Couce Pico ML, Castiñeiras Ramos DE, Bóveda Fontán MD, Iglesias Rodríguez AJ, Cocho de Juan JA, Fraga Bermúdez JM. Avances en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de jarabe de arce, experiencia en Galicia. *An Pediatr* 2007; 67: 337-343.
- ⁵⁰Díaz Fernández C, De la Vega Bueno A, Jara Vega PP. Tirosinemias. En: Sanjurjo P, Baldellou A (eds). Diagnóstico y Tratamiento de las Enfermedades Metabólicas Hereditarias, 3ª Ed. Madrid: Ergón; 2010. p.449-464.
- ⁵¹Naughten ER, Yap S, Mayne PD. Newborn screening for homocystinuria: Irish and world experience. *Eur J Pediatr* 1998; 157: S84-S87.
- ⁵²Couce ML, Castiñeiras D, López Sousa M, Fernández Seara MJ, Eirís J, Cocho JA. Importancia del diagnóstico precoz y el tratamiento temprano en el pronóstico de la aciduria glutárica tipo I. *An Pediatr* 2008; 69: 239-243.
- ⁵³Uematsu M, Sakamoto O, Sugawara N, Kumagai N, Morimoto T, Yamaguchi S, Hasegawa I, Kobayashi H, Ihara K, Yoshino M, Watanabe I, Inokuchi T, Yokoyama T, Kiwaki K, Nakamura K, Endo F, Tsuchiya S, Ohura T. Novel mutations in five Japanese patients with 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency. *J Hum Genet* 2007; 52: 1040-1043.
- ⁵⁴Scaglia F, Lee B. Clinical, biochemical, and molecular spectrum of hyperargininemia due to arginase I deficiency. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2006; 142: 113-120.
- ⁵⁵Wolf B. Worldwide survey of neonatal screening for biotinidase deficiency. *J Inher Metab Dis* 1991; 14: 923-927.
- ⁵⁶Milánkovics I, Kámory E, Csókay B, Fodor F, Somogyi C, Schuler A. Mutations causing biotinidase deficiency in children ascertained by newborn screening in Western Hungary. *Mol Genet Metab* 2007; 90: 345-348.
- ⁵⁷Schulze A, Lindner M, Kohlmüller D, Olgemöller K, Mayatepek E, Hoffmann GF. Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism by electrospray ionization-tandem mass spectrometry: results, outcome and implications. *Pediatrics* 2003; 111: 1399-1406.

-
- ⁵⁸Juan-Fita MJ, Egea-Mellado JM, González-Gallego I, Moya-Quiles MR, Fernández-Sánchez A. Expanded newborn screening in the Region of Murcia, Spain. Three-years experience. *Med Clin* 2012; 139 (13): 566-571.
- ⁵⁹Huang XW, Yang JB, Tong F, Yang RL, Mao HQ, Zhou XL et al. Screening for neonatal inborn errors of metabolism by electrospray ionization-tandem mass spectrometry and follow-up. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 2011; 49: 765-770.
- ⁶⁰Rebollido-Fernández MM, Castiñeiras DE, Bóveda MD, Couce ML, Cocho JA, Fraga JM. Development of electrospray ionization tandem mass spectrometry methods for the study of a high number of urine markers of inborn errors of metabolism. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2012; 26: 2131-2144.
- ⁶¹La Marca G, Malvagia S, Casetta 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-S404.
- ⁶²La Marca G, Malvagia S, Pasquini E, Innocenti M, Donati MA, Zammarchi E. Rapid 2nd-Tier test for measurement of 3-OH-propionic and methylmalonic acids on dried blood spots: reducing the false-positive rate for propionylcarnitine during expanded newborn screening by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2007; 53: 1364-1369.
- ⁶³Nagamani SCS, Erez A, Lee B. Argininosuccinate Lyase Deficiency. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, Adam MP, editors. *GeneReviews™* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle. 2011 [updated 2012 Feb 02].
- ⁶⁴Gallagher RC, Cowan TM, Goodman SI, Enns GM. Glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency and newborn screening: retrospective analysis of a low excretor provides further evidence that some cases may be missed. *Mol Gen Metab* 2005; 86: 417-420.
- ⁶⁵Tortorelli S, Hahn SH, Cowan TM, Brewster TG, Rinaldo P, Matern D. The urinary excretion of glutarylcarnitine is an informative tool in the biochemical diagnosis of glutaric acidemia type I. *Mol Genet Metab* 2005, 84: 137-143.
- ⁶⁶Han LS, Ye J, Qiu WJ, Zhang HW, Wang Y, Ji WJ, Gao XL, Li xy, Jin J, Gu XF. Application of succinylacetone levels measurement in the blood and urine in the diagnosis of tyrosinemia type 1. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*, 2012; 50: 126-130.
- ⁶⁷Dionisi-Vici C, Deodato F, Röschinger W, Rhead W, Wilcken B. "Classical" organic acidurias, propionic aciduria, methylmalonic aciduria and isovaleric aciduria: long-term

outcome and effects of expanded newborn screening using tandem mass spectrometry. *J Inherit Metab Dis* 2006; 29: 383-389.

⁶⁸Bijarnia S, Wiley V, Carpenter K, Christodoulou J, Ellaway CJ, Wilcken B. Glutaric aciduria type I: outcome following detection by newborn screening. *J Inherit Metab Dis* 2008, 31: 503-507.

⁶⁹Wilcken B, Haas M, Joy P, Bowling F, Carpenter K, Christodoulou J, Cowley D, Ellaway C, Fletcher J, Kirk EP, Lewis B, McGill J, Peters H, Pitt J, Ranieri E, Yaplitto-Lee J, Boneh A. Expanded Newborn Screening: Outcome in screened and unscreened patients at age 6 years. *Pediatrics* 2009; 124: 241-248.

⁷⁰Spiekerkoetter U, Lindner M, Santer R, Grotzke M, Baumgartner MR, Boehles H, Das A, Haase C, Hennerman JB, Karall D, de Klerk H, Knerr I, Koch HG, Plecko B, Röschinger W, Schwab KO, Scheible D, Wijburg FA, Zschocke J, Mayatepek E, Wendel U. Management and outcome in 75 individuals with long-chain fatty acid oxidation defects: results from a workshop. *J Inherit Metab Dis* 2009; 32: 488-497.

⁷¹Möslinger D, Stöckler-Ipsiroglu S, Sheibenreiter S, Tiefenthaler M, Mühl A, Seidl R, Strobl W, Plecko B, Suormala T, Baumgartner ER. Clinical and neuropsychological outcome in 33 patients with biotinidase deficiency ascertained by nationwide newborn screening and family studies in Austria. *Eur J Pediatr* 2001; 160: 277-282.

⁷²Van Maldegem BT, Wanders RJ, Wijburg FA. Clinical aspects of short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 2010; 33: 507-511.

⁷³Grünert SC, Stucki M, Morscher RJ, Suormala T, Bürer C, Burda P, Christensen E, Ficicioglu C, Herwig J, Kölker S, Möslinger D, Pasquini E, Santer R, Schwab KO, Wilcken B, Fowler B, Yue WW, Baumgartner MR. 3-Methylcrotonyl-CoA Carboxylase deficiency: clinical, biochemical, enzymatic and molecular studies in 88 individuals. *Orphanet J Rare Dis*. 2012; 7: 31.

⁷⁴Couce ML, Pérez-Cerdá C, García Silva MT, García Cazorla A, Martín Hernández E, Castiñeiras D, Pineda M, Navarrete R, Campistol J, Fraga JM, Pérez B, Ugarte M. Clinical and genetic findings in patients with biotinidase deficiency detected through newborn screening or selective for hearing loss inherited metabolic disease. *Med Clin* 2011;137: 500-503.

⁷⁵Couce ML, Bóveda MD, Castiñeiras DE, Corrales FJ, Mora MI, Fraga JM, Mudd SH. Hypermethioninaemia due to methionine adenosyltransferase I/III (MAT I/III)

deficiency: diagnosis in a expanded neonatal screening programme. *J Inherit Metab Dis.* 2008; 31: S233-S239.

⁷⁶Ficicioglu C, Payan I. 3-Methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: metabolic decompensation in a noncompliant child detected through newborn screening. *Pediatrics* 2006; 118: 2555-2556.

⁷⁷Waisbren SE, Levy HL, Noble M, Matern D, Gregersen N, Pasley K, Marsden D. Short-chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD) deficiency: an examination of the medical and neurodevelopmental characteristics of 14 cases identified through newborn screening or clinical symptoms. *Mol Genet Metab.* 2008; 163: 76-80.

⁷⁸Couce ML, Baña A, Bóveda MD, Pérez-Muñuzuri A, Fernández-Lorenzo JR, Fraga JM. Inborn errors of metabolism in a neonatology unit: impact and long-term results. *Pediatr Int* 2011; 53:13-17.

⁷⁹Walter JH. Arguments for early screening: a clinician's perspective. *Eur J Pediatr* 2003; 162: S2-S4.

⁸⁰Rebollido M, Cocho JA, Castiñeiras D, Bóveda MD, Fraga JM. Aplicación de la Espectrometría de masas en tándem al análisis de aminoácidos, acilcarnitinas, acilglicinas y ácidos orgánicos en muestras de orina en papel. *Química Clínica* 2006; 25: 64-74.

⁸¹Tu w, He J, Dai F, Wang X, Li Y. Impact of inborn errors of metabolism on admission in a neonatal intensive care unit- a prospective cohort study. *Indian J Pediatr* 2012; 79: 494-500.

⁸²Jouvet P, Touati G, Lesage F, Duplic L, Tucci M, Saudubray JM, Hubert P. Impact of inborn errors of metabolism on admission and mortality in a pediatric intensive care unit. *Eur J Pediatr* 2007; 166: 461-465.

⁸³Moure JD, Couce ML, Pérez Muñuzuri A, Fernández Lorenzo JR. Tratamiento de urgencia y en fase aguda de un paciente con citrulinemia. *An Pediatr* 2010; 72: 88-89.

⁸⁴Hoffmann GF, Von Kries R, Klose D, Lindner M, Schulze A, Muntau AC, Röschinger W, Liebl B, Mayatepek E, Roscher AA. Frequencies of inherited organic acidurias and disorders of mitochondrial fatty acid transport and oxidation in Germany. *Eur J Pediatr* 2004; 163: 76-80.

⁸⁵Waisbren S, White DA. Screening for cognitive and social-emotional problems in individuals with PKU: Tools for use in the metabolic clinic. *Mol Genet Metab* 2010; 99: S96-S99.

-
- ⁸⁶Demirkol M, Gizewska M, Giovannini M, Walter J. Follow up of phenylketonuria patients. *Mol Genet Metab* 2011; 104: S31-S39.
- ⁸⁷Van Spronsen FJ, Huijbregts SCJ, Bosch am, Leuzzi V. Cognitive, neurophysiological, neurological and psychosocial outcomes in early-treated PKU-patients: A start toward standardized outcome measurement across development. *Mol Genet Metab* 2011; 104: S45-S51.
- ⁸⁸González JM, Gutiérrez AP, Gassió R, Fusté ME, Vilaseca MA, Campistol J. Neurological complications and behavioral problems in patients with phenylketonuria in a follow-up unit. *Mol Genet Metab* 2011; 104:S73-S79.
- ⁸⁹Desviat LR, Pérez B, Gámez A, Sánchez A, García MJ, Martínez-Pardo M, Marchante C, Bóveda D, Baldellou A, Arena J, Sanjurjo P, Fernández A, Cabello ML, Ugarte M. Genetic and phenotypic aspects of phenylalanine hydroxylase deficiency in Spain: molecular Surrey by regions. *Eur J Hum Gen* 1999; 7: 386-392.
- ⁹⁰Dipple KM, McCabe E. Phenotypes of patients with “simple” mendelian disorders are complex traits: thresholds, modifiers, and systems dynamics. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 1729-1735.
- ⁹¹Scriver CR. The PAH gene, phenylketonuria, and a paradigm shift. *Human Mutation* 2007; 28: 831-845.
- ⁹²Couce ML, Bóveda MD, Valerio E, Pérez Muñuzuri A, Fraga JM. Long-Term pharmacological management of Phenylketonuria, including patients below the age of 4 years. *JIMD Reports* 2011; DOI 10,1007/8904-2011-53.
- ⁹³Zimmermann M, Jacobs P, Fingerhut R, Torresani T, Thöny B, Blau N, Baumgartner MR, Rohrbach M. Positive effect of a simplified diet on blood phenylalanine control in different phenylketonuria variants, characterized by newborn BH4 loading test and PHA analysis. *Mol Genet Metab* 2012; 106: 264-268.
- ⁹⁴Leuret O, Barth M, Kuster A, Eyer D, De Parscau L, Odent S, Gilbert-Dussardier B, Feillet F, Labarthe F. Efficacy and safety of BH4 before the age of 4 years in patients with mild phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis* 2012; 35: 975-981.
- ⁹⁵Couce ML, Aldámiz-Echevarría L, Baldellou A, Blasco J, Bueno MA, Dalmau J, De la Vega A, Del Toro M, Díaz c, Lama R, Marrero M, Navas VM, Pintos G. Recomendaciones y manejo de la tirosinemia hereditaria tipo I o tirosinemia hepatorenal. *An Pediatr* 2010; 73: 279.e1-4.

-
- ⁹⁶Raimann E, Cornejo V, Arias C, Cabello JF, Castro G, Fernández E, de la Parra A. Evolución clínica de pacientes chilenos con tirosinemia tipo I tratados con NTBC. *Rev Med Chil* 2012; 140:169-175.
- ⁹⁷Thimm E, Richter-Werkle R, Kamp G, Molke B, Herebian D, Klee D, Mayatepek E, Spiekerkoetter U. Neurocognitive outcome in patients with hypertyrosinemia type I after long-term treatment with NTBC. *J Inherit Metab Dis* 2012; 35: 263-268.
- ⁹⁸Holme E, Lindstedt S. Nontransplant treatment of tyrosinemia. *Clin Liver Dis* 2000; 4: 805-814.
- ⁹⁹Masurel-Paulet A, Poggi-Bach J, Rolland MO, Bernard O, Guffon N, Dobbelaere E, Sarles J, de Baulny HO, Touati G. NTBC treatment in tyrosinaemia type I: long term outcome in French patients. *J Inherit Metab Dis* 2008; 31: 81-87.
- ¹⁰⁰Blois B, Ridell K, Dooley K, Dyack S. Newborns with C₈-acylcarnitine level over the 90th centile have an increased frequency of the common MCAD 985A>G mutation. *J Inherit Metab Dis* 2005; 28: 551-556.
- ¹⁰¹Pandor A, Eastham J, Beverley C, Chilcott J, Paisley S. Clinical effectiveness and cost-effectiveness of neonatal screening for inborn errors of metabolism using tandem mass spectrometry: a systematic review. *Health Technol Assess* 2004; 8: 1-121.
- ¹⁰²Wilcken B. Fatty acid oxidation disorders: outcome and long-term prognosis. *J Inherit Metab Dis* 2010; 33: 501-506.
- ¹⁰³Spiekerkoetter U. Mitochondrial fatty acid oxidation disorders: clinical presentation of long-chain fatty acid oxidation defects before and after newborn screening. *J Inherit Metab Dis* 2010; 33: 527-532.
- ¹⁰⁴Schweitzer S, Shin Y, Jakobs C, Brodehl J. Long-term outcome in 134 patients with galactosemia. *Eur J Pediatr* 1993; 152: 36-43.
- ¹⁰⁵Bosch AM. Classical galactosemia revisited. *J Inherit Metab Dis* 2006; 29: 516-525.
- ¹⁰⁶Wolf B. Disorders of biotina metabolism. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds). *The metabolic and molecular bases of inherit disease*. New York: McGraw-Hill; 2001.p.3935-3962.
- ¹⁰⁷Wolf B. The neurology of biotinidase deficiency. *Mol Genet Metab* 2011; 137: 500-503.
- ¹⁰⁸Wolf B. Clinical issues and frequent questions about biotinidase deficiency. *Mol Genet Metab* 2010; 100: 6-13.

¹⁰⁹Hoffmann GF, Athanassopoulos S, Burlina AB, Duran M, de Klerk JB, Lehnert W, Leonard JV, Monavari AA, et al. Clinical course, early diagnosis, treatment, and prevention of disease in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Neuropediatrics* .1996; 27: 115-123.

¹¹⁰Lindner M, Kölker S, Schulze A, Christensen E, Greenberg CR, Hoffmann GF. Neonatal screening for glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 2004; 27: 851-859.

¹¹¹Kölker S, Christensen E, Leonard JV, Greenberg CR et al. Diagnosis and management of glutaric aciduria type I- revised recommendations. *J Inherit Metab Dis* 2011; 34: 677-694.

¹¹²Hawkins PN, Lachmann HJ, McDermott MF. Interleukin-1-receptor antagonist in the Muckle-Wells syndrome. *N Engl J Med* 2003; 348: 2583-2584.

¹¹³Goldbach-Mansky R, Dailey NJ, Canna SW, et al. Neonatal-onset multisystem inflammatory disease responsive to interleukin-1 β inhibition. *N Engl J Med* 2006; 355: 581-592.

¹¹⁴Neven B, Valayannopoulos V, Quartier P, Blanche S, Prieur AM, Debré M, Rolland MO, Rabier D, Cuisset L, Cavazzana-Calvo M, de Lonlay P, Fischer A .Allogeneic bone marrow transplantation in mevalonic aciduria. *N Engl J Med* 2007; 356: 2700-2703.

¹¹⁵Chaudhury S, Hormaza L, Mohammad S, Lokar J, Ekong U, Alonso EM, Wainwright MS, Kletzel M, Whittington PF. Liver transplantation followed by allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for atypical mevalónica ciduria. *Am J Trasplant* 2012; 12: 1627-1631.