DANIEL FIORDELISIO DE CARVALHO

**Avaliação da eficácia de diferentes testes confirmatórios na
triagem neonatal da hiperplasia adrenal congênita por
deficiência da 21-hidroxilase**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção de título de Doutor em
Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tânia Aparecida
Sartori Sanchez Bachega

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Carvalho, Daniel Fiordelisio de

Avaliação da eficácia de diferentes testes confirmatórios na triagem neonatal da hiperplasia adrenal congênita por deficiência da 21-hidroxilase / Daniel Fiordelisio de Carvalho. -- São Paulo, 2017.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Endocrinologia.

Orientador: Tânia Aparecida Sartori Sanchez Bachega.

Descritores: 1.Hiperplasia suprarrenal congênita 2.Triagem neonatal 3.Diagnóstico 4.Esteroide 21-hidroxilase 5.Insuficiência adrenal 6.Biologia molecular

USP/FM/DBD-007/17

Este trabalho foi realizado na Unidade de Suprarrenal, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42 da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em conjunto com a Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais - APAE DE SÃO PAULO, parcialmente subsidiado com o auxílio à pesquisa FAPESP (processo 2014/07878-4).

Dedicatória

Dedico esta tese aos meus queridos
filhos, Pedro e Luísa, e à minha amada
esposa Priscila, que sempre me apoiam
incondicionalmente.

Agradecimentos

É impossível não iniciar agradecendo à Profa. Dra. Tânia Sanchez Bachega, minha orientadora, há anos idealizadora deste trabalho. Dedicada, competente e conhecedora de todos os fluxos da triagem neonatal no Brasil, sempre colaborou com ideias úteis e pragmáticas para a execução desta tese, ensinando-me, apoiando e corrigindo-me. Estou certo de que estas próximas páginas, sem sua contribuição, não teriam o mesmo valor.

À APAE SÃO PAULO, que há anos realiza o primeiro teste da triagem neonatal de inúmeras doenças, desempenhando um papel fundamental no diagnóstico de milhares de pacientes e, através da parceria neste estudo, demonstrou a imensa preocupação em otimizar o fluxo da triagem neonatal no Brasil. À Giselle Yuri Hayashi, farmacêutica-bioquímica, que se divide entre a APAE e o Laboratório de Hormônios LIM/42 do Hospital das Clínicas, locais onde desempenha um papel fundamental na sinalização dos recém-nascidos com resultados alterados e se preocupa com cada caso como se fosse de sua família, um exemplo de dedicação e seriedade no trabalho. E a toda a equipe da Busca Ativa, analistas no laboratório, assistentes sociais, farmacêuticos, biólogos e médicos da APAE SÃO PAULO. À Superintendência e à Diretora Aracélia Costa, que em sua nova gestão abriu as portas para a parceria nesta pesquisa.

À Profa. Berenice Bilharinho de Mendonça, Titular da Disciplina de Endocrinologia da FMUSP, pelo constante apoio e pelas críticas construtivas.

Ao Dr. Vinícius Nahime de Brito, com quem sempre compartilhei minhas dúvidas estatísticas, por se tratar de um trabalho com número elevado de indivíduos, sempre muito disposto a me ouvir e opinar; e pelo incessante trabalho com as planilhas provenientes da APAE.

À Helena Panteliou Valassi e à Atecla Nunes Alves, que em meio a tanto trabalho de padronização da metodologia da cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas no LIM/42, realizaram os exames laboratoriais de todos os recém-nascidos incluídos neste estudo e ainda me recebiam para verificação de resultados adicionais. Este trabalho de casuística expressiva é fruto do esforço de vocês.

À Marcia Rodrigues, técnica do laboratório que, enquanto foi possível, realizou de maneira comparativa os exames pela metodologia do radioimunoensaio.

À Andresa de Santi Rodrigues, que executa a rotina de biologia molecular do LIM/42, responsável pela análise genética dos nossos pacientes, sempre disponível e dedicada a interpretar com rigor as amostras dos pacientes.

Às médicas Dra. Guiomar Madureira, Dra. Larissa Garcia Gomes, Mirela Miranda e Fernanda Cavalieri, pela agradável convivência na sala do ambulatório de hiperplasia adrenal congênita, com quem dividi momentos marcantes de minha vida profissional e pessoal.

Aos demais colegas pós-graduandos, companheiros de ambulatório, reuniões, viagens e almoços; vocês tornaram esta caminhada mais divertida.

Aos funcionários do LIM/42, que trabalham de maneira árdua na rotina do laboratório, desde a secretaria e recepção das amostras até a liberação do resultado dos exames e estocagem do soro dos pacientes. Cada um de vocês é parte de um corpo que funciona brilhantemente. E às secretárias da Disciplina de Endocrinologia Cida, Rosana, Senária, Nilda e Rosângela.

Aos pacientes do ambulatório de hiperplasia adrenal congênita e suas famílias, que dividem conosco a sua intimidade e nos delegam o cuidado com suas vidas, e aos pais dos recém-nascidos afetados pela doença, que confiam incondicionalmente em nossas orientações. Minha alegria é que seus filhos não sofrerão as mazelas do diagnóstico tardio desta doença.

Aos Drs. Madson Queiroz de Almeida, Claudio Kater e Heraldo Possolo de Souza, presentes em meu exame de qualificação, que contribuíram significativamente para a melhoria da qualidade deste trabalho. Obrigado por dedicarem o seu tempo e pelas valiosas sugestões. Espero ter atendido, neste trabalho final, à maior parte das colocações propostas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.

Ao amigo e companheiro de trabalho árduo Mauricio Daniel Gattaz, meu maior mentor na carreira profissional, sempre disponível para me ouvir e dar conselhos com atenção e carinho. Um exemplo de médico dedicado, estudioso e competente. Seu apoio para a conquista deste título foi fundamental.

Aos amigos do Pronto Socorro da Clínica Médica do Hospital das Clínicas: Glaura Alvarenga, Tiago Kunitake, Rodrigo Bomeny, Amanda Montal, Francisco Torggler, Lucas Marino, Leila Harima, Andressa Aurich, Flávia Azevedo e Fátima Nadalin, com quem compartilhei muito mais do que horas de plantão, meu obrigado pelo apoio.

Por fim, agradeço à minha querida mãe Pricila e meu pai Mauro, que dedicaram suas vidas à formação de todos os três filhos. Exemplos de trabalho e dedicação aos estudos, amorosos e orgulhosos da carreira de todos nós. Com a paternidade, entendi muito melhor a integralidade do investimento pessoal e profissional que realizaram em minha vida. Ao restante da minha família: minhas irmãs Camila e Cristiane, cunhados, meus sogros Ana e Edson e meus tios e primos, que não mediram esforços para que eu pudesse concluir este trabalho.

E a Deus, o autor da minha vida, que sempre me abençoou aproximando-me de pessoas fantásticas em minha caminhada profissional.

“Não tentes ser bem sucedido,
tenta antes ser um homem de valor”

Albert Einstein

Normatização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas em vigor no momento desta publicação:

- Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).
- Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.
- Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas

1	Introdução	1
1.1	Hiperplasia adrenal congênita por deficiência da 21-hidroxilase	2
1.2	Rastreamento neonatal da HAC-21OH	5
1.3	Primeiro teste de triagem: 17OHP neonatal no papel de filtro	8
1.4	Testes confirmatórios hormonais	11
1.5	Testes confirmatórios por biologia molecular	16
1.6	Justificativa do estudo.....	18
2	Objetivos	19
2.1	Objetivos gerais.....	20
2.2	Objetivos específicos.....	20
3	Casuística e métodos.....	21
3.1	Casuística.....	22
3.2	Dosagens hormonais.....	22
3.3	Estudo molecular do gene <i>CYP21A2</i>	26
4	Análise estatística	28
5	Resultados	31
5.1	Primeiro teste de triagem – N17OHP no papel de filtro	32
5.2	Testes confirmatórios no soro	36
5.3	Recém-nascidos afetados por HAC-21OH.....	43
5.4	Estudo molecular <i>CYP21A2</i>	51
6	Discussão.....	53
7	Conclusões	66
	Referências bibliográficas	70

Lista de figuras

Lista de figuras

Figura 1 – Esteroidogênese adrenal simplificada.	3
Figura 2 – Metabolização da 17OHP em RNs de termo, pré-termo e com HAC-21OH.	16
Figura 3 – Fatores para convocação dos RNs de acordo com peso ao nascimento.	33
Figura 4 – Taxas de convocação para coleta de teste confirmatório no papel de filtro e no soro por faixa de peso ao nascimento.	34
Figura 5 – Proporção de prematuros no total de recém-nascidos e dentre os com resultados falso-positivos.	35
Figura 6 – Fatores para coleta das amostras de soro em cada faixa de peso ao nascimento.	37
Figura 7 - Mediana do tempo de vida (dias) da criança na coleta da amostra de soro nos grupos controle, falso-positivos e afetados pela forma clássica da HAC-21OH.....	39
Figura 8 - Dosagem da 17OHP no soro nos grupos controle, falso-positivos e afetados pela forma clássica da HAC-21-OH.	40
Figura 9 - Valores do 21-deoxicortisol (21-DF) no soro nos grupos controle, falso-positivos e afetados pela forma clássica da HAC-21-OH.....	41
Figura 10 – Fluxograma dos recém-nascidos submetidos à triagem neonatal da HAC-21OH e que foram encaminhados para coleta de teste confirmatório no soro por alteração da N17OHP no papel de filtro.	47
Figura 11 – Paralelo entre a dosagem de 17-hidroxi-progesterona por RIE e por CL-MS/MS no soro nos RNs com resultados falso-positivos.....	50
Figura 12 – Proposta de fluxograma para a triagem neonatal da HAC no Brasil.	64

Lista de tabelas

Lista de tabelas

Tabela 1 - Valor de referência da 17OHP neonatal (N17OHP) por grupo de peso ao nascimento que corresponde ao percentil 99,5.....	23
Tabela 2 – Tempo de vida na coleta do teste do pezinho por faixa de peso ao nascimento e respectivas taxas de convocação.....	32
Tabela 3 - Taxas e número de convocações no primeiro teste no papel de filtro por faixa de peso ao nascimento.	34
Tabela 4 – Comparação da sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo da dosagem da 17OHP no soro por RIE e por CL-MS/MS.	38
Tabela 5 - Eficácia dos diferentes testes confirmatórios no soro para diagnóstico das formas clássicas da HAC-21OH.	42
Tabela 6 - Eficácia dos diferentes testes confirmatórios no soro para diagnóstico da forma perdedora de sal da HAC-21OH.....	43
Tabela 7 – Características clínicas, laboratoriais e genótipo dos recém-nascidos afetados pelas formas clássicas da HAC-21OH.	46
Tabela 8 - Características clínicas, laboratoriais e genótipo dos RNs assintomáticos e com resultados alterados no teste confirmatório pela metodologia CL-MS/MS.....	49
Tabela 9 – Frequências das mutações encontradas nos alelos dos RNs afetados pela forma clássica	52

Lista de abreviaturas

Lista de abreviaturas

17OHP	17-hidroxi-progesterona
21OH	Enzima 21-hidroxilase
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
APAE	Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais de São Paulo
CL-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em <i>tandem</i>
<i>CYP21A1P</i>	Pseudogene, naturalmente não transcrito
<i>CYP21A2</i>	Gene codificador da enzima 21-hidroxilase
DO	Diário oficial
DOC	Deoxicorticosterona
DP	Desvio padrão
E	Especificidade
F	Feminino
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FN	Falso negativo
FP	Falso positivo
HAC	Hiperplasia adrenal congênita
HAC-21OH	Hiperplasia adrenal congênita por deficiência da 21-hidroxilase
HC	Hospital das Clínicas
M	Masculino
mcg/dl	microgramas por decilitro
MS	Ministério da Saúde
N17OHP	17-hidroxi-progesterona neonatal
NC	Não clássica
ng/ml	nanogramas por mililitro
P450c21	Enzima 21-hidroxilase
PNTN	Programa Nacional de Triagem Neonatal
PS	Perdedora de sal
RN	Recém-nascido
ROC	<i>Receiver operating characteristic</i>
S	Sensibilidade
SRTN	Serviço de Referência em Triagem Neonatal
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TN	Triagem neonatal
VN	Verdadeiro negativo
VP	Verdadeiro positivo
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo
VS	Virilizante simples

RESUMO

Carvalho DF. **Avaliação da eficácia de diferentes testes confirmatórios na triagem neonatal da hiperplasia adrenal congênita por deficiência da 21-hidroxilase** [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

A hiperplasia adrenal congênita (HAC), mais comumente causada por deficiência da 21-hidroxilase (21OH), apresenta um espectro de manifestações clínicas, que varia desde virilização da genitália externa de fetos femininos com perda de sal neonatal até manifestações hiperandrogênicas que se iniciam tardiamente. A forma clássica, de maior gravidade, é subdividida em perdedora de sal (PS) e virilizante simples (VS). A doença é elegível para inclusão em programas de triagem neonatal, e o principal problema enfrentado é a taxa elevada de resultados falso-positivos (FP), de até 1%. Cerca de 50-70% destes são atribuídos ao estresse neonatal por doença, à prematuridade e ao baixo peso ao nascimento (PN). Em 7-17% dos FP, a dosagem da 17OHP no teste confirmatório pelo método de radioimunoensaio (RIE) no soro, um dos mais utilizados em nosso país, permanece alterada. A adição da dosagem de outros esteroides como o 21-deoxicorisol (21-DF) e, sobretudo, a utilização de metodologia mais específica, como a cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas (CL-MS/MS), pode aumentar o valor preditivo positivo (VPP). O estudo molecular do gene *CYP21A2* também pode ser útil na confirmação diagnóstica, porém com maior custo e complexidade. No final de 2013, a triagem da HAC-21OH foi incluída no Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN). A eficácia de dosagens hormonais no soro por diferentes metodologias como teste confirmatório não tem sido estudada na literatura.

Objetivos: determinar o esteroide adrenal cuja dosagem oferece maior especificidade como teste confirmatório na triagem neonatal da HAC. Determinar os valores de referência da 17OHP e do 21-DF na população brasileira por CL-MS/MS. **Casuística:** 708.437 recém-nascidos (RN) submetidos à triagem no laboratório da APAE-São Paulo de janeiro de 2014 a dezembro de 2015. **Métodos:** os RNs que apresentaram 17OHP neonatal acima do valor de referência para o P99,5 para o PN foram convocados para dosagem dos esteroides no soro (RIE e CL-MS/MS). Os RNs com resultados 17OHP ≥ 10 ng/ml (CL-MS/MS) no soro foram convocados para estudo molecular do *CYP21A2*. **Resultados:** O VPP do teste de triagem no papel de

filtro (P99,5) foi 3% e a taxa de FP de 0,037%; 65/252 (25%) resultados permaneceram alterados na dosagem 17OHP/RIE (VPP 30%) e 32/289 (11%) continuaram alterados após o teste confirmatório 17OHP/CL-MS/MS (VPP 49%); 58 casos de HAC clássica foram diagnosticados (47PS; 11VS), 57 pela triagem e 1 falso-negativo (forma VS), resultando em incidência de 1:12.200. Outros 32 casos assintomáticos e com 17OHP/CL-MS/MS elevada (indeterminados) foram acompanhados até normalização ou confirmação diagnóstica da forma não clássica da HAC pelo genótipo do *CYP21A2*. A relação (17OHP+ $\Delta 4$)/cortisol foi a que apresentou maior área sob a curva ROC, e o ponto de corte $\geq 9,7$ detectou todos os portadores de forma clássica (S=100%). Valores entre 9,7 e 24,8 compreenderam pacientes com a forma VS, forma não clássica (NC) e não afetados e o ponto de corte $\geq 24,9$ apresentou VPP de 100% (E=100%) para as formas clássicas da HAC. Em 10 casos com resultados indeterminados da 17OHP, o estudo molecular permitiu a alta do seguimento neonatal (4 portadores da forma NC; 4 sem mutações identificadas e 2 heterozigotos). **Conclusão:** A dosagem no soro da 17OHP por CL-MS/MS foi superior à dosagem por RIE. A aplicação dos pontos de corte obtidos pela curva ROC dos diferentes testes confirmatórios no soro permitiria a resolução de 30/32 indeterminados, sendo que a relação (17OHP+ $\Delta 4$)/cortisol foi especialmente útil nestes casos. O estudo molecular foi importante, sobretudo, para elucidação dos casos indeterminados.

ABSTRACT

Carvalho DF. ***Improving the effectiveness of serum confirmatory tests in newborn screening for congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency*** [tese]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2017.

Congenital adrenal hyperplasia (CAH) is most commonly caused by 21-hydroxylase deficiency and clinical presentation depends on the degree of enzyme activity impairment, varying from virilization of external genitalia in females and neonatal salt loss and hyperandrogenic signs in both genders. The classical form is subdivided in salt-wasting (SW) and simple virilizing (SV). The disease is suitable for neonatal screening programs. The high false-positive (FP) result rate, up to 1%, is the main issue, in most cases attributed to either prematurity or neonatal stress caused by coexistence of stress conditions. In serum confirmatory tests, 17-hydroxy-progesterone (17OHP) levels by radioimmunoassay (RIA), one of the main methodologies performed in our country, remains elevated in 7-17% of cases. The addition of other steroids, such as 21-deoxycortisol (21-DF), and the use of a more specific methodology, liquid chromatography followed by tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), increase the positive predictive value (PPV) of confirmatory tests. The *CYP21A2* genotyping is also useful in diagnosing CAH, although its higher cost and complexity are potential limitations. **Objectives:** to determine the adrenal steroid with higher specificity to confirm CAH diagnosis in the newborn screening. To determine the reference values of serum 17OHP and 21-DF by LC-MS/MS in the Brazilian population in neonatal period. **Patients:** 708,437 newborns (NBs) screened in *Laboratório da APAE SÃO PAULO* between January 2014 and December 2015. **Methods:** NBs with neonatal 17OHP (N17OHP) on filter paper above the 99.5th percentile were recalled to serum sample collection and steroids dosage by RIA and LC-MS/MS; Molecular *CYP21A2* analysis was offered to those with 17OHP ≥ 10 ng/ml (LC-MS/MS). **Results:** FP rate on filter paper was 0.037% and these NBs were recalled for serum tests: 65/252 (25%) results of 17OHP by RIA and 32/289 (11%) of 17OHP by LC-MS/MS remained altered. PPV of RIA and LC-MS/MS were 30% and 49%, respectively. Fifty-eight CAH classical cases were diagnosed (47SW;11SV) and other 32 asymptomatic NBs presented increased serum 17OHP by LC-MS/MS and were followed until diagnostic elucidation. In the

ROC curves analyses between false and true-positives, 17OHP/LC-MS/MS had the highest accuracy as a single steroid measurement, for which the 48.3 ng/ml cutoff had 100% sensitivity for classical forms. Serum 21DF was not superior than 17OHP/LC-MS/MS. The product of (17OHP+ Δ 4)/cortisol ratio presented the highest accuracy: the cutoff of 24.9 had a PPV of 100% to detect salt-wasting form, while values between 9.7-24.8 comprised FP, NC and SV patients and molecular tests could be useful for differential diagnosis in this latter group. **Conclusions:** Serum 17OHP by LC-MS/MS was superior than 17OHP by RIA. The efficacy of confirmatory tests was improved using 17OHP by LC-MS/MS and, for the asymptomatic NBs with undetermined results, the (17OHP+ Δ 4)/cortisol ratio presented the highest diagnostic efficacy. The CYP21A2 genotyping was particularly useful in asymptomatic NBs with persistently increased serum 17OHP.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hiperplasia adrenal congênita por deficiência da 21-hidroxilase

Em 1865, um intrigante caso chamou a atenção de um professor italiano de anatomia, Dr. Luigi De Crecchio, ao conduzir uma autópsia em um homem de meia idade chamado Giuseppe Marzo. O paciente apresentava tamanho peniano de 6 cm de comprimento, hipospádia de primeiro grau, não havia testículos na bolsa escrotal e foram encontrados, como órgãos genitais internos, vagina, útero, tubas uterinas e ovários; suas glândulas adrenais eram significativamente aumentadas (1). Este relato de caso é aceito como a primeira descrição de hiperplasia adrenal congênita (HAC). Um século e meio depois, apesar de todos os avanços científicos e metodológicos da medicina, esta doença ainda apresenta desafios diagnósticos e significativa morbidade e mortalidade, com custos elevados para o sistema de saúde em casos não diagnosticados ou com diagnóstico tardio.

Hiperplasia adrenal congênita é o termo utilizado para caracterizar um conjunto de doenças potencialmente letais em que a síntese de cortisol nas glândulas adrenais está diminuída. Em populações caucasianas, 90 a 95% dos casos de HAC ocorrem por redução da atividade da enzima 21-hidroxilase (21OH) (2-4).

A 21-hidroxilase é uma enzima chave na síntese de glicocorticóides e de mineralocorticóides por atuar na conversão da 17-hidroxi-progesterona (17OHP) em 11-deoxicortisol, precursor do cortisol, e na conversão de progesterona em deoxicorticosterona (DOC), precursor da aldosterona. Com a redução na síntese de cortisol, ocorre aumento compensatório na produção hipofisária do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que é responsável pela hiperplasia do córtex da adrenal e pelo incremento na produção de esteróides precursores do cortisol. Estes precursores, sob estímulo constante e aumentado do ACTH, são desviados para a síntese de andrógenos adrenais, que não dependem da ação da enzima 21OH (5, 6), como representado na **Figura 1**.

Figura 1 – Esteroidogênese adrenal simplificada.

A enzima 21-hidroxilase (P450c21) atua na conversão da progesterona em deoxicorticosterona e da 17OH-progesterona em 11-deoxicortisol. A diminuição de sua atividade enzimática reduz a síntese de cortisol, com consequente aumento na produção do hormônio ACTH pela hipófise, que ocasiona hiperplasia do córtex adrenal, estimula a produção excessiva dos precursores do cortisol e, consequentemente, de andrógenos.

Portanto, a doença apresenta manifestações clínicas decorrentes da deficiência de glicocorticoide e/ou mineralocorticoide, hormônios essenciais à vida, sobretudo em situações de estresse, bem como do excesso de andrógenos nos períodos pré e pós-natal.

A doença é causada por mutações no gene *CYP21A2*, que codifica a enzima 21-hidroxilase, localizado no braço curto do cromossomo 6p21.3. Este gene possui um pseudogene em cadeia, *CYP21A1P*, com sequência de bases nitrogenadas 98% homóloga ao gene ativo, que naturalmente contém mutações e não é transcrito. A alta homologia entre *CYP21A2* e *CYP21A1P* contribui para a ocorrência de emparelhamento desigual na meiose e, assim, para maior probabilidade de rearranjos cromossômicos e de transferências de mutações de ponto do pseudogene para o gene ativo. Cada mutação ocasiona um diferente comprometimento da atividade enzimática e, consequentemente, se correlaciona com formas clínicas de diferentes gravidades (4).

A forma de herança da HAC, uma doença genética monogênica, é autossômica recessiva, ou seja, para que a doença se manifeste é necessário

que o indivíduo receba um alelo com mutação de cada um dos genitores. Embora a doença seja mais comum em filhos de pais consanguíneos, a frequência de indivíduos não afetados portadores de mutações para HAC em um dos alelos do *CYP21A2* (heterozigotos) na população geral é de aproximadamente 1:50 (6), o que também contribui para a frequência elevada da HAC.

As formas clínicas da HAC-21OH são divididas em dois grandes grupos: forma clássica, com manifestações ao nascimento, e forma não clássica, cujos sintomas se iniciam tardiamente, podendo ser na infância, puberdade ou vida adulta. A forma clássica é subdividida em perdedora de sal e virilizante simples (6, 7). A frequência da forma clássica descrita mundialmente e no Brasil é de 1:10.000 a 1:15.000 indivíduos. A forma não clássica é cerca de 10 vezes mais comum, em torno de 1:1.000 (4, 7-10).

A forma perdedora de sal (PS) compreende 70 a 75% dos casos de forma clássica em países desenvolvidos que adotaram o rastreamento neonatal desta doença (4, 7, 11). Estes pacientes são carreadores de mutações, em homozigose ou em heterozigose composta, que resultam em grave comprometimento da atividade enzimática da 21-OH (atividade residual <2%) (12). Como a 21OH também é essencial para a síntese de mineralocorticoide na camada glomerulosa da glândula adrenal, um maior comprometimento da atividade enzimática prejudica também a síntese de aldosterona, o que resulta em desidratação hiponatrêmica nas primeiras semanas de vida, com perda de peso, letargia e vômitos, podendo evoluir para choque hipovolêmico e óbito sem diagnóstico e tratamento precoces (4, 13).

A forma virilizante simples (VS) caracteriza-se, no sexo feminino, por virilização pré-natal da genitália externa, que varia desde clitoromegalia isolada à fusão completa das pregas urogenitais, com aparência semelhante à de uma genitália masculina normal sem gônadas palpáveis. No sexo masculino, é descrita macrogenitossomia ao nascimento, não perceptível na maioria dos casos, o que contribui para maior dificuldade diagnóstica deste sexo (14-16). Esta forma clínica também causa virilização pós-natal, em ambos os sexos, com aumento progressivo do clitóris ou pênis, aparecimento precoce dos pelos pubianos, aumento da massa muscular, acne e engrossamento da voz. Ocorre

também incremento da velocidade de crescimento, porém com maior avanço da idade óssea e, assim, fechamento epifisário precoce com baixa estatura final (13, 17). Os pacientes afetados por esta forma clínica são carreadores de mutações que resultam em 3 a 7% de atividade residual da 21OH, em homozigose ou em heterozigose composta com as mutações mencionadas anteriormente (12, 18). Embora a síntese de aldosterona também esteja comprometida, essa atividade residual é suficiente para evitar a depleção volêmica verificada na forma perdedora de sal. As manifestações hiperandrogênicas, entretanto, são as mesmas em ambas as formas clássicas da HAC-21OH.

Os sinais e sintomas da forma não clássica ocorrem mais tardiamente durante o desenvolvimento, com intensidade muito menor e complicações muito menos graves. Compreendem, basicamente, aparecimento precoce de pelos pubianos em ambos os sexos e irregularidade menstrual, hirsutismo e/ou infertilidade no sexo feminino (4, 13).

O diagnóstico hormonal baseia-se na dosagem sérica da 17OHP, hormônio que antecede o defeito enzimático. Os afetados pela forma clássica apresentam valores basais muito elevados, geralmente maiores do que 50 ng/ml; na forma não clássica, valores basais maiores do que 5 ng/ml ou maiores do que 10 ng/ml após teste de estímulo com ACTH sintético são utilizados como critério diagnóstico (18, 19).

1.2 Rastreamento neonatal da HAC-21OH

As formas clássicas da HAC-21OH, PS e VS, são de interesse da triagem neonatal, pois quando não diagnosticadas e tratadas precocemente apresentam complicações potencialmente graves, tais como desidratação hiponatrêmica e óbito perinatal (PS), virilização grave da genitália externa no sexo feminino, que pode levar a erros de determinação do sexo ao nascimento, e pseudo-puberdade precoce em ambos os sexos, com custos elevados para o sistema de saúde (PS e VS).

Desde 1988, discute-se a eficácia de testes de triagem neonatal no diagnóstico da doença, quando *Pang et al. (1988)* padronizaram a dosagem da

17OHP em amostras coletadas em papel de filtro, comprovando a eficiência deste método no diagnóstico precoce da HAC (10). A partir de dados de 6,5 milhões de recém-nascidos (RNs) submetidos à triagem, foi observado que a forma clássica da HAC-21OH possui incidência mundial de aproximadamente 1:15.000 nascidos vivos, variando de 1:10.000 a 1:14.000 nos países da Europa (4, 20, 21). Dois recentes trabalhos na população brasileira demonstraram que a HAC também possui frequência elevada em nosso meio, ocorrendo em aproximadamente 1:10.300 nascidos vivos (8, 9). Entretanto, o Brasil é um país de grandes proporções e, dependendo da região, ocorrem diferentes miscigenações, que podem modificar a incidência da HAC-21OH.

A HAC-21OH é uma doença de prevalência elevada, morbi/mortalidade significativa, com complicações graves e cujo diagnóstico e tratamento precoces são disponíveis, acessíveis e capazes de não apenas prevenir a morte dos RNs e as complicações pós-natais, mas também de diminuir custos do ponto de vista social, psicológico e financeiro para os indivíduos afetados e para o sistema de saúde. Estas características, associadas a um teste de triagem facilmente aceito, tornam a HAC uma doença elegível para inclusão em programas públicos de triagem neonatal.

A triagem neonatal para a HAC-21OH faz parte do programa de saúde em todo território norte-americano e em alguns países da Europa, como França e Suécia, há mais de 20 anos. Nestes, a forma PS tem prevalência elevada, compreendendo de 70-75% dos casos da forma clássica e a triagem neonatal normalizou, ainda, a proporção de diagnóstico entre os sexos para 1:1, compatível com a forma autossômica recessiva de transmissão da doença (7, 13, 22, 23).

De maneira geral, o inverso se observa nos países que não realizam a triagem neonatal para a HAC-21OH, ocorrendo frequência menor do diagnóstico da forma perdedora de sal e do sexo masculino (20, 24). Isto fica evidente quando se analisa a casuística do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), um dos maiores centros de referência para o tratamento desta doença em nosso país. Nesta série de pacientes diagnosticados antes da introdução da triagem neonatal, observa-se que a forma perdedora de sal corresponde a apenas 52% dos

casos da forma clássica e que apenas 1 a cada 4 pacientes são do sexo masculino. No sexo feminino, embora a virilização da genitália externa seja uma manifestação clínica evidente, que poderia chamar a atenção para o diagnóstico, observamos, na mesma casuística, que a atipia genital não foi identificada ao nascimento em 40% das meninas afetadas (21, 24). Adicionalmente, 16% das pacientes com cariótipo 46,XX foram registradas no sexo masculino. Em 7%, as famílias concordaram em reverter para o sexo feminino após o diagnóstico da doença. Entretanto, em 9% essa reversão não foi possível após avaliação psicológica que evidenciou o diagnóstico de identidade de gênero masculina. A maioria dos pacientes 46,XX que permaneceram no sexo masculino apresentavam a forma VS e tiveram diagnóstico tardio da doença.

No Brasil, até o final de 2013, a triagem neonatal da HAC-21OH fazia parte do programa público apenas nos estados de Goiás e Santa Catarina, que a realizavam com verba própria. A cobertura da triagem nestes estados foi de aproximadamente 90% entre os nascidos vivos. Estudo recente que analisou os dados da triagem do estado de Goiás observou que a forma perdedora de sal compreendeu 80% dos casos com forma clássica e foi observada mesma proporção de diagnóstico entre os sexos masculino e feminino, dados compatíveis com casuísticas de países em que a triagem é adotada rotineiramente, comprovando a eficiência da triagem também no nosso meio (8, 25).

A comparação das características clínicas das casuísticas de São Paulo e Goiás, estados sem e com triagem neonatal para HAC-21OH, respectivamente, reforçavam a necessidade de se incluir a doença no Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN). A disparidade entre essas casuísticas nos motivou a realizar um projeto pela Disciplina de Endocrinologia do HC-FMUSP, que foi apresentado à Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo em 2011, defendendo a inclusão do diagnóstico da HAC no programa público de triagem neonatal, o que contribuiria para a redução da mortalidade infantil. Mediante um parecer técnico favorável, o Ministério da Saúde (MS) recolocou em discussão este tema e, em 06 de junho de 2011, reconheceu a importância da inclusão desta doença no PNTN, que está em implantação

gradativa nos estados brasileiros desde dezembro de 2013. Em meados de 2016, de acordo com dados do Ministério da Saúde, todos os 26 estados brasileiros e o Distrito Federal alcançaram a fase IV da triagem neonatal, que inclui a pesquisa da HAC-21OH (26)

1.3 Primeiro teste de triagem: 17OHP neonatal no papel de filtro

Apesar da eficácia da triagem neonatal da HAC, sobretudo no diagnóstico dos casos com a forma perdedora de sal, um dos grandes problemas a ser enfrentado é a frequência elevada de resultados falso-positivos (FP), assim como ocorre em outras doenças pesquisadas em rastreamentos populacionais. Isso acontece porque um teste de triagem, habitualmente, possui elevada sensibilidade com a finalidade de minimizar os falso-negativos, evitando a falsa segurança que um resultado negativo possa trazer a um indivíduo afetado submetido à triagem. O objetivo de um teste de rastreamento, portanto, não é diagnosticar a doença, mas selecionar, dentro de uma grande população, indivíduos que apresentam risco maior para uma determinada condição. Esse grupo menor, selecionado pela triagem, deverá ser submetido a um teste confirmatório com maior especificidade, geralmente de custo mais elevado e/ou maior complexidade, mas com a característica de diagnosticar a doença com maior precisão.

A determinação do ponto de corte de um teste diagnóstico é fundamental porque, a partir daí, é possível determinar a sensibilidade e especificidade inerentes ao método utilizado, avaliar sua eficácia quando aplicado a determinada população e obter, assim, os valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN).

O primeiro teste laboratorial para a triagem da HAC-21OH consiste na determinação da concentração do precursor 17OH-progesterona, o hormônio que antecede o bloqueio enzimático, em amostras de gotas de sangue seco depositadas no papel filtro já utilizadas para o rastreamento de outras doenças. Três são as principais técnicas utilizadas: radioimunoensaio (RIE), *enzima-linked immunosorbent assay (ELISA)* e *time-resolved fluoroimmunoassay (DELFA)*, sendo a última a mais utilizada em larga escala em todo o mundo (9, 27-29).

Essas técnicas envolvem a dosagem da 17OHP a partir de um disco de 1/8" ou 3,2 mm de papel filtro impregnado com sangue seco, obtido do calcanhar do recém-nascido após 48-72 horas de vida. Entretanto, todas essas metodologias podem apresentar elevada taxa de resultados falso-positivos e, em alguns casos, resultados falso-negativos.

Os principais fatores interferentes e potencialmente causadores de resultados falso-negativos (FN) no teste do pezinho (TP) são a coleta precoce da amostra de sangue, antes de 48 horas de vida, e o uso de corticoide pela mãe nos dias que antecedem o parto, sobretudo em coletas nos primeiros dias de vida.

Os resultados falso-positivos (FP) ocorrem, de maneira geral, em aproximadamente 1% dos testes, variando de 0,4 a 9,3% dependendo da metodologia utilizada (4, 6, 15, 30, 31). Falso-positivos são atribuídos ao estresse neonatal por doença coexistente, à prematuridade e ao baixo peso ao nascimento, sendo que os dois últimos contribuem para cerca de 70% destes resultados. Nestas situações, a elevação da 17OHP neonatal é decorrente do baixo *clearance* metabólico por imaturidade hepática (31-33), da diminuição da atividade da 11 β -hidroxilase, bem como da reação cruzada com outros precursores da esteroidogênese, principalmente a 17-hidroxi-pregnenolona e o sulfato de 17-hidroxi-pregnenolona (34). Outros fatores que podem simular incrementos na dosagem da 17OHP são a extração do sangue do papel de filtro sem o uso do solvente adequado (35) e a coleta em tubo contendo EDTA antes de depositar o sangue no papel de filtro, o qual pode interferir em ensaios baseados na fluorescência do lantanídeo (36, 37).

A fim de se viabilizar a triagem neonatal da HAC-21OH, com a redução do índice de convocação e com o aumento do valor preditivo positivo do teste, sugere-se, pela literatura, que os valores da 17-OHP neonatal sejam ajustados de acordo com o grau de prematuridade (38, 39). Esta padronização reduz o índice de resultados FP de aproximadamente 5,2 para até 0,03% na maioria dos estudos populacionais (9, 40-42).

A idade gestacional é considerada a variável mais adequada para padronização dos valores da 17OHP neonatal (42, 43); porém, nos países em que não se realiza a ultrassonografia obstétrica para confirmar a idade

gestacional referida pela mãe, como é o caso do Brasil, sugere-se que esta variável seja substituída pelo peso ao nascimento e que, idealmente, a padronização da 17OHP neonatal seja realizada em três ou mais faixas de peso ao nascimento (40). Como todo exame laboratorial, é importante que cada serviço padronize os seus valores de referência de acordo com a população e com a metodologia utilizada.

Até meados de 2013, a maioria dos centros que realizavam de maneira pioneira a triagem neonatal da HAC no Brasil (Goiás, Santa Catarina e laboratórios privados) utilizavam o método imunofluorimétrico (*DELFLIA*) com dois pontos de corte ajustados para o peso, o que ainda resultava em significativa porcentagem de resultados falso-positivos (8). A partir da introdução da triagem da HAC no PNTN em 2013, este alto índice de resultados falso-positivos ao se utilizar apenas dois pontos de corte poderia inviabilizar o programa, gerando índice elevado de convocações, o que aumentaria o custo da triagem, além de causar grande estresse psicológico para as famílias.

Para melhorar a eficiência da triagem, em um recente estudo realizado em conjunto com a Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE) de São Paulo, os valores de referência da 17OHP neonatal ajustados para quatro grupos de peso ao nascimento foram determinados, o que resultou na redução da frequência de FP de 5,2 para 0,2% (9). Estes dados são compatíveis com os descritos em outras populações, p. ex., *Allen et al* (1997) demonstraram a melhora da eficácia diagnóstica da triagem ao utilizar pontos de corte para quatro faixas de peso ao nascimento, com significativo aumento do valor preditivo positivo (40).

Em alguns países desenvolvidos, como Suécia, Nova Zelândia e Japão, as amostras do papel de filtro dos recém-nascidos com resultados alterados são processadas novamente com técnica de extração com solvente específico e a 17OHP é, então, avaliada por cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas (28, 44-47). Esta metodologia tem a vantagem de ser mais específica, uma vez que não depende de reações antígeno-anticorpo para dosagem dos esteroides; portanto, é menos susceptível a interferência de outros precursores da esteroidogênese muito semelhantes à 17OHP.

Entretanto, a técnica de extração do sangue do papel de filtro é diferente da utilizada no método imunofluorimétrico e esta metodologia não é disponível nos laboratórios que realizam o primeiro teste de triagem no Brasil. Além disso, uma quantidade significativa dos resultados falso-positivos ocorrem porque a 17OHP está verdadeiramente elevada no período neonatal em indivíduos não afetados (33).

Apesar das diferentes abordagens para aumento do VPP do primeiro teste, como a interpretação dos resultados de acordo com o grau de prematuridade e/ou peso ao nascimento e a dosagem da 17OHP por CL-MS/MS ainda no papel de filtro, a principal limitação para incremento do VPP (que seria o aumento do ponto de corte) é a redução da sensibilidade. Como o primeiro teste de triagem precisa altamente sensível, evitando resultados falso-negativos, seu objetivo não é realizar o diagnóstico definitivo de uma dada condição, mas separar dentro de uma grande população os indivíduos com risco de apresentarem esta doença. Estes indivíduos com primeiro teste de triagem alterado devem ser submetidos a testes confirmatórios de alta especificidade.

1.4 Testes confirmatórios hormonais

Ao se analisar diferentes programas de triagem neonatal da HAC-21OH no mundo, observa-se que algumas estratégias são adotadas para se obter VPP próximo de 100%, considerado ideal para um teste confirmatório.

Em algumas regiões, é realizada uma segunda coleta de amostra de todos os RNs, em papel de filtro, independentemente do primeiro resultado, com periodicidade pré-definida pelo programa de triagem; por exemplo, no estado norte-americano do Texas, a primeira coleta é realizada entre 0-48h de vida e a segunda coleta é realizada ao redor de 15 dias de vida. O principal argumento a favor desta abordagem é aumentar a detecção da forma VS, a qual pode apresentar aumento mais tardio da 17OHP, podendo não ser diagnosticada em coletas com menos de 7 dias de vida. Por outro lado, como principais problemas, se observa taxa alta de resultados falso-positivos no

primeiro teste, devido à precocidade da primeira coleta, bem como taxa de cobertura da segunda coleta inferior à da primeira (30, 48).

Em outras localidades, uma segunda amostra em papel de filtro só é coletada mediante um resultado alterado no primeiro teste com dosagem pelo método imunofluorimétrico (IFMA). De maneira geral, a segunda dosagem utiliza metodologia mais específica, CL-MS/MS, que analisa não apenas a 17OHP, mas outros esteroides de interesse para o diagnóstico, como a androstenediona, 21-deoxicortisol e cortisol (4, 29). Para a realização desta última técnica, é necessária a padronização da extração do sangue do papel de filtro, além da aquisição de equipamento específico e de equipe especializada, o que encarece o programa de triagem e dificulta sua uniformização em um país de dimensão continental como o Brasil.

O fluxograma da triagem neonatal no Brasil adotado pelo Ministério da Saúde preconiza a coleta de segunda amostra no papel de filtro somente para valores moderadamente alterados no primeiro teste (acima do valor de referência para o percentil 99), e análise pela mesma metodologia IFMA – convocação de rotina. Valores altamente suspeitos de um afetado para a forma perdedora de sal (duas vezes o valor de referência do percentil 99) são encaminhados diretamente para consulta médica e teste confirmatório no soro, por RIE ou CL-MS/MS – convocação de emergência (49). No estado de São Paulo, em razão do número elevado de nascimentos, foi adotado o percentil 99,5 desde o início. Mais recentemente, em julho de 2015, o MS atualizou o Protocolo de Diretrizes e de Diagnóstico Laboratorial da HAC, considerando o Percentil 99,8 como adequado (50).

Dados na literatura referentes ao desempenho dos testes confirmatórios no soro são escassos e, em geral, os estudos se limitam a comentar o número de casos com diagnóstico confirmado de HAC-21OH. Pouco se conhece sobre o número de casos com resultados ainda indeterminados no teste confirmatório e sobre os valores de 17OHP, por diferentes metodologias, apresentados pelos verdadeiramente afetados e pelos casos indeterminados, assim chamados por incluírem indivíduos com resultados falso-positivos, afetados pela forma não clássica (ambos os sexos) e meninos afetados pela forma virilizante simples. Os estudos que avaliaram a dosagem da 17OHP e dos outros esteroides no

soro o fizeram em número pequeno de indivíduos afetados e controles, fora do contexto da triagem neonatal, em crianças na segunda infância ou em adultos (51-54). Em nossa experiência, crianças afetadas pela forma clássica possuem valores muito elevados da 17OHP, sendo geralmente acima de 100 ng/ml na forma PS e maior do que 50 ng/ml na forma VS (18, 55), porém, não é conhecido se estes valores podem ser extrapolados para o período neonatal.

Algumas séries identificaram que 7 a 17% dos casos com resultados falso-positivos no primeiro teste não apresentam normalização da 17OHP no teste confirmatório no soro, o que pode decorrer também da metodologia utilizada (9, 11, 22). Estes RNs assintomáticos e que permanecem com resultados alterados necessitarão de seguimento clínico e laboratorial até definição diagnóstica ou normalização da 17OHP, a qual em alguns casos pode demorar de seis meses até um ano, aumentando os custos do programa (11).

No Brasil, diferentes metodologias são utilizadas para análise da 17OHP no soro, destacando-se o radioimunoensaio (RIE), um dos mais empregados nos laboratórios dos programas públicos, que se baseia em reações do tipo antígeno-anticorpo. Trata-se de um método disponível, de execução simples e baixo custo, que permite a obtenção de resultados em curto espaço de tempo; porém, apresenta 0,3-1,1% de reação cruzada com outros esteroides, como a 17-hidroxi-pregnenolona, sulfato de 17-hidroxi-pregnenolona, progesterona e o 21-deoxicortisol. Isto implica em testes confirmatórios com resultados falso-positivos, sobretudo em prematuros, que por imaturidade enzimática adrenal podem apresentar valores elevados destes esteroides, o que gera novas convocações, causando ansiedade para os pais e aumento dos custos dos programas de triagem. Uma alternativa nos prematuros, sugerida pelo próprio fabricante do *kit* de dosagem da 17OHP por RIE, é a extração com dietil-éter, o que reduz a interferência do sulfato de 17-hidroxi-pregnenolona, composto geralmente elevado neste grupo de RNs. Entretanto, este procedimento demanda muito tempo e sua aplicabilidade em larga escala é impraticável.

Ao se analisar o desempenho do teste confirmatório por RIE no programa da APAE-Goiás, observa-se que alguns casos falso-positivos

demoraram até seis meses para normalização da 17OHP sérica por esta metodologia.

Desta forma, evidencia-se a importância do emprego de metodologias mais específicas para a confirmação diagnóstica da HAC-21OH, com menor convocação de pacientes e otimização do fluxograma da triagem neonatal. Tem-se dado grande ênfase na literatura à padronização de metodologias mais específicas para o primeiro teste da triagem e não se tem analisado a eficácia dos testes confirmatórios no período neonatal (4, 51-53).

A dosagem da 17OHP por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em *tandem* (CL-MS/MS) tem a vantagem de dosar simultaneamente mais de um composto esteroide, separando-os por peso molecular e não por reações antígeno-anticorpo, o que confere maior especificidade ao método. Por essa razão, alguns países europeus e estados norte-americanos tem empregado esta técnica em papel de filtro. No nosso meio, a CL-MS/MS é disponível principalmente em laboratórios privados, tanto para dosagem no papel de filtro como no soro (51, 56-59).

Embora não abordando o diagnóstico pela triagem, um estudo recente sobre o diagnóstico da HAC em recém-nascidos evidenciou que o valor preditivo positivo (VPP) da concentração sérica elevada de 17OHP isoladamente pode ser melhorado se interpretado em conjunto com outros esteroides, como cortisol, androstenediona e 21-deoxicortisol, possibilitando uma melhor especificidade diagnóstica (51). Vale a pena ressaltar o tamanho limitado da amostra de afetados e a falta de comparação entre diferentes metodologias. A partir de então, a dosagem destes outros esteroides por CL-MS/MS tem sido avaliada, com a vantagem de não sofrer a interferência de reações cruzadas, como observado nos imunoensaios. Entretanto, isso torna os valores de normalidade menores, sendo necessário o ajuste dos valores de referência para este método (51, 60).

Sugere-se que outra maneira de melhorar significativamente o VPP dos testes confirmatórios é pela avaliação das razões entre os esteroides, tais como 17OHP/cortisol, (17OHP+androstenediona)/cortisol e (17OHP+21-deoxicortisol)/cortisol (4, 34, 51, 60). Entretanto, os diferentes estudos supracitados envolveram casuísticas com idades que variaram de recém-

nascidos até adultos e utilizaram diferentes amostras biológicas, papel de filtro e soro.

Na análise do valor diagnóstico das relações entre os esteroides, as razões 17-OHP/cortisol e androstenediona/cortisol baseiam-se no fato de que a HAC não apresenta como única característica laboratorial o aumento da 17OHP e da androstenediona, mas também a redução do cortisol sérico. Utilizando estas relações com a técnica CL-MS/MS, *Matern et al.* (2007), obtiveram redução da taxa de falso-positivos de 1 para 0,06% e um incremento do valor preditivo positivo de 0,8 para 7,3%(61). Similarmente, dois outros estudos demonstraram um aumento significativo do valor preditivo positivo ao considerarem a relação (17OHP+androstenediona)/cortisol, também utilizando como método de dosagem a CL-MS/MS (62, 63). Entretanto, estes três estudos realizaram a dosagem destes esteroides na amostra original do papel de filtro.

Um outro esteroide que pode melhorar a especificidade diagnóstica da HAC é o 21-deoxicortisol (21-DF), um metabólito derivado diretamente da 17OHP através de sua 11 β -hidroxilação (64-69). Esta via de síntese, virtualmente inativa em condições fisiológicas, torna-se exacerbada em pacientes com HAC-21OH em razão da elevada concentração sérica da 17OHP. Assim, o 21-deoxicortisol pode ser considerado um marcador bioquímico adicional da HAC-21OH, tendo-se mostrado até mais sensível do que a 17OHP (67, 70, 71). Sugere-se, ainda, que o 21-DF tem maior benefício na diferenciação entre pré-termos e afetados pela HAC-21OH, um dos maiores desafios na triagem neonatal desta doença(69). A **Figura 2** esquematiza a ação das enzimas 21-hidroxilase e 11 β -hidroxilase, nos diferentes esteroides, evidenciando o maior potencial do 21DF nesta distinção.

Figura 2 – Metabolização da 17OHP em RNs de termo, pré-termo e com HAC-21OH. **A:** RN de termo, com atividades normais das enzimas 21-hidroxiase e 11β-hidroxiase; **B:** RN pré-termo, com redução da atividade da 11β-hidroxiase, levando ao incremento de 17OHP e 11-deoxicortisol e à redução na síntese de 21-deoxicortisol (21-DF); **C:** RN afetado pela HAC-21OH, com atividade reduzida da 21-hidroxiase, com consequente acúmulo de 17OHP e desvio para a síntese de 21-DF, por atividade da 11β-hidroxiase. Adaptado de Kamrath et.al (69).

Em um único estudo de casuística alemã, foi verificado que o uso da relação (17OHP+21DF)/cortisol, todos dosados por CL-MS/MS em papel de filtro, obteve VPP de 100% com especificidade de 100%, poder discriminatório considerado ideal para um teste confirmatório na triagem neonatal. Todos os RNs não afetados, incluindo os pré-termos, apresentaram relação < 0,07 e todos os RNs portadores da HAC-21OH tinham valores desta relação > 0,53 (34). Porém, o consenso internacional para manejo da HAC-21OH sugere que estes valores sejam avaliados em outras populações para se verificar sua reprodutibilidade (4, 72).

Na análise dos trabalhos acima, não é possível inferir o desempenho diagnóstico das diferentes metodologias e das razões entre os esteroides no diagnóstico diferencial entre RNs com resultados falso-positivos, forma virilizante simples e não clássica, sobretudo no sexo masculino, considerando que aproximadamente 30% dos casos de forma não clássica são acidentalmente identificados pela triagem (28). Adicionalmente, não existem valores de referência padronizados para os esteroides supracitados na nossa população de recém-nascidos.

1.5 Testes confirmatórios por biologia molecular

Além dos métodos hormonais de confirmação diagnóstica e a exemplo do que já é realizado na triagem da fibrose cística, a pesquisa de mutações no

gene da 21-hidroxilase (*CYP21A2*) tem sido proposta como teste confirmatório em análise de amostras de DNA de sangue periférico (11, 73). A ideia de utilizar a análise genética baseia-se no fato de que 90-95% dos RNs afetados são heterozigotos compostos ou homozigotos para um número limitado de mutações de ponto, deleções e rearranjos gênicos (18, 55, 74-76). Este teste genético já foi avaliado em estudo conjunto da Disciplina de Endocrinologia do HC-FMUSP com o serviço de referência de triagem do estado de Goiás (APAE-Goiás) em que foi verificada a alta eficácia deste método. A pesquisa das mutações foi capaz de confirmar o diagnóstico neonatal em 21 dos 23 RNs afetados, predizendo a gravidade da forma clínica. Nos outros 2 RNs com HAC, nos quais não foi possível a identificação de mutações no gene *CYP21A2*, foi constatado posteriormente o diagnóstico da deficiência da 11 β -hidroxilase. Em 19 pacientes assintomáticos e mantidos em seguimento por elevação persistente da 17OHP sérica, o estudo molecular identificou genótipo que predizia a forma VS em três meninos, que só apresentaram quadro clínico compatível com HAC de 6 meses a 3 anos de idade, e de forma não clássica em dois meninos, com 6 e 8 anos. Nos demais 14/19 pacientes, por não apresentarem diagnóstico molecular da HAC-21OH, foi possível interromper o seguimento clínico (11).

A análise molecular tem a vantagem de não sofrer influência da idade do RN do momento de coleta, do grau de prematuridade e/ou de doenças coexistentes; por essas razões, pode ser diretamente realizada nas amostras do papel de filtro, evitando a convocação do RN. Em casuística da República Tcheca, *Malikova et al.* (2012) extraíram o DNA da primeira amostra de papel de filtro de 753 RNs com elevação transitória da 17OHP. Os pesquisadores enfrentaram alguns problemas técnicos como a impossibilidade de amplificação do DNA por PCR em 7% dos casos, a detecção de substituições no gene *CYP21A2* não conhecidas e o elevado custo da metodologia, em torno de 80 euros apenas em reagentes por amostra (73).

Outros estudos também avaliaram a análise genética como teste confirmatório (38, 77-79), mas nenhum estudo de larga escala que avaliasse a eficácia desta metodologia foi realizado até o momento.

1.6 Justificativa do estudo

Pode-se dizer, portanto, que a triagem neonatal da HAC-21OH utilizada atualmente é eficiente para detectar RNs com a forma grave perdedora de sal. Em estudo recente, demonstrou-se que a triagem também foi eficiente para identificar todos os afetados pela forma clássica ao analisar o valor da 17OHP neonatal de acordo com o peso ao nascimento (9). Entretanto, o primeiro teste no papel de filtro ainda acarreta em um alto índice de resultados falso-positivos, o que leva à necessidade da realização de um teste confirmatório com elevado valor preditivo positivo. O problema do radioimunoensaio, metodologia mais amplamente disponível para confirmação da doença no território nacional, é que, em 7-17% dos RNs assintomáticos, a 17OHP se mantém elevada, e estes RNs necessitarão de seguimento de longo prazo até a normalização da 17OHP ou confirmação diagnóstica.

Não existe na população brasileira nenhum estudo que avaliou a eficácia de dosagens hormonais por diferentes metodologias como teste confirmatório, o que é essencial uma vez que o diagnóstico da HAC foi incluído no nosso PNTN no final de 2013.

Neste estudo, em conjunto com a APAE-São Paulo, pretendemos avaliar qual dosagem hormonal no teste confirmatório oferece maior valor preditivo positivo e negativo com a utilização da metodologia de espectrometria de massas, que é sabidamente mais específica. Os casos com valores elevados da 17OHP no teste confirmatório tiveram seu diagnóstico reavaliado pelo estudo molecular que, embora seja uma metodologia trabalhosa e de custo elevado, é considerada o padrão-ouro para diagnóstico das formas clássicas da HAC-21OH.

Considerando que o nosso serviço realiza consultoria para o Ministério da Saúde na introdução da triagem neonatal da HAC, os resultados desta pesquisa poderão contribuir com este programa ao apontar o teste confirmatório com maior valor preditivo, o que pode melhorar a eficiência do programa e diminuir seus custos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Determinar qual o esteroide adrenal cuja dosagem resulta em maior especificidade como teste confirmatório na triagem neonatal da HAC-21OH e, portanto, maior valor preditivo positivo.

2.2 Objetivos específicos

Determinar os valores das concentrações da 17OHP e do 21DF por espectrometria de massas dos afetados pelas formas clássicas da HAC-21OH no teste confirmatório.

Verificar se o acréscimo da dosagem de outros compostos esteroides como o cortisol, androstenediona e 21-deoxicortisol, melhora o valor preditivo dos testes confirmatórios na triagem neonatal da HAC.

Analisar se a determinação das razões 17OHP/cortisol, (17OHP+androstenediona)/cortisol e (17OHP+21DF)/cortisol apresenta maior valor preditivo para o diagnóstico das formas clássicas da HAC na triagem neonatal.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Casuística

Este projeto foi submetido aos Comitês de Ética da Disciplina de Endocrinologia do HC-FMUSP e do Laboratório da APAE São Paulo. Após o aceite para participar da pesquisa, os pais e/ou responsáveis dos recém-nascidos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Este estudo foi realizado em conjunto com o Laboratório da APAE São Paulo e foram utilizados dados de recém-nascidos (RNs) provenientes das maternidades privadas e públicas do estado de São Paulo que foram submetidos, rotineiramente, à triagem neonatal da HAC-21OH. No período de coleta de dados, de janeiro de 2014 a dezembro de 2015, 708.437 RNs foram submetidos à triagem neonatal no Laboratório da APAE-São Paulo. Estima-se que a cobertura seja de aproximadamente 98% no Estado de São Paulo.

No primeiro teste de triagem no papel de filtro, foram detectados 1.902 RNs com valores elevados de N17OHP. Aqueles com aumento moderado (acima do percentil 99,5) foram convocados para coleta de nova amostra no papel de filtro (convocação de rotina); e aqueles com valores N17OHP altamente suspeitos para HAC-21OH (acima de duas vezes o valor de referência do percentil 99,5) foram convocados direto para coleta de amostra de soro e consulta médica (convocação emergencial). Ambos os tipos de convocação são habituais na triagem neonatal, para confirmação ou exclusão do diagnóstico. Na ocasião de um RN convocado de rotina apresentar-se para coleta da nova amostra em papel de filtro com mais de 28 dias de vida, foi realizada diretamente coleta de soro, uma vez que o fluxograma no PNTN não contempla a coleta de amostras em papel de filtro a partir desta idade.

Para os casos com persistência do aumento da 17OHP no soro, foi oferecida a coleta de amostra de sangue periférico para análise do gene *CYP21A2*.

3.2 Dosagens hormonais

O primeiro teste de triagem foi realizado pelo Laboratório da APAE-São Paulo e consistiu na análise de amostra de sangue seco dos RNs, coletada em

calcâneo e depositada em papel filtro S&S 903® (Scheicher & Schuell), do 2º até o 7º dia de vida, idealmente, podendo se estender até o 28º dia de vida.

Após a coleta e o processo de secagem, a amostra foi submetida à análise pelo método imunofluorimétrico – B024-112 – AutoDelfia – *Neonatal 17 α -hydroxy-progesterone (17OHP) – Perkin Elmer Life and Analytical Sciences Wallac Oy, Turku, Finland*. O kit Auto Delfia 17 α -hidroxi-progesterona é um fluoroimunoensaio por tempo resolvido em fase sólida com base na reação competitiva entre o 17OHP marcado com o európio e a amostra contendo 17OHP, para um número limitado de sítios de ligação nos anticorpos policlonais específicos 17OHP (derivados de coelho). A precisão do kit foi determinada de acordo com o documento da NCCLS – EP5-A2 (80), segundo seu fabricante. As reações cruzadas com este método são menores do que as realizadas com o radioimunoensaio, sendo 3,6% com a progesterona e 0,13% com a 17-alfa-hidroxi-pregnenolona (81). Os coeficientes de variação inter-ensaio e intra-ensaio foram validados sob controle do CDC – *Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA – Newborn Screening Quality Assurance Program*. Os resultados da amostra de sangue coletadas foram liberadas em soro equivalência.

Foram considerados suspeitos os testes iniciais cujos resultados ultrapassaram o percentil 99,5 para cada faixa de peso ao nascimento e altamente suspeitos aqueles em que a 17OHP foi maior ou igual a duas vezes os valores de referência do percentil 99,5 para as quatro faixas de peso ao nascimento, conforme descrito na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Valor de referência da 17OHP neonatal (N17OHP) por grupo de peso ao nascimento que corresponde ao percentil 99,5.

Peso ao nascimento	N17OHP (ng/ml)
PN1: < 1500g	134,5
PN2: 1501-2000g	53,7
PN3: 2001-2500g	31,8
PN4: > 2500g	17,1

ng/ml em soro equivalência. Adaptado de Hayashi et. al. (9).

Mediante um teste neonatal positivo, utilizando o valor de corte acima de duas vezes o percentil 99,5, os RNs foram convocados para coleta de amostra de sangue, na qual foram dosados no soro, por RIE, a 17OHP e, por CL-MS/MS, os seguintes compostos esteroides:

- 17-hidroxi-progesterona (17OHP)
- Androstenediona ($\Delta 4$)
- 21-deoxicortisol (21DF)
- Cortisol (F)

A partir da determinação destas concentrações, foram calculadas as razões:

- 17OHP/F
- $(17\text{OHP} + \Delta 4)/F$
- $(17\text{OHP} + 21\text{DF})/F$

Utilizamos o método CL-MS/MS previamente descrito por *Alves et al.*, que permite a quantificação de esteroides em amostras de 200 μl de soro (82). O método é capaz de detectar simultaneamente as concentrações dos hormônios de interesse para este estudo: 17OHP, cortisol, androstenediona, 21-deoxicortisol; os esteroides e os solventes foram adquiridos da *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, USA) e os padrões deuterados da *CDN Isotopes* (Pointe-Claire, Canada): d_4 -cortisol, d_8 -21-deoxicortisol, d_7 -A4 (androstenediona) e d_8 -17OHP. Todas as amostras foram preparadas com água Milli-Q®, obtida através de equipamento *Integral 15* (Millipore, Billerica, MA, USA).

A preparação das amostras consistiu em uma primeira etapa de desproteinização, seguida pela combinação dos calibradores, amostras de soro e controles com os padrões deuterados e solução metanol 20:80. As placas foram agitadas por 10 minutos, centrifugadas por 15 minutos a 4000 rpm e colocadas no equipamento Waters 2777 equipado com um resfriador a 8°C; 20 μl do sobrenadante foram injetados em um cartucho *Onyx* monolítico C18 10 x 4,6 mm (*Phenomenex, Torrance, CA*) com fase móvel de metanol 5% com

fluxo de 0,35 ml/min para a bomba binária (*Waters 1515*) para extração dos esteroides por 3,2 minutos.

Foi utilizado equipamento CL-MS/MS (*Waters Xevo TQ-S®, EUA*), equipado com injetor automático, bomba binária, forno de coluna e analisador de massas do tipo triplo quadrupolo. Além das amostras de soro dos RNs, foram analisadas amostras de igual volume de solução branca contendo todos os reagentes do método com exceção do soro e, como calibradores, foram utilizadas amostras também de mesmo volume com concentrações conhecidas dos esteroides padrão correspondentes preparadas com dimetilsulfóxido.

Para a separação cromatográfica, foi empregada coluna analítica (50mm x 2,1mm; *Acquity UPLC® C₁₈*) e coluna-guarda equivalente (4 x 4mm), ambas da *Waters*. A fase móvel foi constituída de água:metanol (20:80, v/v), e as análises serão realizadas no modo isocrático em fluxo de 1ml.min⁻¹. A temperatura do forno de coluna foi ajustada para 40°C.

Solução de padrão interno deuterado contendo d₄-cortisol, d₈-21-deoxicortisol, d₇-A4 (androstenediona) e d₈-17OHP foi adicionada ao soro para minimizar efeitos de matriz durante as análises por CL-MS/MS.

O modo de monitoração de múltiplas reações (MMR) foi utilizado. Nas análises quantitativas foram analisadas as seguintes transições: m/z 363>121 e 363>327 (cortisol); m/z 347>97 e 347>121 (21-deoxicortisol); m/z 287>97 e 287>109 (androstenediona); m/z 331>97 e 331>109 (17OHP). A primeira transição foi utilizada para quantificar o analito alvo e a segunda para qualificar a identidade do composto alvo (51).

Na interpretação dos resultados do teste confirmatório no soro, foram utilizados como valores de referência para a concentração de 17OHP, por CL-MS/MS: 17OHP < 5,0 ng/ml para RNs (até 30 dias de vida) e 17OHP < 1,73 ng/ml (crianças de 1 mês a 1 ano de vida). Estes valores de referência são utilizados, em nosso meio, pelos laboratórios públicos e privados que empregam esta metodologia.

As amostras analisadas por CL-MS/MS foram congeladas a -20°C e, posteriormente, analisadas por radioimunoensaio por laboratório terceirizado privado, uma vez que esta metodologia deixou de ser realizada no LIM-42 do HC-FMUSP em 2014. Pela metodologia do radioimunoensaio, foram utilizados

os seguintes valores de referência: RNs com 1-5 dias: 17OHP < 4,2 ng/ml; RNs com 6-30 dias: 17OHP < 16,8 ng/ml; crianças de 31-60 dias: 17OHP < 9,8 ng/ml; crianças de 61-90 dias: 17OHP < 4,0 ng/ml; crianças com mais de 90 dias: 17OHP < 0,9 ng/ml. Estes valores de referência são descritos no *kit Diasource®*, Bélgica, utilizado pelo laboratório privado.

Aos RNs com valores de 17OHP acima de duas vezes o limite superior da normalidade no teste confirmatório no soro por CL-MS/MS ou, quando não disponível, por RIE, foi oferecida a análise por biologia molecular para a pesquisa de mutações no gene *CYP21A2*. Destes, 35 compareceram para o estudo molecular.

3.3 Estudo molecular do gene *CYP21A2*

O DNA genômico foi extraído de leucócitos periféricos pela técnica *salting-out*. A concentração do DNA foi obtida através de leitura em espectrofotômetro (Amersham, Pharmacia, Uppsala, Suécia) no comprimento de onda 260 nm (1,0 unidade DO 260 = 50 µg/ml). Utilizamos a razão 260/280 >1,8 como ideal de pureza do DNA. As amostras de DNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% para verificar sua integridade e estocadas a 4°C até a sua utilização.

O gene *CYP21A2* foi amplificado por PCR utilizando *primers* específicos, evitando amplificação do pseudogene (18, 83). Esta especificidade foi obtida através da utilização de *primers* localizados no exon 3 que não contem a deleção de oito nucleotídeos, característica do pseudogene. Os *primers* utilizados foram o P4 e o P55 (84).

Os produtos de PCR foram purificados através de pré-tratamento enzimático com 2µL de ExoSAP-IT (*USB Corporation, Cleveland, OH, USA*), para cada 50ng de massa de DNA, conforme instruções do fabricante. Em seguida, o produto de PCR purificado foi submetido à reação de sequenciamento utilizando o *Kit ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) com 5 pmol de *primers* específicos (83, 85). Para o ensaio de sequenciamento, foi utilizado o termociclador *Veriti 96-Well Thermal Cycler* (*Applied Biosystems, Foster City,*

CA, USA) seguindo o protocolo com 25 ciclos de: 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. Os produtos foram submetidos à eletroforese capilar em sequenciador automático de DNA e os eletroferogramas foram analisados através do *software ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os resultados obtidos foram comparados com as respectivas sequências selvagens obtidas do *Gene Bank*, *Ensembl ID*: ENSG00000231852.

Os RNs que apresentaram uma ou nenhuma mutação foram considerados não afetados e tiveram alta do seguimento (24). Para os RNs portadores de duas ou mais mutações, foi realizado estudo de segregação das mutações em amostras de DNA de pelo menos um dos genitores.

Para os pacientes com HAC-21OH confirmada, foi oferecido seguimento ambulatorial no ambulatório de hiperplasia adrenal congênita da Disciplina de Endocrinologia do HC-FMUSP, bem como nos demais centros universitários especializados, como Hospital Central da Santa Casa de São Paulo, Hospital São Paulo da Universidade Federal de São Paulo, Hospital de Clínicas da Universidade de Campinas.

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados numéricos são apresentados como média $\pm$ DP (desvio padrão) para as variáveis que apresentaram distribuição normal e como medianas, variação por faixas e percentil para as variáveis sem distribuição normal.

Para a correlação entre o peso ao nascimento e o tempo de vida na coleta no teste do pezinho, foram utilizados os testes não paramétricos de *Kendall* e *Spearman*. Para a comparação do tempo de coleta nas amostras de soro, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para amostras independentes.

Os dados referentes à 17OHP, androstenediona e 21-deoxicortisol estão expressos em mediana, intervalo interquartil (IQ 25-75), uma vez que a distribuição destas variáveis não foi normal nos pacientes afetados.

A sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo foram assim definidos:

Sensibilidade: capacidade de um exame em detectar a HAC-21OH quando presente; medida pela proporção dos indivíduos com a doença que tem um resultado positivo, sobre todos os indivíduos com a doença que foram submetidos ao teste.

Especificidade: capacidade de um exame em identificar corretamente a ausência de HAC-21OH; medida pela proporção entre indivíduos sem a doença que tem um resultado negativo e todos os indivíduos sem a doença que foram submetidos ao teste.

Valor Preditivo Positivo (VPP): a probabilidade de HAC-21OH em um paciente com o resultado de um teste confirmatório positivo (anormal).

Valor Preditivo Negativo (VPN): a probabilidade de não ter a doença quando o resultado do teste confirmatório for negativo (normal).

$$\text{Sensibilidade} = VP/(VP+FN)$$

$$\text{Especificidade} = VN/(VN+FP)$$

$$\text{Valor Preditivo Positivo} = VP/(VP+FP)$$

$$\text{Valor Preditivo Negativo} = VN/(VN+FN)$$

VP: verdadeiro-positivos; FN: falso-negativos; VN: verdadeiro-negativos; FP: falso-positivos;

A relação entre a sensibilidade e especificidade de um determinado teste diagnóstico, bem como a taxa de falso-positivos e de verdadeiro-positivos em múltiplos pontos de corte, podem ser melhor analisadas pela curva ROC (*receiver-operating-characteristic*). Utilizando esta curva, é possível determinar o ponto de corte mais adequado para um teste confirmatório. Testes diagnósticos com bom poder discriminatório aproximam-se do canto superior esquerdo, em que, à medida que a sensibilidade aumenta, há pouca ou nenhuma perda da especificidade, até que níveis mais altos sejam alcançados. A acurácia global de um teste é representada como a área sob a curva ROC, ou seja, quanto maior a área, melhor o teste.

Foram, então, calculados o VPP e o VPN de cada teste confirmatório e analisada a acurácia de cada uma das razões entre os esteroides descritas anteriormente, objetivando estabelecer uma metodologia acessível, confiável e logisticamente possível para ser proposta ao Ministério da Saúde e utilizada em larga escala no Programa Nacional de Triagem Neonatal do Brasil.

Os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o software *IBM SPSS Statistics*, versão 22, e os gráficos apresentados foram elaborados no *SPSS* e no *Microsoft Excel*.

Os dados deste estudo foram coletados e armazenados na plataforma eletrônica de gerenciamento de dados *REDCap*, ferramenta que garante a qualidade, segurança e privacidade dos dados dos pacientes (86). O uso desta plataforma é oferecido gratuitamente pela Faculdade de Medicina da USP.

5 RESULTADOS

5.1 Primeiro teste de triagem – N17OHP no papel de filtro

Entre os meses de janeiro de 2014 e dezembro de 2015, 708.437 recém-nascidos foram submetidos à dosagem da 17OHP neonatal (N17OHP) no papel de filtro na área de cobertura da APAE São Paulo. Destes, 5.950 RNs apresentaram PN<1500g, 13.177 de 1501-2000g, 43.923 de 2001-2500g e 645.387 acima de 2500g. A mediana do tempo de vida na coleta do teste do pezinho (TP) foi de 6 dias (3-11 dias). O tempo de vida na coleta do TP se correlacionou de modo inversamente proporcional ao peso do RN ao nascimento ($P<0,0001$). O tempo de coleta da amostra do papel de filtro nos afetados não foi diferente dos falso-positivos. A mediana do tempo de envio do teste após a sua coleta para o laboratório foi de 5 dias (2-7 dias). A distribuição dos RNs por faixa de peso ao nascimento, a mediana do tempo de vida na coleta do TP em cada faixa de peso e as taxas de convocação estão descritas na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Tempo de vida na coleta do teste do pezinho por faixa de peso ao nascimento e respectivas taxas de convocação.

PN (g)	RNs (n)	Tempo de vida na coleta (dias)	N17OHP $\geq$ P99,5 (n)	Taxa de convocação (%)
< 1500 g	5.950	9 (5-15)	84	1,41
1501-2000 g	13.177	7 (4-14)	128	0,97
2001-2500 g	43.923	5 (3-9)	264	0,60
> 2500 g	645.387	3 (2-7)	1.426	0,22
Totais	708.437	6 (3-11)	1.902	0,27

PN: peso ao nascimento; RNs: recém-nascidos; N17OHP: 17OHP neonatal no papel de filtro; P99,5: percentil 99,5 ajustado para o peso ao nascimento. Dados de tempo de vida apresentados em mediana (IQ 25-75).

Nestes primeiros dois anos de triagem neonatal da HAC-21OH em São Paulo, os RNs foram convocados por outros motivos além da alteração da N17OHP no primeiro teste em papel de filtro: um deles foi o comparecimento para realização do primeiro teste após 28 dias de vida, sendo encaminhados direto para coleta de soro de todos os testes de triagem ($n=8.854$); outro motivo foi a administração de corticoide para a mãe no parto (n=11.504), pelo provável risco de resultado falso-negativo. Interessantemente, conforme pode

observar-se na **Figura 3**, houve uso importante de corticoide até mesmo nos RNs com peso adequado ao nascimento (RN de termo). Apenas 1.902 RNs foram convocados por alteração da N17OHP no papel de filtro inicial. A distribuição destes RNs e da convocação pelos diferentes motivos, por faixa de peso, estão especificadas na **Figura 3**.

Figura 3 – Fatores para convocação dos RNs de acordo com peso ao nascimento. **Corticoide antes do parto:** convocados para coleta da 17OHP no soro, independentemente do resultado da N17OHP; **Tardio:** teste realizado diretamente no soro, por terem se apresentado para coleta com mais de 28 dias de vida; **N17OHP alterada:** convocados para repetição da 17OHP, no papel de filtro ou no soro, por terem apresentado valores da N17OHP alterados no primeiro papel de filtro.

Do total de 1.902 (0,27%) RNs que apresentaram valores alterados da N17OHP no papel de filtro, 1.584 foram convocados para repetição em segunda coleta em papel de filtro, por discreta alteração da N17OHP, sendo que em 1.552 a N17OHP na segunda amostra no papel de filtro teve valor normal (98%). A redução média no valor da N17OHP no segundo papel de filtro foi de 60%. Em apenas 16 RNs que foram encaminhados para nova coleta em papel de filtro houve aumento da N17OHP, com incremento médio de 11%;

todos foram submetidos a teste confirmatório sérico em outros laboratórios, com relato de normalização dos valores da 17OHP.

Os 318 RNs (0,04%) remanescentes foram encaminhados diretamente para teste confirmatório no soro por apresentarem valores da N17OHP mais elevados (**Tabela 3**); 261/318 foram classificados como falso-positivos (FP), resultando em uma taxa de 0,037%. Nos 57 RNs remanescentes confirmou-se o diagnóstico da forma clássica da HAC-21OH.

Tabela 3 – Convocações (%) no primeiro teste no papel de filtro por faixa de peso ao nascimento.

Peso (g)	Total	Geral	Papel de filtro		Soro			
		Convocados (n)	Convocados (n)	Taxa convocados	Convocados (n)	Taxa convocados	Falso-positivos (n)	Afetados (n)
≤ 1500 g	5.950	84	25	0,42%	59	0,99%	59	0
1501-2000 g	13.177	128	102	0,77%	26	0,20%	25	1
2001-2500 g	43.923	264	224	0,51%	40	0,09%	36	4
> 2500 g	645.387	1.426	1.233	0,19%	193	0,03%	141	52
Total	708.437	1.902	1.584	0,22%	318	0,04%	261	57

Na **Figura 4**, fica evidente a relação inversamente proporcional entre a taxa de convocação e a faixa de peso ao nascimento.

Figura 4 – Taxas de convocação para coleta de teste confirmatório no papel de filtro e no soro por faixa de peso ao nascimento.

Os prematuros, apesar de compreenderem apenas 9% do total de nascimentos, representaram 46% do total de resultados FP, como demonstrado na **Figura 5**.

Figura 5 – Proporção de prematuros no total de recém-nascidos e dentre os com resultados falso-positivos.

A: distribuição do número total de recém-nascidos, de acordo com o peso ao nascimento, submetidos à triagem em papel de filtro (n=708.437). **B:** distribuição dos recém-nascidos com resultados falso-positivos no primeiro teste e que foram encaminhados diretamente para teste confirmatório no soro (n=261).

Com relação à taxa de resultados falso-negativos (FN) no primeiro teste, foi observado apenas 1 caso com a forma virilizante simples (Caso 50, Tabela 7), até o momento. Trata-se de paciente do sexo masculino, com PN de 3.070 gramas, cuja coleta do teste do pezinho foi realizada com 5 dias de vida e o resultado da N17OHP foi de 11,6 ng/ml (VR< 17,1 ng/ml). Considerando que havia a informação no papel de filtro de que a mãe recebera corticoide no periparto, o bebê foi encaminhado para teste confirmatório no soro, com 43 dias de vida, quando se estabeleceu o diagnóstico da forma clássica (17OHP/RIE de 83,2 ng/ml). Com este caso, totalizou-se 58 casos da forma clássica da doença.

O primeiro teste de triagem no papel de filtro apresentou sensibilidade de 98,3% e especificidade de 99,7% para detecção da forma clássica da HAC. O valor preditivo negativo foi de 99,99% e, apesar de uma especificidade

aparentemente elevada, o valor preditivo positivo foi de apenas 3% (ao se utilizar o valor de referência de 99,5).

O menor valor em um recém-nascido afetado por forma clássica da 17OHP neonatal no papel de filtro foi de 31,1 ng/ml na forma perdedora de sal (Caso 27, Tabela 7) e de 36,6 ng/ml na forma virilizante simples (Caso 52, Tabela 7), excluindo os valores dos RNs cujas mães haviam recebido corticoide no periparto.

5.2 Testes confirmatórios no soro

A mediana do tempo de vida na coleta do teste confirmatório sérico, considerando os 318 RNs que tiveram resultado positivo no primeiro teste, foi de 70 dias (53-99 dias). Entre os RNs altamente suspeitos para HAC, ou seja, com valores de N17OHP acima de 2 vezes o P99,5, a mediana do tempo de vida na coleta do soro foi menor, de 17 dias (13-34 dias).

Dentre os 318 RNs acima referidos, 15 receberam corticoide antes da coleta do soro, por terem recebido o primeiro atendimento médico em serviço de emergência, e seus dados foram excluídos da análise estatística. Dos 303 RNs remanescentes, não tivemos acesso ao teste confirmatório de 14, por estarem em acompanhamento em serviços particulares.

Portanto, foram analisadas 289 amostras de soro: 28 de RNs afetados pela forma clássica e 261 de RNs com testes falso-positivos, subgrupo que incluiu também os RNs com a forma NC detectados acidentalmente pela triagem.

Além da coleta das 318 amostras de soro citadas acima, foram coletadas outras 596 amostras: 261/596 por administração de corticoide à mãe no periparto e 335/596 por triagem iniciada com mais de 28 dias de vida (tardios). No grupo corticoide, a média do tempo de vida do RN na coleta do teste confirmatório foi de 78 ± 40 dias, e no grupo tardio foi de 97 ± 51 dias ($p > 0,05$). As amostras destes RNs foram utilizadas para determinação dos valores de referência no soro no período neonatal da 17OHP (RIE e CL-MS/MS) e do 21-deoxicortisol. A **Figura 6** mostra a distribuição das 914 amostras de soro por faixa de peso ao nascimento.

Figura 6 – Fatores para coleta das amostras de soro em cada faixa de peso ao nascimento.

Corticoide: administração de corticoide para a mãe no periparto. **Tardio:** primeiro teste de triagem após 30 dias de vida. **Falso-positivo:** valor da N17OHP alterado em papel de filtro e exclusão do diagnóstico de forma clássica após teste confirmatório no soro. **Afetados:** valor da N17OHP alterado no papel de filtro, com diagnóstico de forma clássica após teste confirmatório no soro.

A dosagem da 17OHP por RIE foi realizada em 252 amostras: 28 de RNs afetados pela forma clássica e 224 de RNs com resultados FP, dentre os quais 159 (71%) apresentaram normalização da 17OHP sérica. Portanto, o número de resultados indeterminados por esta metodologia foi de 65 (29%).

A dosagem da 17OHP por CL-MS/MS foi realizada em 289 amostras: 32 de RNs afetados pela forma clássica e 257 de RNs com resultados FP, dentre os quais 225 (88%) apresentaram normalização da 17OHP sérica. Portanto, o número de resultados indeterminados por esta metodologia foi de 32 (12%).

A **Tabela 4** reúne as informações de sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo da dosagem da 17OHP no soro pelas metodologias RIE e CL-MS/MS.

Tabela 4 – Comparação da sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo da dosagem da 17OHP no soro por RIE e por CL-MS/MS.

	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)
17OHP no soro por RIE	100	71	30	100
17OHP no soro por CL-MS/MS	100	87,5	49,2	100

S: sensibilidade; E: especificidade; VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo; 17OHP: 17-hidroxi-progesterona; RIE: radioimunoensaio; CL-MS/MS: cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas.

Valores de referência (RIE) - RNs com 1-5 dias: 17OHP < 4,2 ng/ml; RNs com 6-30 dias: 17OHP < 16,8 ng/ml; crianças de 31-60 dias: 17OHP < 9,8 ng/ml; crianças de 61-90 dias: 17OHP < 4,0 ng/ml; crianças com mais de 90 dias: 17OHP < 0,9 ng/ml.

Valores de referência (CL-MS/MS) - 17OHP < 5,0 ng/ml para RNs (até 30 dias de vida) e 17OHP < 1,73 ng/ml (crianças de 1 mês a 1 ano de vida).

Para analisar o desempenho das dosagens de 17OHP, androstenediona e 21-deoxicortisol como teste confirmatório, bem como da relação entre os esteroides e o cortisol, foram utilizadas amostras de soro de 596 RNs controles, 261 RNs falso-positivos no teste do pezinho e 58 RNs verdadeiramente positivos para as formas clássicas da HAC. A mediana do tempo de vida na coleta da amostra de soro nestes 3 grupos foi de 75 (58-106), 64 (40-84) e 18 (13-32) dias, respectivamente, com significância estatística ($P < 0,001$). **Figura 7.**

Figura 7 - Mediana do tempo de vida (dias) da criança na coleta da amostra de soro nos grupos controle, falso-positivos e afetados pela forma clássica da HAC-21OH.

Como pode ser observado na **Figura 8**, em relação às dosagens da 17OHP no soro por diferentes metodologias, houve sobreposição entre valores de afetados pelas formas clássicas da HAC-21OH e RNs com resultados falso-positivos no primeiro teste. Os RNs que já haviam sido submetidos a tratamento com glicocorticoide antes da coleta de amostra do soro foram excluídos desta análise.

Figura 8 - Dosagem da 17OHP no soro nos grupos controle, falso-positivos e afetados pela forma clássica da HAC-21-OH.

A: dosagem por radioimunoensaio (RIE). **B:** dosagem por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-MS/MS).

Dos 5 RNs falso-positivos cujo resultado da 17OHP por RIE no soro apresentou sobreposição com valores de afetados, 2 são portadores da forma não clássica, confirmada por estudo molecular, 2 não compareceram para coleta de amostra de DNA e, no outro, houve normalização da dosagem da 17OHP quando repetida por CL-MS/MS.

Dos 3 RNs falso-positivos cujo resultado da 17OHP por CL-MS/MS no soro apresentou sobreposição com valores de afetados, todos eram portadores da forma não clássica, confirmada por estudo molecular, sendo que dois deles apresentavam heterozigose composta para mutações de forma clássica.

A **Figura 9** mostra os valores do 21-deoxicortisol no soro por CL-MS/MS nos diferentes grupos e também evidencia que houve sobreposição entre resultados de afetados pelas formas clássicas da HAC-21OH e RNs com resultados falso-positivos no primeiro teste.

Figura 9 - Valores do 21-deoxicortisol (21DF) no soro nos grupos controle, falso-positivos e afetados pela forma clássica da HAC-21-OH. Dosagem pela metodologia cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-MS/MS).

Dos 4 RNs falso-positivos cujo resultado do 21-DF por CL-MS/MS no soro apresentou sobreposição com os valores de afetados, 3 eram os portadores da forma não clássica, confirmada pelo estudo molecular e o outro não compareceu para a realização do estudo molecular.

O desempenho diagnóstico das dosagens da 17OHP pelas duas metodologias, bem como das relações entre os esteroides, foi avaliado através da análise da curva ROC. A área sob a curva ROC, bem como os pontos de corte que apresentaram 100% de especificidade (VPP 100%) e 100% de sensibilidade (VPN 100%), estão apresentados na **Tabela 5**. Inicialmente, foi

avaliada a eficácia destes testes para diagnóstico da forma clássica, incluindo os pacientes com a forma PS e VS.

Tabela 5 - Eficácia dos diferentes testes confirmatórios no soro para diagnóstico das formas clássicas da HAC-21OH.

	AUC (%)	Ponto de corte	E (%)	S (%)
17OHP dosada por RIE (ng/ml)	99,8	78,2 47,7	100 86	91,7 100
17OHP dosada por CL (ng/ml)	99,9	80,9 48,3	100 99,2	82,6 100
21-deoxicortisol (CL) (ng/ml)	99,9	9,71 2,4	100 98,4	95,2 100
17OHP/cortisol (CL) (sem unidade)	99,9	26 9	100 99,2	90,5 100
(17OHP+Δ4)/cortisol (CL) (sem unidade)	99,9	24,9 9,7	100 99,2	95,2 100
(17OHP+21DF)/cortisol (CL) (sem unidade)	99,9	37,9 9,6	100 98,8	90,5 100

17OHP: 17-hidroxi-progesterona; Δ 4: androstenediona; 21DF: 21-deoxicortisol; RIE: radioimunoensaio; CL: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas; AUC: área sob a curva ROC; E: especificidade; S: sensibilidade.

Foi avaliada, ainda, a eficácia destes testes para o diagnóstico isolado da forma perdedora de sal, por sua maior gravidade e urgência para evitar a crise de desidratação com perda de sal. A **Tabela 6** apresenta as características destes mesmos testes para o diagnóstico da forma PS.

Tabela 6 - Eficácia dos diferentes testes confirmatórios no soro para diagnóstico da forma perdedora de sal da HAC-21OH.

	AUC (%)	Ponto de corte	E (%)	S (%)
17OHP dosada por RIE (ng/ml)	100	82,4	100	100
17OHP dosada por CL (ng/ml)	99,9	80,9 50,9	100 99,2	94,4 100
21-deoxicortisol (CL) (ng/ml)	99,9	16,3 2,4	100 98,4	94,1 100
17OHP/cortisol (CL) (sem unidade)	99,9	58,4 14,3	100 99,6	94,1 100
(17OHP+Δ4)/cortisol (CL) (sem unidade)	100	24,9	100	100
(17OHP+21DF)/cortisol (CL) (sem unidade)	99,9	76,3 15,4	100 99,6	94,1 100

Nota: destaca-se o pequeno número de afetados avaliados pela metodologia RIE.

17OHP: 17-hidroxi-progesterona; Δ 4: androstenediona; 21DF: 21-deoxicortisol; RIE: radioimunoensaio; CL: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas; AUC: área sob a curva ROC; E: especificidade; S: sensibilidade.

5.3 Recém-nascidos afetados por HAC-21OH

No período de 2 anos de triagem, 58 RNs com a forma clássica (47 PS; 11 VS) foram diagnosticados, resultando em incidência de aproximadamente 1:12.200. A forma PS compreendeu 80% dos casos, e a proporção do sexo F:M foi de 1,2:1,0.

O primeiro teste de triagem no papel de filtro foi capaz de detectar 57/58 casos, sendo que 1 único RN (Caso 50, Tabela 7) com a forma VS obteve resultado falso-negativo (N17OHP de 11,6 ng/ml) provavelmente decorrente do uso de corticoide pela mãe no parto.

Dados sobre o teste confirmatório de 44/58 casos afetados pela forma clássica foram obtidos; os restantes, por terem sido realizados em instituições privadas, não foram disponibilizados. Ambas as metodologias de dosagem da

17OHP sérica, RIE e CL-MS/MS, detectaram 100% dos casos afetados pela forma clássica da HAC-21OH. Nas dosagens por RIE, os valores da 17OHP dos afetados pela forma PS variaram de 91 a 1880 ng/ml, mediana 253 ng/ml (IC 95%: 112-312), e, pela forma VS, de 32 a 230 ng/ml, mediana 83 ng/ml (IC 95%: 55-99); nas dosagens por CL-MS/MS, a 17OHP sérica variou na forma PS de 56 a 668 ng/ml, mediana 228 ng/ml (IC 95%:139-453) e, na forma VS, de 51 a 117 ng/ml, mediana 54 ng/ml (IC 95%: 51-73). Apesar da instituição da terapia com corticoide antes da coleta do soro em 15 de 58 RNs afetados pela forma clássica, em apenas 1 portador da forma VS (Caso 48, Tabela 7) observou-se valor normal da 17OHP sérica.

A média do tempo de vida na primeira consulta em nosso centro de referência foi de 18 ± 8 dias. Embora os RNs com a forma PS estivessem oligo ou assintomáticos na data da primeira consulta, em 25 de 38 (65%) casos observou-se valores de sódio abaixo de 135 mEq/L, com mediana de 126 (IQ 118-133), e 7 destes casos apresentavam hiponatremia grave, com sódio ≤ 115 mEq/L.

Na primeira consulta dos RNs altamente suspeitos para o diagnóstico da forma clássica por valores da N17OHP ≥ 2 vezes o P99,5 e/ou, no caso das meninas, presença de atipia genital, foi iniciada a reposição de glico e mineralocorticoide imediatamente após a coleta do teste confirmatório no soro.

A forma PS foi definida, clínica e laboratorialmente, pela presença de hiponatremia no período neonatal ou pela necessidade de aumento da dose do mineralocorticoide durante o acompanhamento (sódio sérico abaixo do limite inferior associado a valores muito elevados da renina sérica). Os RNs com a forma VS apresentavam sódio dentro dos valores de normalidade e o mineralocorticoide foi progressivamente retirado. Apesar de todos os afetados apresentarem aumento importante da 17OHP sérica, por ambas as metodologias, a distinção entre as formas clínicas pelo valor da 17OHP não foi possível.

Das 31 meninas afetadas pela forma clássica, em 13 a informação sobre o Prader estava disponível, sendo 1 classificada com Prader 2, 4 com Prader 3, 5 com Prader 4 e 3 com Prader 5. A atipia genital Prader 3 em uma menina não foi reconhecida em Centro de Referência do Estado de São Paulo. Duas das 3

RNs com escore de virilização Prader 5 foram registradas no sexo masculino, uma vez que a atipia genital também não foi reconhecida, apesar da ausência de gônadas palpáveis. Após o diagnóstico, explicação para os pais sobre a doença e avaliação psicológica, foi possível a reversão para o sexo feminino nos 2 casos. Em 18 meninas afetadas, a informação sobre o reconhecimento da atipia genital não foi disponível.

Neste período, ocorreram 2 óbitos de RNs afetado pela forma PS (Casos 11 e 38 Tabela 7), não por falta de diagnóstico, mas por outras causas descritas a seguir. No Caso 11, apesar de a mãe ter sido contactada pela busca ativa da APAE mais do que uma vez, não levou o RN para consulta imediata. Subsequentemente, a criança internou em serviço de emergência com desidratação hiponatrêmica grave e choque hipovolêmico, evoluindo para óbito. No Caso 38, a criança apresentava uso irregular da medicação e, ao ser questionada, a mãe alegou dificuldade na obtenção da fludrocortisona.

A todos os recém-nascidos portadores da forma clássica da HAC e àqueles com resultados falso-positivos que se mantiveram significativamente alterados no teste confirmatório no soro por CL-MS/MS, foi oferecido o estudo molecular do gene *CYP21A2* por meio de coleta de sangue periférico. Destes, 35 compareceram para coleta de amostra para o estudo molecular.

A **Tabela 7** reúne os dados clínicos e laboratoriais dos recém-nascidos afetados pelas formas clássicas.

Tabela 7 – Características clínicas, laboratoriais e genótipo dos recém-nascidos afetados pelas formas clássicas da HAC-21OH.

Pt.	Forma	Sexo	PN (g)	Id TP	N17OHP (ng/ml)	Id Soro	Na	17OHP (RIE)	17OHP (CL)	21-DF (CL)	Genótipo
1	PS	M	2540	2	304,0	22	126	-	7,4 *	16,3 *	Deleção / Deleção
2	PS	M	2360	2	322,6	-	131	-	14,1 *	-	-
3	PS	F	2260	7	387,1	-	129	-	17,8 *	-	-
4	PS	F	3605	2	196,9	49	135	-	22,3 *	12,1 *	I2 splice / Q318X
5	PS	F	3540	3	164,4	7	139	129,2 *	25,5 *	0,5 *	GR / GR
6	PS	M	3335	2	95,4	19	131	-	26,7 *	7,3 *	-
7	PS	F	3445	3	222,0	50	136	-	34,3 *	6,2 *	GR / I2 splice
8	PS	F	4430	2	275,6	3	133	108,0	56,5	2,5	GR / GR
9	PS	M	2870	3	394,3	14	131	91,6	88,4	29,5	-
10	PS	F	3610	3	260,8	10	105	-	96,0	103,3	I2 splice / E6 Cluster, Q318X
11	PS	F	2090	4	369,8	-	126	-	115,0	-	-
12	PS	M	3270	2	199,8	14	121	-	130,5	72,2	I2 splice / R356W
13	PS	M	3990	2	524,2	14	136	325,0	189,7	23,3	Q318X / I2 splice, V281L
14	PS	M	3650	2	231,2	32	122	-	194,0	45,2	I2 splice / I2 splice
15	PS	F	3775	2	307,0	9	130	-	196,7	130,5	GR / GR
16	PS	F	3195	5	452,1	12	132	237,0	198,0	70,4	Q318X / Q318X
17	PS	M	4245	2	433,4	29	95	253,2	228,4	28,8	Q318X / Q318X
18	PS	F	3855	2	180,4	16	115	-	248,0	54,9	-
19	PS	M	3765	2	258,9	13	122	297,0	256,2	23,6	GR / GR
20	PS	F	3340	3	397,0	23	140	298,0	286,4	29,3	-
21	PS	M	3465	4	370,5	13	124	-	330,3	75,8	-
22	PS	M	3200	2	394,3	45	124	116,9	452,5	82,5	I2 splice / Deleção
23	PS	F	3440	4	736,6	23	115	-	517,4	117,9	-
24	PS	F	3150	18	337,2	15	111	1880,2	581,5	76,1	I2 splice / Deleção
25	PS	F	3150	4	489,4	44	136	-	668,1	135,6	E6 Cluster, R483W / Conversão
26	PS	F	3470	2	276,0	6	129	135,8	-	-	I2 splice / IVS2-2A>G
27	PS	F	2950	2	31,1	13	131	212,0	-	-	I172N / IVS2-2A>G
28	PS	M	2455	8	494,0	-	94	> 20 *	-	-	-
29	PS	M	3350	6	351,7	19	101	400,1	-	-	R356W / Deleção
30	PS	M	3650	3	480,3	-	-	191,0	-	-	-
31	PS	F	3985	2	127,0	-	-	41,8 *	-	-	-
32	PS	F	2600	13	437,4	-	-	38,6 *	-	-	-
33	PS	F	4020	3	264,5	8	143	36,0 *	-	-	-
34	PS	M	3620	2	27,7*	-	-	30,5 *	-	-	-
35	PS	F	3155	2	77,5	-	132	30,4 *	-	-	-
36	PS	M	2910	2	221,5	81	126	24,7 *	-	-	I2 splice / Q318X, R356W
37	PS	M	2930	7	41,4	-	-	-	-	-	-
38	PS	F	3740	3	119,9	-	126	-	-	-	-
39	PS	M	3205	2	137,7	-	-	-	-	-	-
40	PS	M	3820	2	154,4	-	-	-	-	-	-
41	PS	F	3885	4	163,1	-	-	-	-	-	-
42	PS	M	3200	2	330,0	-	-	-	-	-	-
43	PS	M	1825	3	379,6	-	-	-	-	-	-
44	PS	F	3095	4	396,1	-	-	-	-	-	-
45	PS	M	3580	2	410,9	-	-	-	-	-	-
46	PS	F	2655	4	443,5	-	-	-	-	-	-
47	PS	F	2880	2	469,2	-	-	-	-	-	-

(continua)

Pt.: paciente; PN: peso ao nascimento; Id TP: idade do RN na coleta do teste do pezinho; N17OHP: 17OH-progesterona neonatal no papel de filtro; Id soro: idade do RN na coleta da amostra de soro; Na: sódio sérico; 21-DF: 21-deoxicortisol; PS: perdedor de sal; VS: virilizante simples; M: masculino; F: feminino; GR: grande rearranjo gênico; (*): coleta de amostra de soro após a instituição do tratamento com glicocorticoide.

Tabela 7 (cont.) – Características clínicas, laboratoriais e genótipo dos recém-nascidos afetados pelas formas clássicas da HAC-21OH.

Pt.	Forma	Sexo	PN (g)	Id TP	N17OHP (ng/ml)	Id Soro	Na	17OHP (RIE)	17OHP (CL)	21-DF (CL)	Genótipo
48	VS	F	2505	3	41,8	11	141	3,7 *	1,8 *	0,5 *	-
49	VS	M	3225	3	57,8	6	136	55,3	51,2	34,3	-
50	VS	M	3070	5	11,6*	43	-	83,2	54,0	10,0	-
51	VS	F	3835	3	53,1	10	136	99,0	73,1	51,3	I172N / I2 splice
52	VS	M	2950	2	36,6	31	135	32,0	104,0	-	I172N / G424S
53	VS	F	2860	7	48,8	57	135	135,2	117,3	37,1	I2 splice / R426H
54	VS	M	3620	2	52,8	17	133	230,2	-	-	I172N / InsT, Q318X, R356W
55	VS	M	2630	27	45,7	-	-	3,2 *	-	-	-
56	VS	F	2700	2	42,9	-	-	-	-	-	-
57	VS	F	2560	3	47,2	-	-	-	-	-	-
58	VS	F	3340	3	51,8	-	-	-	-	-	-

Pt.: paciente; PN: peso ao nascimento; Id TP: idade do RN na coleta do teste do pezinho; N17OHP: 17OH-progesterona neonatal no papel de filtro; Id soro: idade do RN na coleta da amostra de soro; Na: sódio sérico; 21-DF: 21-deoxicortisol; PS: perdedor de sal; VS: virilizante simples; M: masculino; F: feminino. (*): coleta de amostra de soro após a instituição do tratamento com glicocorticoide.

O fluxograma de realização dos testes confirmatórios por diferentes metodologias está representado na **Figura 10**.

Figura 10 – Fluxograma dos recém-nascidos submetidos à triagem neonatal da HAC-21OH e que foram encaminhados para coleta de teste confirmatório no soro por alteração da N17OHP no papel de filtro.

As dosagens da 17OHP pelas metodologias RIE e CL-MS/MS foram realizadas na mesma amostra de soro do recém-nascido.

N17OHP: 17-hidroxi-progesterona neonatal; IFMA: imunofluorimétrico; P99,5: percentil 99,5; PN: peso ao nascimento; FN: falso-negativo; RIE: radioimunoensaio; CL-MS/MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas; N/D: não disponíveis; (*): Amostras excluídas da análise por terem sido colhidas após a administração de glicocorticoide ao recém-nascido.

Os 32 recém-nascidos assintomáticos e com resultados alterados pela metodologia CL-MS/MS permaneceram em seguimento no Ambulatório da APAE São Paulo, destacando-se que os RNs do sexo feminino apresentavam genitália externa normal. Estas crianças foram seguidas até normalização da 17OHP no soro ou, em alguns casos, foram encaminhadas aos Centros de Referência para avaliação especializada devido a valores flutuantes de 17OHP sérica. A **Tabela 8** reúne as informações disponíveis sobre os casos indeterminados (RNs assintomáticos e com resultados alterados no teste confirmatório pela metodologia CL-MS/MS).

Como pode ser observado, em 11/32 casos com resultados indeterminados, foi colhida amostra de sangue para o estudo molecular. Em 4/11 casos, foi identificado genótipo que prediz a forma não clássica da HAC-21OH; dentre os casos remanescentes: 4 não possuíam mutações e 2 apresentavam mutação em heterozigose no gene *CYP21A2*, o que permitiu a exclusão da doença e a alta do seguimento (Casos 84 e 89, Tabela 8). Em 1 caso, houve falha na amplificação do DNA e a família não compareceu para coleta de nova amostra.

Tabela 8 - Características clínicas, laboratoriais e genótipo dos RNs assintomáticos e com resultados alterados no teste confirmatório pela metodologia CL-MS/MS.

Pt.	Diagn	Sexo	PN (g)	Id TP	N17OHP (ng/ml)	Id Soro	17OHP (RIE)	17OHP (CL)	21-DF (CL)	Relações entre esteroides			Genótipo
										17OHP Cortisol	17+Δ4 Cortisol	17+21DF Cortisol	
59	HAC-NC	F	3255	8	20,6	82	66,9	73,3	9,4	12,4	12,7	14,0	V281L / Q318X, R356W
60	HAC-NC	M	2030	12	4,8	117	70,0	58,0	4,6	4,3	4,4	4,7	V281L / V281L
61	HAC-NC	M	4100	29	95,0	222	10,7	45,3	2,8	4,3	4,3	4,5	V281L / R426H
62	HAC-NC	F	-	-	-	44	9,9	-	-	-	-	-	V281L / V281L
63	Indeterm.	F	-	-	-	118	11,7	23,2	1,2	2,6	2,6	2,7	†
64	Indeterm.	F	820	26	161,8*	39	38,6	20,2	1,1	19,8	23,6	20,9	†
65	Indeterm.	F	-	-	-	119	40,1	19,2	2,3	1,7	1,8	2,0	†
66	Indeterm.	F	735	8	149,2*	40	23,6	17,7	1,4	2,8	4,7	3,0	†
67	Indeterm.	M	1120	5	338,6	17	22,9	12,0	0,5	2,3	2,7	2,4	†
68	Indeterm.	M	2785	18	47,6	75	7,4	10,8	3,4	3,0	3,3	4,0	†
69	Indeterm.	M	-	-	-	178	-	8,6	2,2	0,4	0,4	0,5	†
70	Indeterm.	F	2530	10	95,7	24	9,2	8,5	0,6	3,8	4,8	4,1	†
71	Indeterm.	M	1535	13	205,9*	26	4,7	8,1	0,7	2,5	3,9	2,7	†
72	Indeterm.	F	2785	18	47,6	49	7,2	6,4	0,6	3,3	3,5	3,6	†
73	Indeterm.	M	3430	2	96,6	18	-	5,7	0,5	0,9	1,6	1,6	sem mutação
74	Indeterm.	M	2405	2	76,4	31	16,8	5,3	0,7	6,4	7,6	7,3	†
75	Indeterm.	M	1520	8	163,3*	28	7,0	5,2	0,5	3,8	4,4	4,1	†
76	Indeterm.	F	2080	4	138,5*	31	14,2	4,1	0,5	2,2	2,9	2,4	sem mutação
77	Indeterm.	M	3155	11	55,9	324	-	3,8	0,8	0,6	0,8	0,7	†
78	Indeterm.	F	840	6	159,1*	56	9,3	3,6	0,5	1,5	2,9	1,7	†
79	Indeterm.	F	2630	7	46,5	46	14,5	3,5	0,5	3,3	3,9	3,7	†
80	Indeterm.	M	2430	4	115,0	33	2,8	3,4	1,2	0,1	0,1	0,1	sem mutação
81	Indeterm.	M	2835	2	22,3	31	14,4	3,2	0,5	0,6	0,8	0,7	†
82	Indeterm.	M	2630	2	32,8	31	5,3	3,0	0,6	1,9	2,9	2,3	†
83	Indeterm.	F	2535	6	46,3	38	12,4	2,8	0,5	0,5	0,6	0,6	†
84	Indeterm.	M	2695	5	51,6	34	3,2	2,5	0,5	2,0	3,1	2,4	R479L / sem mutação
85	Indeterm.	M	2010	10	43,1	69	5,1	2,3	0,5	0,2	0,3	0,2	†
86	Indeterm.	F	2050	5	87*	33	5,6	2,3	0,5	4,7	5,7	5,7	†
87	Indeterm.	F	1690	3	75,6	35	7,0	2,2	1,0	0,1	0,2	0,2	†
88	Indeterm.	M	2170	3	218,9*	33	4,3	2,0	0,8	-	-	-	sem mutação
89	Indeterm.	F	-	-	-	154	2,1	1,9	0,5	0,1	0,1	0,1	V281L / sem mutação
90	Indeterm.	M	2690	4	98,3	14	16,9	1,9	0,5	0,2	0,3	0,3	◇

Pt.: paciente; PN: peso ao nascimento; Id. TP: idade do RN na coleta do teste do pezinho; N17OHP: 17-hidroxi-progesterona neonatal no papel de filtro; Id. soro: idade do RN na coleta da amostra de soro; Na: sódio sérico; 21-DF: 21-deoxicortisol; Indeterm.: indeterminado; PS: perdedor de sal; VS: virilizante simples; M: masculino; F: feminino.

†: não compareceu para coleta de amostra para o estudo molecular.

◇: falha na amplificação por PCR do DNA da amostra.

Para interpretação do resultado da 17OHP sérica, foram utilizados os valores de referência para crianças por faixa de idade na coleta do soro, por RIE e por CL-MS/MS, adotados pelos laboratórios públicos e privados que

realizam estas dosagens. Após a identificação dos casos afetados e falso-positivos, além das amostras de 484 controles (corticoide administrado à mãe no periparto e coletas tardias), foi possível determinar os valores de referência na população brasileira nas primeiras 16 semanas de vida, tanto por RIE (VR < 5,8 ng/ml) quanto por CL-MS/MS (VR < 3,0 ng/ml). Os resultados da 17OHP sérica nos RNs que colheram amostra de soro nos primeiros 30 dias de vida não diferiram significativamente dos que coletaram mais tardiamente, até 120 dias de vida ($p > 0,05$).

Em relação à administração de corticoide à mãe no periparto também não houve diferença estatística dos valores de 17OHP no soro comparado aos RNs das mães que não receberam corticoide ($p > 0,05$). As amostras de falso-positivos e afetados não foram incluídas neste cálculo.

De maneira geral, o resultado da 17OHP por RIE foi maior do que por CL-MS/MS, como pode ser verificado na **Figura 11**, que mostra um paralelo das dosagens por ambas as metodologias realizadas na mesma amostra de soro das crianças com resultados falso-positivos.

Figura 11 – Paralelo entre a dosagem de 17-hidroxi-progesterona por RIE e por CL-MS/MS no soro nos RNs com resultados falso-positivos.

17OHP: 17-hidroxi-progesterona; RIE: radioimunoensaio; CL-MS/MS: cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas.

Adicionalmente, de maneira semelhante à 17OHP sérica, determinamos o valor de referência para o 21-DF na nossa população nas primeiras 16 semanas de vida: VR < 1,0 ng/ml. Todos os RNs afetados pela forma clássica que colheram amostra de soro antes do início do tratamento com

glicocorticoide apresentaram 21-DF acima deste valor. O menor valor do 21-DF na forma PS foi de 2,5 ng/ml, numa coleta precoce de soro com 3 dias de vida, em RN do sexo feminino e com ambiguidade genital (Caso 8, Tabela 7).

Nos pacientes afetados pela forma clássica da HAC-21OH, o resultado do 21-DF no soro, por CL-MS/MS variou, na forma PS, de 2,5 a 135,6 ng/ml, mediana 29 ng/ml (IC 95%: 23-76) e, na forma VS, 10 a 51,3 ng/ml, mediana 34 ng/ml (IC 95%: 10-51).

O resultado da relação (17OHP+ Δ 4)/cortisol, todos dosados por CL-MS/MS, variou, na forma PS, de 26,3 a 458,7 e, na forma VS, de 9,9 a 58,3.

5.4 Estudo molecular *CYP21A2*

A todos os recém-nascidos afetados pelas formas clássicas da HAC-21OH foi oferecido o estudo molecular do gene *CYP21A2*, que teve o objetivo de ratificar o diagnóstico hormonal para, subsequentemente, validar os resultados encontrados na análise hormonal. Adicionalmente, as crianças assintomáticas com valores elevados da 17OHP sérica por CL-MS/MS também foram convocadas para a análise genética a fim de se identificar casos com a forma NC e casos com a forma VS com elevação moderada da 17OHP. No total, 35 crianças compareceram para o estudo molecular.

Dos 35 RNs submetidos ao estudo molecular, 24 eram portadores da forma clássica e todos tiveram mutações identificadas em 100% dos alelos. A correlação do genótipo com o fenótipo foi de 96%: apenas 1 paciente com a forma PS apresentou no alelo com mutação de menor gravidade a I172N e, no outro alelo, a mutação IVS2-2A>G (Caso 27, Tabela 7). Nesta mesma paciente, não foram identificadas mutações na região promotora e intrônica no alelo com a mutação I172N.

O resultado do estudo molecular possibilitou a alta do seguimento em centro de referência de triagem de 10 crianças: 4 afetadas pela forma não clássica da HAC e 6 sem genótipo de HAC (2 heterozigotas e 4 sem mutações) **Tabela 8.** Em apenas 1 indivíduo em seguimento por resultado alterado da 17OHP e submetido ao estudo genético não foi possível a amplificação do DNA por PCR.

A frequência das diferentes mutações encontradas nos portadores da forma clássica está apresentada na **Tabela 9**.

Tabela 9 – Frequências das mutações encontradas nos alelos dos RNs afetados pela forma clássica

Mutação	Frequência (%)
I2 splice	27,1
Deleção CYP21A2 ou grande rearranjo	31,3
Q318X	18,8
R356W	8,3
I172N	8,3
IVS2-2A>G*	4,2
E6 Cluster (I236N, V237E, M239K)	4,2
Ins T	2,1
G424S*	2,1
R426H*	2,1
R483W	2,1
V281L	2,1

(*) mutações não derivadas de eventos de recombinação com o pseudogene;
 %: frequência do total de 48 alelos de pacientes com a forma clássica.

Dentre as 12 mutações encontradas nos pacientes com HAC clássica, 9 são resultantes de eventos de recombinação gênica com o pseudogene, detectadas por PCR alelo específico, seguido por MLPA, e 3 são mutações mais raras já descritas na população brasileira: G424S, IVS 2-2A>G e R426H, detectadas pelo sequenciamento de todo o gene (83, 84). Dos 48 alelos de portadores da forma clássica, 5 (10,4%) carregavam mais de uma mutação de ponto no mesmo alelo, como mostrado na **Tabela 7**.

Entre os 4 portadores da forma não clássica da HAC detectados pela triagem, a mutação mais frequentemente encontrada foi a V281L, presente em 6/8 alelos (75%). Dois alelos carregadores de mutações preditoras da forma clássica (R426H e Q318X, R356W), como mostrado na **Tabela 8**.

6 DISCUSSÃO

O início da triagem da HAC-21OH no PNTN no final de 2013 possibilitou a coleta de um grande número de testes nos dois primeiros anos de sua implementação. Mais de 700.000 RNs foram triados na área de abrangência do estudo, permitindo a realização de uma análise crítica do programa.

Apesar da coleta do teste do pezinho estar dentro de um prazo adequado, após 48h e até o sétimo dia de vida, um dos problemas ainda enfrentados é a demora que ocorre em alguns municípios para envio das amostras de papel de filtro por correio ao Laboratório da APAE, onde é realizada a análise. A mediana do tempo de envio do teste após a sua coleta para o laboratório foi de 5 dias (2-7 dias). Isso significa que, apesar de todos os esforços para conscientizar a população e a equipe de profissionais de saúde a respeito da importância da coleta do teste do pezinho na primeira semana de vida, até o décimo dia de vida metade dos recém-nascidos não teve o seu teste analisado. Esta informação é relevante no caso da triagem da HAC-21OH porque, na forma grave perdedora de sal, a desidratação já se inicia por volta da segunda semana de vida (11).

Como o objetivo de qualquer rastreamento populacional é detectar a doença em sua fase pré-clínica (assintomática), agilizar o encaminhamento das amostras ao laboratório e, com isso, a liberação do resultado, convocação dos RNs com resultados suspeitos e posterior coleta dos testes confirmatórios no soro é fundamental. A priorização do envio das amostras acarretará em melhora não apenas da qualidade da triagem neonatal da HAC, mas também do hipotireoidismo congênito, deficiência da biotinidase e fenilcetonúria, doenças que também se beneficiam da instituição do tratamento antes dos 15 dias de vida do RN (26, 49).

Como esperado, a taxa de convocação por resultado alterado para coleta de testes confirmatórios foi 6,5 vezes maior nos RNs de peso menor ao nascimento ($\leq 1.500\text{g}$) em comparação aos de peso normal ($> 2.500\text{g}$). Por essa razão, este grupo de RNs é submetido a um fluxo diferente em alguns países que realizam triagem, por exemplo, com coleta mais tardia da amostra do papel de filtro (44, 87). É possível, ainda, que este grupo de pré-termos extremos ($\leq 1.500\text{g}$) se beneficie de uma abordagem mais detalhada para análise do primeiro teste de triagem ou do teste confirmatório, utilizando o

resultado das razões entre os esteroides e não apenas da 17OHP, por exemplo (28, 34). Outros autores propõem uma conduta mais radical e sugerem que a triagem da HAC não seja realizada neste grupo de RNs (88, 89). Por outro lado, também se discute que estes RNs estão sob atenção médica constante e o rastreamento pode antecipar em alguns dias o diagnóstico dos afetados, bem como a coleta mais rápida de uma segunda amostra do teste, quando necessária (28).

Outro aspecto em relação a estas faixas de peso ($\leq 2.000\text{g}$) é que a coleta do primeiro teste é geralmente adiada pela dificuldade e riscos de punção do calcâneo nos RNs de muito baixo peso e pelo fato de, com frequência, estarem internados em UTI, sob o estresse de infecção e/ou ventilação mecânica, fatores que sabidamente causam resultados falso-positivos. Como o número de RNs pré-termos triados neste estudo ainda é pequeno, apenas um caso com PN entre 1.501 e 2.000g foi diagnosticado até o momento e nenhum caso com peso menor ou igual a 1.500g, a validação destas informações na nossa população não é possível neste momento.

Além da prematuridade, outra causa importante de resultados falso-positivos é a presença de RNs com a forma não clássica da doença, cuja detecção não é objetivo da triagem neonatal, uma vez que esta forma não apresenta risco de vida ou de erro de determinação de sexo ao nascimento. Esses pacientes apresentam valores de 17OHP mais elevados em relação aos não afetados e geralmente contribuirão para uma parte dos resultados falso-positivos em qualquer programa de triagem da HAC, pois a prevalência desta forma é em torno de 1:1.000 nascidos vivos (24, 28, 90). Por essa razão, é de fundamental importância tentar separar, no primeiro teste, valores moderadamente aumentados da 17OHP, compatíveis com verdadeiramente falso-positivos ou portadores da forma não clássica, de valores muito aumentados, presentes nos afetados pelas formas clássicas. Na Suécia, por exemplo, um país pequeno e que tem registro nacional de todos os pacientes com HAC, foi verificado que 35% do total de casos com a forma não clássica foram detectados na triagem neonatal (28). Já em um estudo no Estado do Texas (EUA), dos 175 casos de HAC detectados pela triagem durante 6 anos, 54 (30%) eram portadores da forma não clássica (30). De maneira geral, os

pacientes com a forma não clássica detectados pela triagem são heterozigotos compostos para mutações de forma não clássica e clássica, tendo, portanto, tendência a apresentar concentrações séricas maiores de 17OHP (19, 71).

O grande número de coletas de soro por outros motivos (n=20.358; 91,5%), que não a elevação da N17OHP, sobrecarrega o sistema público de triagem, aumenta o estresse das famílias, encarecendo e dificultando a triagem neonatal da doença. Consequentemente, esforços contínuos no sentido de conscientização da população e dos profissionais de saúde devem ter a finalidade de reduzir o número de coletas tardias, possibilitando sua coleta ainda no papel de filtro.

Adicionalmente, a administração indiscriminada de corticoide à mãe no periparto e a conduta de se convocar para amostra de soro todos estes RNs (n=11.504; 51,7%) também contribui para a saturação das equipes que lidam com os casos suspeitos. Como verificado, o uso do corticoide no periparto foi relacionado a apenas 1 resultado falso-negativo em um RN com a forma VS (Caso 50, Tabela 7). Porém, no caso com a forma PS cuja mãe recebera corticoide no periparto, o valor da N17OHP entre 48-72h de vida estava acima do valor de referência (Caso 34, Tabela 7).

Apesar do potencial efeito do corticoide em gerar resultados falso-negativos na triagem da HAC, dados sobre seu uso no periparto são escassos na literatura e não existe a recomendação de se coletar teste confirmatório em todos os casos (4, 91, 92). Os dados do nosso estudo indicam que não é necessário proceder a coleta de soro em todos os RNs cujas mães foram tratadas com corticoide no periparto, uma vez que a forma PS seria diagnosticada com a utilização dos valores de referência dos percentis 99,5 e 99,8.

Dos 1.902 RNs convocados por alteração da N17OHP, a grande maioria (n=1.584; 83%) foi submetida à coleta de nova amostra em papel de filtro. A redução média no valor da segunda dosagem da 17OHP em papel de filtro, pela mesma metodologia IFMA, foi em torno de 60%. Este dado é compatível com a informação prévia de que uma redução acima de 20% é satisfatória para considerar o RN não afetado (28).

As taxas de resultados falso-positivos convocados para repetição em papel de filtro (0,22%) ou para confirmatório no soro (0,037%) foram baixas, compatíveis com outros países, nos quais variam de 0,02 a 1% (8, 30, 39, 93, 94). Entretanto, ao utilizarmos o percentil 99,5 da N17OHP ajustado para o peso ao nascimento, o VPP obtido no primeiro teste foi de apenas 3%. Caso o valor de referência da N17OHP no primeiro teste fosse aumentado para o percentil 99,8, o VPP aumentaria para 5,2%, valor mais próximo ao de outros países que realizam triagem, em que varia de 1-13,4% nas casuísticas com número expressivo de RNs triados (28, 39, 46, 93, 95). Esse aumento do valor de referência para o P99,8 não acarretaria em perda do diagnóstico de nenhum RN afetado pela forma clássica da doença.

A dosagem da 17OHP pelo método imunofluorimétrico no papel de filtro teve sensibilidade boa para um teste de rastreamento ($S=98,3\%$). O reduzido VPP de 3%(P99,5), ou mesmo de 5,2% (P99,8), reforça a necessidade de realização de testes confirmatórios. Por outro lado, o VPN de 99,9% fornece segurança considerável aos pais e familiares dos RNs com resultados negativos.

Outras metodologias no papel de filtro apresentam VPP maior, como a espectrometria de massas, porém necessita de um tempo maior para obtenção do resultado, equipe e maquinário mais especializado, além de não ser amplamente disponível nos laboratórios brasileiros de triagem. Como seu custo é mais elevado e nosso índice de natalidade é muito alto, é importante também validar seus resultados e a custo-efetividade na nossa população, para possivelmente selecionar um subgrupo específico de RNs com maior potencial de se beneficiarem desta análise, por exemplo, os pré-termos.

Neste período de dois anos, não houve notificação de óbitos por resultado falso-negativo. Ocorreram 2 óbitos de RNs sabidamente com a forma PS, um deles foi por uso irregular da medicação e outro por recusa da mãe a comparecer para coleta do teste confirmatório. Entretanto, como o período decorrido é de apenas 24 meses, o tempo é insuficiente para afirmar que não houve mais algum caso de falso-negativo, especialmente para a forma virilizante simples, cujo diagnóstico pelo quadro clínico ocorre, geralmente, a partir dos três anos de idade (11, 94).

A eficiência menor da triagem para a detecção da forma virilizante simples é conhecida (46). Isso faz com que alguns locais que realizam triagem neonatal, como no Texas (EUA), rotineiramente duas amostras de sangue no papel de filtro são colhidas: uma primeira logo após o nascimento e outra com 1-2 semanas de vida. Utilizando este fluxograma, com uma primeira coleta muito precoce (< 24h de vida), ocorre perda de aproximadamente 60% dos casos com a forma virilizante simples no primeiro teste (falso-negativos) (30). Contudo, a realização de um segundo teste para todos os RNs encarece muito um programa de triagem neonatal e, sobretudo em países desenvolvidos, estes casos são diagnosticados clinicamente nos primeiros anos de vida.

Em nossa casuística, o menor valor da N17OHP no papel de filtro de um RN afetado foi de 31,1 ng/ml (forma PS), cuja amostra foi colhida entre 48-72h de vida (Caso 27, Tabela 7). Essa ocorrência motivou um outro estudo que avaliou a relevância de se utilizar valores de referência diferentes para interpretar a coleta precoce da amostra de sangue no papel de filtro (antes de 72h) em comparação à coleta após as 72h de vida do recém-nascido. Este estudo demonstrou que os valores de referência para as coletas mais precoces são significativamente menores (96). Essa adaptação dos valores de referência pode minimizar a ocorrência de falso-negativos na interpretação das coletas precoces, mas também reduzir o número de falso-positivos na avaliação das coletas mais tardias, uma vez que permite o uso de valores de corte maiores. A plausibilidade biológica deste resultado se deve ao fato de que a concentração sérica da 17OHP neonatal aumenta progressivamente nos indivíduos afetados pelas formas clássicas da HAC-21OH e reduz com o passar dos dias nos RNs não afetados, desde que não estejam sob estresse decorrente de infecções ou ventilação mecânica.

Essa informação é particularmente importante no Estado de São Paulo devido ao Projeto Mãe Paulistana, que mantém a mãe internada na maternidade por um dia adicional, com o objetivo de que a mãe e a criança recebam alta hospitalar simultaneamente. Com isso, 30% dos testes do pezinho analisados pelo Laboratório da APAE são coletados entre 48-72h de vida, pois boa parte é proveniente das maternidades da cidade de São Paulo.

A coleta do teste confirmatório sérico mostrou-se tardia em 79% (252/318) dos casos (após 15 dias de vida), enfatizando a importância de se otimizar o treinamento das equipes municipais de saúde e transporte, uma vez que, com frequência, os RNs de municípios mais afastados não tem como se deslocar para coleta da amostra de soro. A coleta do teste confirmatório, entretanto, ocorreu bem mais precocemente nos RNs altamente suspeitos, com diferença significativa em comparação ao grupo de falso-positivos ($P < 0,001$). Portanto, é possível notar que tem ocorrido priorização da coleta do teste confirmatório no grupo de RNs com resultados da 17OHP no papel de filtro muito alterados (acima de 2 vezes o Percentil 99,5 para o peso ao nascimento).

Com relação aos testes confirmatórios, com a mudança de metodologia para a CL-MS/MS, é importante o conhecimento destes valores na nossa população, e este trabalho possibilitou a padronização dos valores de referência para RNs na população brasileira, que será útil na elaboração do fluxograma da triagem neonatal, otimizando o diagnóstico da HAC.

Como esperado, a metodologia CL-MS/MS foi mais específica para a dosagem da 17OHP no soro, em comparação com o RIE, com VPP cerca de 40% maior. A maioria dos estudos da literatura que utilizam esta metodologia como confirmatório a empregam na análise da primeira amostra, em papel de filtro; ou na análise de uma segunda amostra, também no papel de filtro (62, 63, 97), o que torna difícil a comparação dos nossos resultados no soro com os dados provenientes destes trabalhos.

A metodologia da CL-MS/MS tem a vantagem de permitir a dosagem de mais de um composto simultaneamente, possibilitando o cálculo das relações entre os esteroides e o cortisol, útil principalmente em RNs estressados com doenças coexistentes (34, 51); adicionalmente, não gera manipulação e nem descarte de material radioativo, características do radioimunoensaio.

A proporção menor de resultados indeterminados gerado pela 17OHP por CL-MS/MS, comparada à dosagem deste mesmo esteroide por RIE, 12 vs. 29%, reduziu significativamente o número de RNs que seriam mantidos em seguimento até confirmação ou exclusão diagnóstica da HAC. Em um estudo francês que também realizou a dosagem da 17OHP no soro como teste confirmatório por RIE, 51,7% dos resultados inicialmente positivos foram

classificados como indeterminados por esta metodologia; este trabalho verificou, ainda, que o tempo para normalização da 17OHP sérica foi de aproximadamente 6 meses em diversos casos (95). Entretanto, desde a publicação deste trabalho houve mudança para anticorpo mais específico e os valores de referência precisam ser novamente padronizados.

Na avaliação do desempenho dos diferentes testes confirmatórios no soro através da interpretação da curva ROC, percebe-se que todos os testes propostos, inclusive o RIE, têm excelente poder discriminatório entre os falso-positivos e afetados, dada a área sob a curva ROC maior ou igual a 99,8% ($p < 0,001$).

Apesar do VPP menor da dosagem da 17OHP por RIE, nota-se que esta metodologia apresentou uma boa eficácia diagnóstica da HAC-21OH. Em um país de grande dimensão como o Brasil, com limitação de recursos financeiros e técnicos em grande parte do território nacional, é importante conhecer as características diagnósticas do radioimunoensaio, metodologia mais amplamente utilizada pelos laboratórios de triagem para confirmação da doença. Além disso, o número elevado de nascimentos em todas as regiões brasileiras também torna mandatória a utilização de testes diagnósticos de custo baixo e ampla disponibilidade no fluxograma da triagem neonatal do Ministério da Saúde.

Como a dosagem do 21-DF não é realizada rotineiramente, nem mesmo pelos laboratórios que utilizam a metodologia CL-MS/MS, verificamos a sua eficácia diagnóstica e constatamos que não foi superior, por exemplo, à dosagem da 17OHP isolada por CL e nem ao cálculo das relações 17OHP/cortisol ou (17OHP+ $\Delta 4$)/cortisol. Entretanto, a eficácia do 21-DF na nossa amostra de neonatos difere do que já foi demonstrado em crianças, adolescentes/adultos com HAC, nos quais o 21-DF foi útil, inclusive, na discriminação entre heterozigotos e pacientes com a forma não clássica (68, 71). Nossa hipótese é de que esta eficiência menor do 21-DF no período neonatal pode ser explicada pela imaturidade da enzima 11 β -hidroxilase em fases precoces do desenvolvimento (69).

O conhecimento dos pontos de corte com 100% de sensibilidade e 100% de especificidade é muito útil, por exemplo, na elucidação dos casos em que a

17OHP permanece elevada nos RNs assintomáticos (resultados indeterminados). Por exemplo, ao se aplicar o ponto de corte com 100% de sensibilidade da 17OHP (CL), de 48,3 ng/ml, nos 32 pacientes indeterminados, apenas 2 permaneceriam em seguimento (Casos 59 e 60, Tabela 8). Com a aplicação do ponto de corte das razões entre os esteroides, um deles poderia receber alta do seguimento neonatal (Caso 60, Tabela 8) e um permaneceria em seguimento até o resultado do estudo molecular, que subsequentemente identificou o genótipo que prediz a forma não clássica (Caso 59, Tabela 8).

Especificamente com relação à razão (17OHP+21-DF)/cortisol (CL) no papel de filtro, o resultado verificado anteriormente, com VPP e VPN de 100%, não foi reproduzido em nossa amostra no soro (34).

O nosso resultado obtido sobre o ponto de corte de 24,9 para a relação (17OHP+Δ4)/cortisol, com VPP e VPN de 100% para o diagnóstico da forma perdedora de sal é de extrema relevância na prática clínica. Cabe ressaltar que os valores da 17OHP e da androstenediona devem estar expressos em ng/ml e, do cortisol, em mcg/dl. Esta relação entre os esteroides foi avaliada em outros estudos, mas apenas em dosagens no papel de filtro, também por CL-MS/MS, com alta eficácia diagnóstica, apresentando VPP que variou de 10 a 100% e VPN de cerca de 80 a 100%, em semelhança aos nossos resultados no soro (34, 62, 63). Portanto, percebe-se que a aplicação prática destes resultados tem grande impacto na redução da sobrecarga do sistema público de saúde.

Em relação aos RNs afetados pela HAC-21OH, a incidência da doença foi compatível com a observada em outros estudos na população brasileira (8, 25, 98). A triagem normalizou, ainda, a frequência de distribuição entre os sexos para próximo de 1F:1M, considerando o que se espera em uma doença com herança autossômica recessiva, bem como a proporção de 3 a 4:1 esperada entre as formas PS:VS. Essas proporções também estão de acordo com o encontrado em outras casuísticas de pacientes triados (11, 28, 44, 90) e sugerem que não ocorreu a perda de diagnóstico da HAC-21OH em nosso meio.

O fato de que 65% dos RNs apresentaram-se na data da primeira consulta com hiponatremia e quase 25% destes com hiponatremia grave ($\text{Na} \leq$

115 mEq/L) evidencia a importância de se otimizar os tempos de coleta e ações na triagem da HAC, uma vez que, ao redor de 18 ± 8 dias, quase um quarto destes RNs já estão em franca desidratação. Ainda que a triagem neonatal não seja capaz de evitar a crise de desidratação em todos os pacientes, já foi demonstrado que o diagnóstico mais precoce da HAC pela triagem leva à hiponatremia menos grave, com chance menor de desencadear convulsões, bem como sequelas neurológicas (90, 99).

Com relação à atipia genital, que é uma manifestação que facilita o diagnóstico por meios clínicos, observamos algumas falhas na sua identificação. Nesta amostra, a atipia genital não foi identificada em 1 RN com Prader 3 que estava em seguimento por resultado alterado da 17OHP sérica; além disso, 2 RNs com Prader 5 foram registradas no sexo masculino. Estes dados mostram a importância de investimento no treinamento de profissionais de saúde em larga escala, a fim de se evitar que casos como estes sejam negligenciados. Sabe-se que a triagem não necessariamente impede o erro de atribuição do sexo ao nascimento antes do registro, que é realizado nos primeiros dias de vida; porém, permite a sua correção precoce, minimizando o sofrimento dos pacientes e familiares (11, 21).

A determinação dos valores de referência da 17OHP na nossa população, desde o período neonatal até 120 dias, é também de crucial importância, dada a oscilação fisiológica deste esteroide nas primeiras semanas de vida. A utilização destes novos valores de referência para interpretação da 17OHP sérica classificaria número menor de RNs como indeterminados: 12/224 (RIE) e 5/257 RNs (CL-MS/MS), sem acarretar em resultados falso-negativos adicionais; esta redução do número de resultados indeterminados corresponde a 5,3% e 2% pelas metodologias RIE ($VR < 5,8$ ng/ml) e CL-MS/MS ($VR < 3,0$ ng/ml), respectivamente, e otimizaria o seguimento dos RNs com resultados falso-positivos no primeiro teste.

Com a padronização dos testes hormonais e das razões entre os esteroides, a grande maioria dos casos verdadeiramente afetados e indeterminados teriam o seu diagnóstico elucidado. Na nossa amostra, observamos que o estudo molecular não é necessário para o diagnóstico das formas clássicas HAC-21OH e também não tem grande utilidade na distinção

entre as formas perdedora de sal e virilizante simples, uma vez que a mutação mais frequentemente encontrada nos alelos de forma clássica é a *I2 splice*, que pode prever ambas as formas clássicas (55).

A análise genética tem se mostrado útil na prática clínica nos casos oligo ou assintomáticos, que mediante a exclusão ou confirmação diagnóstica da forma clássica podem ou não receber alta do seguimento no período neonatal, aliviando o sistema público de saúde por reduzir número de consultas médicas, exames e medicamentos desnecessários (11).

Alguns serviços de triagem, até mesmo pelo índice menor de natalidade, já realizam o estudo molecular no papel de filtro como teste confirmatório. Considerando que esta metodologia também é dispendiosa em tempo e custo, com os dados deste estudo sugerimos que a biologia molecular pode ter o seu papel, mas em uma etapa posterior da triagem, nos indivíduos assintomáticos e que mantem a 17OHP elevada em uma segunda coleta de teste confirmatório no soro. Observamos que estudo molecular contribuiu para elucidação diagnóstica em 10/32 casos indeterminados (31%), aliviando a sobrecarga do sistema público de saúde. Em nossa experiência, quando se utiliza o sequenciamento de todo o gene *CYP21A2*, se identifica mutações em 100% dos alelos dos pacientes com forma clássica (55); na ausência deste resultado, se permite a exclusão diagnóstica e alta do seguimento (11, 100). Resultados menos satisfatórios foram encontrados em outros trabalhos, mas que utilizaram metodologias *sítio* dirigidas para pesquisa das mutações. Adicionalmente 4/32 (12,5%) dos indeterminados eram portadores da forma não clássica, um problema conhecido na triagem neonatal da HAC, uma vez que apresentam flutuações da 17OHP sérica.

Em relação à frequência das mutações nos alelos de pacientes com a forma clássica, as mutações mais frequentemente encontradas são derivadas de eventos com o pseudogene, em 92% dos alelos. Entretanto, a presença de 8% de alelos com mutações com efeito de gene fundador, não derivadas do pseudogene, reforça a importância de serem incluídas em um painel de triagem na nossa população. Este dado está de acordo com publicação anterior, em que foi verificado que até 11% dos alelos na população brasileira contém mutações não derivadas do pseudogene (55).

A correlação do genótipo de carreadores de mutações que predizem total ou grave comprometimento da atividade enzimática, com o fenótipo de forma clássica foi de 100%. Entretanto, como uma das mutações mais frequentes é a *I2 splice*, que na nossa experiência de casuística diagnosticada sem triagem, metade dos casos são portadores da forma PS, a utilização do genótipo na predição da necessidade de tratamento com mineralocorticoide ainda é limitada (55). Por essa razão, alguns centros, frente a um diagnóstico de forma clássica pela triagem, já introduzem tanto glico quanto mineralocorticoide (4) e a sua necessidade é verificada clínica e laboratorialmente, com redução progressiva da dose na presença de hipertensão ou valores suprimidos de renina.

Ao término deste estudo, com estes dados preliminares, sugerimos o fluxograma proposto na **Figura 12**.

Figura 12 – Proposta de fluxograma para a triagem neonatal da HAC no Brasil.

N17OHP: 17-hidroxi-progesterona neonatal; IFMA: imunofluorimétrico; P99,8 para PN: percentil 99,8 ajustado para o peso ao nascimento; 1x: uma vez; 2x: 2 vezes; RIE: radioimunoensaio; CL-MS/MS: cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas; Δ4: androstenediona; *CYP21A2*: gene codificador da enzima 21-hidroxilase; PS: perdedora de sal.

(◇) Útil na distinção entre a forma virilizante simples oligo/assintomática no período neonatal, forma não clássica e não afetados.

Limitações do estudo

O tempo de acompanhamento dos RNs, de cerca de 2 anos, pode não ter sido suficiente para a detecção clínica de todos os casos com a forma virilizante simples; portanto, é possível que a taxa de resultados falso-negativos no primeiro teste de triagem no papel de filtro tenha sido subestimada. Entretanto, não há evidências, até o momento, da perda da detecção pela triagem de casos afetados pela forma perdedora de sal, cujas manifestações clínicas ocorrem bem mais precocemente, ainda no primeiro mês de vida.

A descentralização do acompanhamento dos casos afetados por HAC-21OH, por exemplo, em serviços privados, dificulta a obtenção de dados de maneira homogênea. De outra forma, o grande número de nascimentos no Estado de São Paulo permitiu uma casuística bastante expressiva em curto espaço de tempo, o que fortalece a qualidade dos dados deste trabalho.

7 CONCLUSÕES

- A triagem neonatal da HAC no Brasil demonstrou-se altamente eficaz para diagnóstico da forma clássica da HAC-21OH, com sensibilidade de 98,3% e especificidade de 99,7% do primeiro teste no papel de filtro. O incremento do P99,5 para o P99,8 na interpretação da N17OHP leva a aumento significativo do VPP de 3% para 5,2%, sem a perda adicional de indivíduos afetados.
- A dosagem da 17OHP no soro por RIE apresentou boa eficácia para diagnóstico da doença, porém foi a metodologia com menor VPP;
- A17OHP no soro dosada por CL-MS/MS foi o esteroide adrenal cuja dosagem isolada apresentou maior especificidade para a confirmação da doença. O resultado da 17OHP $\geq 48,3$ ng/ml detectou todos os portadores da forma clássica (S=100%) e 17OHP $\geq 80,9$ ng/ml foi o ponto de corte com VPP de 100% (E=100%).
- Os valores de referência obtidos, de 3 a 120 dias de vida, foram: 17OHP (RIE) $< 5,8$ ng/ml; 17OHP (CL-MS/MS) $< 3,0$ ng/ml e 21DF (CL-MS/MS) $< 1,0$ ng/ml.
- A relação (17OHP+ $\Delta 4$)/cortisol (sem unidade), todos dosados no soro e por CL-MS/MS, foi a que obteve maior poder discriminatório entre resultados falso-positivos e afetados pela forma clássica da HAC-21OH. O produto desta relação $\geq 9,7$ detectou todos os portadores da forma clássica (S=100%) e o ponto de corte $\geq 24,9$ apresentou VPP de 100% (E=100%).
- Para diagnóstico da forma perdedora de sal de maneira isolada, o produto da relação (17OHP+ $\Delta 4$)/cortisol (sem unidade) obteve 100% de área sob a curva ROC, sendo que o ponto de corte único $\geq 24,9$ apresentou VPP e VPN de 100%.
- O cálculo do produto da relação (17OHP+ $\Delta 4$)/cortisol teve acurácia superior à dosagem da 17OHP por CL-MS/MS isolada, elucidando a maior parte dos casos indeterminados.
- O estudo molecular do gene *CYP21A2* elucidou 90% dos casos oligo ou assintomáticos (10/11) submetidos a esta análise, ou pela ausência de mutações identificadas em pelo menos um dos alelos ou pela confirmação de genótipo compatível com a forma não clássica.

Premiações e apresentações

Os resultados deste trabalho tiveram grande receptividade na comunidade científica, tendo recebido premiação (*Travel Grant*) em todos os congressos para os quais foi submetido: na América Latina em 2015 (Sociedade Latinoamericana de Endocrinopediatria – SLEP); nos Estados Unidos em 2016 (*Endocrine Society*); na Europa em 2016 (*European Society of Paediatric Endocrinology* – ESPE).

O trabalho também foi selecionado para apresentação oral nos congressos da Sociedade Latinoamericana de Endocrinologia Pediátrica (SLEP) em 2015, em Puerto Varas-Chile, e da Sociedade Americana de Endocrinologia (*Endocrine Society*) em 2016, em Boston-EUA.

Além disso, o trabalho ganhou o Prêmio Saúde da Editora Abril, no ano de 2015, após concorrer com mais de 500 trabalhos. Recentemente, a continuação deste estudo, que analisará a custo-efetividade, foi selecionada para auxílio à pesquisa no PPSUS na categoria Inovação Tecnológica em Saúde.

Publicações científicas

Os dados moleculares sobre os pacientes portadores de HAC-21OH acompanhados no Hospital das Clínicas da FMUSP, crianças e adultos, foram recentemente publicados em revista com fator de impacto expressivo (*Carvalho et. al, Eur J Endocrinology, 2016*). **[Anexo I]**.

Após pouco mais de dois anos da triagem neonatal da HAC-21OH no Brasil, foi possível também avaliar o desempenho do primeiro teste de triagem no papel de filtro, bem como otimizar a sua interpretação ao demonstrar que as coletas mais precoces (entre 48 e 72h de vida) devem ser interpretadas com valores de referência menores do que o primeiro teste (*Hayashi, Carvalho, et. al, Clin Endocrinol, 2016*). **[Anexo II]**

Por fim, os dados deste trabalho, que enfoca a eficácia dos testes confirmatórios séricos na triagem neonatal da HAC-21OH, foram submetidos para publicação no periódico *JAMA Pediatrics* e o artigo está em processo de revisão (*Carvalho, et. al*) . **[Anexo III]**.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências bibliográficas

1. Bongiovanni AM, Root AW. The adrenogenital syndrome. *N Engl J Med*. 1963;268:1391-9 concl.
2. Mello MP, Bachega TA, Santos MC. Bases moleculares da hiperplasia adrenal congênita. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2002;46(4):21.
3. New M, Dupont B, Grumbach K, Levine L, editors. *Congenital Adrenal Hyperplasia and related conditions*. New York: Mc Graw Hill; 1982.
4. Speiser PW, Azziz R, Baskin LS, Ghizzoni L, Hensle TW, Merke DP, et al. Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(9):4133-60.
5. Nimkarn S, Lin-Su K, New MI. Steroid 21 hydroxylase deficiency congenital adrenal hyperplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2009;38(4):699-718.
6. Speiser PW, White PC. Congenital adrenal hyperplasia. *N Engl J Med*. 2003;349(8):776-88.
7. Grosse SD, Van Vliet G. How many deaths can be prevented by newborn screening for congenital adrenal hyperplasia? *Horm Res*. 2007;67(6):284-91.
8. Silveira EL, dos Santos EP, Bachega TA, van der Linden Nader I, Gross JL, Elnecape RH. The actual incidence of congenital adrenal hyperplasia in Brazil may not be as high as inferred--an estimate based on a public neonatal screening program in the state of Goiás. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2008;21(5):455-60.
9. Hayashi G, Faure C, Brondi MF, Vallejos C, Soares D, Oliveira E, et al. Weight-adjusted neonatal 17OH-progesterone cutoff levels improve the efficiency of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2011;55:632-7.
10. Pang SY, Wallace MA, Hofman L, Thuline HC, Dorche C, Lyon IC, et al. Worldwide experience in newborn screening for classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Pediatrics*. 1988;81(6):866-74.
11. Silveira EL, Elnecape RH, dos Santos EP, Moura V, Pinto EM, van der Linden Nader I, et al. Molecular analysis of CYP21A2 can optimize the follow-up of positive results in newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Clin Genet*. 2009;76(6):503-10.
12. Higashi Y, Hiromasa T, Tanae A, Miki T, Nakura J, Kondo T, et al. Effects of individual mutations in the P-450(C21) pseudogene on the P-450(C21) activity and their distribution in the patient genomes of congenital steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Biochem*. 1991;109(4):638-44.
13. New MI. An update of congenital adrenal hyperplasia. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1038:14-43.
14. Steigert M, Schoenle EJ, Biason-Lauber A, Torresani T. High reliability of neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia in Switzerland. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(9):4106-10.
15. Votava F, Torok D, Kovacs J, Moslinger D, Baumgartner-Parzer SM, Solyom J, et al. Estimation of the false-negative rate in newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Eur J Endocrinol*. 2005;152(6):869-74.
16. Prader A. Hereditary defects of adrenal cortical steroid biosynthesis. *Prog Clin Biol Res*. 1985;200:219-31.
17. White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev*. 2000;21(3):245-91.
18. Bachega TA, Billerbeck AE, Madureira G, Marcondes JA, Longui CA, Leite MV, et al. Molecular genotyping in Brazilian patients with the classical and nonclassical forms of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(12):4416-9.
19. Bachega TA, Billerbeck AE, Marcondes JA, Madureira G, Arnhold IJ, Mendonça BB. Influence of different genotypes on 17-hydroxyprogesterone levels in patients with

nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2000;52(5):601-7.

20. Pang S, Murphey W, Levine LS, Spence DA, Leon A, LaFranchi S, et al. A pilot newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in Alaska. *J Clin Endocrinol Metab*. 1982;55(3):413-20.

21. Santos M, Silveira EL, EP dS, L G, G M, V B, et al. Comparison of clinical features between CAH cohorts from Goiás and São Paulo: states with and without neonatal screening. *VIII Congresso Latinoamericano de Errores Innatos Del Metabolismo y Pesquisa Neonatal*. 2011;31.

22. Speiser PW. Improving neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(8):3685-6.

23. White PC. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *Nat Rev Endocrinol*. 2009;5(9):490-8.

24. Bachega TA, Billerbeck AE, Parente EB, Lemos-Marini SH, Baptista MT, Mello MP, et al. [Multicentric study of Brazilian patients with 21-hydroxylase deficiency: a genotype-phenotype correlation]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2004;48(5):697-704.

25. Nascimento ML, Cristiano AN, Campos T, Ohira M, Cechinel E, Simoni G, et al. Ten-year evaluation of a Neonatal Screening Program for congenital adrenal hyperplasia. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2014;58(7):765-71.

26. República SdDHPd. Atenção à Saúde Brasil 2016 [Available from: <http://www.sdh.gov.br/assuntos/pessoa-com-deficiencia/observatorio/atencao-a-saude/programa-nacional-de-triagem-neonatal>].

27. van der Kamp HJ, Wit JM. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *Eur J Endocrinol*. 2004;151 Suppl 3:U71-5.

28. Gidlöf S, Wedell A, Guthenberg C, von Döbeln U, Nordenström A. Nationwide neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia in Sweden: a 26-year longitudinal prospective population-based study. *JAMA Pediatr*. 2014;168(6):567-74.

29. Pearce M, DeMartino L, McMahon R, Hamel R, Maloney B, Stansfield DM, et al. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in New York State. *Mol Genet Metab Rep*. 2016;7:1-7.

30. Therrell BL, Jr., Berenbaum SA, Manter-Kapanke V, Simmank J, Korman K, Prentice L, et al. Results of screening 1.9 million Texas newborns for 21-hydroxylase-deficient congenital adrenal hyperplasia. *Pediatrics*. 1998;101(4 Pt 1):583-90.

31. Thompson R, Seargeant L, Winter JS. Screening for congenital adrenal hyperplasia: distribution of 17 alpha-hydroxyprogesterone concentrations in neonatal blood spot specimens. *J Pediatr*. 1989;114(3):400-4.

32. Wallace AM, Beesley J, Thomson M, Giles CA, Ross AM, Taylor NF. Adrenal status during the first month of life in mature and premature human infants. *J Endocrinol*. 1987;112(3):473-80.

33. Hingre RV, Gross SJ, Hingre KS, Mayes DM, Richman RA. Adrenal steroidogenesis in very low birth weight preterm infants. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994;78(2):266-70.

34. Janzen N, Peter M, Sander S, Steuerwald U, Terhardt M, Holtkamp U, et al. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia: additional steroid profile using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(7):2581-9.

35. Wallace AM. Analytical support for the detection and treatment of congenital adrenal hyperplasia. *Ann Clin Biochem*. 1995;32 (Pt 1):9-27.

36. Holtkamp U, Klein J, Sander J, Peter M, Janzen N, Steuerwald U, et al. EDTA in dried blood spots leads to false results in neonatal endocrinologic screening. *Clin Chem*. 2008;54(3):602-5.

37. Fingerhut R. False positive rate in newborn screening for congenital adrenal hyperplasia (CAH)-ether extraction reveals two distinct reasons for elevated 17alpha-hydroxyprogesterone (17-OHP) values. *Steroids*. 2009;74(8):662-5.

38. Nordenstrom A, Thilen A, Hagenfeldt L, Larsson A, Wedell A. Genotyping is a valuable diagnostic complement to neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(5):1505-9.
39. van der Kamp HJ, Oudshoorn CG, Elvers BH, van Baarle M, Otten BJ, Wit JM, et al. Cutoff levels of 17-alpha-hydroxyprogesterone in neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia should be based on gestational age rather than on birth weight. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(7):3904-7.
40. Allen DB, Hoffman GL, Fitzpatrick P, Laessig R, Maby S, Slyper A. Improved precision of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia using weight-adjusted criteria for 17-hydroxyprogesterone levels. *J Pediatr.* 1997;130(1):128-33.
41. Pelzzuti IL, Silva IN, Barra CB, Mantovani RM, Januario JN. Triagem neonatal para Hiperplasia Adrenal Congênita - Projeto piloto realizado pelo Programa Estadual de Triagem Neonatal de Minas Gerais PETN-MG). VIII Congresso Latinoamericano de Errores Innatos Del Metabolismo y Pesquisa Neonatal; 2011; Cuzco - Peru 2011.
42. Torresani T, Gruters A, Scherz R, Burckhardt JJ, Harras A, Zachmann M. Improving the efficacy of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia by adjusting the cut-off level of 17 α -hydroxyprogesterone to gestational age. *Screening.* 1994;3(2):77-84.
43. Cardoso CBMA, Fonseca AA, Oliveira MdFS, Pereira BB, Guimaraes MM. Triagem neonatal para hiperplasia adrenal congênita: experiência do estado do Rio de Janeiro. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia.* 2005;49:112-9.
44. Heather NL, Seneviratne SN, Webster D, Derraik JG, Jefferies C, Carll J, et al. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in New Zealand, 1994-2013. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(3):1002-8.
45. Morikawa S, Nakamura A, Fujikura K, Fukushi M, Hotsubo T, Miyata J, et al. Results from 28 years of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in sapporo. *Clin Pediatr Endocrinol.* 2014;23(2):35-43.
46. Sarafoglou K, Banks K, Gaviglio A, Hietala A, McCann M, Thomas W. Comparison of one-tier and two-tier newborn screening metrics for congenital adrenal hyperplasia. *Pediatrics.* 2012;130(5):e1261-8.
47. Monostori P, Szabó P, Marginean O, Bereczki C, Karg E. Concurrent Confirmation and Differential Diagnosis of Congenital Adrenal Hyperplasia from Dried Blood Spots: Application of a Second-Tier LC-MS/MS Assay in a Cross-Border Cooperation for Newborn Screening. *Horm Res Paediatr.* 2015;84(5):311-8.
48. Held PK, Shapira SK, Hinton CF, Jones E, Hannon WH, Ojodu J. Congenital adrenal hyperplasia cases identified by newborn screening in one- and two-screen states. *Mol Genet Metab.* 2015;116(3):133-8.
49. Araújo JPB, Goldbeck AS, Santos EPd, Silva IN, Oliveira MdF, Nascimento ML, et al. Triagem neonatal : hiperplasia adrenal congênita. In: e DdAE, Temática MdS, editors. 1a. edição ed. Brasília-DF: Editora MS; 2015. p. 44.
50. DO. Executivo, Caderno 1, Diário Oficial do Estado de São Paulo de 30/07/2015 2015 [Available from: <http://www.jusbrasil.com.br/diarios/96834243/dosp-executivo-caderno-1-30-07-2015-pg-46>].
51. Rossi C, Calton L, Hammond G, Brown HA, Wallace AM, Sacchetta P, et al. Serum steroid profiling for congenital adrenal hyperplasia using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta.* 2010;411(3-4):222-8.
52. Tonetto-Fernandes V, Lemos-Marini SH, Kuperman H, Ribeiro-Neto LM, Verreschi IT, Kater CE. Serum 21-Deoxycortisol, 17-Hydroxyprogesterone, and 11-deoxycortisol in classic congenital adrenal hyperplasia: clinical and hormonal correlations and identification of patients with 11 β -hydroxylase deficiency among a large group with alleged 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(6):2179-84.

53. Muñoz LN, Ochetti M, Perez G, Sobrero GM, Silvano LK, Martin SE, et al. Measurement of Serum 17 α -Hydroxyprogesterone in Infants by Radioimmunoassay. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2015;12(4):366-72.
54. Huidobro Fernández B, Echeverría Fernández M, Dulin Iñiguez E, Ezquieta Zubicaray B, Roldán Martín MB, Rodríguez Arnao MD, et al. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia: transitory elevation of 17-hydroxyprogesterone. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2011;24(3-4):155-62.
55. de Carvalho DF, Miranda MC, Gomes LG, Madureira G, Marcondes JA, Billerbeck AE, et al. Molecular CYP21A2 diagnosis in 480 Brazilian patients with congenital adrenal hyperplasia before newborn screening introduction. *Eur J Endocrinol.* 2016;175(2):107-16.
56. Vogeser M, Parhofer KG. Liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS)--technique and applications in endocrinology. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2007;115(9):559-70.
57. Vogeser M, Seger C. A decade of HPLC-MS/MS in the routine clinical laboratory--goals for further developments. *Clin Biochem.* 2008;41(9):649-62.
58. Xu RN, Fan L, Rieser MJ, El-Shourbagy TA. Recent advances in high-throughput quantitative bioanalysis by LC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal.* 2007;44(2):342-55.
59. Rauh M, Groschl M, Rascher W, Dorr HG. Automated, fast and sensitive quantification of 17 alpha-hydroxy-progesterone, androstenedione and testosterone by tandem mass spectrometry with on-line extraction. *Steroids.* 2006;71(6):450-8.
60. De Jesus VR, Simms DA, Schiffer J, Kennedy M, Mei JV, Hannon WH. Pilot proficiency testing study for second tier congenital adrenal hyperplasia newborn screening. *Clin Chim Acta.* 2010;411(21-22):1684-7.
61. Matern D, Tortorelli S, Oglesbee D, Gavrilov D, Rinaldo P. Reduction of the false-positive rate in newborn screening by implementation of MS/MS-based second-tier tests: the Mayo Clinic experience (2004-2007). *J Inherit Metab Dis.* 2007;30(4):585-92.
62. Schwarz E, Liu A, Randall H, Haslip C, Keune F, Murray M, et al. Use of steroid profiling by UPLC-MS/MS as a second tier test in newborn screening for congenital adrenal hyperplasia: the Utah experience. *Pediatr Res.* 2009;66(2):230-5.
63. Dhillon K, Ho T, Rich P, Xu D, Lorey F, She J, et al. An automated method on analysis of blood steroids using liquid chromatography tandem mass spectrometry: application to population screening for congenital adrenal hyperplasia in newborns. *Clin Chim Acta.* 2011;412(23-24):2076-84.
64. Wieland RG, Maynard DE, Riley TR, Hamwi GJ. Detection of 21-deoxycortisol in blood from a patient with congenital adrenal hyperplasia. *Metabolism.* 1965;14(12):1276-81.
65. Nahoul K, Adeline J, Bercovici JP. Radioimmunoassay of plasma 21-deoxycortisol. *J Steroid Biochem.* 1989;33(6):1167-72.
66. Fiet J, Villette JM, Galons H, Boudou P, Burthier JM, Hardy N, et al. The application of a new highly-sensitive radioimmunoassay for plasma 21-deoxycortisol to the detection of steroid-21-hydroxylase deficiency. *Ann Clin Biochem.* 1994;31 (Pt 1):56-64.
67. Tonetto-Fernandes Vn, Ribeiro-Neto LM, Verreschi ITN, Fiet J, Vieira JGH, Kater CE. Desenvolvimento de um radioimunoensaio para 21-deoxicortisol sérico e sua potencial aplicação no diagnóstico da hiperplasia adrenal congênita. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia.* 2003;47:171-6.
68. Costa-Barbosa FA, Carvalho VM, Nakamura OH, Bachega TA, Vieira JG, Kater CE. Zona fasciculata 21-hydroxysteroids and precursor-to-product ratios in 21-hydroxylase deficiency: further characterization of classic and non-classic patients and heterozygote carriers. *J Endocrinol Invest.* 2011;34(8):587-92.

69. Kamrath C, Hartmann MF, Boettcher C, Wudy SA. Reduced activity of 11 β -hydroxylase accounts for elevated 17 α -hydroxyprogesterone in preterms. *J Pediatr*. 2014;165(2):280-4.
70. Fiet J, Gueux B, Raux-Demay MC, Kuttann F, Vexiau P, Gourmelen M, et al. [21-deoxycortisol. A new marker of virilizing adrenal hyperplasia caused by 21-hydroxylase deficiency]. *Presse Med*. 1989;18(40):1965-9.
71. Costa-Barbosa FA, Tonetto-Fernandes VF, Carvalho VM, Nakamura OH, Moura V, Bachega TA, et al. Superior discriminating value of ACTH-stimulated serum 21-deoxycortisol in identifying heterozygote carriers for 21-hydroxylase deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2010;73(6):700-6.
72. White PC. Optimizing newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *J Pediatr*. 2013;163(1):10-2.
73. Malikova J, Votava F, Vrzalova Z, Lebl J, Cinek O. Genetic analysis of the CYP21A2 gene in neonatal dried blood spots from children with transiently elevated 17-hydroxyprogesterone. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012;77(2):187-94.
74. Paulino LC, Araujo M, Guerra G, Jr., Marini SH, De Mello MP. Mutation distribution and CYP21/C4 locus variability in Brazilian families with the classical form of the 21-hydroxylase deficiency. *Acta Paediatr*. 1999;88(3):275-83.
75. Torres N, Mello MP, Germano CM, Elias LL, Moreira AC, Castro M. Phenotype and genotype correlation of the microconversion from the CYP21A1P to the CYP21A2 gene in congenital adrenal hyperplasia. *Braz J Med Biol Res*. 2003;36(10):1311-8.
76. Witchel SF, Smith R, Crivellaro CE, Della Manna T, Dichtchekian V, Setian N, et al. CYP21 mutations in Brazilian patients with 21-hydroxylase deficiency. *Hum Genet*. 2000;106(4):414-9.
77. Fitness J, Dixit N, Webster D, Torresani T, Pergolizzi R, Speiser PW, et al. Genotyping of CYP21, linked chromosome 6p markers, and a sex-specific gene in neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(3):960-6.
78. Kosel S, Burggraf S, Fingerhut R, Dorr HG, Roscher AA, Olgemoller B. Rapid second-tier molecular genetic analysis for congenital adrenal hyperplasia attributable to steroid 21-hydroxylase deficiency. *Clin Chem*. 2005;51(2):298-304.
79. Yang YP, Corley N, Garcia-Heras J. Reverse dot-blot hybridization as an improved tool for the molecular diagnosis of point mutations in congenital adrenal hyperplasia caused by 21-hydroxylase deficiency. *Mol Diagn*. 2001;6(3):193-9.
80. Standards N-NCfCaL. Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods. NCCLS Document. West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA2004.
81. Cardoso CBMA. Triagem Neonatal para Hiperplasia Adrenal Congênita. blog da SBEM. 2006;Parte 1.
82. Alves ANL, Mendonca BB, Valassi HPL. Analytical Performance of LC-MS/MS Method for Simultaneous Determination of Five Steroids in Serum. *Mass Spectrom Purif Tech*. 2015;1(2):107.
83. Billerbeck AE, Bachega TA, Frazatto ET, Nishi MY, Goldberg AC, Marin ML, et al. A novel missense mutation, GLY424SER, in Brazilian patients with 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(8):2870-2.
84. Billerbeck AE, Mendonca BB, Pinto EM, Madureira G, Arnhold IJ, Bachega TA. Three novel mutations in CYP21 gene in Brazilian patients with the classical form of 21-hydroxylase deficiency due to a founder effect. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(9):4314-7.
85. Bachega TA, Billerbeck AE, Madureira G, Arnhold IJ, Medeiros MA, Marcondes JA, et al. Low frequency of CYP2B deletions in Brazilian patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Hum Hered*. 1999;49(1):9-14.
86. Harris PA, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzalez N, Conde JG. Research electronic data capture (REDCap)--a metadata-driven methodology and workflow

process for providing translational research informatics support. *J Biomed Inform.* 2009;42(2):377-81.

87. Sarafoglou K, Gaviglio A, Hietala A, Frogner G, Banks K, McCann M, et al. Comparison of newborn screening protocols for congenital adrenal hyperplasia in preterm infants. *J Pediatr.* 2014;164(5):1136-40.

88. Huet F, Godefroy A, Cheillan D, Somma C, Roussey M. [Do we need congenital adrenal hyperplasia screening for premature infants?]. *Arch Pediatr.* 2014;21(2):233-6.

89. Coulm B, Coste J, Tardy V, Ecosse E, Roussey M, Morel Y, et al. Efficiency of neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency in children born in mainland France between 1996 and 2003. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2012;166(2):113-20.

90. Speiser PW, Azziz R, Baskin LS, Ghizzoni L, Hensle TW, Merke DP, et al. Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 95(9):4133-60.

91. Gatelais F, Berthelot J, Beringue F, Descamps P, Bonneau D, Limal JM, et al. Effect of single and multiple courses of prenatal corticosteroids on 17-hydroxyprogesterone levels: implication for neonatal screening of congenital adrenal hyperplasia. *Pediatr Res.* 2004;56(5):701-5.

92. King JL, Naber JM, Hopkin RJ, Repaske DR, Bailey L, Leslie ND. Antenatal corticosteroids and newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2001;155(9):1038-42.

93. Votava F, Novotna D, Kracmar P, Vinohradská H, Stahlova-Hrabincova E, Vrzalova Z, et al. Lessons learned from 5 years of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in the Czech Republic: 17-hydroxyprogesterone, genotypes, and screening performance. *Eur J Pediatr.* 2012;171(6):935-40.

94. Sarafoglou K, Banks K, Kylo J, Pittock S, Thomas W. Cases of congenital adrenal hyperplasia missed by newborn screening in Minnesota. *JAMA.* 2012;307(22):2371-4.

95. Cavarzere P, Samara-Boustani D, Flechtner I, Dechaux M, Elie C, Tardy V, et al. Transient hyper-17-hydroxyprogesteronemia: a clinical subgroup of patients diagnosed at neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *Eur J Endocrinol.* 2009;161(2):285-92.

96. Hayashi GY. Otimização dos valores de corte N17OHP [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

97. Janzen N, Sander S, Terhardt M, Steuerwald U, Peter M, Das AM, et al. Rapid steroid hormone quantification for congenital adrenal hyperplasia (CAH) in dried blood spots using UPLC liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Steroids.* 2011;76(13):1437-42.

98. Hayashi G, Faure Cu, Brondi MF, Vallejos C, Soares D, Oliveira Ær, et al. Weight-adjusted neonatal 17OH-progesterone cutoff levels improve the efficiency of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia.* 55:632-7.

99. Nass R, Baker S. Learning disabilities in children with congenital adrenal hyperplasia. *J Child Neurol.* 1991;6(4):306-12.

100. Sarafoglou K, Lorentz CP, Otten N, Oetting WS, Grebe SK. Molecular testing in congenital adrenal hyperplasia due to 21 α -hydroxylase deficiency in the era of newborn screening. *Clin Genet.* 2012;82(1):64-70.

ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. Nome do paciente:
Documento de identidade nº : Sexo : M ☐ F ☐
Data Nascimento: / / Hospital/maternidade:
Endereço Nº..... APTO:
Bairro:..... Cidade :
CEP:..... Telefones:(.....)
2. Responsável legal:
Nome da mãe (no caso de não ser a responsável legal):
Natureza (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
Documento de identidade nº : Sexo: M ☐ F ☐
Data Nascimento: / /
Endereço Nº..... APTO:
Bairro:..... Cidade :
CEP:..... Telefones:(.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. Título do protocolo de pesquisa:

Avaliação da eficácia de diferentes testes confirmatórios na triagem neonatal da hiperplasia adrenal congênita por deficiência da 21-hidroxilase

2. Pesquisador: Tânia Sanchez Bachega

Cargo/função: Médico

Inscrição Conselho Regional nº 58.954

Unidade do HC-FMUSP: Endocrinologia

3. Avaliação do risco da pesquisa:

Risco mínimo ☒ Risco baixo ☐ Risco médio ☐ Risco maior ☐

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. Duração da pesquisa : 4 (quatro) anos

1- Estamos convidando seu filho(a) a participar desta pesquisa que tem o objetivo de avaliar qual exame laboratorial é melhor para fazer o diagnóstico de uma doença chamada hiperplasia adrenal congênita, que acomete recém-nascidos desde o nascimento. Esta é uma das doenças avaliadas no teste do pezinho porque pode ser diagnosticada já nos primeiros dias de vida através da dosagem de algumas substâncias no sangue.

2- Seu filho(a) está sendo convidado a participar deste estudo porque o resultado do exame do teste do pezinho está alterado, mostrando que ele(a) tem um risco de poder apresentar a doença. Entretanto, o teste do pezinho não faz o diagnóstico definitivo da doença, apenas seleciona os bebês suspeitos, e por isso é preciso realizar alguns outros exames mais completos no sangue para confirmar ou afastar o diagnóstico desta doença. Por causa deste resultado, ele(a) precisará realizar outros exames laboratoriais imediatamente.

3- Para confirmar o diagnóstico da doença através de exames laboratoriais, é realizada rotineiramente a coleta de 5 ml de sangue (correspondente a 1 colher de sopa) através de uma picada com agulha estéril descartável preferencialmente em veia do antebraço.

4- Como queremos testar outros exames além dos atualmente utilizados, precisaremos retirar, utilizando a mesma picada, mais 5 ml de sangue de seu bebê, o que equivale a 1 colher de sopa a mais de sangue do que o habitual. Se estes exames de sangue ainda continuarem com resultados duvidosos, ou seja, não conseguirem definir se seu bebê tem ou não a doença, analisaremos o material genético, conhecido por DNA, naquela mesma amostra de sangue já coletada anteriormente e procuraremos a presença de mutação (alteração) no DNA, as quais são a causa da doença.

5- O desconforto dessa coleta é a dor da picada da coleta de um exame de sangue habitual. Eventualmente pode ocorrer o aparecimento de uma pequena mancha arroxeadada em torno da picada, que desaparecerá em poucos dias. A quantidade de sangue coletada a mais por causa deste estudo é muito pequena e o risco de complicações por causa da retirada deste tanto a mais de sangue é mínimo.

6- O benefício ao participar deste estudo será a correta e ágil confirmação ou exclusão se o seu filho(a) apresenta esta doença, permitindo o início rápido do tratamento com remédios, caso os exames acima citados confirmem que ele é portador da doença. O início precoce da terapia evita que ele(a) apresente as complicações que esta doença normalmente causa, por exemplo vômitos, desidratação grave e queda da pressão. Outro benefício com o aperfeiçoamento destes exames é o de dar tranquilidade para os pais com alta do seguimento médico caso seu bebê não seja doente, mas por algum motivo o teste do pezinho tenha tido um resultado suspeito para esta doença.

7- A vantagem para o seu bebê em participar deste estudo é a possibilidade de o diagnóstico ser feito mais rápido e de forma mais precisa a partir dos achados deste novo estudo. Outra vantagem é que, se nós encontrarmos alguma alteração genética do DNA de seu bebê, ofereceremos para sua família uma orientação sobre o risco de terem outros filhos afetados.

8- Os pais ou responsáveis legais terão acesso em qualquer momento às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecer eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Tânia Sanchez Bachega, que pode ser encontrada na Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155 – 2º andar bloco 6. Tel.: (11) 2661-7512. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel. (11) 2661-6442 ramais 16, 17 ou 18. E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

9- Os pais ou responsáveis legais terão liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade do tratamento médico.

10- Garantimos a confidencialidade, sigilo e privacidade de todos os dados de seu bebê.

11- Os pais ou responsáveis legais tem ainda o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais da pesquisa referentes ao seu bebê por se tratar de um estudo aberto.

12- Não há despesas pessoais para você ou para o bebê em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas médicas. Também não há compensação financeira pela participação no estudo.

13- O pesquisador se compromete a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa. Não haverá armazenamento de material para utilização posterior.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: Avaliação da eficácia de diferentes testes confirmatórios na triagem neonatal da hiperplasia adrenal congênita por deficiência da 21-hidroxilase.

Eu discuti com a Dra. Tânia Sanchez Bachega sobre a minha decisão em permitir que meu bebê participe deste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a participação de meu bebê é isenta de despesas e que ele terá garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concorde voluntariamente que ele(a) participe deste estudo e sei que poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que ele(a) possa ter adquirido, ou em seu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente ou representante legal

Data ____/____/____

Assinatura da testemunha

Data ____/____/____

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____/____/____

Clinical Study

D F Carvalho and others

CAH molecular diagnosis
before NBS

175:2

107–116

Molecular *CYP21A2* diagnosis in 480 Brazilian patients with congenital adrenal hyperplasia before newborn screening introduction

Daniel F de Carvalho¹, Mirela C Miranda¹, Larissa G Gomes¹, Guiomar Madureira¹, José A M Marcondes¹, Ana Elisa C Billerbeck¹, Andresa S Rodrigues¹, Paula F Presti², Hilton Kuperman², Durval Damiani², Berenice B Mendonça¹ and Tania A S S Bachega¹

¹Laboratório de Hormônios e Genética Molecular- LIM/42, Unidade de Adrenal, Disc. de Endocrinologia e Metabologia, ²Unidade de Endocrinologia Pediátrica, Instituto da Criança, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Correspondence
should be addressed
to D F Carvalho
Email
dacarv89@gmail.com

Abstract

Background: Most congenital adrenal hyperplasia (CAH) patients carry *CYP21A2* mutations derived from conversion events involving the pseudogene, and the remaining carry new mutations.

Objective: To review causal mutations and genotype–phenotype correlation in 480 Brazilian patients.

Methods: DNA was extracted from 158 salt-wasters (SWs), 116 simple virilizing (SV), and 206 nonclassical (NC) patients. Fourteen point mutations were screened by allele-specific PCR, large rearrangements by Southern blotting/MLPA, and sequencing was performed in those with incomplete genotype. The gene founder effect was analyzed by microsatellite studies. Patients were divided into six genotypes (Null; A: <2%; B: 3–7%; C: >20% of residual enzymatic activity (EA); D: unknown EA; E: incomplete genotype).

Results: Targeted methodologies defined genotype in 87.6% of classical and in 80% of NC patients and the addition of sequencing in 100 and 83.5%, respectively. The most frequent mutations were p.V281L (26.6% of alleles), IVS2-13A/C>G (21.1%), and p.I172N (7.5%); seven rare mutations and one novel mutation (p.E351V) were identified. Gene founder effect was observed in all but one (p.W19X) mutation. Null, A, B, and C genotypes correlated with SW (88%), SW (70%), SV (98%), and NC forms (100%), respectively. In group D, the p.E351V mutation correlated with classical form and group E comprised exclusively NC-patients. ACTH-stimulated 17OHP level of 44.3 ng/mL was the best cutoff to identify NC-patients carrying severe mutations. **Conclusions:** We identified a good genotype–phenotype correlation in CAH, providing useful data regarding prediction of disease's severity; moreover, we suggest that ACTH-stimulated 17OHP levels could predict carrier status for severe mutations. Sequencing is essential to optimize molecular diagnosis in Brazilian CAH patients.

European Journal of
Endocrinology
(2016) 175, 107–116

Introduction

Congenital adrenal hyperplasia (CAH) due to 21-hydroxylase deficiency (21OHD) is the most common inborn metabolism error, which presents an autosomal recessive inheritance and comprises 90–95% of CAH cases. A spectrum of clinical manifestations is observed and, traditionally, it is divided into classical (simple virilizing – SV and salt wasting – SW) and nonclassical

(NC) forms. The SV form is characterized by prenatal external genitalia virilization in females and postnatal virilization in both sexes. In the SW form, in addition to the prior listed symptoms, patients also present with hyponatremic dehydration in the first weeks of life. In the NC form, postnatal hyperandrogenic manifestations initiate at infancy, adolescence, or even at adult life (1).

Clinical Study	D F Carvalho and others	CAH molecular diagnosis before NBS	175:2	108
----------------	-------------------------	------------------------------------	-------	-----

The classical form frequency is approximately 1:10 000 to 1:15 000 live births, whereas the NC form is much more frequent and is estimated to have a frequency of 1 in 100–1000 in the general population (2, 3, 4, 5).

The 21-hydroxylase coding gene (*CYP21A2*) and its pseudogene (*CYP21A1P*) extend over a long region in the short arm of chromosome 6, alternating in *tandem* with *C4A* and *C4B* genes. Because of the high homology between *CYP21* genes and the tandem-repeat organization of the *CYP21/C4* locus, this genomic region is vulnerable to gene conversion events; thus, 90–95% of patients carry *CYP21A2* mutations derived from the pseudogene, instead of new casual mutagenic events (6, 7, 8, 9).

The great variability in phenotypic expression of CAH results from mutations leading to different degrees of enzymatic impairment, from mild to severe, and the phenotype correlates with the allele harboring the less severe mutation in a compound heterozygous patient (10, 11, 12).

A high genotype–phenotype correlation of up to 90–95% has been described in several studies (9, 13, 14, 15, 16, 17). Mutations resulting in up to 2% of residual enzymatic activity correlate with the SW form, 3–10% correlate with the SV form, and 20–50% correlate with the NC form (6, 7, 8, 9, 11, 16). These findings have emphasized the use of molecular diagnosis in clinical practice, especially in situations that require phenotype prediction. For example, molecular analysis could elucidate the diagnosis in male asymptomatic newborns with positive neonatal tests or in premature females in whom true clitoromegaly can be overestimated (4, 18). In Brazil, CAH newborn screening (CAH-NBS) is being implemented, and, considering the usefulness of molecular diagnosis to confirm/exclude CAH diagnosis, its use has been approved as a confirmatory test (19).

The aim of this paper is to review our 20 years of experience in diagnosis of CAH due to 21-hydroxylase deficiency. We determined the causing mutations in a cohort of 480 Brazilian patients to obtain a panel of the most prevalent mutations and evaluated their phenotype prediction. This information would be helpful for improving diagnostic accuracy and genetic counseling.

Subjects and methods

Patients

The study was approved by the Ethical Committee of Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo and written consent was obtained from all the participants.

Between 1993 and 2013, a total of 480 CAH patients from 429 families were diagnosed (158 SW, 116 SV, and 206 NC). All patients were followed at the Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, most of them were from São Paulo state, but few were from other Brazilian States, especially from Northeast region. The cohort included 359 females and 121 males, and the female/male ratios in classical and nonclassical forms were 1.9/1.0 and 6.7/1.0, respectively.

Clinical and hormonal-criteria defined phenotypic classification is as follows: SW, SV, and NC forms (6). In the SV form, females were referred by atypical genitalia at birth according to Prader genital scores (PGSs) or by clitoris enlargement during early childhood; males were diagnosed by precocious pubarche and penis enlargement. In both genders, bone age was advanced. In the SW form, in addition to the virilizing signs, patients also failed to thrive and demonstrated hyponatremic dehydration in the first weeks of life. All classic patients presented with extremely increased basal 17OHP levels. The mean chronological age at diagnosis in the SW form was 66 ± 121 days, and in the SV form, it was 4.0 ± 4.5 years in girls and 4.2 ± 2.0 in boys. The mean bone age at diagnosis in SV girls was 4.2 ± 5.3 years and in SV boys was 8.5 ± 6.6 years. The NC form included female patients with late-onset hyperandrogenic manifestations such as precocious pubarche, menstrual abnormalities, hirsutism, and/or infertility. Nonclassical males were referred by precocious pubarche. All NC patients demonstrated basal or 1-h after ACTH-stimulated 17OHP levels clearly increased above 10 ng/mL (20). NC females were tested during the follicular phase of the menstrual cycle or with progesterone levels ≤ 3 ng/mL. The mean age at diagnosis in NC females was 18.3 ± 13.7 years and in NC males was 7.1 ± 3.6 years.

Hormone assays

Serum 17OHP and androstenedione levels and plasma renin activity were measured by radioimmunoassays, and the intra- and interassay coefficients of variation were 12%, 18%, and 18%, respectively. Serum cortisol and testosterone levels were analyzed by immunofluorometric assays, and the intra- and intervariation coefficients were $<8\%$ for both variables. The 17OHP values were expressed in ng/mL ($1 \text{ ng/mL} = 3.18 \text{ nmol/L}$). All steroid hormones were measured before treatment introduction.

Clinical Study	D F Carvalho and others	CAH molecular diagnosis before NBS	175:2	109
----------------	-------------------------	------------------------------------	-------	-----

Mutation analysis of the *CYP21A2* gene

DNA samples from patients and at least one parent were obtained from peripheral leukocytes. The *CYP21A2* gene was PCR-amplified, and the most frequent 14-point mutations were screened by allele-specific PCR (10, 11). Large gene rearrangements (LRs) were screened by Southern blot followed by *CYP21* probe hybridization or by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) (SALSA MLPA kit P050B CAH; MCR Holland, Amsterdam, the Netherlands) (21, 22).

When at least one allele remained with no mutation identified, entire *CYP21A2* sequencing was performed by dideoxynucleotide terminator methodology as described previously. The new allelic variant identified was also screened in at least 100 alleles of *CYP21A2* and *CYP21A1P* genes from normal Brazilian subjects (10, 23, 24), and also assessed in online known genome databases like ExAC (Exome Aggregation Consortium) and 1000 Genome. *In silico* prediction analysis of the novel p.E351V mutation was assessed using Mutation Taster (www.mutationtaster.org), Polyphen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>), and SIFT (Sorting Intolerant from Tolerant Human Protein) (http://sift.jcvi.org/www/SIFT_enst_submit.html) tools.

Two microsatellite loci (D6S273 and TAP 1), flanking the *CYP21A2* gene, were studied in all patients and their relatives who carried new mutations, as described previously (23, 24).

Genotype categories

After mutation segregation analysis, patients' genotypes were divided into six different groups. Group Null included patients who carried two mutations that predicted 0% overall activity. Group A included patients who were homozygous for the IVS2-13A/C>G mutation (<2%) or in compound heterozygosity with the group Null mutations. Group B included patients who were homozygous for the p.I172N mutation (3–7%) or in compound heterozygosity with mutations from groups Null or A. Group C included patients who were homozygous for the p.P30L, p.V281L, and p.P453S mutations (20–50%) or in compound heterozygosity with the former mutations (12). Finally, group D included patients with novel mutations for which enzymatic activity impairment had not been assessed and group E with at least one allele without identified mutations.

Statistical analysis

Data are presented as median and interquartile range of variables for which the normality test failed. The Fisher's test was used to analyze the association of mutations with clinical forms and also to verify the association of the new mutations with their respective haplotypes. Correlation between genotype groups and 17OHP levels was verified using either Mann–Whitney or Hodges–Lehmann nonparametric tests. Statistical significance was considered if $P < 0.05$. All of the statistical analyses were performed using SPSS software version 22.

Results

Disease-causing allele's distribution

Mutations were identified in both alleles using allele-specific PCR followed by Southern blot or MLPA methodologies in 88.6% of SW patients, 86.3% of SV, and 80% of NC patients. The addition of *CYP21A2* sequencing allowed for the identification of mutations in all of the classical patients and in 83.5% of NC patients. The rate of compound heterozygosity was 65.3%.

Mutations were observed in 95.7% of the 856 unrelated alleles; 86.7% had point mutations and 9% carried large gene rearrangements. The identified mutations were segregated in samples from at least one of the parents, and 6% of the alleles carried two or more point mutations. The most frequent point mutations were p.V281L (26.6% of alleles), IVS2-13A/C>G (21.1%), and p.I172N (7.5%) (Table 1).

Mutations not derived from gene conversion events

The previously described mutations p.G424S, p.R408C, IVS2-2A>G, p.Ser170fs, p.R426H, p.H365Y, and p.W19X were observed in 35 nonrelated patients (23, 24, 25, 26) (Table 2). Among them, the most frequent were the IVS2-2A>G, p.G424S, and p.R426H mutations. Microsatellite analysis was performed for six former mutations using markers flanking the *CYP21A2* gene and disclosed the same haplotype for each new mutation, suggesting a gene founder effect.

Additionally, a new allelic variant was observed: the p.E351V, in three nonrelated patients (1SW/2SV) (Table 2). This substitution was not found in 100 alleles of *CYP21A2* and *CYP21A1P* genes from normal subjects, and neither in Human Genome databases, ruling out the possibility

Clinical Study	D F Carvalho and others	CAH molecular diagnosis before NBS	175:2	110
-----------------------	--------------------------------	---	--------------	------------

Table 1 Frequency of *CYP21A2* mutations in Brazilian CAH patients and in other countries.

	Country or region (reference)									
	Brazil (this study)	Argentina (13)	Portugal (29)	Spain (17)	Chile (27, 28)	Germany (14)	Sweden (9)	USA (15)	Mexico (30)	Mid-Europe (35)
Number of unrelated alleles	856	866	112	354	164	310	186	3005	94	864
Mutations										
<i>CYP21A2</i> deletion or conversion	9.0	11.2	25.9	19.2	19.5	27.4	29.8	20.0	1.0	30.6
p.P30L	0.6	0.7	1.8			2.6	1.6	2.6	8.5	3.7
IVS2-13A/C>G	21.1	20.6	9.8	17.5	15.8	30.3	30.0	22.9	47.9	31.2
p.G110EfsX21 (E3Δ8bp)	1.8	0.8	2.7	3.3		1.6	1.2	2.1	2.1	1.0
p.I172N	7.5	8.2	9.8	3.7	7.3	19.7	20.3	8.2	11.7	14.5
p.I235N, p.V236E, p.M238K (E6 cluster)	1.2	2.0			1.8	1.0	1.1	2.1	0.0	0.3
p.V281L	26.6	26.2	25.9	33.9	2.4	2.9	7.0	23.9	8.5	3.4
p.G291S	0.1	*					0.5		0	*
p.Leu307fs (InsT)	2.2	*	4.4	1.4	0.0	0.3	0.5		1.1	1.6
p.Q318X	6.1	6.7	6.3	9.3	7.9	4.8	3.2	3.5	4.2	2.6
p.R356W	5.4	4.2	1.8		9.7	4.5	4.3	3.6	7.4	2.4
p.P453S	1.4	1.4				0.3	0.5		2.1	0.7
p.R483P	0.0									0.1
p.R483PfsX58	0.0	1.5								0.9
% of mutations involving events with pseudo-gene	82.9	82	88.4	93.9	64.4	98.1	100	88.9	94.5	92
% of alleles with no mutations identified	4.3	11.9	0.9	9.3	23.7	1.3			21.3	

*Not screened.

of polymorphism. All of the carriers disclosed the same haplotype, suggesting a gene founder effect. *In silico* analysis by Polyphen and Mutation Taster revealed scores of 0.811 and 121, respectively.

Genotype–phenotype correlation

The overall genotype–phenotype correlation was 97.3%. Genotype accurately predicted phenotype in 88.2% of the

patients in group Null, 70% of the patients in group A, 98% of the patients in group B, and 100% of the patients in group C. The Null and A genotypes comprised mainly SW patients; the B genotype was mainly associated with the SV form, but one patient presented with the NC form (LR, p.P30L/IVS2-2A>G). The C genotype was exclusively associated with the NC form. The D genotype comprised four classical patients. Finally, the E genotype was observed in 34 NC patients (Table 3).

Table 2 *CYP21A2* mutations not derived from pseudogene events: mutations with gene founder effect and a novel mutation.

ENSP00000408860	ENST00000418967	Frequency (%)	Patients [§] (n)	Founder effect	Microsatellites	
					D6S273	TAP-1
p.G424S	c.1273G>A	0.6	6	+	1	5
p.Ser170fs	c.511_512insA	0.5	4	+	3	6
p.R408C	c.1225C>T	0.5	4	+	5	5
IVS2-2A>G		1.2	10	+	3	1
p.H365Y	c.1096C>T	0.2	2	+	2	5
p.R426H	c.1280G>A	0.8	7	+	6	3
p.W19X	c.59G>A	0.2	2	–	–	–
p.E351V	c.1055A>T	0.3	3	+	4	5

[§]Number of unrelated patients.

Clinical Study	D F Carvalho and others	CAH molecular diagnosis before NBS	175:2	111
----------------	-------------------------	------------------------------------	-------	-----

In the SW form, the most frequent mutation was IVS2-13A/C>G (33.2% of alleles), in the SV form the p.I172N (32.0%) followed by IVS2-13A/C>G (27.8%), and in the NC form the p.V281L (61.4%).

Prader genital score was available in 101 classical females. The most common PGS in Null, A, and B genotypes was Prader III (49.5%). Severe virilization (Prader IV and V) was observed more frequently in genotypes Null and A than in B ($P=0.03$), although there was no difference between groups Null and A (Fig. 1). The PGSs were similar in all classical female siblings (5 families). Interestingly, 8% of the NC females had a slight clitoromegaly (Prader I).

Median basal 17OHP levels were significantly different among genotype groups Null, A, B, and C. The lowest basal 17OHP level in a classical patient was 38 ng/mL. Among NC patients from group C, median basal 17OHP levels varied from normal (7.2%) to those that overlap with the classical form. The median basal 17OHP level was significantly higher in genotype A/C (median 17.5 ng/mL, range 0.4–80 ng/mL) than in C/C (median 7.6 ng/mL, range 0.3–58 ng/mL) as was ACTH-stimulated 17OHP levels ($P=0.005$) (Table 4). Data of basal and stimulated-17OHP levels from pre- and postpubertal NC patients were analyzed together, since their values did not significantly differed ($P>0.05$). The lowest ACTH-stimulated 17OHP level in an NC patient from group C was 11 ng/mL. ACTH-stimulated serum 17OHP level of 44.3 ng/mL was the cutoff with higher sensitivity (0.674) and specificity (0.702) to identify NC patients with compound heterozygosis for severe mutations (area under ROC curve=0.701 (0.597–0.804) ($P=0.001$).

Even after *CYP21A2* sequencing, 16.5% of the NC patients persisted with an incomplete genotype (group E). Among these, 8 patients presented basal 17OHP level above 15 ng/mL, 8 presented ACTH-stimulated 17OHP level between 10 and 15 ng/mL, and 20 presented ACTH-stimulated 17OHP level above 15 ng/mL. These patients had their *CYP21A2* sequencing revised though a new PCR product and allelic drop out was ruled out.

Discussion

In the present study, we explored the clinical and molecular features of one of the largest Latin American CAH cohorts. We identified the nine previously described *CYP21A2* point mutations, derived from gene conversion events, in 74% of unrelated alleles and large gene

rearrangements in 9% of the alleles. Compared with other ethnic groups, the overall results were similar, especially concerning the high frequency of IVS2-13A/C>G mutation. Our lower frequency of LR was probably because many SW patients died without precocious neonatal diagnosis (6, 13, 15, 16, 17, 26, 27, 28, 29). The lower SW:SV ratio (1.3:1.0) than that found in countries where CAH neonatal screening is routinely performed (3-4:1), in addition to the lower proportion of males than females (1.0/1.9) among classical patients, illustrates the importance of introducing CAH newborn screening (4). In Argentina (13) and Mexico (30), countries in which CAH-NBS has been implemented more recently, the patient cohort characteristics are similar to ours.

The widely used site-directed mutation analysis and Southern blot/MLPA techniques failed to identify mutations more often than expected. Considering the significant proportion of mutations that were not derived from the pseudogene (4.4% of the alleles), we suggest the addition of sequencing to propose an accurate diagnostic molecular panel in our population. *CYP21A2* sequencing increased the identification of mutations to 100% of classical alleles, similar to what was described previously (9, 16).

Remarkably, analysis of the Brazilian cohort found eight rare/novel mutations. The gene founder effect was observed in all carriers of the p.R408C, p.Ser170fs, p.H365Y, IVS2-2A>G, and p.G424S, as described previously (23, 24, 26), and in the present work, we also observed in carriers of the p.E351V and p.R426H mutations. For instance, the p.H365Y, p.G424S, and p.R426H mutations were already described in Spanish and Portuguese patients, which are the two main parental populations responsible for Brazilian population constitution, suggesting a common origin (29, 31). Although the majority of our patients was from São Paulo state, we have no information about their ancestry, which may come from other places of Brazil. For instance, we also identified these mutations in screened patients from Goiás state, suggesting that they are present in Brazilian population overall (32).

The codon 351 is a highly conserved residue of P450 cytochromes and belongs to the E351/R354/R408 triad that stabilizes the three-dimensional protein structure (33). A missense mutation p.E351K was described in the same codon leading to severe enzyme activity impairment (34). Although we did not perform *in vitro* studies, *in silico* analysis suggested deleterious effect of this mutation; the p.E351V mutation was found in classical patients confirming the severity of the mutation *in vivo*.

Clinical Study	D F Carvalho and others	CAH molecular diagnosis before NBS	175:2	112
----------------	-------------------------	------------------------------------	-------	-----

Table 3 Genotype–phenotype correlation and gender distribution of patients with point mutations or large rearrangements.

Group	CYP21A2 genotype	CAH phenotype				Sex	
		SW	SV	NC	Total	F	M
Null	Del or conv./Del or conv.	9	1		10	6	4
	Del/p.Leu307fs	1			1	1	
	Del or conv./p.Q318X	5	1		6	1	5
	Del or conv./p.R356W	5			5	2	3
	Del/p.W19X	1			1	1	
	p.Leu307fs/E6 cluster	2			2	1	1
	E3 Δ8bp/E3 Δ8bp	3			3		3
	E3 Δ8bp/p.Q318X	3			3		1
	E3 Δ8bp/p.R356W	1			1	1	
	E6 cluster/E6 cluster	1			1		1
	E6 cluster/p.R356W	1			1	1	
	p.Q318X/p.Q318X	7			7	4	3
	p.Q318X/p.Leu307fs	1			1	1	
	p.R356W/p.R356W	5	1		6	5	1
	p.R356W/p.Q318X	4	1		5	1	4
	p.R356W/p.Leu307fs	5			5	3	2
	p.H365Y/IVS2-13A/C>G	1			1	1	
	p.Ser170fs/p.Leu307fs	1			1	1	
	p.Ser170fs/p.Q318X	1			1		1
	IVS2-2A>G/IVS2-2A>G	1			1	1	
	p.Ser170fs/p.R408C	1			1		1
	p.R408C/p.Q318X		1		1		1
	p.R408C, IVS2-13A/C>G/IVS2-13A/C>G	1			1	1	
A	IVS2-13A/C>G/Del or conv.	18	3		21	19	2
	IVS2-13A/C>G/IVS2-13A/C>G	23	15		38	25	13
	IVS2-13A/C>G/E3 Δ8bp	2	1		3	2	1
	IVS2-13A/C>G/E6 cluster	1			1	1	
	IVS2-13A/C>G/p.G291S	1			1	1	
	IVS2-13A/C>G/p.Leu307fs	4			4	2	2
	IVS2-13A/C>G/p.Q318X	9	4		14	10	4
	IVS2-13A/C>G/p.R356W	3	3		6	3	3
	IVS2-13A/C>G/IVS2-2A>G	3			3	2	1
	IVS2-13A/C>G/p.W19X, p.V281L	1			1	1	
	IVS2-13A/C>G/p.Ser170fs	1			1	1	
B	p.I172N/Del or conv.		4		4	3	1
	p.I172N/IVS2-13A/C>G		14		14	12	2
	p.I172N/E6 cluster		3		3	2	1
	p.I172N/p.I172N		16		16	12	4
	p.I172N/p.Q318X		5		5	4	1
	p.I172N/p.R356W		4		4	3	1
	p.I172N/p.Leu307fs		1		1	1	
	p.I172N/Conv P30L		2		2	2	
	p.I172N/IVS2-2A>G		2		2	1	1
	p.I172N/p.G424S		1		1		1
	p.I172N/p.R408C		1		1	1	
	p.G424S/IVS2-13A/C>G		2		2	2	
	p.G424S/p.R356W		2		2	1	1
	p.R426H/Del		1		1	1	
	p.R426H/p.Q318X		2		2	1	1
	p.R426H/p.H365Y		1		1		1
	p.R426H/p.R426H		1		1	1	
	Conv P30L/IVS2-13A/C>G		1		1	1	
	Conv P30L/p.R356W		1		1	1	
	Conv P30L/IVS2-2A>G			1	1	1	
C	p.V281L/Del or conv.			13	13	11	2
	p.V281L/IVS2-13A/C>G			21	21	19	2
	p.V281L/p.I172N			7	7	5	2

Continued

Clinical Study	D F Carvalho and others	CAH molecular diagnosis before NBS	175:2	113
----------------	-------------------------	------------------------------------	-------	-----

Table 3 (Continued).

Group	CYP21A2 genotype	CAH phenotype				Sex	
		SW	SV	NC	Total	F	M
	p.V281L/p.V281L			73	73	64	9
	p.V281L/p.P30L			1	1	1	
	p.V281L/E3 Δ8bp			3	3	2	1
	p.V281L/E6 cluster			1	1		1
	p.V281L/p.Leu307fs			3	3	3	
	p.V281L/p.Q318X			3	3	3	
	p.V281L/p.R356W			8	8	7	1
	p.V281L/Conv P30L			1	1	1	
	p.V281L/p.R426H			1	1		1
	p.V281L/p.G424S			1	1	1	
	p.V281L/IVS2-2A>G			1	1	1	
	p.V281L/p.P453S			8	8	6	2
	p.P30L/IVS2-13A/C>G			2	2	1	1
	p.P30L/p.P30L			1	1	1	
	p.P453S/E3 Δ8bp			1	1	1	
	p.P453S/IVS2-13A/C>G			2	2	2	
D	p.E351V/E6 cluster		1		1	1	
	p.E351V/IVS2-13A/C>G	2			2		2
	p.E351V/p.G424S		1		1		1
E	IVS2-13A/C>G/-			3	3	3	
	p.V281L/-			20	20	19	1
	-/-			9	9	9	

A strong positive genotype–phenotype association was verified, similar to that found in other ethnic groups (9, 13, 14, 15, 16, 17, 27, 28, 29, 30, 35). The salt-waster frequency was higher in the Null group than in group A, which is also important for clinical decisions in asymptomatic patients (18) during the neonatal period. When the most frequent mutation IVS2-13A/C>G was present in the less severe allele (group A), carriers has an increased chance (71%) to develop the SW form. Its presence in some simple virilizing patients can be explained by alternative splicing, which leads to a minimal residual enzyme activity, thus avoiding salt loss (36).

High concordance between genotype and phenotype was also observed in group B. This was different from other studies, which demonstrated a wide phenotypic spectrum with the p.I172N mutation, varying from SW to SV forms (7, 13, 15, 16). Another positive genotype–phenotype correlation was observed in group C, where all patients presented with the NC form except for those carrying the p.P30L mutation, since some patients also presented the SV form. It is important to evaluate whether p.P30L mutation represents a microconversion event involving the exon 1 of the pseudogene or a macroconversion event involving the promoter region plus exon 1 of the pseudogene. For the latter cases, in our experience, the phenotypic expression of SV form prevails, since the promoter region of the pseudogene carries mutations that

reduce the transcriptional activity five-fold, resulting in a more severe phenotype (37).

Despite the above-mentioned positive genotype–phenotype correlation, we observed few cases with less severe phenotypes than what was predicted by the genotype. This divergence has been observed in some

Figure 1
Frequency of Prader genital scores (PGSs) according to genotype groups.

Clinical Study	D F Carvalho and others	CAH molecular diagnosis before NBS	175:2	114
----------------	-------------------------	------------------------------------	-------	-----

Table 4 Serum basal and ACTH-stimulated 17OHP levels according to genotype in CAH patients.

Genotype group	Patients (n)	Basal 17OHP (ng/mL)			ACTH-stimulated 17OHP (ng/mL)		
		Mean	Median	Range	Mean	Median	Range
Null	85	227.5	188.3	50–801	–	–	–
A	115	225.8	180.1	50–1549	–	–	–
B	71	166.8	145.7	38–393	–	–	–
C	171	17.6	12.8	0.6–80	49.2	43.6	11–255
NC genotypes							
A/C	74	23.1	17.5	0.4–80	60.3	55	11–255
B/C	10	23.2	19	8–43	64.5	60	20–118
C/C	87	12	7.6	0.3–58	39.8	36	15–121
C/– or –/–	34	10.7	3.5	0.9–58.9	24	19	10.8–83.7

studies worldwide (14, 15); this may be due to a role of modifier genes involving 21-hydroxylase transcription/translation or even the presence of extra-adrenal 21-hydroxylation (21, 38).

Data available regarding genotype correlation with the degree of external genitalia virilization reveal conflicting results (9, 14, 39). We observed severe genitalia virilization more frequently in genotypes Null and A than in B; however, due to the wide overlap of this manifestation, genotype could not be used as a predictor.

Median basal 17OHP levels were significantly different among genotypes Null, A, B, and C; however, a great overlap among genotype groups has been observed (7, 11). Basal and ACTH-stimulated 17OHP levels were significantly higher in NC genotype A/C than C/C. These findings are in accordance with other series that included a significant number of NC patients (2, 20, 40).

Different ACTH-stimulated 17OHP levels (10–15 ng/mL) have been used for NC diagnosis (2, 3). Most of our NC patients presented with highly increased stimulated 17OHP levels, but 3.3% of them presented with levels lower than 15 ng/mL. Among these latter patients with incomplete genotype, we cannot rule out the polycystic ovary syndrome diagnosis. In this way, it was observed that some obligate heterozygotes for severe mutations presented with ACTH-stimulated 17OHP levels that overlapped with those of NC diagnosis (41). All these data indicate that hormonal nonclassical diagnosis criteria should be revised taking into account molecular data. However, we also observed that most patients with incomplete genotype (group E) presented ACTH-stimulated 17OHP levels higher than 15 ng/mL. Nevertheless, this finding also points out to the possibility of mutations in other sites like distal regulatory regions (42).

Due to our large number of NC patients, we investigated the peak 17OHP cutoff that better predicts the risk of compound heterozygosis with severe mutations

(genotype A/C), which is important for genetic counseling purposes. The ACTH-stimulated 17OHP value of 44.3 ng/mL presented the highest sensitivity and specificity to identify this subgroup of patients; a previous study found a similar value (49.8 ng/mL) (43).

CAH molecular diagnosis is one of the most complicated of all monogenic disorders. Through our large CAH cohort, we were able to designate the complexities in their genotypes. We provided mutation prevalence in Brazil, which enables the development of a mutation panel for molecular diagnosis in our population in the clinical practice, such as newborn screening.

The CAH-NBS is not universally adopted, mainly because of its high false-positive results rate and of the good healthcare professionals' performance in detecting CAH during neonatal period in developed countries (44, 45). Unfortunately, the scenario is different in emergent nations. Data of this unscreened Brazilian cohort highlight the pitfalls of clinical diagnosis, illustrating the importance of CAH-NBS introduction nationwide. Recent data from NBS in São Paulo indicated that it is highly efficient to promote early diagnosis, preventing neonatal deaths in our state (32). In NBS, the molecular study is particularly useful to set the precise diagnosis, avoiding unnecessary treatment and follow-up of oligo/asymptomatic patients with persistently increased 17OHP levels.

In conclusion, we demonstrated a good genotype–phenotype correlation and that *CYP21A2* sequencing is essential to achieve adequate CAH molecular diagnosis, although 16.5% of the NC patients persisted with an incomplete genotype. We also suggest that stimulated 17OHP levels could be predictive of carrier status for severe mutations, which is important for genetic counseling. Genotyping is a useful complementary tool for confirming or excluding CAH diagnosis and predicting the clinical manifestations in patients who are diagnosed before the symptomatic phase.

Clinical Study	D F Carvalho and others	CAH molecular diagnosis before NBS	175:2	115
----------------	-------------------------	------------------------------------	-------	-----

Declaration of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Funding

This paper was partially supported by a grant from FAPESP # 2014/07878-4. TASSB and BBM were supported by grants from CNPq # 308318/2012-9 and 305743/2011-2, respectively.

References

- New M, Lekarev O, Parsa A, Yuen T, O'Malley B & Hammer G. *Genetic Steroid Disorders*. London, UK: Elsevier, 2013.
- Speiser PW, Knochenhauer ES, Dewailly D, Fruzzetti F, Marcondes JA & Azziz R. A multicenter study of women with nonclassical congenital adrenal hyperplasia: relationship between genotype and phenotype. *Molecular Genetics and Metabolism* 2000 **71** 527–534. (doi:10.1006/mgme.2000.3036)
- New MI. Extensive clinical experience: nonclassical 21-hydroxylase deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2006 **91** 4205–4214. (doi:10.1210/jc.2006-1645)
- Silveira EL, dos Santos EP, Bachega TA, van der Linden Nader I, Gross JL & Elencave RH. The actual incidence of congenital adrenal hyperplasia in Brazil may not be as high as inferred – an estimate based on a public neonatal screening program in the state of Goiás. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism* 2008 **21** 455–460. (doi:10.1515/JPEM.2008.21.5.4556)
- Hayashi G, Faure C, Brondi MF, Vallejos C, Soares D, Oliveira E, Brito VN, Mendonça BB & Bachega TASS. Weight-adjusted neonatal 17OH-progesterone cutoff levels improve the efficiency of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* 2011 **55** 632–637. (doi:10.1590/S0004-27302011000800019)
- White PC & Bachega TA. Congenital adrenal hyperplasia due to 21 hydroxylase deficiency: from birth to adulthood. *Seminars in Reproductive Medicine* 2012 **30** 400–409. (doi:10.1055/s-0032-1324724)
- Krone N, Braun A, Roscher AA, Knorr D & Schwarz HP. Predicting phenotype in steroid 21-hydroxylase deficiency? Comprehensive genotyping in 155 unrelated, well defined patients from southern Germany. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2000 **85** 1059–1065.
- Bachega TA, Billerbeck AE, Parente EB, Lemos-Marini SH, Baptista MT, Mello MP, Guerra G Jr, Kuperman H, Setian N, Damiani D et al. [Multicentric study of Brazilian patients with 21-hydroxylase deficiency: a genotype-phenotype correlation]. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* 2004 **48** 697–704. (doi:10.1590/S0004-27302004000500016)
- Wedell A, Thilén A, Ritzén EM, Stengler B & Luthman H. Mutational spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Sweden: implications for genetic diagnosis and association with disease manifestation. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1994 **78** 1145–1152. (doi:10.1210/jcem.78.5.8175971)
- Wedell A & Luthman H. Steroid 21-hydroxylase deficiency: two additional mutations in salt-wasting disease and rapid screening of disease-causing mutations. *Human Molecular Genetics* 1993 **2** 499–504. (doi:10.1093/hmg/2.5.499)
- Bachega TA, Billerbeck AE, Madureira G, Marcondes JA, Longui CA, Leite MV, Arnhold IJ & Mendonça BB. Molecular genotyping in Brazilian patients with the classical and nonclassical forms of 21-hydroxylase deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1998 **83** 4416–4419. (doi:10.1210/jcem.83.12.5350)
- Higashi Y, Hiromasa T, Tanai E, Miki T, Nakura J, Kondo T, Ohura T, Ogawa E, Nakayama K & Fujii-Kuriyama Y. Effects of individual mutations in the P-450(C21) pseudogene on the P-450(C21) activity and their distribution in the patient genomes of congenital steroid 21-hydroxylase deficiency. *Journal of Biochemistry* 1991 **109** 638–644.
- Marino R, Ramirez P, Galeano J, Perez Garrido N, Rocco C, Ciacio M, Warman DM, Guercio G, Chaler E, Maceiras M et al. Steroid 21-hydroxylase gene mutational spectrum in 454 Argentinean patients: genotype-phenotype correlation in a large cohort of patients with congenital adrenal hyperplasia. *Clinical Endocrinology* 2011 **75** 427–435. (doi:10.1111/cen.2011.75.issue-4)
- Krone N, Rose IT, Willis DS, Hodson J, Wild SH, Doherty EJ, Hahner S, Parajes S, Stimson RH, Han TS et al. Genotype-phenotype correlation in 153 adult patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: analysis of the United Kingdom Congenital adrenal Hyperplasia Adult Study Executive (CaHASE) cohort. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2013 **98** E346–E354. (doi:10.1210/jc.2012-3343)
- New MI, Abraham M, Gonzalez B, Dumic M, Razzaghy-Azar M, Chitayat D, Sun L, Zaidi M, Wilson RC & Yuen T. Genotype-phenotype correlation in 1,507 families with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. *PNAS* 2013 **110** 2611–2616. (doi:10.1073/pnas.1300057110)
- Finkelstein GP, Chen W, Mehta SP, Fujimura FK, Hanna RM, Van Ryzin C, McDonnell NB & Merke DP. Comprehensive genetic analysis of 182 unrelated families with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2011 **96** E161–E172. (doi:10.1210/jc.2010-0319)
- Ezquieta B, Cueva E, Oyarzábal M, Oliver A, Varela JM & Jariego C. Gene conversion (655G splicing mutation) and the founder effect (Gln318Stop) contribute to the most frequent severe point mutations in congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency) in the Spanish population. *Clinical Genetics* 2002 **62** 181–188. (doi:10.1034/j.1399-0004.2002.620213.x)
- Sarafoglou K, Lorentz CP, Otten N, Oetting WS & Grebe SK. Molecular testing in congenital adrenal hyperplasia due to 21 α -hydroxylase deficiency in the era of newborn screening. *Clinical Genetics* 2012 **82** 64–70. (doi:10.1111/cge.2012.82.issue-1)
- União DO. Portaria Ministerial N 2.829. Brasil, 2012.
- Bachega TA, Billerbeck AE, Marcondes JA, Madureira G, Arnhold IJ & Mendonça BB. Influence of different genotypes on 17-hydroxyprogesterone levels in patients with nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Clinical Endocrinology* 2000 **52** 601–607. (doi:10.1046/j.1365-2265.2000.00995.x)
- Bachega TA, Billerbeck AE, Madureira G, Arnhold IJ, Medeiros MA, Marcondes JA, Longui CA, Nicolau W, Bloise W & Mendonça BB. Low frequency of CYP2B deletions in Brazilian patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Human Heredity* 1999 **49** 9–14. (doi:10.1159/000022833)
- Costa-Barbosa FA, Tonetto-Fernandes VF, Carvalho VM, Nakamura OH, Moura V, Bachega TA, Vieira JG & Kater CE. Superior discriminating value of ACTH-stimulated serum 21-deoxycortisol in identifying heterozygote carriers for 21-hydroxylase deficiency. *Clinical Endocrinology* 2010 **73** 700–706. (doi:10.1111/cen.2010.73.issue-6)
- Billerbeck AE, Bachega TA, Frazzatto ET, Nishi MY, Goldberg AC, Marin ML, Madureira G, Monte O, Arnhold IJ & Mendonça BB. A novel missense mutation, GLY424SER, in Brazilian patients with 21-hydroxylase deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1999 **84** 2870–2872. (doi:10.1210/jcem.84.8.5937)
- Billerbeck AE, Mendonça BB, Pinto EM, Madureira G, Arnhold IJ & Bachega TA. Three novel mutations in CYP21 gene in Brazilian patients with the classical form of 21-hydroxylase deficiency due to a founder effect. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2002 **87** 4314–4317. (doi:10.1210/jc.2001-011939)
- Kharrat M, Tardy V, M'Rad R, Maazoul F, Jemaa LB, Refai M, Morel Y & Chaabouni H. Molecular genetic analysis of Tunisian patients with

Clinical Study	D F Carvalho and others	CAH molecular diagnosis before NBS	175:2	116
----------------	-------------------------	------------------------------------	-------	-----

- a classic form of 21-hydroxylase deficiency: identification of four novel mutations and high prevalence of Q318X mutation. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2004 **89** 368–374. (doi:10.1210/jc.2003-031056)
- 26 Baumgartner-Parzer SM, Schulze E, Waldhäusl W, Pauschenwein S, Rondot S, Nowotny P, Meyer K, Frisch H, Waldhauser F & Vierhapper H. Mutational spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Austria: identification of a novel missense mutation. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2001 **86** 4771–4775. (doi:10.1210/jc.86.10.4771)
 - 27 Fardella CE, Poggi H, Pineda P, Soto J, Torrealba I, Cattani A, Oestreicher E & Foradori A. Salt-wasting congenital adrenal hyperplasia: detection of mutations in CYP21B gene in a Chilean population. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1998 **83** 3357–3360. (doi:10.1210/jc.83.9.3357)
 - 28 Fardella CE, Poggi H, Soto J, Torrealba I, Cattani A, Ugarte F, Cortinez A & Foradori A. Mutations in the CYP21 B gene in a Chilean population with simple virilizing congenital adrenal hyperplasia. *Journal of Endocrinological Investigation* 2000 **23** 412–416. (doi:10.1007/BF03343746)
 - 29 Friães A, Rêgo AT, Aragão00E9s JM, Moura LE, Mirante A, Mascarenhas MR, Kay TT, Lopes LA, Rodrigues JC, Guerra S *et al.* CYP21A2 mutations in Portuguese patients with congenital adrenal hyperplasia: identification of two novel mutations and characterization of four different partial gene conversions. *Molecular Genetics and Metabolism* 2006 **88** 58–65. (doi:10.1016/j.ymgme.2005.11.015)
 - 30 Ordoñez-Sánchez ML, Ramírez-Jiménez S, López-Gutiérrez AU, Riba L, Gamboa-Cardiel S, Cerrillo-Hinojosa M, Altamirano-Bustamante N, Calzada-León R, Robles-Valdés C & Mendoza-Morfin F. Molecular genetic analysis of patients carrying steroid 21-hydroxylase deficiency in the Mexican population: identification of possible new mutations and high prevalence of apparent germ-line mutations. *Human Genetics* 1998 **102** 170–177. (doi:10.1007/s004390050672)
 - 31 Santomé Collazo JL, Cirujano Segura A, Ferreira Fernández B, Casado Fúnez C, Muñoz-Pacheco R & Ezquieta Zubizaray B. [Simple virilizing forms of congenital adrenal hyperplasia: adaptation and prospective validation of the molecular screening]. *Medicina Clínica* 2010 **135** 195–201. (doi:10.1016/j.medcli.2009.11.039)
 - 32 Silveira EL, Elnecave RH, dos Santos EP, Moura V, Pinto EM, van der Linden Nader I, Mendonça BB & Bachega TA. Molecular analysis of CYP21A2 can optimize the follow-up of positive results in newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Clinical Genetics* 2009 **76** 503–510. (doi:10.1111/cge.2009.76.issue-6)
 - 33 Tardy V, Menassa R, Sulmont V, Lienhardt-Roussie A, Lecointre C, Brauner R, David M & Morel Y. Phenotype-genotype correlations of 13 rare CYP21A2 mutations detected in 46 patients affected with 21-hydroxylase deficiency and in one carrier. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2010 **95** 1288–1300. (doi:10.1210/jc.2009-1202)
 - 34 Krone N, Riepe FG, Grötzinger J, Partsch CJ, Brämwig J & Sippell WG. The residue E351 is essential for the activity of human 21-hydroxylase: evidence from a naturally occurring novel point mutation compared with artificial mutants generated by single amino acid substitutions. *Journal of Molecular Medicine* 2005 **83** 561–568. (doi:10.1007/s00109-005-0655-3)
 - 35 Dolzan V, Sólyom J, Fekete G, Kovács J, Rakosnikova V, Votava F, Lebl J, Pribilincova Z, Baumgartner-Parzer SM, Riedl S *et al.* Mutational spectrum of steroid 21-hydroxylase and the genotype-phenotype association in Middle European patients with congenital adrenal hyperplasia. *European Journal of Endocrinology* 2005 **153** 99–106. (doi:10.1530/eje.1.01944)
 - 36 Higashi Y, Tanae A, Inoue H, Hiromasa T & Fujii-Kuriyama Y. Aberrant splicing and missense mutations cause steroid 21-hydroxylase [P-450(C21)] deficiency in humans: possible gene conversion products. *PNAS* 1988 **85** 7486–7490. (doi:10.1073/pnas.85.20.7486)
 - 37 Araujo RS, Billerbeck AE, Madureira G, Mendonça BB & Bachega TA. Substitutions in the CYP21A2 promoter explain the simple-virilizing form of 21-hydroxylase deficiency in patients harbouring a P30L mutation. *Clinical Endocrinology* 2005 **62** 132–136. (doi:10.1111/cen.2005.62.issue-2)
 - 38 Gomes LG, Huang N, Agrawal V, Mendonça BB, Bachega TA & Miller WL. Extraadrenal 21-hydroxylation by CYP2C19 and CYP3A4: effect on 21-hydroxylase deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2009 **94** 89–95. (doi:10.1210/jc.2008-1174)
 - 39 Welzel M, Schwarz HP, Hedderich J, Dörr HG, Binder G, Brämwig JH, Krude H, Richter-Unruh A, Niedziela M, Gromoll J *et al.* No correlation between androgen receptor CAG and GGN repeat length and the degree of genital virilization in females with 21-hydroxylase deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2010 **95** 2443–2450. (doi:10.1210/jc.2009-1338)
 - 40 Bidet M, Bellanné-Chantelot C, Galand-Portier MB, Tardy V, Billaud L, Laborde K, Coussieu C, Morel Y, Vauzy C, Golmard JL *et al.* Clinical and molecular characterization of a cohort of 161 unrelated women with nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency and 330 family members. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2009 **94** 1570–1578. (doi:10.1210/jc.2008-1582)
 - 41 Bachega TA, Brenilha EM, Billerbeck AE, Marcondes JA, Madureira G, Arnhold JJ & Mendonça BB. Variable ACTH-stimulated 17-hydroxyprogesterone values in 21-hydroxylase deficiency carriers are not related to the different CYP21 gene mutations. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2002 **87** 786–790.
 - 42 Araújo RS, Mendonça BB, Barbosa AS, Lin CJ, Marcondes JA, Billerbeck AE & Bachega TA. Microconversion between CYP21A2 and CYP21A1P promoter regions causes the nonclassical form of 21-hydroxylase deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2007 **92** 4028–4034. (doi:10.1210/jc.2006-2163)
 - 43 Ezquieta B, Cueva E, Varela J, Oliver A, Fernández J & Jariago C. Non-classical 21-hydroxylase deficiency in children: association of adrenocorticotrophic hormone-stimulated 17-hydroxyprogesterone with the risk of compound heterozygosity with severe mutations. *Acta Paediatrica* 2002 **91** 892–898. (doi:10.1111/j.1651-2227.2002.tb02851.x)
 - 44 Virdi NK, Rayner PH, Rudd BT & Green A. Should we screen for congenital adrenal hyperplasia? A review of 117 cases. *Archives of Disease in Childhood* 1987 **62** 659–662. (doi:10.1136/adc.62.7.659)
 - 45 Hird BE, Tetlow L, Tobi S, Patel L & Clayton PE. No evidence of an increase in early infant mortality from congenital adrenal hyperplasia in the absence of screening. *Archives of Disease in Childhood* 2014 **99** 158–164.

Received 23 February 2016
Revised version received 1 May 2016
Accepted 16 May 2016

ORIGINAL ARTICLE

Neonatal 17-hydroxyprogesterone levels adjusted according to age at sample collection and birthweight improve the efficacy of congenital adrenal hyperplasia newborn screening

Giselle Y. Hayashi^{*†‡}, Daniel F. Carvalhot[†], Mirela C. de Mirandat, Cláudia Faure^{*}, Carla Vallejos^{*},
Vinícius N. Brito[†], Andresa De Santit, Guiomar Madureirat, Berenice B. Mendoncat and Tânia A.S.S. Bachegat

^{*}Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais de São Paulo – APAE DE SÃO PAULO, and [†]Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/LIM 42 – Disciplina de Endocrinologia e Metabologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Summary

Introduction The primary concern related to congenital adrenal hyperplasia (CAH) newborn screening (NBS) is the high rate of false-positive results (FPR) associated with prematurity; false-negative results (FNR) can also occur due to precocious sample collection.

Objective To determine the neonatal 17-hydroxyprogesterone (N17OHP) normal range in newborns in São Paulo using different references according to age and birthweight (BW) and to establish the optimal NBS cut-off levels.

Methods Neonatal 17-hydroxyprogesterone levels from 271 810 newborns (NBs) according to sample collection time (G1: 48–72 h and G2: ≥72 h) and BW (≤1500 g, 1501–2000 g, 2001–2500 g and >2500 g) were evaluated. N17OHP was measured by an immunofluorometric assay, and serum 17OHP was measured by liquid chromatography-mass spectrometry. Affected and asymptomatic NBs with persistently increased 17OHP levels were submitted to CYP21A2-sequencing.

Results Neonatal 17-hydroxyprogesterone levels in G1 were lower than G2 in all BW groups ($P < 0.001$). The FPR rate in G1/G2 was 0.2% using the 99.8th and 0.5% using the 99.5th percentile. The 99.8th percentile N17OHP value was the best cut-off for distinguishing between unaffected and affected NBs. Forty-four salt wasters, and five simple virilisers were diagnosed; N17OHP levels ranged from 93.3 to 2209.8 nmol/L, and no affected neonates with FNR were identified. The positive predictive value in G1 and G2 using the 99.8th percentile was 5.6% and 14.1%, respectively, and 2.3% and 7%, respectively, using

the 99.5th percentile. Molecular tests identified two NBs with the nonclassical form among the 29 FPR.

Conclusion Neonatal 17-hydroxyprogesterone levels adjusted to sample collection age and birthweight reduced the FPR, and the use of N17OHP values based upon the 99.8th percentile improved the NBS efficacy.

(Received 8 August 2016; return for revision 4 November 2016; finally revised 6 December 2016; accepted 7 December 2016)

Introduction

Congenital adrenal hyperplasia (CAH) due to 21-hydroxylase deficiency is a common genetic disorder caused by CYP21A2 mutations. The impairment of 21-hydroxylase activity results in decreased cortisol and/or aldosterone synthesis and leads to a spectrum of clinical manifestations, ranging from a simple virilising (SV) type, with prenatal external genitalia virilisation in females, to the severely affected salt-wasting form, a life-threatening condition.^{1–6}

Congenital adrenal hyperplasia is an eligible disease for newborn screening (NBS) programmes, which aim to establish an early diagnosis in order to prevent significant morbidity and mortality.^{4,7–9} The pilot newborn screening for congenital adrenal hyperplasia (CAH-NBS) in Brazil revealed a high frequency of classical forms, approximately 1:10 000 live-births in São Paulo and Goiás states,¹⁰ justifying the introduction of CAH in our National Newborn Screening Program in November 2013.^{11,12}

Congenital adrenal hyperplasia-NBS shows high efficacy of detection in severe cases; however, the false-positive results (FPR) rate of 0.4–9.3% from these tests is a significant concern.^{3,13–15} Approximately 70% of the FPR are due to prematurity and/or low birthweight (BW); other causes include stressed conditions and methodological assay specificities.^{14,16–18} Therefore, protocols that consider the physiological variation in neonatal 17-hydroxyprogesterone (N17OHP) values have been suggested, adjusting the 17-OHP cut-off values for gestational age and/or BW.^{19–21}

Correspondence: Tânia A.S.S. Bachega, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular / LIM 42 – Disciplina de Endocrinologia e Metabologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Av. Dr Enéas de Carvalho Aguiar, n 155, 2 andar, Bl 6, Cerqueira César, São Paulo, CEP: 0503-900, São Paulo, Brazil. Tel.: 00000000; E-mail: tbachega@usp.br

^{*}Author who wrote the first draft of the manuscript.

CE Menck T	13292	CEN	Journal Code
Disputed: 25.12.16	13292	Journal Code	Journal Code
No. of pages: 8	13292	Journal Code	Journal Code
PI: Sharmila R	13292	Journal Code	Journal Code

However, data concerning the optimal cut-off values of blood 17-OHP in CAH-NBS are conflicting. Additionally, it is well known that age at sample collection also influences neonatal 17-OHP levels,^{21,22} and a previous study indicated that adjusting 17-OHP cut-off values for sampling age might further reduce recall rates.²³ These aforementioned studies were published before the implementation of a new antibody in the fluoroimmunoassay, the most widely used methodology, which improved its specificity and likely altered the 17OHP cut-off levels.

In the light of this variability in N17OHP levels, standardization of the cut-off levels for fluoroimmunoassay could improve the CAH-NBS efficacy. After 18 months of CAH-NBS in São Paulo, and taking into account that sample collections are performed at different ages across the country, we evaluated whether N17OHP levels differed in samples collected at the third day of life from those collected thereafter. We also established different N17OHP cut-offs according to BW to determine which one results in the lowest FPR.

Patients and methods

The study was approved by the Ethical Committee of Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo and of APAE DE SÃO PAULO.

We performed a retrospective evaluation of data from 271 810 newborns from São Paulo state who underwent NBS routinely performed by the National Newborn Screening Program, in which CAH was introduced in November 2013. Heel prick capillary blood was collected from newborns and deposited on S&S 903 filter paper; dried samples were shipped daily to the APAE laboratory for N17OHP analysis. Newborns were divided into two groups: samples collected between 48 and <72 h of life (G1) and those after 72 h (G2). G1 and G2 groups were subdivided into four groups according to BW (BW1: ≤1500 g; BW2: 1501–2000 g; BW3: 2001–2500 g; BW4: >2500 g), as outlined in a previous study.¹⁷

All filter paper hormonal assays were performed using the same kit with the same antibody; the time-resolved, solid-phase fluoroimmunoassay 17OHP neonatal kit (B015-112 – Auto DELFIA – Neonatal 17OHprogesterone; Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Wallac Oy, Turku, Finland). N17OHP concentrations were expressed as serum equivalence (conversion rate: 1 nmol/l = 0.33 ng/ml in whole blood and 0.73 ng/ml in serum equivalence).

Newborns with increased N17OHP levels according to the 99.5th percentile (current protocol of São Paulo state) were submitted to a new sample collection on filter paper; those with N17OHP levels higher than twice the 99.8th percentile were submitted to a serum analysis of 17OHP, androstenedione and cortisol by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) and testosterone by fluoroimmunoassay. Sodium and potassium were also analysed. The intra-assay and interassay coefficients were <8% for the filter paper assay.

For this study protocol, after written informed consent was obtained from the parents, DNA samples from peripheral leucocytes were obtained from affected newborns and from those that

were asymptomatic but presenting with persistently increased serum 17OHP levels. The *CYP21A2* gene was PCR-amplified with specific primers, and the products were submitted to direct automatic sequencing. For all patients whose DNA was analysed, the whole gene was sequenced including the promoter and the intronic regions, as previously described.²⁴ DNA samples from at least one parent were collected to perform mutation segregation analysis.

Statistical analysis

Numerical data are presented as the means, standard deviations, medians, interquartile intervals (IQ), ranges and percentages. The N17OHP levels were non-normally distributed (Kolmogorov–Smirnov test, $P < 0.05$) in all groups, and the Mann–Whitney test was used to compare data of samples collected between G1 and G2 of each BW group. Different N17OHP cut-off values were determined for each BW group, G1 and G2, using the 99.5th and 99.8th percentiles.

The number of cases that would be recalled as FPR using different cut-off levels for each BW group and age at sample collection was evaluated. Sensitivity (S) and specificity (E) were determined for each cut-off value, as well as positive and negative predictive values. Statistical significance was established at $P < 0.05$. The software SPSS Statistics, version 22 was used.

Results

A total of 271 810 newborns were screened; 214 092 samples were collected between 48 < 72 h of life (G1) and 57 718 were collected after ≥72 h of life (G2). The number of newborns in each group is described in Table 1.

Median N17OHP levels in BW1, BW2, BW3 and BW4 in both G1 and G2 are shown in Table 1. The N17OHP levels were significantly lower in the G1 than in the G2 group in all BW groups ($P < 0.001$). Subsequently, N17OHP cut-offs were determined according to each BW group of G1 and G2 using both the 99.5th and 99.8th percentiles. The results are displayed in Table 1.

To determine the accuracy of these N17OHP cut-offs, data from affected newborns were also evaluated (Table 2). Twenty-five newborns (12 M, 13 F) presented with the salt wasting (SW) form in the G1 group, and their N17OHP levels ranged from 93.3 to 1572.6 nmol/l. Nineteen newborns (eight M, 11 F) presented with the SW form in the G2 group, and their N17OHP levels ranged from 294.9 to 2209.8 nmol/l. Five (two M, three F) newborns with the SV form were diagnosed in the G1 and G2 groups, and their N17OHP levels ranged from 109.8 to 159.3 nmol/l (Table 2, cases 8, 21, 27, 35 and 45).

During the study period in São Paulo state, no CAH diagnosis with negative screening was reported. Even one SW case whose mother received 12 mg of betamethasone injection 24–48 h before delivery would be diagnosed using the new 99.8th cut-off level.

Among CAH females, only case 11 was promptly diagnosed at delivery due to the presence of atypical genitalia. Surprisingly, atypical genitalia were not recognized at delivery in two 46XX

2

N17OHP adjusted to age and birthweight 3

Table 1. Neonatal 17-hydroxyprogesterone (nmol/l) levels according to BW and sample collection age

Weight	G1 (<72 h)				G2 (≥72 h)				P*
	NB (n)	Median (IQ)	Range	Cut-offs 99-5th/99-8th	NB (n)	Median (IQ)	Range	Cut-offs 99-5th/99-8th	
BW1	466	38.7 (18.9–79.8)	(1.5–155.5)	330/360	3583	40.2 (23.1–75.3)	(0.7–200.2)	441/519	<0.001
BW2	1763	24.6 (15.9–40.2)	(0.8–122)	168/213	6502	26.7 (16.8–44.4)	(0.4–262.6)	207/270	<0.001
BW3	13 527	20.1 (14.4–28.5)	(0.8–125.3)	96/117	6813	20.7 (13.5–33.3)	(0.4–138.7)	144/198	<0.001
BW4	198 336	15.6 (11.7–21)	(0.5–169)	51/60	40820	11.7 (8.1–16.5)	(0.3–187.0)	60/75	<0.001

IQ, interquartile interval; BW, birthweight; BW1: ≤1500 g; BW2: 1501–2000 g; BW3: 2001–2500 g; BW4: >2500 g.

newborns. Patient 9 (Table 2) was assigned as male due to severe external genitalia virilisation (Prader V). Patient 13 presented with less severe external genitalia virilisation (Prader II), so she was correctly assigned at birth as female. The remaining CAH females were under diagnostic investigation for atypical genitalia by the time of the NBS results. In these females, the CAH diagnosis was established only through NBS-CAH, highlighting its importance to prevent salt-wasting crises even in females.

Among the salt wasters, two were hospitalized with severe hyponatraemic dehydration before the NBS result. Fourteen salt wasters (six males) immediately received gluco- and mineralocorticoid therapy due to a filter paper result associated with hyponatraemia, but admission at the emergency care unit was avoided. Mean sodium levels were 127.5 ± 10.6 mmol/l, and mean potassium levels were 4.8 ± 0.1 mmol/l. These findings were likely due to some basic health units sending the filter paper samples to the NBS laboratory only once a week. However, no deaths due to salt-wasting crises were reported.

Taking into account the N17OHP cut-offs according to the 99.5th percentile, 1143 (0.53%) newborns would present with FPR in the G1 group, and 290 (0.5%) newborns would present with FPR in the G2 group. Using cut-offs established by the 99.8th percentile, 470 (0.21%) and 121 (0.2%) newborns would present with FPR in the G1 and G2 groups, respectively (Table 3). Among cases with FPR, eight presented with extremely increased N17OHP levels; in 4/8, N17OHP levels ranged from 1495.2 to 2099.7 nmol/l. This was identified as a methodological sample collection error due to the use of EDTA blood tubes, which interfere with the immunofluorometric assay. In the remaining four cases, N17OHP levels ranged from 489.9 to 1152.6 nmol/l. These newborns were in the intensive care unit due to sepsis. N17OHP levels of cases with FPR according to the 99.8th percentile are reported in Fig. 1.

The sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of N17OHP values according to the 99.5th and 99.8th percentiles are described in Table 4.

With regard to the confirmatory serum tests of the affected newborns, the mean 17OHP value in the SW form was 693.4 ± 512.5 nmol/l and ranged from 219.3 to 351.9 nmol/l in the five cases with the SV form. Sixteen of 44 SW newborns and four of five SV newborns from which DNA samples were collected had mutations in both alleles (maternal and paternal) in the CYP21A2 gene. The SW newborns carried mutations

predicting the total or almost total (I2 splice) impairment of enzymatic activity in both alleles; the SV newborns carried mutations predicting the severe impairment (I172N) of enzymatic activity in compound heterozygotes with the former mutations. A good correlation between genotype and phenotype was observed in all classical cases, as previously described.⁶ DNA sample collection of the remaining affected patients was not permitted by their parents, and the classical form diagnosis was confirmed through hormonal analysis in a private centre, where they are being followed by paediatric endocrinologists.

Among the cases with neonatal FPR, 29 newborns retained increased serum 17OHP levels, nine of whom normalized serum 17OHP levels during follow-up (<6 nmol/l). The remaining 20 cases were followed up at different medical centres but only in six cases did parents agree to collect DNA samples. In 2/6 newborns (one M, one F), complete CYP21A2 sequencing revealed genotypes predicting the nonclassical (NC) form, namely mutations predicting moderate impairment of enzymatic activity (V281L mutation) in compound heterozygosity with those predicting almost total or near total impairment (Q318X, R356W and R426H mutations). In the remaining four cases, no CYP21A2 mutation was identified in the exonic, intronic or promoter regions, and newborns were discharged from further follow-up.

Discussion

Despite the high miscegenation of our population, previous studies observed a high frequency of CAH in Brazil.^{17,25,26} The present study demonstrates the importance of NBS implementation in Brazil, as it was effective in identifying the salt-wasting form, increasing the SW/SV proportion as well as normalizing the male/female ratio in comparison with data from the unscreened Brazilian cohort.²⁷ The data from Sao Paulo CAH-NBS are in accordance with those in the literature.^{10,13,14}

Additionally, our preliminary data suggest that in Brazil both males and females should be screened, in contrast to the recommendation of screening only male newborns to improve cost-effectiveness.²⁸ In some series, and confirmed in our study, atypical genitalia is widely underdiagnosed.²⁹

The main concern of CAH-NBS is the high rate of FPR mainly related to prematurity and/or low BW.^{30–32} Similar to other reports, we observed that N17OHP values increased

4 G. Y. Hayashi et al.

Table 2. Phenotype and genotype of congenital adrenal hyperplasia patients

Pt.	Clinical Form	Sex	Weight (g)	Age NBS (h)	N17OHP (nmol/l)	Age serum (days)	Na (meq/l)	Serum N17OHP (nmol/l)	Genotype
1	SW	F	2470	48:00	126.6	–	–	>60*	
2	SW	F	3155	48:00	232.5	–	132	91.2**†	
3	SW	F	4430	48:00	826.8	3	133	169.5	LGR/LGR
4	SW	F	2880	48:00	1407.6	–	–	>60*	
5	SW	M	3990	48:00	1572.6	14	136	569.1	Q318X/I2 splice, V281L
6	SW	M	2910	48:03	664.5	81	126	74.1**†	I2 splice/Q318X, R356W
7	SW	M	3765	48:06	776.7	13	122	768.6	LGR/LGR
8	SV	M	2950	48:10	109.8	31	135	312	I172N/G424S
9	SW	F	3470	48:12	828.0	6	129	407.4*	I2 splice/IVS2–2A>G
10	SW	M	3335	48:13	286.2	19	131	80.1†	
11	SW	F	3620	48:18	83.1‡	–	–	91.5**†	
12	SW	M	3200	48:20	990.0	–	–	>60*	
13	SW	F	2950	48:20	93.3	13	131	636.0*	I172N/IVS2–2A>G
14	SW	M	2360	48:23	967.8	–	131	42.3†	
15	SW	M	3270	48:29	599.4	14	121	391.5	I2 splice/R356W
16	SW	M	3200	48:30	1182.9	45	124	1357.5	I2 splice/CYP21A2 Del
17	SW	M	2540	48:36	912	22	126	22.2†	CYP21A2 Del/CYP21A2 Del
18	SW	F	3855	49:00	541.2	16	115	744	
19	SW	F	3985	49:00	381	–	–	125.4**†	
20	SW	M	3205	49:40	413.1	–	–	>60*	
21	SV	M	3620	49:51	158.4	17	133	>60	I172N/InsT, Q318X, R356W
22	SW	M	3580	51:06	1232.7	–	–	>60*	
23	SW	F	3610	56:15	782.4	10	105	288.0	I2 splice/Q318X, Cluster, I236N
24	SW	M	3650	56:25	693.6	32	122	582.0	I2 splice/I2 splice
25	SW	F	4020	57:20	793.5	8	143	108†*	
26	SW	F	3740	61:21	359.7	–	126	>60*	
27	SV	F	3340	65:08	155.4	–	–	>60	
28	SW	F	3340	65:35	1191	23	140	859.2	
29	SW	M	3650	78:30	1440.9	–	–	573.0*	
30	SW	F	3540	79:39	493.2	7	139	76.5†	LGR/LGR
31	SW	M	2170	81:06	656.7	49	135	66.9†	I2 splice/Q318X
32	SW	F	3445	82:36	666	50	136	102.9†	LGC/I2 splice
33	SW	M	1825	84:12	1138.8	–	–	>60*	
34	SW	F	2655	85:00	1330.5	–	–	>60*	
35	SV	F	3835	85:11	159.3	10	136	219.3	I172N/I2 splice
36	SW	F	3095	90:46	1188.3	–	–	>60*	
37	SW	M	2690	92:05	294.9	–	–	>60*	
38	SW	F	3440	92:05	2209.8	23	115	1552.2	
39	SW	F	3150	92:16	1468.2	44	136	2004.3	R483W, Cluster, I236N/LGC
40	SW	F	3885	92:19	489.3	–	–	>60†	
41	SW	F	2090	101:10	1109.4	–	126	345	
42	SW	M	3465	98:54	1111.5	13	124	990.3	
43	SW	M	2430	103:27	345	–	–	>60*	
44	SW	M	3350	154:39	1152	–	–	>60*	
45	SV	F	2860	165:00	146.4	57	135	351.9	I2 splice/R426H
46	SW	F	2260	175:25	1161.3	–	129	53.4†	
47	SW	M	2455	191:45	1482	–	94	>60**†	
48	NC	F	3255	192:05	61.8	–	–	>60	V281L/Q318X, R356W
49	SW	F	2600	317:42	1312.2	–	–	38.6**†	
50	SW	F	3195	391:02	1356.3	12	132	198.0	Q318X/Q318X
51	NC	M	4094	696:00	285	222	140	45.3	V281L/R426H

SW, salt wasting; SV, simple virilising; NC, nonclassical; NBS, newborn screening; age NBS, age at filter paper sample collection; age Serum, age at confirmatory serum collection; LGR, large gene rearrangement; LGC, large gene conversion; Del, deletion.

*Radioimmunoassay.

†NB on glucocorticoid therapy.

‡Mother received betamethasone injection before delivery.

Table 3. Percentage of false-positive results according to age at sample collection and birthweight using the 99.5 and 99.8th percentiles for neonatal 17-hydroxyprogesterone levels

Birthweight	G1 (<72 h)			G2 (≥72 h)		
	Newborns (n)	99.5 (%)	99.8 (%)	Newborns (n)	99.5 (%)	99.8 (%)
BW1	466	0.64	0.21	3583	0.21	0.08
BW2	1763	0.51	0.22	6502	0.53	0.21
BW3	13 527	0.48	0.22	6813	0.51	0.19
BW4	198 336	0.53	0.21	40 820	0.51	0.22
Total	214 092	0.53	0.21	57 718	0.5	0.2

BW1: ≤1500 g; BW2: 1501–2000 g; BW3: 2001–2500 g; BW4: >2500 g.

Fig. 1 N17OHP (nmol/l) values of false-positive results according to birthweight and age at sample collection using the 99.8th percentile as the cut-off.

significantly with decreasing BW. Consequently, we established cut-offs for each BW and sample collection time using the values of the 99.5th percentile, as suggested by the current NBS protocol of São Paulo state.³³ However, the FPR rate related to the 99.8th percentile seems more appropriate for our programme, in accordance with other studies.^{17,23,34,35}

Using the 99.8th percentile as a cut-off adjusted to the two groups of sample collection times and to the four BW groups, we observed that there was significant improvement in the positive predictive value and in the specificity of a positive test with the immunofluorometric assay, in agreement with other studies.^{13,36} These cut-offs were efficient in identifying salt wasters, with a sensitivity of 100%. However, we could not determine these values for the extremely premature group as no affected newborn was diagnosed due to the low number of babies screened. Nevertheless, it remains controversial whether this group should be screened as the positive predictive value of

Table 4. Sensitivity (%), specificity (%), positive and negative predictive values (%) were defined for G1 and G2 groups, according to birthweight, using the 99.5 and 99.8th percentiles

	G1 (<72 h)				G2 (≥72 h)			
	S	E	PPV	NPV	S	E	PPV	NPV
99.5								
BW1	NA	99.3	NA	100	NA	99.7	NA	100
BW2	NA	99.4	NA	100	100	99.4	2.7	100
BW3	100	99.5	2.9	100	100	99.4	12.5	100
BW4	100	99.4	2.3	100	100	99.4	7.0	100
99.8								
BW1	NA	99.7	NA	100	NA	99.9	NA	100
BW2	NA	99.7	NA	100	100	99.7	6.6	100
BW3	100	99.7	6.2	100	100	99.8	27.7	100
BW4	100	99.7	5.6	100	100	99.7	14.1	100

BW1: ≤1500; BW2: 1501–2000; BW3: 2001–2500; BW4: >2500; S: sensitivity; E: specificity; PPV: predictive positive value; NPV: negative predictive value; NA: not applicable.

a positive test is low, varying from 0.4% to 5.9%.¹³ Considering the extended duration that these babies spend in intensive care units, they could be diagnosed by clinical means.

The main problem of using a high cut-off such as the 99.8th percentile is that it increases the possibility of false-negative results (FNR). Screening for CAH is primarily designed to detect the severe life-threatening SW and SV forms; therefore, the expectation is that the less severe SV and NC forms may be missed. Most studies of NBS for CAH have described a very small FNR that is most frequently associated with the SV form.¹⁵ One study found the FNR to be associated with the SW form in Minnesota, USA, where samples were collected 24–48 h after birth.³⁷ As shown in our study and in others, early collections of dried blood display lower 17-OHP levels and could thus lead to a greater FNR. Although we cannot entirely rule out FNR in our pilot study, we consider this unlikely. During the study period in São Paulo state, no CAH diagnosis with negative screening was reported. A widely considered cause of false-negative screening results is perinatal treatment with corticosteroids;³⁸ however, the newly proposed NBS cut-off level was able to identify the one salt waster that received antenatal glucocorticoid therapy. We recognize that this study has some limitations and that the false-negative rate could be underestimated due to patients with CAH that remain undiagnosed, patients who moved out of the state, or infants who passed away with unidentified CAH.

It is known that sample collection before 24–48 h of life could impair the diagnostic precision of NBS.^{9,21} In our pilot NBS study, we found that some of the severely affected newborns presented with moderately increased N17OHP values and that all of them were submitted to a sample collection at 48 h of life. Cut-off values for 17-OHP have mostly been based on a fixed recommended sample collection time; however, in practice, age at sample collection varies. In Brazil, most samples in other states are collected between the 4th and 7th days of life, while in São Paulo state, they were collected on the third day of life.

6 G. Y. Hayashi et al.

We observed that samples collected on the third day of life had significantly lower N17OHP levels in all BW groups than those collected thereafter, highlighting the need to create specific N17OHP cut-offs for each age at sample collection. A previous study in Brazil determined N17OHP cut-offs, but we cannot compare our data as a different methodology was used to measure N17OHP levels and because neonatal samples were collected at approximately 7 days of life.³⁹ Using time-resolved immunofluorescence with the AutoDelfia Neonatal 17-OHP test kit, Olgemoller *et al.* showed a 35% reduction in the total recall rate (from 1.13% to 0.74%) and an increase in the positive predictive value from 0.84% to 1.29% without reducing the diagnostic sensitivity, using 17OHP cut-off levels adjusted for both age and BW at the time of sampling.²⁸ Our findings, which were undertaken after improvements in the immunoassay, are similar and reinforce the suggestion that the efficiency of CAH screening can be improved using easily obtainable information on sampling age to adjust 17-OHP cut-off values. This methodology allows CAH-NBS to proceed with a rational follow-up workload, even when early blood sample collection is necessary.

All salt-wasting newborns had extremely increased N17OHP levels. The only five newborns diagnosed with the SV form had moderately increased N17OHP levels; however, all were diagnosed using the both the 99.5th percentile and 99.8th percentile cut-offs. As we diagnosed few SV newborns, we cannot rule out a sample size effect due to precocious NBS onset. It has been suggested that NBS may not identify all SV newborns; hence, some programmes perform a second sample collection at approximately 2 weeks of life.²² However, in developed countries, this group of patients is not the main objective of NBS as they are usually promptly diagnosed in infancy due to signs of postnatal virilisation.^{1,7}

In the present study, we did not evaluate the performance of confirmatory tests as they were performed by LC-MS/MS and/or radioimmunoassay and were used to confirm the neonatal diagnosis.^{40,41} Similarly, the molecular tests were performed to confirm the result of an altered neonatal test. Although CAH molecular analysis is a time-consuming and expensive methodology, it has been noted that it is useful for confirming the neonatal diagnosis, especially in asymptomatic newborns with persistently increased serum 17OHP levels. This prevents unnecessary follow-up in unaffected newborns,^{31,42} as occurred in four normal newborns and in the two NC patients with positive screening in our cohort.

In this study, we were able to identify some issues concerning our NBS programme. The main problem was the delay in sending the samples for analysis from basic health units out of the city centre. This resulted in late diagnosis and explains why a significant number of newborns presented with hyponatraemia, some severe, at the first consultation. Although no deaths due to salt-wasting crises were reported, this emphasizes the need for a continuous education programme for the health professionals engaged in our NBS programme.

Congenital adrenal hyperplasia-NBS is an important advance in establishing an early diagnosis of CAH and preventing morbidity and mortality. However, the NBS programme still faces

problems that mainly relate to the economic and psychosocial costs associated with FPR. Considering these factors, we conclude that adjusting N17OHP levels by sample collection time and BW allows a reduced FPR and improves NBS-CAH efficacy. To prevent late diagnosis and the development of salt-wasting crises, we recommend that the sample collection should be performed between 48 h and 72 h. Additionally, we suggest that adoption of N17OHP values based on the 99.8th percentile further improves NBS-CAH efficacy.

Disclosure

The authors have no conflict of interest to disclosure.

Acknowledgements

This work was partially supported by grants from FAPESP # 2014/07878-4.

References

- 1 van der Kamp, H.J., Oudshoorn, C.G., Elvers, B.H. *et al.* (2005) Cutoff levels of 17-alpha-hydroxyprogesterone in neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia should be based on gestational age rather than on birth weight. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **90**, 3904–3907.
- 2 Krone, N., Rose, I.T., Willis, D.S. *et al.* (2013) Genotype-phenotype correlation in 153 adult patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: analysis of the United Kingdom Congenital adrenal Hyperplasia Adult Study Executive (CaHASE) cohort. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **98**, E346–E354.
- 3 Krone, N., Braun, A., Roscher, A.A. *et al.* (2000) Predicting phenotype in steroid 21-hydroxylase deficiency? Comprehensive genotyping in 155 unrelated, well defined patients from southern Germany. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **85**, 1059–1065.
- 4 Krone, N. & Arlt, W. (2009) Genetics of congenital adrenal hyperplasia. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, **23**, 181–192.
- 5 Wedell, A., Thilén, A., Ritzén, E.M. *et al.* (1994) Mutational spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Sweden: implications for genetic diagnosis and association with disease manifestation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **78**, 1145–1152.
- 6 Cardoso, C.B.M.A., Fonseca, A.A., Oliveira, M. *et al.* (2005) Triagem neonatal para hiperplasia adrenal congênita: experiência do estado do Rio de Janeiro. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, **49**, 112–119.
- 7 New, M.I., Abraham, M., Gonzalez, B. *et al.* (2013) Genotype-phenotype correlation in 1,507 families with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**, 2611–2616.
- 8 Prader, A., Anders, G.J. & Habich, H. (1962) On the genetics of the congenital adrenogenital syndrome (virilizing adrenal hyperplasia). *Helvetica Paediatrica Acta*, **17**, 271–284.
- 9 Finkelstein, G.P., Kim, M.S., Sinaii, N. *et al.* (2012) Clinical characteristics of a cohort of 244 patients with congenital adrenal

- hyperplasia. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **97**, 4429–4438.
- 10 Pelzzuti, I.L., Silva, I.N., Barra, C.B. *et al.* (2011) Triagem neonatal para Hiperplasia Adrenal Congênita - Projeto piloto realizado pelo Programa Estadual de Triagem Neonatal de Minas Gerais (PETN-MG). VIII Congresso Latinoamericano de Errores Innatos Del Metabolismo y Pesquisa Neonatal, Cuzco - Peru.
- 11 White, P.C. & Bachega, T.A. (2012) Congenital adrenal hyperplasia due to 21 hydroxylase deficiency: from birth to adulthood. *Seminars in Reproductive Endocrinology*, **30**, 400–409.
- 12 Santomé Collazo, J.L., Cirujano Segura, A., Ferreiro Fernández, B. *et al.* (2010) Simple virilizing forms of congenital adrenal hyperplasia: adaptation and prospective validation of the molecular screening. *Medicina Clínica (Barc)*, **135**, 195–201.
- 13 Timbie, J.W., Hayward, R.A. & Vijan, S. (2010) Diminishing efficacy of combination therapy, response-heterogeneity, and treatment intolerance limit the attainability of tight risk factor control in patients with diabetes. *Health Services Research*, **45**, 437–456.
- 14 Bidet, M., Bellanné-Chantelot, C., Galand-Portier, M.B. *et al.* (2009) Clinical and molecular characterization of a cohort of 161 unrelated women with nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency and 330 family members. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **94**, 1570–1578.
- 15 Lajic, S., Levo, A., Nikoshkov, A. *et al.* (1997) A cluster of missense mutations at Arg356 of human steroid 21-hydroxylase may impair redox partner interaction. *Human Genetics*, **99**, 704–709.
- 16 Wilson, R.C., Wei, J.Q., Cheng, K.C. *et al.* (1995) Rapid deoxyribonucleic acid analysis by allele-specific polymerase chain reaction for detection of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **80**, 1635–1640.
- 17 Torresani, T. & Bignon-Laubert, A. (2007) Congenital adrenal hyperplasia: diagnostic advances. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, **30**, 563–575.
- 18 Prader, A. & Gurtner, H.P. (1955) The syndrome of male pseudohermaphroditism in congenital adrenocortical hyperplasia without overproduction of androgens (adrenal male pseudohermaphroditism). *Helvetica Paediatrica Acta*, **10**, 397–412.
- 19 Azziz, R., Dewailly, D. & Owerbach, D. (1994) Clinical review 56: nonclassic adrenal hyperplasia: current concepts. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **78**, 810–815.
- 20 Ezquieta, B., Cueva, E., Varela, J. *et al.* (2002) Non-classical 21-hydroxylase deficiency in children: association of adrenocorticotrophic hormone-stimulated 17-hydroxyprogesterone with the risk of compound heterozygosity with severe mutations. *Acta Paediatrica*, **91**, 892–898.
- 21 Müller, W., Prader, M., Kofler, J. *et al.* (1979) Frequency of congenital adrenal hyperplasia. *Pädiatrie und Pädologie*, **14**, 151–155.
- 22 Prader, A. & Siebenmann, R.E. (1957) Adrenal insufficiency in congenital lipid hyperplasia of the adrenals. *Helvetica Paediatrica Acta*, **12**, 569–595.
- 23 Friães, A., Rêgo, A.T., Aragüés, J.M. *et al.* (2006) CYP21A2 mutations in Portuguese patients with congenital adrenal hyperplasia: identification of two novel mutations and characterization of four different partial gene conversions. *Molecular Genetics and Metabolism*, **88**, 58–65.
- 24 Allen, D.B., Hoffman, G.L., Fitzpatrick, P. *et al.* (1997) Improved precision of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia using weight-adjusted criteria for 17-hydroxyprogesterone levels. *Journal of Pediatrics*, **130**, 128–133.
- 25 Tusí-Luna, M.T., Ramírez-Jiménez, S., Ordóñez-Sánchez, M.L. *et al.* (1996) Low frequency of deletion alleles in patients with steroid 21-hydroxylase deficiency in a Mexican population. *Human Genetics*, **98**, 376–379.
- 26 Baumgartner-Parzer, S.M., Schulze, E., Waldhäusl, W. *et al.* (2001) Mutational spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Austria: identification of a novel missense mutation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **86**, 4771–4775.
- 27 Escobar-Morreale, H.F. & Sanchoín, R. (2008) San Millán J.L. A prospective study of the prevalence of nonclassical congenital adrenal hyperplasia among women presenting with hyperandrogenic symptoms and signs. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **93**, 527–533.
- 28 Krone, N., Riepe, E.G., Gröttinger, J. *et al.* (2005) The residue E351 is essential for the activity of human 21-hydroxylase: evidence from a naturally occurring novel point mutation compared with artificial mutants generated by single amino acid substitutions. *Journal of Molecular Medicine (Berlin)*, **83**, 561–568.
- 29 Moura-Massari, V.O., Bugano, D.D., Marcondes, J.A. *et al.* (2013) CYP21A2 genotypes do not predict the severity of hyperandrogenic manifestations in the nonclassical form of congenital adrenal hyperplasia. *Hormone and Metabolic Research*, **45**, 301–307.
- 30 Costa-Barbosa, F.A., Tonetto-Fernandes, V.F., Carvalho, V.M. *et al.* (2010) Superior discriminating value of ACTH-stimulated serum 21-deoxycortisol in identifying heterozygote carriers for 21-hydroxylase deficiency. *Clinical Endocrinology (Oxf)*, **73**, 700–706.
- 31 Dolzan, V., Solyom, J., Fekete, G. *et al.* (2005) Mutational spectrum of steroid 21-hydroxylase and the genotype-phenotype association in Middle European patients with congenital adrenal hyperplasia. *European Journal of Endocrinology*, **153**, 99–106.
- 32 Zeng, X., Witchel, S.F., Dobrowolski, S.F. *et al.* (2004) Detection and assignment of CYP21 mutations using peptide mass signature genotyping. *Molecular Genetics and Metabolism*, **82**, 38–47.
- 33 Gaffney, D., Howie, A.F., Baklash, A.M. *et al.* (2011) Functional characterisation of the H365Y mutation of the 21-hydroxylase gene in congenital adrenal hyperplasia. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **123**, 109–114.
- 34 Bachega, T.A., Billebeck, A.E., Marcondes, J.A. *et al.* (2000) Influence of different genotypes on 17-hydroxyprogesterone levels in patients with nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Clinical Endocrinology (Oxf)*, **52**, 601–607.
- 35 Fardella, C.E., Poggi, H., Soto, J. *et al.* (2000) Mutations in the CYP21B gene in a Chilean population with simple virilizing congenital adrenal hyperplasia. *Journal of Endocrinological Investigation*, **23**, 412–416.
- 36 Tardy, V., Menassa, R., Sulmont, V. *et al.* (2010) Phenotype-genotype correlations of 13 rare CYP21A2 mutations detected in 46 patients affected with 21-hydroxylase deficiency and in one carrier. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **95**, 1288–1300.
- 37 Koppens, P.F., Hoogenboezem, T., Drop, S.L. *et al.* (1998) Aldosterone production despite absence or defectiveness of the CYP21 genes in two patients with salt-losing congenital adrenal hyperplasia caused by steroid 21-hydroxylase deficiency. *Clinical Endocrinology (Oxf)*, **49**, 815–822.
- 38 Morikawa, S., Nakamura, A., Fujikura, K. *et al.* (2014) Results from 28 years of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in sapporo. *Clinical Pediatric Endocrinology*, **23**, 35–43.
- 39 Moran, C., Azziz, R., Weintrob, N. *et al.* (2006) Reproductive outcome of women with 21-hydroxylase-deficient nonclassic

8 G. Y. Hayashi et al.

adrenal hyperplasia. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **91**, 3451–3456.

40 Scott, R.R., Gomes, L.G., Huang, N. et al. (2007) Apparent manifesting heterozygosity in P450 oxidoreductase deficiency and its effect on coexisting 21-hydroxylase deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **92**, 2318–2322.

41 Soardi, F.C., Barbaro, M., Lau, I.F. et al. (2008) Inhibition of CYP21A2 enzyme activity caused by novel missense mutations

identified in Brazilian and Scandinavian patients. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **93**, 2416–2420.

42 Barbaro, M., Baldazzi, L., Balsamo, A. et al. (2006) Functional studies of two novel and two rare mutations in the 21-hydroxylase gene. *Journal of Molecular Medicine (Berlin)*, **84**, 521–528.

The JAMA Network

JAMA Pediatrics

[HOME](#)[AUTHOR
INSTRUCTIONS](#)[REVIEWER
INSTRUCTIONS](#)[EDITOR
INSTRUCTIONS](#)[HELP TIPS](#)[LOGOUT](#)[JOURNAL
HOME](#)

Manuscript #	PAM16-2780
Current Revision #	0
Submission Date	01-02-2017 20:34
Current Stage	Under Review
Title	Serum confirmatory tests in congenital adrenal hyperplasia newborn screening: a retrospective evaluation of 708,437 neonates screened in São Paulo state in two years.
Subtitle	Serum confirmatory tests in CAH-NBS
Manuscript Type	Original Investigation
Theme Issue	N/A
Corresponding Author	Daniel Carvalho (Laboratório de Hormônios e Genética Molecular- LIM/42, Unidade de Suprarrenal, Disc. de Endocrinologia e Metabologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo)
Coauthors	Daniel Carvalho (corr_auth) , Helena Lima-Valassi , Atecla Alves , Mirela Miranda , Andresa Rodrigues , Giselle Hayashi , Guiomar Madureira , Leandra Steinmetz , Durval Damiani , Berenice Mendonca , Tania Bachega
	<p>Importance: Congenital adrenal hyperplasia newborn screening (CAH-NBS) still has a high false-positive (FP) rate, mainly due to prematurity or neonatal stress. There are scarce data regarding the efficacy of serum confirmatory tests with the available methodologies.</p> <p>Objective: To determine which serum confirmatory test presents the highest positive predictive value (PPV) in the CAH-NBS.</p> <p>Design: Retrospective study</p> <p>Participants: 708,437 newborns (NBs) screened for CAH.</p>

<p>Abstract</p>	<p>Exposure: Neonatal 17OHP (N17OHP) results above twice the 99.5th percentile were recalled for serum sample collection of steroid dosages by RIA and LC-MS/MS. Molecular analysis, through entire CYP21A2 sequencing, was performed to validate the hormonal data. Non-parametric tests and ROC curves were used.</p> <p>Main Outcome and Measures: The efficacy of different serum confirmatory tests was evaluated.</p> <p>Results: FP rate on filter paper was 0.037% and these NBs were recalled for serum tests: 65/252 (25%) results of 17OHP by RIA and 32/289 (11%) of 17OHP by LC-MS/MS remained altered. PPV of RIA and LC-MS/MS were 30% and 49%, respectively. Fifty-eight CAH classical cases were diagnosed (47SW;11SV) and 32 asymptomatic NBs presented increased serum 17OHP by LC-MS/MS and were followed until diagnostic elucidation. In the ROC curves analyses between false and true-positives, 17OHP/LC-MS/MS had the highest accuracy as a single steroid measurement, for which the 48.3 ng/ml cutoff had 100% sensitivity for classical forms. Serum 21DF was not superior than 17OHP/LC-MS/MS. The product of (17OHP+Δ4)/cortisol ratio presented the highest accuracy: the cutoff of 24.9 had a PPV of 100% to detect salt-wasting form, while values between 9.7-24.8 comprised of FP, NC and SV patients and molecular tests could be useful for differential diagnosis in this latter group.</p> <p>Conclusions and Relevance: Serum 17OHP by LC-MS/MS was superior than 17OHP by RIA. The efficacy of confirmatory tests was improved using 17OHP by LC-MS/MS and, for the asymptomatic NBs with undetermined results, the (17OHP+Δ4)/cortisol ratio presented the highest diagnostic efficacy.</p>
<p>Associate Editor</p>	<p>Frederick Rivara</p>
<p>Subject Areas</p>	<p>Primary Subject Area: Newborn screening Secondary Subject Area: Endocrinology</p>
<p>Conflicts of Interest</p>	<p>No, the author(s) have no potential conflicts of interest to disclose</p>

Funding Organization(s) and Funding Support	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) ✓ : Tania Aparecida Sartori Sanchez Bachega 2014/07878-4 MCTI Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) ✓ : Tania Aparecida Sartori Sanchez Bachega 303088/2015-0 MCTI Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) ✓ : Berenice Bilharinho Mendonca 305743/2011-2
--	---

Manuscript Items

1. Cover Letter [PDF \(29KB\)](#) [Small PDF \(31KB\)](#) [Source File \(PDF\) 90KB](#)
2. Merged File containing manuscript text and 2 Figure files. [PDF \(516KB\)](#)
 - a. Article File [PDF \(304KB\)](#) [Small PDF \(282KB\)](#) [Source File \(DOCX\) 189KB](#)
 - b. Figure - Serum confirmatory tests in CAH-NBS. Comparison of 17OHP by RIA and by LC-MS/MS, 21DF and (17OHP+Δ4)/cortisol ratio between false-positives and CAH affected newborns. [PDF \(97KB\)](#) [Small PDF \(97KB\)](#) [Source File \(DOCX\) 121KB](#)
 - c. Figure - Proposed congenital adrenal hyperplasia newborn screening flowchart. [PDF \(124KB\)](#) [Small PDF \(124KB\)](#) [Source File \(DOCX\) 162KB](#)

Manuscript Tasks

[Send Manuscript Correspondence](#)

[Check Status](#)

[MANUSCRIPT HOME](#) | [AUTHOR INSTRUCTIONS](#) | [REVIEWER INSTRUCTIONS](#) | [HELP](#) | [TIPS](#) | [LOGOUT](#) | [JOURNAL HOME](#)

[TERMS OF SERVICE](#) | [PRIVACY POLICY](#)

EJPress Software by eJournalPress Licensed under Patent #US 7,620,555B1

© 2017 American Medical Association. All Rights Reserved.