

## Provas de segundo nível para o rastreio neonatal da hiperplasia congénita das suprarrenais

### Second tier tests for neonatal screening of congenital adrenal hyperplasia

Ana Leal<sup>1,2</sup>, Hugo Rocha<sup>1,2</sup>, Marlene Mota<sup>2</sup>, Laura Vilarinho<sup>1</sup>

a.catarina.leal@insa.min-saude.pt

(1) Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética, Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto, Portugal

(2) Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto, Porto, Portugal

#### \_Resumo

O rastreio neonatal tem um papel essencial na deteção precoce da Hiperplasia Congénita das Suprarrenais, numa fase pré-sintomática, permitindo uma institucionalização atempada de tratamento com melhoras no curso clínico do recém-nascido. O marcador utilizado para efeitos de rastreio neonatal, é a 17- $\alpha$ -hidroxiprogesterona (17-OHP), quantificada em cartão de Guthrie por fluoroimunoensaio. No entanto, este marcador origina classicamente um elevado número de falsos positivos, sobretudo em recém-nascidos de baixo peso e/ou prematuros. De forma a contornar esta limitação, a estratégia preconizada passa pelo ajuste dos valores de referência da 17-OHP, em função do peso e/ou idade gestacional e a utilização de provas de segundo nível, através da análise de perfis de esteroides, em sangue em papel.

Neste trabalho foi levada a cabo a definição de valores de referência para a 17-OHP (estratificados por peso e idade gestacional) adaptados à população portuguesa de recém-nascidos e foram implementadas as provas de segundo nível. Da conjugação destas duas estratégias, resulta uma abordagem que se traduzirá numa considerável melhoria de sensibilidade e especificidade, caso se considere no futuro a introdução do rastreio desta patologia no Programa Nacional de Rastreio Neonatal.

#### \_Abstract

Neonatal screening has an essential role in the early detection of Congenital Adrenal Hyperplasia in a pre-symptomatic phase, allowing an early institutionalization of treatment with improvements in the clinical course of the newborn. The marker used for neonatal screening purposes is 17- $\alpha$ -hydroxyprogesterone (17-OHP), quantified in Guthrie cards by fluoroimmunoassay. However, this marker classically leads to a high number of false positives, especially in low birth weight and/or premature newborns. To overcome this limitation, various screening programs resort to the adjustment of the reference values of 17-OHP, according to weight and/or gestational age and the use of second-tier tests, through the analysis of steroid profiles, in dried blood spots.

In this work, the definition of reference values for 17-OHP (stratified by weight and gestational age) adapted to the Portuguese population of newborns was carried out and the second-tier tests were implemented. The combination of stratified reference values and the use of these second-tier tests results in an approach that will translate into a considerable improvement in sensitivity and specificity, if the introduction of screening for this pathology in the National Neonatal Screening Program is considered in the future.

#### \_Introdução

A Hiperplasia Congénita das Suprarrenais (HCSR) compreende um grupo de doenças genéticas com um modo de transmissão autossómica recessiva, que pode ter origem em defeitos em uma de cinco enzimas, envolvidas na biossíntese do cortisol, pelas glândulas suprarrenais (21-hidroxilase, 11- $\beta$ -hidroxilase, 3- $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase, 17- $\alpha$ -hidroxilase e a StAR - *steroidogenic acute regulatory protein*) (1). A HCSR por défice de 21-hidroxilase, que se deve a mutações no gene *CYP21A2* (1-3), representa cerca de 90 a 95% dos casos desta patologia e por isso é reiteradamente considerado sinónimo de HCSR (4,5). Esta apresenta uma ampla variabilidade clínica que se traduz num vasto espectro de sintomas. Nas formas clássicas, as manifestações clínicas podem surgir já durante o período pré-natal, por norma mais severas, sendo subdivididas entre formas com perda de sal e virilizantes simples. Já, as formas não clássicas, podem apresentar manifestações clínicas em idade mais tardia, sendo que alguns pacientes podem ser assintomáticos (6). A HCSR clássica apresenta uma incidência global de 1 em cada 15.000 nados-vivos, sendo esta semelhante em ambos os sexos. Por sua vez, a forma não clássica, apesar de sub-diagnosticada, é mais comum, estimando-se que tenha uma incidência de 1 em cada 1000 nados-vivos (7-9).

O diagnóstico da deficiência de 21-hidroxilase deve ser ponderado em recém-nascidos com ambiguidade sexual e perda de sal, hipotensão ou hipoglicemia. Analiticamente, a hiponatremia e hipercalemia com aumento da atividade plasmática da renina são encontradas na forma com perda de sal. A alteração bioquímica mais característica da HCSR



artigos breves\_ n. 9

por deficiência de 21-hidroxilase é o aumento da 17 $\alpha$ -OHP, mas que não é específico, podendo também pode ser observado na deficiência em 11- $\beta$ -hidroxilase (10-12).

Entre 1986 e 1987, foi efetuado em Portugal um estudo-piloto para o Rastreio Neonatal da HCSR em 100.000 recém-nascidos, tendo sido detetados sete casos positivos (prevalência ao nascimento de 1/14.300), mas onde apenas se conseguiu antecipar o diagnóstico clínico em dois casos, devido ao facto de à data a média de início de tratamento ser 19 dias de vida. Por esta razão a avaliação do estudo-piloto não foi positiva e atualmente, o Programa Nacional de Rastreio Neonatal (PNRN) não inclui a HCSR no seu painel de doenças rastreadas (13). A nível mundial, já são vários os países que incluem a Hiperplasia Congénita das Suprarrenais no rastreio neonatal, tendo em vista, essencialmente, a identificação da forma clássica com perda de sal e a virilizante simples, o que se traduz numa significativa diminuição da morbilidade e mortalidade associadas (1,14). Além de permitir a rápida administração do tratamento adequado (uso de mineralocorticoides ou glicocorticoides), prevenindo crises de perda de sal e morbimortalidade associada, a deteção precoce possibilita a correta classificação do género em recém-nascidos do sexo feminino com virilização dos órgãos genitais externos e o diagnóstico precoce da forma virilizante simples, evitando a hiperandrogenização durante a infância (15,16).

Todavia, a utilização da 17-OHP como marcador primário do rastreio desta doença resulta num elevado número de falsos positivos, devido a reações cruzadas com metabolitos precursores deste esteroide, verificadas principalmente nas primeiras 48h após o nascimento e em recém-nascidos pré-termo e/ou de baixo peso ou até mesmo devido a patologias associadas, stress e variação biológica (17,18). No sentido de mitigar este problema foi reportada a utilização de provas de segundo nível recorrendo a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em *tandem* (LC-MS/MS). Desta forma, o doseamento da 17-OHP de forma mais específica por LC-MS/MS, conjuntamente com a quantificação de outros metabolitos como a androstenediona (A4), 11-desoxicortisol (11-D), 21-desoxicortisol (21-D), cortisol (F) e particularmente, o uso da razão (17-OHP+A4) /F, fornecem informações adicionais importantes,

melhorando significativamente a especificidade do protocolo e por consequência o seu valor preditivo positivo (6,19).

O desenvolvimento das provas de segundo nível associadas ao facto de o PNRN ter aos dias de hoje uma média de início de tratamento de 9,3 dias, faz com que se volte a equacionar o rastreio desta patologia em Portugal, como aliás já se encontra vertido no Despacho n.º 7276/2019, de 16 de agosto que aprova o Programa Nacional de Rastreio Neonatal (20).

### \_Objetivo

Estabelecer valores de referência para o doseamento da 17- $\alpha$ -OH-progesterona em sangue seco em papel de filtro, numa população de recém-nascidos portugueses, tendo por base a idade gestacional e/ou peso e a implementação das provas de segundo nível por LC-MS/MS.

### \_Materiais e métodos

O doseamento da 17-OHP foi efetuado por fluoroimunoensaio de resolução temporal de fase sólida, em amostras anonimizadas residuais de sangue seco em papel de filtro de 1724 recém-nascidos, rececionadas no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge para efeitos de rastreio neonatal entre 2020 e 2023.

Assim, para este doseamento, o protocolo baseou-se no kit DELFIA® 17 $\alpha$ -OH-progesterona da Perkin Elmer. Este método utiliza uma reação competitiva entre a 17-OHP marcada com Európio (Eu) e a 17-OHP da amostra, que competem para locais limitados de ligação a anticorpos policlonais específicos para a 17-OHP de coelho. O danazol é usado para libertar a 17-OHP das proteínas ligadas. Um segundo anticorpo, contra IgG de coelho, separa os anticorpos ligados dos antigénios livres. A solução intensificadora dissocia os iões de Európio, formando quelatos fluorescentes, cuja intensidade é inversamente proporcional à quantidade de 17-OHP na amostra (10).

Tendo em vista a otimização dos valores de referência, foi calculado o percentil 99,5 da população saudável em estudo e tendo em conta os subgrupos previamente definidos pelo método de *Lahti*, em função da idade gestacional e do peso.

De seguida, para desenvolvimento e implementação das provas de segundo nível foi selecionada a técnica de LC-MS/MS. Esta trata-se de uma técnica que permite identificar e quantificar os esteroides em estudo (17-OHP, androstenediona, 11-desoxicortisol, 21-desoxicortisol e cortisol) com base nas suas razões massa/carga e padrões de fragmentação, oferecendo alta sensibilidade e especificidade. A implementação do procedimento experimental incluiu três fases principais: extração, separação cromatográfica e deteção por espectrometria de massa (19,21). Neste contexto, foram analisadas amostras de controlo externo de qualidade (CDC – *Center for Disease Control and Prevention* – Atlanta), amostras de recém-nascidos normais e duas amostras de doentes com HCSR (diagnosticados após apresentação de sintomas).

## Resultados

Para definir os grupos para os valores de referência de 17-OHP (em função da idade gestacional e peso) adequados, é primordial que o nível deste metabolito seja homogéneo. Para isso, foram seguidas as recomendações do Comité Nacional de Normas Laboratoriais Clínicas dos Estados Unidos da América (NCCLS). De forma a otimizar o ajuste dos valores de referência para a 17-OHP, utilizou-se o percentil 99,5, da população saudável em estudo e tendo em conta

os subgrupos previamente definidos pelo método de *Lahti*, em função da idade gestacional e do peso. Os resultados encontram-se apresentados na [tabela 1](#).

Com o intuito de obter resultados quantitativos, foram construídas curvas de calibração para cada um dos metabolitos em estudo, utilizando-se amostras certificadas do programa de controlo de qualidade do CDC. Obteve-se um coeficiente de correlação superior a 0,99 para todos os metabolitos a quantificar, com baixos limites de deteção e quantificação. A análise de amostras de indivíduos com HCSR revelou, como esperado, um aumento não apenas da 17-OHP, mas também da androstenediona e da razão (17-OHP+ androstenediona)/cortisol.

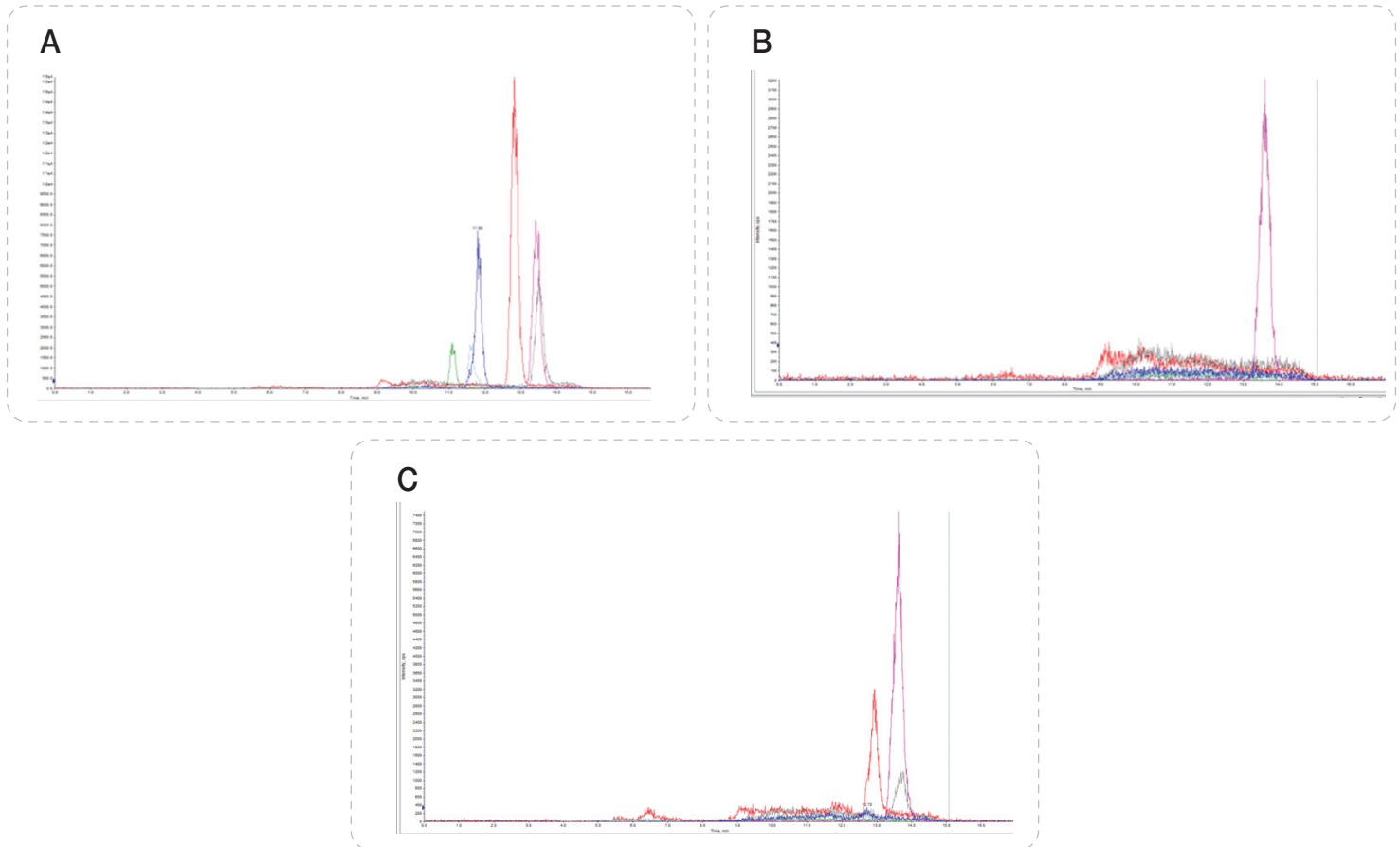
A implementação das provas de segundo nível, por espectrometria de massa em *tandem*, permitiu quantificar vários esteroides em sangue em papel, com altos níveis de sensibilidade e especificidade ([gráfico 1](#)):

Tabela 1: Percentil 99,5 de 17-OHP (nmol/L), em função do peso e idade gestacional.

Grupos	Peso (gramas)	Percentil 99,5 (nmol/L)
A	<1750	212,80
B	1750-2500	51,08
C	2500-3000	32,67
D	>3000	12,97

Grupos	Idade gestacional (semanas)	Percentil 99,5 (nmol/L)
I	<31	252,70
II	31-33	107,49
III	33-35	61,16
IV	35-36	38,03
V	36-37	28,43
VI	37-38	20,30
VII	38-39	14,94
VIII	>39	13,28

Gráfico 1: Perfil cromatográfico de esteroides obtido de uma amostra fornecida pelo controlo de qualidade externo (CDC) (A), um controlo normal (B) e um positivo para HCSR (C).



d<sub>5</sub>-17OHP - rosa, 17-OHP - cinza, androstenediona (A4) - vermelho, 11-desoxicortisol (11-D) - azul, 21-desoxicortisol (21-D) - azul-claro, cortisol (F) - verde.

## Discussão e conclusão

Este estudo comprovou a necessidade de efetuar uma estratificação dos valores de 17-OHP, no que diz respeito à idade gestacional e/ou peso, tendo sido definidos os intervalos e peso e idade gestacional que devem ser considerados e a variação da 17-OHP em cada um deles, servindo de suporte a uma futura definição dos valores de referência para a população portuguesa.

No entanto, a especificidade limitada do doseamento da 17-OHP por fluoroimunoensaio e as alterações decorrentes da prematuridade, resultam numa alta taxa de falsos positivos (FP) quando esta é utilizada como única abordagem ao rastreio (21-23). A alta taxa de FP ao rastreio, acarreta gastos económicos superiores a 10 vezes o gasto de uma amostra

considerada normal, acrescentando ainda a avaliação clínica, muitas vezes desnecessária, assim como ansiedade gerada nas famílias (24). Uma das estratégias para diminuição dos FP é a utilização das provas de segundo nível que são efetuadas sobre a amostra inicial do rastreio neonatal, quando o marcador primário do rastreio se encontra aumentado (17-OHP doseada por fluoroimunoensaio).

No caso do rastreio da HCSR a prova de segundo nível baseia-se numa cromatografia de esteroides, por LC-MS/MS, doseando para além da 17-OHP (de forma mais específica) outros marcadores secundários, nomeadamente, androstenediona (A4), cortisol (F), 21-desoxicortisol (21-D) e 11-desoxicortisol (11-D) e da aplicação da razão (17-OHP + androstenediona)/ cortisol (6).

Tendo em consideração a importância das provas de segundo nível para a eficácia da abordagem laboratorial ao rastreio da HCSR e tendo em vista uma eventual inclusão no painel de doenças rastreadas no PNRN, foi levado a cabo a sua implementação na Unidade de Rastreio de Neonatal, Metabolismo e Genética, o braço laboratorial do Programa Nacional de Rastreio Neonatal. Os resultados obtidos revelam uma especificidade e sensibilidade adequadas e uma eficiente quantificação dos metabolitos numa gama de concentrações clinicamente relevantes.

Sendo a cromatografia de esteroides uma prova extremamente específica, a sua adoção e inclusão no fluxograma de rastreio da HCSR permitirá não só os óbvios ganhos em especificidade (com a redução de falsos positivos), mas também de sensibilidade, pois permitirá definir os valores de referência do marcador primários em valores inferiores ao  $P_{99,5}$ , melhorando desta forma a sensibilidade, sem comprometer a especificidade.

O cálculo dos valores de referência da 17-OHP estratificados por idade gestacional e peso ajustados à população portuguesa e a implementação da cromatografia de esteroides como prova de segundo nível, cria bases para se equacionar o início de um novo estudo-piloto para o rastreio de HCSR em Portugal.

#### Referências bibliográficas:

- (1) Witchel SF. Congenital Adrenal Hyperplasia. *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 2017 Oct;30(5):520-534. Epub 2017 Apr 24. <https://doi.org/10.1016/j.jpaga.2017.04.001>
- (2) Turcu AF, Auchus RJ. Adrenal Steroidogenesis and Congenital Adrenal Hyperplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2015 Jun;44(2):275-96. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2015.02.002>
- (3) White PC, Grossberger D, Onufer BJ, et al. Two genes encoding steroid 21-hydroxylase are located near the genes encoding the fourth component of complement in man. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 Feb;82(4):1089-93. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.4.1089>
- (4) Azevedo T, Martins T, Lemos M, et al. Hiperplasia congénita da suprarrenal não clássica: aspetos relevantes para a prática clínica. *Rev Port End Diab Metab*. 2014;9(1):59-64. <https://doi.org/10.1016/j.rpedm.2013.12.001>
- (5) White PC, Bachega TA. Congenital adrenal hyperplasia due to 21 hydroxylase deficiency: from birth to adulthood. *Semin Reprod Med*. 2012 Oct;30(5):400-9. Epub 2012 Oct 8. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1324724>
- (6) de Hora MR, Heather NL, Webster D, et al. Birth Weight- or Gestational Age-adjusted Second-tier LCMSMS Cutoffs Improve Newborn Screening for CAH in New Zealand. *J Clin Endocrinol Metab*. 2021 Aug 18;106(9):e3390-99. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgab383>
- (7) Nimkarn S, Gangishetti PK, Yau M, et al. 21-Hydroxylase-Deficient Congenital Adrenal Hyperplasia. 2002 Feb 26 [updated 2016 Feb 4]. IN: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, et al.(eds). *GeneReviews*® [online]. Seattle (WA): University of Washington, 1993-2025. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1171/>
- (8) Merke DP, Bornstein SR. Congenital adrenal hyperplasia. *Lancet*. 2005 Jun 18-24;365(9477):2125-36. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66736-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66736-0)
- (9) Nimkarn S, Lin-Su K, New MI. Steroid 21 hydroxylase deficiency congenital adrenal hyperplasia. *Pediatr Clin North Am*. 2011 Oct;58(5):1281-300. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2011.07.012>
- (10) Wallac Oy. DELFIA® Neonatal 17 $\alpha$ -OH-progesterone kit: instrução de utilização. Turku, Finland, 2019.
- (11) Berry J, Betts P, Wood PJ. The interpretation of bloodspot 17 alpha-hydroxyprogesterone levels in term and pre-term neonates. *Ann Clin Biochem*. 1986 Sep;23 (Pt 5):546-51. <https://doi.org/10.1177/000456328602300510>
- (12) Honour JW. 17-Hydroxyprogesterone in children, adolescents and adults. *Ann Clin Biochem*. 2014 Jul;51(Pt 4):424-40. Epub 2014 Apr 7. <https://doi.org/10.1177/0004563214529748>
- (13) Osório RV, Vilarinho L, Soares JP. Rastreio nacional da fenilcetonúria, hipotirodismo congénito e hiperplasia congénita das suprarrenais. *Acta Med Port*. 1992 Mar;5(3):131-4. [www.actamedicportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/view/3215](http://www.actamedicportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/view/3215)
- (14) Sharma L, Momodu II, Singh G. Congenital Adrenal Hyperplasia. 2023 [Updated 2025 Jan 27]. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2025 Jan-. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448098/>
- (15) Dulin Iñiguez E, Ezquieta Zubicaray B. Cribado neonatal de hiperplasia suprarrenal congénita. *Endocrinol Diabetes Nutr (Engl Ed)*. 2018 Jan;65(1):1-4. Epub 2017 Dec 11. <https://doi.org/10.1016/j.endinu.2017.11.001>
- (16) Rhéaume E, Lachance Y, Zhao HF, et al. Structure and expression of a new complementary DNA encoding the almost exclusive 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase in human adrenals and gonads. *Mol Endocrinol*. 1991 Aug;5(8):1147-57. <https://doi.org/10.1210/mend-5-8-1147>
- (17) Gidlöf S, Wedell A, Guthenberg C, et al. Nationwide neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia in sweden: a 26-year longitudinal prospective population-based study. *JAMA Pediatr*. 2014 Jun;168(6):567-74. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2013.5321>
- (18) Heather NL, Seneviratne SN, Webster D, et al. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in New Zealand, 1994-2013. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015 Mar;100(3):1002-8. Epub 2014 Dec 12. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-3168>
- (19) Janzen N, Peter M, Sander S, et al. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia: additional steroid profile using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Jul;92(7):2581-9. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-2890>
- (20) Despacho n.º 7276/2019, de 16 de agosto. DR n.º 156/2019, Série II 2019-08-16: 141-47. Aprova o Programa Nacional do Rastreio Neonatal (PNRN) e determina a sua implementação pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P. [https://diariodarepublica.pt/dr/detalhe/despacho/7276-2019-124006819\\_c](https://diariodarepublica.pt/dr/detalhe/despacho/7276-2019-124006819_c)
- (21) Vogeser M, Parhofer KG. Liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS) -Technique and applications in endocrinology. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2007 Oct;115(9):559-70. <https://doi.org/10.1055/s-2007-981458>
- (22) Clayton PE, Miller WL, Oberfield SE, et al.; ESPE/ LWPES CAH Working Group. Consensus statement on 21-hydroxylase deficiency from the European Society for Paediatric Endocrinology and the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society. *Horm Res*. 2002;58(4):188-95. <https://doi.org/10.1159/000065490>
- (23) Berry J, Betts P, Wood PJ. The interpretation of bloodspot 17 alpha-hydroxyprogesterone levels in term and pre-term neonates. *Ann Clin Biochem*. 1986 Sep;23 (Pt 5):546-51. <https://doi.org/10.1177/000456328602300510>
- (24) Ng PC, Wong GW, Lam CW, et al. Pituitary-adrenal response in preterm very low birth weight infants after treatment with antenatal corticosteroids. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 Nov;82(11):3548-52. <https://doi.org/10.1210/jcem.82.11.4392>
- (25) Olgemöller B, Roscher AA, Liebl B, et al. Screening for congenital adrenal hyperplasia: adjustment of 17-hydroxyprogesterone cut-off values to both age and birth weight markedly improves the predictive value. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Dec;88(12):5790-4. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-021732>