

Cribado neonatal ampliado de enfermedades lisosomales mediante espectrometría de masas

Revisión sistemática y
evaluación económica

Extended neonatal screening
for lysosomal diseases
by mass spectrometry.
Executive summary

INFORMES DE EVALUACIÓN DE TECNOLOGÍAS SANITARIAS
AETSA 2011 / II

INFORMES, ESTUDIOS E INVESTIGACIÓN



MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y COMPETITIVIDAD



Ministerio de Economía y Competitividad
AETSA - Agencia de Evaluación
de Tecnologías Sanitarias
Carlos III



MINISTERIO
DE SANIDAD, SERVICIOS SOCIALES
E IGUALDAD



Cribado neonatal ampliado de enfermedades lisosomales mediante espectrometría de masas

Revisión sistemática y
evaluación económica

Extended neonatal screening
for lysosomal diseases by mass
spectrometry. *Executive summary*

INFORMES DE EVALUACIÓN DE TECNOLOGÍAS SANITARIAS
AETSA 2011 / 11

Martínez Férrez, Isabel María

Cribado neonatal ampliado de enfermedades lisosomales mediante espectrometría de masas. Isabel M^a. Martínez Férrez, Sergio Márquez Peláez — Sevilla: Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía, 2012.

103 p; 24 cm. (Colección: Informes, estudios e investigación. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Serie: Informes de Evaluación de Tecnologías Sanitarias)

1. Enfermedades por Almacenamiento Lisosomal/ diagnóstico 2. Espectrometría de Masas en Tandem / utilización I. Márquez Peláez, Sergio II. Andalucía. Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias III. España. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad IV. España. Ministerio de Economía y Competitividad.

Autores: Isabel M^a. Martínez Férrez, Sergio Márquez Peláez

Este documento se ha realizado en el marco de colaboración previsto en el Plan de Calidad para el Sistema Nacional de Salud elaborado por el Ministerio de Sanidad y Servicios Sociales, al amparo del convenio de colaboración suscrito por el Instituto de Salud Carlos III, organismo autónomo del Ministerio de Economía y Competitividad y la Fundación Progreso y Salud de Andalucía

Edita:

Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía

CONSEJERÍA DE SALUD - Junta de Andalucía

Avda. de la Innovación s/n. Edificio ARENA 1

41020 Sevilla

España – Spain

ISBN: 978-84-15600-04-6

NIPO: MINECO 725-12-050-3; MSSSI 680-12-094-8

Este documento puede ser reproducido en todo o en parte, por cualquier medio, siempre que se cite explícitamente su procedencia

Cribado neonatal ampliado de enfermedades lisosomales mediante espectrometría de masas

Revisión sistemática y
evaluación económica

Extended neonatal screening
for lysosomal diseases by mass
spectrometry. *Executive summary*

INFORMES DE EVALUACIÓN DE TECNOLOGÍAS SANITARIAS
AETSA 2011 / II

Conflicto de Interés

Los autores declaran que no tienen intereses que puedan competir con el interés primario y los objetivos de este informe e influir en su juicio profesional al respecto.

Agradecimientos

Este trabajo se ha beneficiado de forma importante de las aportaciones del Dr. D. Antonio González-Meneses López, pediatra. *Responsable de la Unidad de Dismorfología del Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla. Director del Plan de atención a las personas afectadas con enfermedades raras.*

Ha sido revisora interna de este documento D^a. Carmen Beltrán Calvo, farmacéutica. *Jefa de Servicio de Evaluación de Tecnologías Sanitarias.*

La Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía y los autores agradecen al revisor de este texto el esfuerzo realizado, su dedicación y sus aportaciones.

Los contenidos del informe son responsabilidad de los autores, procediendo el eximente habitual en el caso de los revisores.

Índice

Índice de Tablas y Figuras	11
Abreviaturas.....	13
Glosario	15
Resumen ejecutivo	17
Executive summary	21
Parte I: revisión sistemática	25
Introducción	27
Enfermedades por almacenamiento lisosomal.....	27
Descripción de las principales patologías	30
Espectrometría de masas en tándem (MS/MS)	37
Cribado neonatal	38
Objetivos.....	41
Material y Métodos	43
Tipo de estudio	43
Búsqueda bibliográfica: bases de datos y estrategia.....	43
Selección de artículos relevantes	43
Evaluación de la calidad de los estudios.....	44
Resultados	45
Resultados de la búsqueda	45
Calidad de los estudios	47
Resultados de los estudios	47
Discusión	61
Referencias.....	69
Capítulo II: Estudio de eficiencia	77
Introducción	79
Objetivos	80
Material y Métodos	81
Revisión sistemática	81
Búsqueda bibliográfica: bases de datos y estrategia.....	81
Selección de artículos relevantes	81
Análisis del impacto económico en el SNS	82
Métodos de estimación de los costes.....	83
Coste del cribado neonatal	83
Datos poblacionales.....	85
Resultados	87
Resultados de la búsqueda	87
Resultados del estudio económico.....	88

Discusión	93
Referencias	95
Conclusiones del informe	97
Anexos	99
Anexo 1: Estrategias de búsqueda de estudios de eficacia	99
Anexo 2: Estrategias de búsqueda de estudios económicos	101

Índice de Tablas y Figuras

Tabla 1: Algunas de las principales enfermedades lisosomales y sus manifestaciones clínicas [Hopkin y Grabowski, 2009].	31
Tabla 1: Algunas de las principales enfermedades lisosomales y sus manifestaciones clínicas [Hopkin y Grabowski, 2009].	32
Tabla 2: Referencias incluidas en el informe.	47
Tabla 3: Resultados analíticos de los estudios centrados en la determinación de la actividad de una enzima lisosomal	52
Tabla 4: Resultados analíticos de los estudios con multiensayos enzimáticos incluidos en la revisión	56
Tabla 5: Prevalencia en Europa de las enfermedades lisosomales por cada 100.000 neonatos.	86
Tabla 6: Costes del cribado neonatal para el SNS.....	88
Tabla 7: Costes de la prueba de confirmación de los casos positivos de la enfermedad de Fabri detectados en el cribado neonatal	89
Tabla 8: Costes de la prueba de confirmación de los casos positivos de la enfermedad de Gaucher detectados en el cribado neonatal	89
Tabla 9: Costes de la prueba de confirmación de los casos positivos de la enfermedad de Pompe detectados en el cribado neonatal.....	90
Tabla 10: Costes de la prueba de confirmación de los casos positivos de la enfermedad de Niemann-Pick A y B detectados en el cribado neonatal.....	90
Tabla 11: Coste total de la confirmación de casos positivos del cribado según la prevalencia.	91
Figura 1: Flujo de selección de referencias identificadas en las bases de datos MedLine y Embase. Revisión sistemática	45
Figura 2: Flujo de selección de referencias identificadas en las bases de datos MedLine y Embase. Estudios económicos.	87

Abreviaturas

ABG:	Glucosidasa ácida
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ASM:	Esfingomielinasa
CV:	Coefficiente de variabilidad
DBS:	Gotas de sangre seca (<i>Dried Blood Spot</i>)
DMA:	Actividad media diaria
EAL:	Enfermedades de almacenamiento lisosomal
GAA:	Glucosidasa ácida
GAG:	Glicosaminoglicano
GALC:	Galactosilceramidasa
GLA:	Galactosidasa A
GM ₂ :	Gangliósidos
ECA:	Ensayo clínico aleatorizado
Gb-3:	Globotriaosilceramida
LCHAD:	Deficiencia de acil-CoA-deshidrogenasa de cadena larga
MCAD:	Deficiencia de acil-CoA-deshidrogenasa de cadena media
ML:	Mucopoliposis
MPS:	Mucopolisacaridosis
MS/MS:	Espectrometría de masas en tándem
SNC:	Sistema nervioso central
TCH:	Transplante de células hematopoyéticas
TSE:	Terapia de sustitución enzimática
TMH:	Trastornos metabólicos hereditarios
VPP:	Valor predictivo positivo
VPN:	Valor predictivo negativo

Glosario

Actividad enzimática: Proceso catalizador llevado a cabo por una enzima y cuya velocidad se ve afectada por factores como la temperatura, pH, concentración del sustrato, competidores, etc.

Alelo: Cada una de las diferentes secuencias de ADN que puede adoptar un gen específico en la población.

Enzima: Las enzimas son catalizadores de naturaleza proteínica que regulan la velocidad de los procesos fisiológicos producidos por los organismos vivos.

Especificidad: Proporción de individuos no afectados por una enfermedad correctamente identificados en una prueba diagnóstica.

Fenotipo. Características externas que presenta un individuo y que vienen determinadas por el genotipo. El fenotipo puede ser una característica bioquímica, fisiológica, o bien ser un rasgo físico específico. Así pues, todo fenotipo siempre es el resultado de una expresión genotípica y el entorno o ambiente del individuo en el que se expresa.

Gen. Unidad básica de herencia de los seres vivos. Se puede definir como una secuencia de ADN que controla una característica hereditaria.

Genotipo. Conjunto o parte de la constitución genética de un individuo. Conjunto de los genes existentes en cada uno de los núcleos celulares de los individuos pertenecientes a una determinada especie vegetal o animal.

Heterocigosis: Condición del heterocigoto.

Heterocigoto: Individuo que posee dos alelos distintos de un mismo locus.

Homocigosis: Condición del homocigoto.

Homocigoto: Individuo que posee dos alelos iguales de un mismo locus.

Lisosoma: Orgánulo celular que contiene enzimas hidrolíticas y proteolíticas encargado de la digestión celular.

Locus: Localización cromosómica de un determinado gen.

Metabolismo: Conjunto de reacciones bioquímicas que tiene lugar en el organismo y que constituyen la base de la vida.

Mutación: Alteración o cambio en la información genética (genotipo) de un ser vivo y que puede producir un cambio de características (fenotipo). Se presenta súbita y espontáneamente y se puede transmitir o heredar a la descendencia.

Mutación autosómica recesiva: Mutación en un cromosoma autosómico (no involucrado en la determinación del sexo) que se manifiesta fenotípicamente solamente en homocigosis.

Mutación ligada al sexo: Mutación en un gen localizado en los cromosomas sexuales.

Portador: Individuo que posee un alelo mutado de un gen causante de una enfermedad pero no manifiesta la enfermedad. Este término se aplica al individuo heterocigoto que en uno de los alelos de un gen específico lleva una mutación recesiva que causa una enfermedad.

Prevalencia: Proporción de individuos de una población que presentan el evento o la enfermedad en un momento o periodo de tiempo determinado.

Sensibilidad: Proporción de individuos afectados por una enfermedad correctamente identificados en una prueba diagnóstica.

Unidad de actividad enzimática: Es la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μmol de sustrato por minuto.

Valor predictivo positivo: Probabilidad de un individuo de estar enfermo cuando la prueba diagnóstica es positiva.

Valor predictivo negativo: Probabilidad de un individuo de no estar enfermo cuando la prueba diagnóstica es negativa.

Error congénito del metabolismo: Deficiencia en una enzima específica, debida a una alteración genética, que provoca la alteración del metabolismo y puede llevar asociado un genotipo patológico.

Resumen ejecutivo

Título: Cribado neonatal ampliado de enfermedades lisosomales mediante espectrometría de masas.

Autor: Isabel M. Martínez Férez, Sergio Márquez Peláez.

ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

Los trastornos metabólicos hereditarios (TMH) son un conjunto de enfermedades causadas por la ausencia o alteración de la actividad de una determinada enzima en la ruta del metabolismo intermediario. Las enfermedades por almacenamiento lisosomal (EAL) o enfermedades lisosomales se encuentran dentro de estos trastornos enzimáticos hereditarios y engloban un grupo heterogéneo de patologías. Actualmente, la estrategia de cribado de los TMH, mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS), en las distintas CCAA es desigual y no incluye estas enfermedades, por lo que sería de gran utilidad poder evaluar la utilidad y factibilidad del cribado de este grupo de pacientes. Para ello es importante conocer la evidencia disponible sobre el cribado neonatal de las EAL así como realizar una estimación del impacto económico que supondría la implantación del cribado.

OBJETIVOS

- Evaluar la utilidad y eficacia de la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) en el cribado neonatal de enfermedades lisosomales en términos de validez analítica y clínica.
- Evaluar la factibilidad el cribado neonatal de enfermedades lisosomales mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS) en términos de coste; así como el impacto económico que supondría su incorporación al programa nacional.

METODOLOGÍA

Revisión sistemática de la literatura. Se ha llevado a cabo una búsqueda bibliográfica enfocada a identificar revisiones sistemáticas o informes de evaluación en la biblioteca Cochrane, en la base de datos del CRD (Centre for Reviews and Dissemination), ECRI, ISI Web of Knowledge e INAHTA. Se realizaron búsquedas en las bases de referencias MEDLINE (incluido Pre-MEDLINE) y EMBASE, hasta mayo del 2011, para estudios de eficacia; y hasta enero de 2012, para estudios económicos.

Se seleccionaron las referencias correspondientes a cualquier tipo de estudio que aportara datos sobre cribado neonatal de EAL realizado por MS/MS.

Para el estudio económico se realizó una estimación del impacto presupuestario que supondría la ampliación del cribado neonatal de TMH a estas enfermedades. El escenario fue el Sistema Nacional de Salud y los costes tenidos en consideración han sido los directos de la prueba de cribado más los asociados a las pruebas de confirmación de los casos positivos detectados durante el mismo.

RESULTADOS

La búsqueda bibliográfica permitió identificar 20 estudios con datos sobre cribado neonatal de EAL por MS/MS, 17 de esos estudios se correspondían a estudios de validez analítica de diferentes ensayos enzimáticos como prueba para cribado y los otros 3 estudios eran pruebas piloto de cribado neonatal. No se identificaron estudios económicos sobre enfermedades de almacenamiento lisosomal.

Eficacia

Los estudios analíticos mostraron ensayos para medir directamente la actividad enzimática responsable de la enfermedad lisosomal a partir de muestras de gotas de sangre seca en papel. Los estudios describían diferentes protocolos de ensayos de la actividad de la enzima lisosomal de interés y la medida de dicha actividad, cuantificando los productos resultantes, se realizaba mediante MS/MS. Los protocolos pretendían lograr la optimización de los ensayos con el fin de cuantificar de la manera más precisa y menos laboriosa posible los productos de las reacciones enzimáticas y así hacerlos compatibles con un cribado neonatal. Se han identificado estudios centrados en ensayos de una única enzima lisosomal y estudios que analizaban varias actividades enzimáticas a la vez. Todos los ensayos presentaban coeficientes de variabilidad intra e inter-ensayo aceptables (<10% y <15% respectivamente) y la validez clínica de los métodos utilizados ha sido determinada de manera preliminar midiendo la actividad de la enzima lisosomal de interés en muestras procedentes de población neonatal y en muestras procedentes de población enferma diagnosticada. Los ensayos eran capaces de distinguir entre neonatos sanos y enfermos aunque no se han establecido de manera estandarizada los puntos de corte, además, no han aportado valores de sensibilidad y especificidad del ensayo estudiado, ya que no se aportaba información sobre los posibles casos positivos, ni se analizan los posibles falsos negativos.

Los estudios piloto de cribado de la enfermedad de Fabri y de Pompe realizados en Austria concluían que el cribado era factible aunque no

aportaban datos sobre la sensibilidad y especificidad del programa de cribado ni información sobre los beneficios en salud de los mismos. El estudio piloto de la enfermedad de Krabbe realizado en el estado de Nueva York cuyo protocolo está basado en el algoritmo para la enfermedad de Krabbe propuesto por Orsini *et al.* 2009, mostró 25 casos positivos: 4 catalogados de alto riesgo y 21 casos clasificados como de riesgo moderado o bajo, sólo 2 de los 4 neonatos de alto riesgo presentaron síntomas. Los otros 2 neonatos de alto riesgo y los 21 de riesgo moderado o bajo no desarrollaron síntomas. El cribado mostró un valor predictivo positivo de la prueba del 8% (2/25).

Análisis económico

El estudio del impacto económico realizado ha mostrado que la incorporación de las enfermedades de almacenamiento lisosomal al programa actual de cribado neonatal por MS/MS supondría para el Sistema Nacional de Salud un incremento de aproximadamente 0,53 millones de euros al gasto anual bajo los supuestos y datos considerados.

CONCLUSIONES

- Los estudios existentes se centran en la validez analítica de las medidas de actividades enzimáticas lisosomales mediante MS/MS.
- La evidencia disponible hasta el momento muestra la viabilidad de la detección de algunas actividades enzimáticas lisosomales mediante MS/MS utilizando gotas de sangre en papel como fuente de la enzima.
- No se dispone de un método estandarizado de los ensayos enzimáticos para el cribado de enfermedades de almacenamiento lisosomal, estando aún este método en fase de optimización.
- No hay evidencia sobre la validez clínica y utilidad clínica del cribado neonatal de enfermedades lisosomales mediante MS/MS.
- Se necesitan estudios prospectivos a largo plazo que permitan estimar de manera fiable la capacidad diagnóstica de la tecnología (sensibilidad, especificidad y valores predictivos).
- La ampliación del cribado neonatal a las enfermedades lisosomales en el Sistema Nacional de Salud supondría un impacto económico en el gasto anual de 0,53 millones de euros.
- El cribado neonatal ampliado a las enfermedades de almacenamiento lisosomal es factible aunque su beneficio potencial en términos de mejora de la salud es incierto.

Executive summary

Title: Extended neonatal screening for lysosomal diseases by mass spectrometry.

Authors: Isabel M. Martínez Férez, Sergio Márquez Peláez.

BACKGROUND AND JUSTIFICATION

The inherited metabolic disorders (IMDs) are a set of diseases caused by the absence or alteration of the activity of a specific enzyme in a metabolic pathway. Lysosomal storage diseases (LSDs) or lysosomal diseases are among these inherited enzyme disorders and encompass a heterogeneous group of pathologies. Currently, the strategy of screening for the IMDs by tandem mass spectrometry (MS/MS), in the different Autonomous Communities, is unequal and does not include these diseases. Thus it would be very useful to be able to assess the utility and feasibility of screening for this group of patients. For this assessment, it is important to know the evidence available on neonatal screening for the LSDs, as well as to make an assessment of the economic impact of the screening implementation.

OBJECTIVES

- To assess the utility and effectiveness of MS/MS in the neonatal screening of lysosomal diseases in terms of analytical and clinical validity.
- To assess the feasibility of neonatal screening for lysosomal diseases by MS/MS in terms of cost, as well as the economic impact of its incorporation into the national programme.

METHODOLOGY

Systematic review of the literature. A bibliographical search was made, which focused on identifying systematic reviews or assessment reports, in the Cochrane Library, in the database of the CRD (Centre for Reviews and Dissemination), ECRI, ISI Web of Knowledge and INHATA. In addition, searches were made in MEDLINE (including Pre-MEDLINE) and EMBASE reference databases up to May 2011, for effectiveness studies, and up to January 2012 for economic studies. The selected references corresponded to any type of study which provided data on neonatal screening for LSDs by MS/MS.

For the economic study, an assessment was made of the budgetary impact of extending the neonatal screening for IMDs to these diseases. The perspective was the National Health System and the costs considered were those that related directly to the screening test, plus those associated with confirmation tests on the resulting positive cases detected.

RESULTS

The bibliographical search identified 20 studies with data on neonatal screening for LSDs by MS/MS; 17 of those studies corresponded to studies of analytical validity of different enzyme assays, as tests for screening and the other 3 studies were pilot tests for neonatal screening. No economic studies were identified on LSDs.

Effectiveness

The analytical studies described assays to directly measure the enzymatic activity responsible for the lysosomal disease from dried blood spot samples on paper. The studies described different protocols for assays of the activity of the lysosomal enzyme of interest, and the measurement of this activity, quantifying the resultant reaction products by MS/MS. The protocols attempted to optimize the assays to quantify the products of the enzymatic reactions in the most precise and least laborious manner possible, and thus to make them compatible with neonatal screening. Studies were identified that focused on assays of only one lysosomal enzyme, and others that analysed several enzymatic activities simultaneously. All the assays displayed acceptable coefficients of intra and inter-test variability (<10% and <15% respectively), and the clinical validity of the methods used was pre-determined by measuring the activity of the lysosomal enzyme of interest in samples, from the neonatal population, and samples from the diagnosed diseased population. The assays were able to distinguish between healthy and affected neonates, although the cut off values were not established in a standardised manner. In addition, sensitivity and specificity values were not given for the studied test, as data were not given on the possible positive cases, and the possible false negatives were not analysed.

The pilot studies undertaken in Austria on screening for the diseases of Fabri and of Pompe, concluded that screening was feasible, although they did not contribute data on the sensitivity and specificity of the screening programme or information on its health benefits. The pilot study undertaken in the State of New York on Krabbe disease, based on the algorithm proposed by Orsini *et al.* 2009, showed 25 positive cases: 4 classified as high risk and 21 cases classified as moderate or low risk, with only 2 of the 4 high risk neonates displaying symptoms.

The other 2 high risk neonates and the 21 with moderate or low risk did not develop symptoms. The screening showed a positive predictive value for the test of 8% (2/25).

Economic analysis

The budget impact analysis showed that the incorporation of the LSDs into the present neonatal screening programme by MS/MS would represent an increase of approximately 0.53 million euros in the annual cost for the National Health System under the assumptions and data considered.

CONCLUSIONS

- The existing studies are focused on the analytical validity of the measurements of lysosomal enzymatic activities by MS/MS.
- The evidence available to date, demonstrates the viability of the detection of some lysosomal enzymatic activities by MS/MS using dried blood spots on paper as the source of the enzyme.
- A standardised method of enzyme assay for the screening of LSDs is not available, as this method is still in the optimization phase.
- There is no evidence on the clinical validity or clinical utility of the neonatal screening for lysosomal diseases by MS/MS.
- Long-term prospective studies are needed to reliably estimate the diagnostic capacity of the technology (sensitivity, specificity and predictive values).
- The extension of neonatal screening to the lysosomal diseases in the National Health System would represent an economic impact in the annual cost of 0.53 million euros.
- Extending neonatal screening to the LSDs is feasible although its potential benefit in terms of health improvement is uncertain.

Parte I: revisión sistemática

Introducción

Enfermedades por almacenamiento lisosomal

Los trastornos metabólicos hereditarios (TMH) son un conjunto de enfermedades causadas por la ausencia o alteración de la actividad de una determinada enzima en la ruta del metabolismo intermediario. Esta alteración en la actividad enzimática puede provocar el depósito de sustancias no deseadas o tóxicas en los tejidos o la falta de algún compuesto esencial para la salud. Como consecuencia de ello ocurre un fallo metabólico que puede llevar a la muerte del individuo o a daños irreversibles en órganos importantes siendo de especial interés por su severidad el daño cerebral. El daño cerebral origina graves problemas de aprendizaje o discapacidad que a menudo suelen aparecer a una edad muy temprana.

Dentro de los trastornos enzimáticos hereditarios se encuentran las denominadas enfermedades por almacenamiento lisosomal (EAL) o lisosomales que engloban un grupo heterogéneo de patologías. Las EAL representan aproximadamente unas 50 entidades clínicas todas ellas caracterizadas por el depósito de moléculas dentro de los lisosomas como consecuencia de la deficiencia de alguna enzima lisosomal. Este depósito de sustancias en los lisosomas a su vez se traduce en la acumulación de macromoléculas específicas en diferentes tejidos y células que provocan consecuencias patológicas, que al igual que en el resto de TMH, afectan a órganos somáticos y también al sistema nervioso central.

Los lisosomas son orgánulos celulares eucarióticas cuya función es la de digerir tanto sustancias endocitadas como sustancias de desecho intracelular. El lisosoma consiste en una vesícula delimitada por una membrana que contiene un gran número de enzimas digestivas que para su actividad necesitan pH ácidos. El pH ácido del interior del lisosoma se mantiene mediante bombas de protones. Estas enzimas se inactivan en el citosol debido a su pH más básico. La mayoría de las enzimas lisosomales son hidrolasas. El mal funcionamiento o alteración de estas enzimas impide la degradación de las sustancias sobre las que actúan produciéndose el depósito de las mismas dentro de los lisosomas que lleva a un mal funcionamiento celular y a anomalías clínicas. Según el material almacenado las enfermedades lisosomales pueden clasificarse en [Hopkin y Grabowski, 2009]:

- Enfermedades lisosomales por acumulación de mucopolisacáridos o mucopolisacaridosis (MPS): enfermedad de Hurler, enfermedad de Hunter, enfermedad de Maroteaux-Lamy...
- Enfermedades lisosomales por acumulación de gangliósidos (GM₂): enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff.
- Enfermedades lisosomales por acumulación de glucoesfingolípidos: enfermedad de Fabry, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Niemann-Pick A y B.
- Enfermedades lisosomales por acumulación de glicoproteínas: Fucosidosis, Manosidosis alfa y beta, aspartilglucosaminuria, Sialidosis.
- Enfermedades lisosomales por acumulación de mucolípidos: Mucopoliposis (ML) II y III.
- Leucodistrofias: enfermedad de Krabbe, Leucodistrofia metacromática, Deficiencia múltiple de sulfatasa.
- Enfermedades lisosomales por acumulación de lípidos neutros: enfermedad de Wolman, enfermedad de almacenamiento de éster de colesterilo, enfermedad de Faber, enfermedad de Pompe.

La mayor parte de estas enfermedades se deben a mutaciones autosómicas recesivas excepto la enfermedad de Hunter (MPS tipo II) y la enfermedad de Fabry que se deben a mutaciones recesivas ligadas al cromosoma X [Hopkin y Grabowski, 2009]. Según las causas genéticas las enfermedades lisosomales pueden clasificarse en diferentes grupos [Menéndez Saínz *et al.* 2002]:

- Enfermedades causadas por mutaciones en genes estructurales que codifican las hidrolasas de los lisosomas. En la mayoría de los casos se sintetizan una enzima con sus propiedades catalíticas alteradas.
- Enfermedades en las que las enzimas no son incluidas o procesadas correctamente en el lisosoma por falta de señales de reconocimiento.
- Enfermedades en las que las enzimas no son estables en el lisosoma.
- Enfermedades por alteraciones en las proteínas activadoras de hidrolasas.
- Enfermedades por alteraciones en el mecanismo de transporte de membrana de los metabolitos que deben salir del lisosoma.

Las enfermedades lisosomales presentan un amplio espectro de manifestaciones clínicas. La correlación entre un determinado genotipo con su expresión fenotípica es muy compleja, ya que existe una gran heterogeneidad fenotípica en estas enfermedades [Menéndez Saínz *et al.* 2002].

Las enfermedades lisosomales dada su baja incidencia están consideradas enfermedades raras. Según la Unión Europea las enfermedades raras son aquellas que afectan a menos de 5 de cada 10.000 individuos. Son enfermedades generalmente de carácter crónico, progresivas, degenerativas y a menudo ponen en peligro la vida de la persona afectada. Las personas afectadas tienden a sufrir una incapacidad severa afectando de forma importante su calidad de vida y a la de su entorno. La baja prevalencia de estas enfermedades hace que los pacientes afectados se enfrenten a numerosos problemas, entre los que se pueden describir el retraso del diagnóstico correcto, la falta de información y de estudios médicos y la dificultad de acceso al tratamiento adecuado [European Awareness of Rare Diseases, 2011].

La incidencia global de todas las EAL no se conoce con exactitud, pero en cualquier caso las frecuencias individuales estimadas son bajas (aproximadamente 1 a 4/100.000 nacimientos), por ejemplo, el síndrome de Sanfilippo presenta una frecuencia de 1/24.000 y la frecuencia de los síndromes de Hunter y de Hurler es de 1/100.000. Debemos señalar que algunas de estas enfermedades presentan una prevalencia muy alta en determinadas poblaciones como ocurre con la enfermedad de Gaucher y la enfermedad de Tay Sachs que se presentan principalmente en los judíos de origen Ashkenazi con una incidencia 1/ 6.000 y 1/2.500 respectivamente o la aspartilglucosaminidasa y la enfermedad Salla cuya prevalencia es muy alta en la población del nordeste de Finlandia, siendo 1 de cada 40 individuos de esta población portador de la enfermedad [Menéndez Sainz *et al.* 2002].

Aunque las EAL de manera individual son enfermedades raras, un estudio realizado en Australia estimó que la incidencia global (casos diagnosticados de forma postnatal/número de nacimientos) de todas ellas podría llegar a ser de aproximadamente 11,2 casos por cada 100.000 niños recién nacidos y la prevalencia global a su vez sería de 12,99 por cada 100.000 recién nacidos (casos diagnosticados de forma pre y postnatal/nacimientos) [Meikle *et al.* 1999]. En Europa se han realizado estudios en diferentes países con el objetivo de estimar la prevalencia de estas enfermedades así estudios realizados en Holanda, Portugal y República Checa han estimado que la prevalencia global de las EAL era de 14, 25, y 12,25 casos por cada 100.000 recién nacidos respectivamente [Poorthuis *et al.* 1999; Pinto *et al.* 2004; Poupětová *et al.* 2010]. La prevalencia global en Europa según los datos publicados se encontraría entre 12 y 25 casos por 100.000 recién nacidos.

Hasta hace poco tiempo no se disponía de tratamientos terapéuticos que logran alterar la historia natural de estas enfermedades. En los últimos años se ha avanzado mucho en este campo y han aparecido nuevas terapias con resultados prometedores que han abierto una nueva vía en el tratamiento de las enfermedades lisosomales. Entre estas terapias destacan la terapia de sustitución enzimática (TSE), la terapia génica y el trasplante de células hematopoyéticas. Actualmente, entre las enfermedades lisosomales de las que se dispone de alguna de estas nuevas terapias o se espera disponer de ellas en corto plazo de tiempo, se encuentran las mucopolisacaridososis (MPS) I, II y VI, las enfermedades de Gaucher, Fabry, Pompe, Niemann-Pick y Krabbe. Por lo que estas EAL han sido consideradas, de entre todas las alteraciones lisosomales, las enfermedades candidatas para la realización de un cribado neonatal con el fin de actuar en su tratamiento antes de que los daños provocados por la enfermedad sean irreversibles [Nakamura *et al.* 2011].

Descripción de las principales patologías

Las enfermedades de depósito lisosomal de las que se disponen o se espera disponer de un tratamiento que permita alterar el curso de la enfermedad así como sus diferentes manifestaciones se muestran en la tabla 1. Puesto que los lisosomas se encuentran en prácticamente todas las células excepto en los eritrocitos maduros, la disfunción de las hidrolasas lisosomales puede afectar a la función de cualquier órgano. La mayoría de las EAL presentan afectación neurológica, aunque la gravedad de esta afectación no es igual en todas las enfermedades ni en todos los pacientes afectados por una misma enfermedad.

Tabla 1: Algunas de las principales enfermedades lisosomales y sus manifestaciones clínicas [Hopkin y Grabowski, 2009].

Enfermedad	Alteración enzimática	Tipos clínicos/ edad iniciación	Manifestaciones clínicas	Terapia
MPS I	L-iduronidasa	Severo (Hurler)/ infantil Intermedio (Hurler/ Scheie) adulto Atenuado (Scheie)/ adulto	Hurler: degeneración neurológica grave. Hurler/Scheie: afección somática grave sin deterioro neurológico. Scheie: sin afectación del SNC y daño menos grave que las anteriores.	TCH TSE
MPS II	Iduronato-2-sulfatasa	Grave/infantil Leve/juvenil	La forma infantil es la más grave con un fuerte retraso mental.	TSE
MPS IV	A: Sulfatasa de N-acetilgalactosamina-6-sulfato B: β -galactosidasa	Morquio A Morquio B	Afectación neurológica.	-
MPS III	A: heparán N-sulfatasa B: α -N-acetilglucosaminidasa C: acetil-CoAlfa-Glucosaminida-acetiltransferasa D: N-acetilglucosamina 6-sulfatasa	Sanfilippo A Sanfilippo B Sanfilippo C Sanfilippo D	Afectación neurológica.	-
MPS VI	Arilsulfatasa B	Infantil	Sin afectación neurológica. Organomegalia, afectación ósea, cardíaca y respiratoria.	TSE
KRABBE	Galactosilcera-midasa (GALC)	Infantil/2-3 meses Juvenil	Afectación del SNC. La infantil lleva a la muerte antes de los 4 años.	TCH
POMPE	α -Glucosidasa ácida (GAA)	Infantil De aparición tardía	Afectación neuromuscular. La forma infantil grave produce la muerte en el primer año de vida por miocardiopatía hipertrófica e hipotonía profunda. La de aparición tardía tiene debilidad muscular progresiva y produce la muerte por fallo respiratorio.	TSE
TAY-SACHS	Hexosaminidasa β A	Infantil-Juvenil	Afectación motora y del SNC. Expectativas de vida entre 2 y 5 años.	-

Tabla 1: Algunas de las principales enfermedades lisosomales y sus manifestaciones clínicas [Hopkin y Grabowski, 2009].

Enfermedad	Alteración enzimática	Tipos clínicos/ edad iniciación	Manifestaciones clínicas	Terapia
FABRY	α -Galactosidasa A (GLA)	Infantil	Afectación renal, cardíaca y del SNC.	TSE
GAUCHER	β -Glucosidasa ácida (ABG)	Tipo1/>2años Tipo2 /1er año Tipo3/juvenil	Tipo 1: No afecta SNC, afectación ósea, anemia esplenomegalia, trombocitopenia. Tipo 2: afectación SNC. Muerte antes 2 años. Tipo 3: afectación SNC crónica y visceral.	TSE
NIEMANN-PICK	A y B: Esfingomielinasa (ASM) C: productos de los genes NPC1 y NPC2	A Neuropático B No neuropático C -	El tipo A afecta SNC con muerte en los 2 ó 3 primeros años de vida. Tipo B con un progresivo deterioro de la función pulmonar. Tipo C: Afectación neurológica.	A y B: - C: TSE

SNC: Sistema nervioso central. TSE: terapia de sustitución enzimática. TCH: transplante de células hematopoyéticas.

* Meikle *et al.* 1999.

Enfermedad de Fabry

La enfermedad de Fabry es una enfermedad lisosomal ligada al cromosoma X y causada por la deficiencia de la enzima Galactosidasa α A. Esta deficiencia enzimática provoca la acumulación de globotriaosilceramida (Gb-3) que se deposita en células de diferentes órganos contribuyendo a la patología pero cuyo mecanismo de interacción no es conocido. Las complicaciones más serias de esta enfermedad afectan al riñón, corazón y sistema nervioso central.

Los primeros síntomas aparecen durante la infancia y/o adolescencia, suelen ser principalmente de carácter neurológico y consisten en acroparestesias o dolor neuropático [Pintos-Morell y Beck, 2009].

El curso natural de la enfermedad es muy heterogéneo tanto en síntomas como en el tiempo en el que se manifiestan. Además, al contrario de lo que ocurre con otras enfermedades ligadas al cromosoma X, las mujeres heterocigotas no son meramente portadoras de la mutación sino que hasta un 70% de ellas pueden presentar los síntomas de la enfermedad, siendo en estos casos todavía más variable la edad de aparición de los síntomas y las características de los mismos. El hecho de que los síntomas no sean específicos de la enfermedad puede retrasar su diagnóstico sobre todo en ausencia de historia familiar. En España el retraso medio en el diagnóstico de la enfermedad es de 11 años en ambos sexos [Barba-Romero *et al.* 2011].

Los pacientes que no reciben tratamiento mueren por insuficiencia renal o enfermedad cardiovascular o cerebrovascular [Hopkin y Grabowski, 2009]. El tratamiento de la enfermedad es la terapia enzimática de sustitución intravenosa. Actualmente existen dos formas disponibles de enzima: la agalsidasa alfa (Replagal®; Shire Human Genetic Therapies, Dublin, Ireland) y agalsidasa beta (Fabrazyme®; Genzyme Corporation, Cambridge, MA). Los ensayos clínicos aleatorizados que han estudiado la eficacia del tratamiento con agalsidasa (alfa o beta) frente a placebo han mostrado cierto beneficio a favor del tratamiento, en los niveles de Gb-3 en plasma y tejidos, aunque se trataban de ensayos de baja calidad metodológica lo que limitaba la robustez de la evidencia aportada [El Dib y Pastores, 2010]. Otros tipos de estudios han mostrado que en adultos ambos tratamientos reducían los niveles de Gb-3 en plasma y estabilizaban la función renal. En niños, se ha observado que el tratamiento con agalsidasa alfa reduce los niveles de Gb-3 en plasma y el dolor; y el tratamiento con agalsidasa beta reduce la acumulación de Gb-3 en el endotelio dérmico [Pintos-Morell y Beck, 2009].

Enfermedad de Gaucher

La enfermedad de Gaucher es un TMH de carácter autosómico recesivo que conlleva la deficiencia de la enzima lisosomal, β -glucosidasa ácida y el depósito de glucosilceramida en los lisosomas; este depósito es el causante de los signos y síntomas de la patología

Se han identificado tres tipos clínicos diferentes basados en la ausencia o presencia de afectación neurológica y a la gravedad de ésta [Hopkin y Grabowski, 2009]:

- Tipo 1: puede presentarse en la infancia o en la edad adulta y no afecta al sistema nervioso central. Presenta afectación ósea, esplenomegalia, trombocitopenia, anemia. Es más frecuente en adultos de origen judío.
- Tipo 2: es la menos frecuente y la que presenta una afectación neurológica severa. Se presenta en niños y lleva a la muerte hacia los dos años de edad.
- Tipo 3: tiene manifestaciones muy variadas tanto viscerales como neurológicas. Las manifestaciones viscerales son similares al tipo 1 pero de mayor gravedad. El retraso mental puede evolucionar lentamente o permanecer sin cambios. Esta variante suele presentarse en individuos de origen sueco.

La enfermedad de Gaucher es la EAL más frecuente y aproximadamente el 95% de los pacientes son del tipo 1 [Cox y Schofield, 1997].

Los tratamientos utilizados son la TSE y tratamiento por inhibición de sustrato, este último consiste la administración de medicamentos que reducen la producción de las moléculas complejas de lípidos que son el sustrato de la enzima β -glucosidasa ácida. Las TSE disponibles para la tipo 1 son: Velaglucerasa alfa (Vpriv[®], Shire HGT); aglucerasa (Ceredase, Genzyme Inc.), imiglucerasa (Cerezyme, Genzyme Therapeutics Inc., Cambridge, MA).

Enfermedad de Pompe

Está causada por la acumulación de glucógeno en los lisosomas como consecuencia de una deficiencia de la actividad de la enzima glucosidasa alfa ácida. Este depósito de glucógeno lleva a un deterioro muscular progresivo y un fallo orgánico. Se distinguen dos tipos: la infantil y la de aparición tardía. El tipo infantil es el más grave y los pacientes mueren en el primer año de vida. La muerte es debida a hipotonía profunda y a una miocardiopatía hipertrófica. La de aparición tardía es más leve y se manifiesta durante la niñez o en edad adulta. Está asociada a una debilidad muscular progresiva y conduce a la muerte por fallo respiratorio [Kemper *et al.* 2007].

La TSE ha mostrado tener claros beneficios en la forma infantil, donde mejora la función cardíaca y prolonga la supervivencia. La mayoría de los lactantes tratados presentan mejoría en la función respiratoria. Los estudios realizados en la forma de aparición tardía son por el momento limitados, y la enfermedad muy avanzada tiene componentes significativos irreversibles [Hopkin y Grabowski, 2009].

Enfermedad de Niemann-Pick

Existen principalmente tres formas de la enfermedad conocidas como tipos A, B y C. Cada uno de estos tipos afecta a órganos diferentes y puede afectar o no al sistema nervioso central. Desde una perspectiva clínica el tipo A tiene una presentación aguda, el tipo B crónica y el tipo C subaguda.

Es una enfermedad autosómica recesiva causada por el depósito lisosomal de esfingomielina originado por la alteración en la actividad de la enzima esfingomielinidasa ácida (tipos A y B) o por el depósito de colesterol libre y glucoesfingolípidos originado por alteraciones en el transporte del colesterol (tipo C).

Los subtipos A y B son debidos a variaciones alélicas causadas por mutaciones en el gen de esfingomielina-fosfodiesterasa 1, mientras que el tipo C es producida por alteraciones en el gen *NPCI* o en el gen *NPC2* localizados en los cromosomas 18 y 14 respectivamente.

El tipo A presenta hepatomegalia, dificultad motora. La progresión de la enfermedad es rápida y con una severa pérdida de la función neuronal que lleva a la muerte en los 2 o 3 primeros años de vida [Cruse, 2001].

El tipo B es menos severo que el A pues no presenta afectación neurológica y está caracterizado por el desarrollo de hepatomegalia en la niñez y trombocitopenia. La historia natural de la enfermedad lleva a un progresivo deterioro de la función pulmonar.

El tipo C se caracteriza por una afectación neurológica progresiva y daños graves en otros órganos. La enfermedad puede manifestarse en edad infantil, juvenil y adulta.

Para los tipos A y B no se dispone en la actualidad de tratamiento que modifique la parición o la progresión neurológica de la enfermedad o prolongue la vida de los pacientes.

En el tipo C el tratamiento con misglutat, un inhibidor de la biosíntesis de glucoesfingolípidos, reduce el depósito de lípidos en los tejidos y parece estabilizar el estado neurológico en la presentación juvenil de la enfermedad mostrando un menor beneficio terapéutico en la presentación infantil con mayor grado de severidad de la enfermedad [Pineda *et al.* 2009; Chabrol 2010].

Enfermedad de Krabbe

Los individuos afectados por esta enfermedad presentan alteración de la enzima galactosilceramidasa lo que lleva asociado el depósito de galactosilceramida en los lisosomas.

Es una enfermedad neurodegenerativa que puede manifestarse clínicamente en edad muy temprana (infantil) y que lleva a la muerte a los 4 años de edad, o puede manifestarse en una edad adulta sin que apenas muestre síntomas en la niñez. Entre estos dos extremos se encuentra toda una gran variedad de formas, algunas de ellas, pueden ser asintomáticas.

El único tratamiento disponible para la forma infantil de la enfermedad es el trasplante de células hematopoyéticas. Se ha observado que aunque los niños transplantados sobreviven más que los no transplantados, la gran mayoría de estos niños desarrollan de manera progresiva microcefalia y deficiencias motoras y neurológicas durante su desarrollo [Duffner *et al.* 2009b].

Mucopolisacaridosis

Las mucopolisacaridosis (MPS) engloban un conjunto de TMH originados por la deficiencia de enzimas implicadas en la degradación de los glicosaminoglicanos (GAG) y que conlleva la acumulación de estas moléculas en los lisosomas celulares. Se tratan de errores metabólicos

heredados de manera autosómica recesiva, excepto la MPS II que está ligada al sexo.

Se distinguen siete tipos de MPS: I, II, III, IV, VI, VII y IX. Existe una alta heterogeneidad fenotípica en las MPS y la correlación entre alteraciones genéticas y sus expresiones fenotípicas es muy compleja. Las MPS de los tipos III y IV presentan varios subtipos que se corresponden a mutaciones en diferentes genes, por lo tanto implican a diferentes enzimas, que dan lugar a fenotipos o presentaciones clínicas semejantes. Por otra parte la MPS I y II presentan diferentes grados de severidad todos ellos causados por diferentes alteraciones en el mismo gen. Así por ejemplo, en la MPS I se distinguen tres grados: severo (Enfermedad de Hurler), intermedio (Enfermedad Hurler/Scheie) y atenuado (Enfermedad de Scheie) y en el de la MPS II dos grados severo y atenuado [Menéndez Sainz *et al.* 2002; Muenzer, 2004; Hopkin y Grabowski, 2009]. Los pacientes con MPS I tipo severo (Hurler) sin tratamiento mueren antes de los 10 años de vida [Giugliani *et al.*, 2010].

Las MPS se caracterizan por afectar a varios sistemas, presentar facies características, organomegalia y disostosis múltiple. La presentación clínica, la severidad de los síntomas y la afectación o no del sistema nervioso central puede variar tanto entre los tipos de mucopolisacaridosis descritas como dentro de cada uno de ellos. Las presentaciones severas de las MPS I, MPS II Y MPS VII conllevan un retraso mental progresivo mientras que las MPS IV y MPS VI no la presentan a pesar de la severidad de sus síntomas somáticos. Los pacientes con MPS III tienen síntomas somáticos más atenuados pero una gran afectación del sistema nerviosos central con retraso mental severo, hiperactividad y trastornos de conducta [Muenzer, 2004].

El tratamiento de las MPS para corregir las deficiencias enzimáticas se ha centrado en dos técnicas, el trasplante de células hematopoyéticas (TCH) y la terapia de sustitución enzimática (TSE). En la MPS II y VI el trasplante ha sido relegado como opción terapéutica a un segundo plano por no demostrar beneficio neurológico y por llevar asociado una alta morbilidad y mortalidad. El TCH está indicado principalmente para pacientes con MPS I severa, si se realiza antes de los 2 años de edad [Giugliani *et al.*, 2010], en pacientes con formas atenuadas de MPS II y en pacientes con MPS VI si no funciona la terapia enzimática de sustitución que sería la primera opción de tratamiento [AHRQ, 2012]. Actualmente, la TSE es otra opción al tratamiento de las MPS I, II y VI al presentar algunas ventajas como la de un aporte mayor de enzima que la producida con el TCH, un menor riesgo y un incremento en el rango de pacientes a tratar. Si bien, la mayor desventaja de esta terapia es que la enzima administrada de forma intravenosa no puede atravesar

la barrera hematoencefálica [Muenzer, 2004]. Los tratamientos aprobados por la EMA (Agencia Europea del Medicamento) para estas MPS son:

MPSI: Larodinas (Aldurazyme®, Genzyme Corporation)

MPSII: Idursulfasa (Elaprase®, Shire HGT)

MPSVI: Galsulfasa (Naglazyme®, BioMarin Pharmaceuticals).

Un informe realizado recientemente por la Agència d'Informació, Avaluació i Qualitat en Salut de Catalunya sobre TSE en pacientes con MPS I, II y VI ha concluido que estos tratamientos, en pacientes adultos con fenotipos leves-moderados y a corto plazo, son bien tolerados, mejoran la distancia caminada, la capacidad respiratoria y reducen la organomegalia. Aunque falta evidencia sobre el impacto en la calidad de vida y en la evolución de enfermedad neurológica en pacientes con MPS I y II. Por lo tanto, se debería definir las condiciones de indicación de estos con el consenso de los profesionales y expertos. [Sunyer *et al.* 2011].

Espectrometría de masas en tándem (MS/MS)

La MS/MS es una técnica de análisis que permite la separación, identificación y cuantificación de múltiples moléculas presentes en una muestra gracias a la razón entre la masa y la carga de cada uno después de su ionización. El MS/MS determina por lo tanto las moléculas que forman una mezcla y la cantidad de cada una de ellas, todo ello en un tiempo muy corto y de manera simultánea. El equipo consta básicamente en dos espectrómetros de masas separados por una cámara de colisión, aunque se pueden diferenciar las siguientes partes:

- Sistema de introducción de la muestra
- Fuente de ionización
- Analizador de masas (MS1)
- Celda de colisión
- Analizador de masas (MS2)
- Detector

El proceso de análisis de la muestra básicamente consiste en la ionización de la misma con el fin de generar moléculas cargadas que son separadas según su relación masa/carga y analizadas por el MS1, a continuación pasan a la celda de colisión donde los compuestos ionizados colisionan con un gas inerte fragmentándose y generando nuevos productos que son analizados en el MS2 y que se pueden correlacionar con las moléculas intactas

producidas en el MS1. Finalmente, el detector registra la información originando un espectro de masas (representación gráfica de los iones separados por su valor de masa/carga y ajustados según al porcentaje de las especies más abundante en la muestra) que es recogido en un sistema informático [Fernández- Lainez *et al.* 2009].

Los primeros procedimientos bioquímicos diseñados para el diagnóstico de las enfermedades lisosomales fueron las determinaciones de los compuestos que se acumulan en la orina de los pacientes mediante pruebas de simple rastreo, así como pruebas cualitativas y cuantitativas precisas. No obstante, aunque estas determinaciones permitían diferenciar entre las principales clases de enfermedades lisosomales, no eran capaces de distinguir entre los subgrupos.

Sin embargo, la posibilidad de desarrollar análisis mediante MS/MS sobre placas de microtitulación y de su consiguiente automatización puede ampliar el cribado neonatal de dichas enfermedades lisosomales. Por ello, la espectrometría de masas en tándem es una técnica de potencial implantación en los laboratorios clínicos. El cribado neonatal de las enfermedades lisosomales mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS) en muestras biológicas humanas, permite la determinación de las actividades enzimáticas en los lisados de las células procedentes de las mismas.

Cribado neonatal

El objetivo del cribado neonatal es la detección con precisión de errores congénitos del metabolismo (ECM) en los recién nacidos a una edad en la que la aplicación de un programa terapéutico pueda evitar el daño o mejorar su evolución (AAP Newborn Screening Task Force, 2000).

La mayoría de las enfermedades lisosomales no disponen de un tratamiento eficaz que permita la curación o paliación de los síntomas por lo que la realización de un cribado neonatal debería centrarse en aquellas patologías de esta naturaleza de las que se dispusiera un tratamiento eficaz que variara el curso natural de la enfermedad. La detección precoz podría ser vital ya que el tratamiento de los pacientes en las primeras etapas de la vida antes de la aparición o progresión de los síntomas podría reducir la morbilidad y mortalidad debidas a estas patologías.

La realización de cribados poblacionales con potenciales beneficios de salud en la población también puede ocasionar daños o perjuicios a los individuos, además de un gasto económico considerable y la posible necesidad de cambios organizativos en el sistema sanitario. Por lo tanto antes de realizar un cribado y sobre todo cuando éste es neonatal debe

tenerse en consideración la relación beneficio/daño esperada, para lo que es indispensable basarse en una buena evidencia científica.

Se han desarrollado diferentes técnicas para el posible cribado neonatal de las EAL (espectrofotometría, fluorometría o radiometría) pero la espectrometría de masas en tándem tiene la ventaja frente a estas otras técnicas de poder analizar los productos de varias actividades enzimáticas simultáneamente; lo que permitiría cribar diferentes enfermedades al mismo tiempo.

El diagnóstico definitivo de las enfermedades lisosomales se debe de realizar mediante la comprobación de la actividad enzimática lisosomal correspondiente (en fibroblastos o en amniocitos cultivados, leucocitos, suero/plasma); y mediante la realización de un estudio genético.

Actualmente, la estrategia de cribado de anomalías congénitas en las distintas CCAA es desigual, por lo que sería de gran utilidad poder evaluar la utilidad y factibilidad del cribado de este grupo de pacientes. Una revisión de la evidencia disponible sobre el cribado neonatal de las enfermedades de almacenamiento lisosomal así como la estimación del impacto económico que supondría la implantación del cribado, podría ayudar a discernir la necesidad, utilidad o viabilidad de su realización en la población española.

Objetivos

Evaluar la utilidad y eficacia de la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) en el cribado neonatal de enfermedades lisosomales en términos de:

- Validez analítica: evaluar la precisión con que el MS/MS es capaz de identificar una variante enzimática concreta.
- Validez clínica: evaluar la exactitud con que el MS/MS predice un resultado clínico determinado, correspondiendo con un subgrupo concreto de enfermedad lisosomal.

Material y Métodos

Tipo de estudio

Revisión sistemática de la literatura sobre la utilidad y eficacia de la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) en el cribado neonatal de enfermedades de almacenamiento lisosomal o lisosomales.

Búsqueda bibliográfica: bases de datos y estrategia

Se ha realizado una búsqueda bibliográfica enfocada a identificar revisiones sistemáticas o informes de evaluación en la biblioteca Cochrane, en la base de datos del CRD (Centre for Reviews and Dissemination), ECRI, ISI Web of Knowledge e INHATA. Además, se realizaron búsquedas de estudios en las bases de referencias MEDLINE (incluido Pre-MEDLINE mediante OVID) y EMBASE, hasta los días 19 y 20 de Mayo del 2011 respectivamente. Las estrategias utilizadas se describen en el anexo 1.

Selección de artículos relevantes

Los criterios de inclusión en la selección de los estudios se establecieron con base en los siguientes puntos:

- Población: recién nacidos.
- Intervención: cribado neonatal mediante espectrometría de masas.
- Resultados:
 - Rendimiento diagnóstico: sensibilidad, especificidad, valores predictivos de la técnica.
 - Mejora de los síntomas clínicos.
 - Mejora calidad de vida.
 - Mejora de la supervivencia.
- Diseño: Los estudios considerados en este informe fueron revisiones sistemáticas y cualquier tipo de estudio primario que aportara información sobre el cribado neonatal de cualquier enfermedad lisosomal mediante MS/MS.

Se han incluido estudios sin límite de idioma.

Se excluyeron las publicaciones como cartas, editoriales, revisiones no sistemáticas y todas aquellas que no incluyeran estudios originales sobre el tema.

Evaluación de la calidad de los estudios

Se ha realizado una lectura crítica de los artículos seleccionados, con el fin de identificar los problemas metodológicos que pudieran influir en la validez interna y externa de los estudios. En aquellos casos en los que ha sido posible evaluar la calidad del estudio, se han aplicado los criterios establecidos en la guía CASPe para establecer su validez interna [disponible en: <http://www.redcaspe.org/herramientas/index.htm#lecturacritica>].

Por último, se ha realizado la extracción de los resultados descritos en cada estudio y se han resumido en tablas de evidencia.

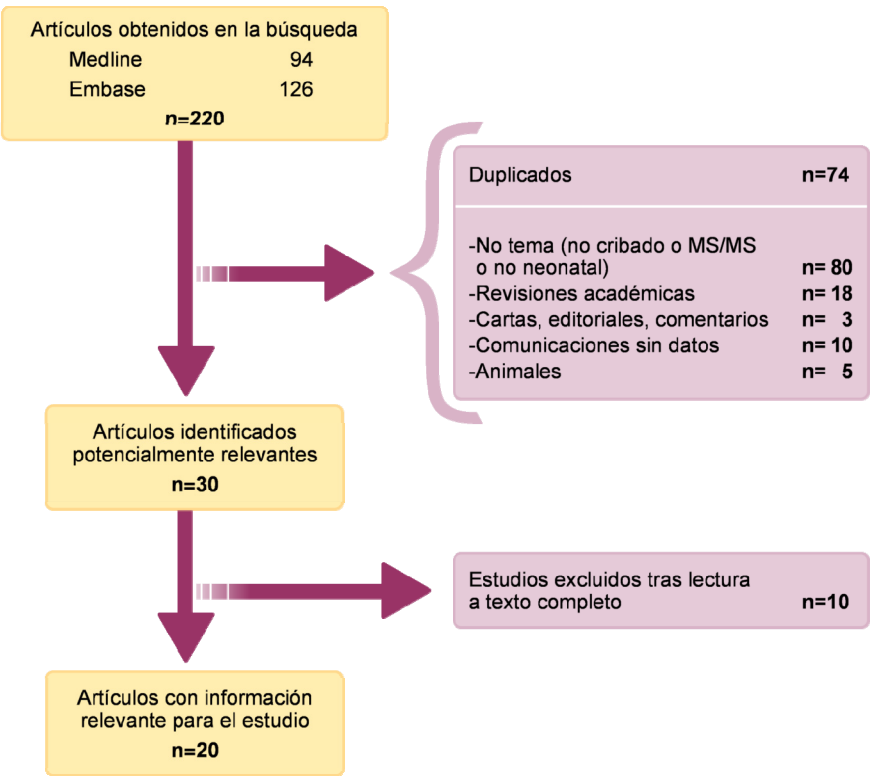
Resultados

Resultados de la búsqueda

Las estrategias de búsqueda en las bases de referencias MedLine y Embase identificaron un total de 220 artículos. De las referencias encontradas 74 se descartaron por tratarse de duplicados encontrados en ambas bases de datos a la vez.

Tras la lectura del título y el resumen de las referencias, se excluyeron aquellas que no cumplían los criterios de inclusión establecidos y se seleccionaron para su lectura a texto completo un total de 30 estudios. El esquema muestra el flujo de selección de referencias se describe en la figura 1.

Figura 1: Flujo de selección de referencias identificadas en las bases de datos MedLine y Embase. Revisión sistemática.



La lectura completa de las referencias permitió la identificación y exclusión de 2 revisiones sistemáticas sobre el cribado neonatal de la enfermedad de Pompe y de Krabbe [Kemper *et al.* 2007; Kemper *et al.* 2010]. Los motivos de su exclusión fueron no recoger datos sobre cribado por MS/MS, y por lo tanto no cumplir los criterios de inclusión establecidos [Kemper *et al.* 2007], y recoger información de diagnóstico, tratamiento y cribado, siendo los datos sobre cribado analizados y actualizados en este informe [Kemper *et al.* 2010].

También se rechazaron las siguientes referencias por las causas a continuación detalladas:

- Dos referencias correspondientes a dos comunicaciones a congresos [Bodamer *et al.* 2008a; Bodamer *et al.* 2009] que presentaban datos recogidos respectivamente en los estudios de Dajnoki *et al.* 2008 y Dajnoki *et al.* 2010 incluidos en el informe. Estas referencias suponían una duplicación de información y la posible magnificación de los resultados.
- Un estudio por tratarse de un método por MS/MS de posibles marcadores para el diagnóstico y seguimiento terapéutico de la enfermedad de Pompe [Rozaklis *et al.* 2002] y no sobre cribado por lo que no cumplía los criterios de inclusión.
- Un estudio que valoraba la razón Gb3/creatina como posible biomarcador de la enfermedad de Fabry; pero se limitaba a medir la razón Gb3/creatina en neonatos sanos no aportando datos que permitieran comparar enfermos y sanos [Barr *et al.* 2009].
- Un estudio donde se describía un método analítico para la detección de derivados de glucosa en orina y plasma pero donde no se aportaban datos sobre niveles de actividad enzimática o niveles de presencia de productos como consecuencia de fallo metabólico ni en neonatos, ni en adultos ni en enfermos [Young *et al.* 2003].
- Un programa piloto de cribado neonatal de la enfermedad de Pompe por no medir la actividad enzimática mediante MS/MS sino mediante fluorescencia [Labrousse *et al.* 2010].
- Dos estudios donde se describían métodos analíticos por MS/MS para la enfermedad de Krabbe y MPS IVA por no incluir en la población de estudio a neonatos y/o presentar datos agregados de individuos con diferentes edades, por lo tanto no cumplía los criterios de inclusión establecidos [Li *et al.* 2004a; Tomatsu *et al.* 2010a, respectivamente].

Finalmente se incluyeron 20 referencias que aportaban información relevante sobre el tema.

Calidad de los estudios

Los diseños de los estudios no han permitido la valoración de su validez interna según los criterios CASPe. Por otra parte, las referencias correspondientes a comunicaciones presentadas a congresos aportaban escasa información lo que no ha permitido realizar una valoración crítica adecuada de las mismas.

Resultados de los estudios

Tabla 2: Referencias incluidas en el informe.		
Referencia	EAL estudiada	Tipo de estudio
Li et al. 2004b	Krabbe, Pompe, Fabry, Gaucher y Niemann-Pick	Analítico
Wang et al. 2005	MPS I	Analítico
Wang et al. 2007	MPS II (Hunter)	Analítico
Zhang et al. 2008	Krabbe, Pompe, Fabry, Gaucher y Niemann-Pick	Analítico
Dajnoki et al. 2008	Pompe	Analítico
Blanchard et al. 2008	MPS I	Analítico
Bodamer et al. 2008b	Pompe	Piloto/cribado /CC
Bodamer et al. 2008c	Fabry	Piloto/cribado/CC
La Marca et al. 2009	Krabbe, Pompe, Fabry, Gaucher y Niemann-Pick	Analítico
Orsini et al. 2009	Krabbe	Analítico
Duffner et al. 2009a	Krabbe	Piloto/cribado
Scott et al.2009	Fabry	Analítico/CC
Duffey et al. 2010a	Pompe, Fabry y MPS I:	Analítico
Kasper et al. 2010	Pompe, Fabry, Gaucher y Niemann-Pick	Analítico
Dajnoki et al. 2010	Fabry	Analítico
Duffey et al. 2010b	MPS VI	Analítico
Tomatsu et al. 2010b	MPS	Analítico
Legini et al. 2011	Gaucher	Analítico
Khaliq et al. 2011	MPS IVa	Analítico
Wolfe et al. 2011	MPS II (Hunter)	Analítico
CC: comunicación a congreso		

Los artículos seleccionados (tabla 2) recogían información sobre el cribado por espectrometría de masas en tándem de varias enfermedades lisosomales, concretamente las 20 referencias incluían:

- 3 referencias para el cribado simultáneo de cinco enfermedades lisosomales: Krabbe, Pompe, Fabry, Gaucher y Niemann-Pick.
- 1 referencia sobre el cribado simultáneo de tres enfermedades lisosomales: Pompe, Fabry y MPS I (Hurler).
- 1 referencia sobre el cribado simultáneo de cuatro enfermedades lisosomales: Pompe, Fabry, Gaucher y Niemann-Pick.
- 2 referencias sobre el cribado de la enfermedad de Pompe.
- 2 referencias sobre el cribado de la enfermedad de Krabbe.
- 3 referencias sobre el cribado de la enfermedad de Fabry.
- 1 referencia sobre el cribado de la enfermedad de Gaucher.
- 7 referencias sobre el cribado de MPS.

De estas 20 referencias, 17 correspondían a estudios analíticos que describían métodos para el cribado neonatal con el fin de identificar a bebés afectados por alguna EAL, y por lo tanto trataba de estudios sobre la validez analítica de las técnicas descritas, y 3 referencias se correspondían a estudios piloto o cribados neonatales (tabla 2).

Estudios analíticos

Se han identificado dos tipos de estudios analíticos, los que medían directamente la actividad enzimática responsable de la enfermedad lisosomal (16 referencias) y los que medían o cuantificaban la cantidad de producto acumulado en sangre u orina como resultado de la deficiencia enzimática responsable de la EAL (1 referencia, Tomatsu *et al.* 2010b).

Los estudios que medían directamente la actividad enzimática, responsable de la enfermedad, describían diferentes protocolos de ensayos de la actividad de la enzima lisosomal de interés y la cuantificación de dicha actividad mediante espectrometría de masas en tándem de los productos resultantes. Cada uno de los estudios proponía la técnica descrita como posible método de cribado neonatal para las EAL. Los estudios utilizaron como fuente de la enzima para la determinación de la actividad gotas de sangre seca en papel (DBS) y consistían básicamente en la rehidratación de la muestra introduciéndola en un tampón al que se le añadía el sustrato sintético específico de la enzima a estudiar, tras un determinado periodo de incubación, se procedía a la cuantificación de los productos resultantes

de la actividad enzimática mediante espectrometría de masas en tándem para lo cual utilizaban un estándar interno determinado.

En general, los ensayos enzimáticos estudiados se centraban en describir tres puntos de interés:

- Analizar la combinación de diferentes sustratos sintéticos específicos para las enzimas lisosomales de interés con diferentes estándares internos.
- Probar diferentes condiciones de ensayo (pH, tiempos de incubación, tampones, tamaño de DBS, concentración de sustrato,...).
- Probar diferentes técnicas de preparación de muestras, separación y detección (extracciones líquido-líquido, extracciones en fase sólida, condiciones de espectrometría...).

Los protocolos pretendían lograr la optimización de los ensayos con el fin de cuantificar de la manera más precisa y menos laboriosa posible los productos de las reacciones enzimáticas y así hacerlos compatibles con un cribado neonatal. Para demostrar la validez analítica de los protocolos, algunos de los estudios estimaban la correlación entre la actividad enzimática y el hematocrito, observando en los casos analizados que existía una correlación lineal ($R^2 > 0,9$), la variabilidad intra y entre ensayos con el fin de estimar la precisión o repetibilidad del ensayo en los casos estudiados estos valores fueron $< 15\%$, los límites de detección y los límites de cuantificación (tabla 3).

La validez clínica de los métodos utilizados ha sido determinada de manera preliminar midiendo la actividad de la enzima lisosomal de interés en muestras procedentes de población neonatal y en muestras procedentes de población enferma diagnosticada. La comparación de las medidas ha permitido a los autores de los estudios comprobar si el ensayo distinguía claramente entre estas dos poblaciones. Algunos de los estudios, una vez establecidos los niveles de actividad entre las dos poblaciones, han propuesto valores de corte que en un cribado neonatal permitirían clasificar los casos en positivos (enfermos) y negativos (sanos) (tabla 3). Ningún estudio ha aportado valores de sensibilidad y especificidad del ensayo estudiado, ya que no se aportaba información sobre los posibles casos positivos, ni se analizan los posibles falsos negativos. Algunos de ellos lo que estimaban era la tasa de casos pendientes de confirmación encontrados en sus muestras considerando los valores de corte estimados (tabla 3). El estudio de Legini *et al.* 2011, sobre la actividad enzimática responsable de la enfermedad de Gaucher, proponía como valor de corte preliminar una medida de actividad enzimática de $4,2 \mu\text{mol/L/h}$ lo que implicaría en su estudio una tasa de casos pendientes de confirmación del $0,14\%$ (3/2088).

En la misma línea el estudio de Dajnoki et al. 2008 sobre la enfermedad de Pompe observaba que según su valor de corte de la actividad enzimática de más de 10.000 neonatos analizados sólo 4 mostraron valores inferiores al de corte por lo que debían de ser analizados de nuevo (tasa de casos por confirmar 0,039%). En ninguno de los estudios se pudo confirmar los posibles casos positivos al no disponer de información, por lo que no se ha podido estimar la proporción de falsos positivos.

Por otra parte, el estudio de Orsini *et al.* 2009 no ha propuesto como medida de corte para la detección de casos positivos y negativos, la medida absoluta de actividad enzimática sino el porcentaje de actividad media diaria (% DMA). Los autores han establecido esta medida con el objetivo de normalizar los datos dentro de un mismo día y evitar cambios en la estabilidad a largo plazo del método. Así esta medida intenta controlar los efectos debidos a la manipulación de las muestras, a la variabilidad de los reactivos utilizados y condiciones del ensayo, lo que facilita la comparación de resultados entre laboratorios. El estudio ha propuesto como corte tres valores de % DMA: 20%, 12% y 8%. Así en un primer análisis todas aquellas muestras cuyas medidas fueran <20% DMA debían ser analizadas de nuevo, tras el segundo análisis las muestras con valores de %DMA $\leq 8\%$ eran consideradas casos positivos y las que mostraban valores de %DMA $>12\%$ casos negativos. Las muestras con medidas comprendidas entre 8-12% DMA deberían de ser sometidas a pruebas de secuenciación de ADN para su evaluación definitiva.

En la tabla 3 se recogen los principales resultados obtenidos en los estudios analíticos que describían técnicas de medida de actividad de una única enzima lisosomal y que por consiguiente se referían al cribado de la enfermedad lisosomal correspondiente a la enzima estudiada en cada caso.

En la tabla 4 se recogen los resultados de los estudios que han descrito técnicas denominadas como multiensayos enzimáticos, es decir técnicas que permitían analizar de manera simultánea la actividad de varias enzimas lisosomales y que por consiguiente permitirían el cribado de varias enfermedades a la misma vez. Todos estos estudios se han desarrollado a partir de muestras de DBS como fuente de las enzimas de estudio. Las técnicas multiensayos consistían básicamente en la rehidratación de la muestra y la preparación de las diferentes mezclas de reacción, una mezcla por cada actividad enzimática a analizar. Posteriormente, se realizaba mediante diferentes técnicas la extracción de los productos resultantes de las reacciones enzimáticas, se mezclaban dichos productos y se cuantificaban simultáneamente mediante MS/MS. Sólo un estudio proponía un protocolo con una mezcla de reacción única para varias enzimas [Duffey *et al.* 2010a].

En cuanto a los estudios que utilizaban la cantidad de producto acumulado en la sangre o en la orina para la identificación de personas afectadas por deficiencias en enzimas lisosomales, el estudio de Tomatsu *et al.* 2010b analizó las concentraciones de heparan sulfato (HS) y dermatan sulfato (DS) en plasma y orina, como marcadores comunes de varias MPS y mucopolis. Comprobaron que en 3 neonatos afectados por MPS I, MPS VII y mucopolis I los niveles de HS+DS en plasma eran superiores a los encontrados en neonatos sanos control, sugiriendo que estos compuestos aparecen en concentraciones altas en pacientes al nacer lo que podría ser utilizado para un cribado neonatal de algunas MPS, aunque no permitiría distinguir entre estas MPS.

La mayor parte de los estudios han sido financiados por Asociaciones de afectados y empresas farmacéuticas con intereses en el campo como Genzyme Corporation y BioMarine Pharmaceuticals Inc. Todos los estudios con financiación privada indicaban que los patrocinadores no habían participado en el diseño, elección de los pacientes, revisión e interpretación de los datos.

Tabla 3: Resultados analíticos de los estudios centrados en la determinación de la actividad de una enzima lisosomal					
ESTUDIO	FUENTE DE LA ENZIMA	N	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA μmol/L h	Valor de corte /Porcentaje de casos por confirmar	Comentarios
POMPE					
Dajnokí et al. 2008	DBS (3,2 mm)	Neonatos: 10.279 Adultos: 229 Enfermos Pompe: 29 (Pompe infantil: 14 Pompe tardía: 15)	Media [SD]: Neonatos: 14,7 [7,2] Adultos: 9,3 [3,3] Enfermo: <2,0	<2 μmol/L/h / 0,039 % (4/10279)	-No encontraron diferencias de actividad entre los tipos, infantil y tardía, de la enfermedad. -Correlación R2>0,9 entre actividad y hematocrito. - CV- intra y CV-entre <10%. -LD:0,26 -LC:0,35 No detectaron ningún caso positivo
FABRY					
Scott et al.2009 (CC)	DBS (3mm)	Neonatos: - Enfermos: -	Neonatos: mediana 10 Enfermos: <2	<2	Comunicación a congreso con poca información sobre el ensayo utilizado, sin indicar número de participantes ni medidas de actividades.
Dajnokí et al. 2010	DBS (3,2 mm)	Cribado neonatal: Niños=5.025 Niñas=4.677 Enfermos con Fabry: Hombres adultos=9 Mujeres adultas=32 Neonatos=6	Cribado neonatal: mediana: Niños= 9,85±6,4 IC95% 9,67-10,02 Niñas= 10,2±6,3 IC95% 10,02-10,38 Rango: Niños: 1,8-146,5 Niñas:3-103,5 Enfermos con Fabry: Hombres <1,64 Mujeres <4,73 Neonatos<1,63	3,18 μmol/L/h 0,38% (28 niñas y 9 niños)	- CV-intra y entre <15%. - Correlación entre actividad y hematocrito: R²>0,9 -Con este punto de corte el 16% de las mujeres incluidas (5/32) estarían por encima por lo que se perderían como casos en el cribado.

Tabla 3: Resultados analíticos de los estudios centrados en la determinación de la actividad de una enzima lisosomal					
ESTUDIO	FUENTE DE LA ENZIMA	N	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA μmol/L h	Valor de corte /Porcentaje de casos por confirmar	Comentarios
KRABBE					
Orsini <i>et al.</i> 2009	DBS (3,2 mm)	Neonatos: 139,074 Portadores: 56 Enfermos Krabbe: 16	<i>Rango actividad:</i> Neonatos: 0,17-355 Portadores: 0,28-2,71 Enfermos Krabbe: 0,08-0,48 <i>Actividad promedio</i> [SD]: Neonatos: 4,74 [4,10] Portadores: 0,98 [0,52] Enfermos Krabbe: 0,2 [0,084]	Valor de corte basado en %DMA 1 ^{er} corte: >20% DMA casos negativos <20% DMA reanalizar 2º corte: > 12%DMA casos negativos <12% DMA realizar análisis ADN <8%DMA casos positivos	Propone el algoritmo para el cribado neonatal de la enfermedad de Krabbe que es utilizado en el programa de cribado del estado de Nueva York [Duffner <i>et al.</i> 2009]
			<i>Promedios %DMA:</i> Neonatos: 100 Portadores: 23,0 Enfermos Krabbe: 4,5		
			<i>Rango de %DMA:</i> Neonatos: 3,6-7880 Portadores: 6,4-60,6 Enfermos Krabbe: 1,9-10,9		
GAUCHER					
Legini <i>et al.</i> 2011	DBS (3,2 mm)	Neonatos: 2088 (48-72h) Gaucher tipo 1:10	<i>Media</i> [SD]: Neonatos:22,0[13,8] Gaucher tipo 1: <4,2	4,2 μmol/L/h 0,14% (3/2088)	LD: 0,75 μmol/Lh LC: 1,25 μmol/Lh CV- intra: <10% CV- entre: 10%

Tabla 3: Resultados analíticos de los estudios centrados en la determinación de la actividad de una enzima lisosomal					
ESTUDIO	FUENTE DE LA ENZIMA	N	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA μmol/L h	Valor de corte /Porcentaje de casos por confirmar	Comentarios
MPS					
Wang <i>et al.</i> 2005 MPS I	DBS (3mm)	Neonatos: 48 Portadores MPS I: 4 Enfermos MPS I: 14	Media/Mediana/Rango: Neonatos: 17,87/7,22/ 4,54-12,6 Portadores MPS 11,32/1,36/1,07-1,48 Enfermos MPS I: 0,066/0,065/0,007-0,11	nd	
Wang <i>et al.</i> 2007 MPS II	DBS (2mm)	Neonatos: 57 Enfermos MPS II:13	Media/Mediana/Rango Neonatos: 36,4/34,2/ 10,4-83,4 Enfermos MPS II: 0,81/0,64/0,044-1,9	nd	
Blanchard <i>et al.</i> 2008 MPS I	DBS (3 mm)	Neonatos: 10 Portadores MPS I: 5 Enfermos MPS I: 5	Media/rango: Neonatos: 12,3/7,4-23,4 Portadores MPS I: 2,9 / 1,4-5,6 Enfermos MPS I: 0,053 / 0-0,268	nd CV- intra: <10% CV- entre: < 10%	
Wolfe <i>et al.</i> 2011 MPS II	DBS (3mm)	Neonatos:75 Enfermos MPSII: 14	Media/rango: Neonatos 0,9,1/ 4,8-16,0 Enfermo MPS II 0,29/ 0,17-0,52	nd	CV- intra: 3,1% CV- entre: 15%

Tabla 3: Resultados analíticos de los estudios centrados en la determinación de la actividad de una enzima lisosomal					
ESTUDIO	FUENTE DE LA ENZIMA	N	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA μmol/L h	Valor de corte /Porcentaje de casos por confirmar	Comentarios
Khaliq <i>et al.</i> 2011 MPS IVa	DBS (2mm)	Neonatos: 30 Enfermos MPS IVa: 9	Media/rango: Neonatos 0,279/ 0,109-0,550 Enfermo MPS VI 0,0096/ 0,0019-0,0188	nd	CV- intra: 6,4% CV- entre: 8,3%
Duffey <i>et al.</i> 2010b MPS VI	DBS (3mm)	Neonatos: 89 Enfermos MPS VI: 1	Media/rango: Neonatos 7,4/ 1,4-16,9 Enfermo MPS VI 0,12/ -	nd	CV-intra=1,1% CV-entre=4,5%

AE Actividad enzimática, LD: límite de detección, LC: límite de cuantificación, CV- intra: coeficiente variabilidad intra-ensayo, CV- entre: coeficiente variabilidad entre ensayos, nd: no determinado, CC: comunicación a congresos; DMA actividad media diaria, SD: Desviación estándar.

Tabla 4: Resultados analíticos de los estudios con multiensayos enzimáticos incluidos en la revisión

ESTUDIO	N	ACTIVIDAD en neonatos y/o individuos sanos • μmol/L/h	ACTIVIDAD en individuos enfermos sanos • μmol/L h	Comentarios
Li <i>et al.</i> 2004b	Niños <1 año: 32	<i>Mediana/rango:</i> Niños <1 año: GAA: 4,58 / 1,36-10,8 GLA: 7,50 / 1,80-19,7 ABG: 6,04/ 1,77-19,2 ASM: 9,19/ 1,93-19,4 GALC: 2,02/ 0,81-2,93 Adultos no portadores: GAA: 3,59/ 1,24-8,50 GLA: 7,23/ 1,11-10,9 ABG: 6,54/ 2,01-13,6 ASM: 4,25/ 1,42-4,25 GALC: 1,75/ 0,94-2,53 <i>Valores mínimos actividad:</i> Adultos Portadores: GAA: 1,14 GLA: 0,59 ABG: 1,29 ASM: 0,67	Valor máximo actividad GAA: 0,17 GLA: 0,25 ABG: 0,47 ASM: 0,21 GALC: 0,23	Las actividades mostradas se obtuvieron utilizando un fragmento de 2mm del DBS para cada reacción enzimática (5 extracciones independientes). El estudio también ha descrito un tampón único para la extracción de las enzimas desde una sola DBS de 5mm. En este caso 10 μl de dicho tampón de extracción eran utilizados para cada reacción enzimática. Las actividades obtenidas con el tampón único fueron inferiores a las obtenidas con extracciones independientes desde 5 DBS de 2mm. Las actividades de GALC sólo se analizaron en 15 niños y 16 adultos sanos.
	Adultos:			
	No portadores: 20 portadores: GAA: 9 GLA: 5 ABG: 5 ASM: 5 Enfermos: GAA: 11 GLA: 5 ABG: 5 ASM: 5 GALC: 9			

Tabla 4: Resultados analíticos de los estudios con multiensayos enzimáticos incluidos en la revisión				
ESTUDIO	N	ACTIVIDAD en neonatos y/o individuos sanos • $\mu\text{mol/L/h}$	ACTIVIDAD en individuos enfermos sanos • $\mu\text{mol/L/h}$	Comentarios
Zhang <i>et al.</i> 2008	Neonatos:100 Adultos sanos: 149 Enfermos: 60 Pompe:14 Fabry:13 Niemann-Pick: 10 Gaucher: 13 Krabbe:10	Mediana/rango: Neonatos: GAA: 7,77/ 2,26-21,99 GLA: 4,62/ 2,22-14,46 ABG: 8,28/ 3,99-16,52 ASM: 3,52/ 1,09-8,60 GALC: 1,36/ 0,42-5,32 Adultos: GAA: 7,53/ 2,51-18,31 GLA: 4,67/ 2,21-11,73 ABG: 9,31/ 4,14-17,13 ASM: 4,96/ 1,76-20,89 GALC: 1,94/ 0,63-8,05	Mediana/rango: GAA: 0,30/ 0,00-0,44 GLA: 0,63/0,22-0,98 ABG: 0,45/ 0,00-1,25 ASM: 0,48/0,00-0,89 GALC: 0,16/0,00-0,32	Optimización del ensayo múltiple de Li <i>et al.</i> 2004b, logran que la mediana de las actividades en adultos sanos aumente 2-3 veces con respecto al ensayo original.
	Neonatos:5000 Adultos: No portadores: 300 Portadores: Fabry 18 Pompe 10 Gaucher 4 Enfermos: Pompe:10 Fabry:12 Niemann-Pick: 4 Gaucher: 6 Krabbe: 2	Mediana/Rango: Neonatos: Pompe: 11,56/ 2,31-27,38 Gaucher: 11,65/ 2,2-47,71 Fabry:11,95/ 1,13-36,6 Niemann-Pick:2,43/ 0,56-7,43 Krabbe: 1,41/ 0,5-5,64 Adultos No portadores: Pompe: 6,56/1,86-21,88 Gaucher: 14,4/ 1,72-38,33 Fabry: 21,2/ 5,71-49,02 Niemann-Pick: 1,78/ 0,42-5,55 Krabbe: 3,38/ 1,01-10,07 Adultos portadores: Pompe: -/2,72-4,85 Gaucher: -/3,4-8,89 Fabry: -/ 1,01-5,87	Valor máximo actividad: Pompe: 0,13 Gaucher: 0,45 Fabry:0,40 Niemann-Pick: 0,08 Krabbe: 0,20	Es un método simplificado que reduce el tiempo de análisis al no tener proceso de preparación de la muestra tras la reacción enzimática ya que extraen los productos para el MS/MS pasando las mezclas de reacción por dos columnas cromatográficas. Utilizan 5 DBS una por cada mezcla de reacción CV-en un mismo día: entre 1,31%-8,27% para los cinco ensayos enzimáticos. CV-entre diferentes días: 5,44%-15,74% para los cinco ensayos enzimáticos.

Tabla 4: Resultados analíticos de los estudios con multiensayos enzimáticos incluidos en la revisión

ESTUDIO	N	ACTIVIDAD en neonatos y/o individuos sanos • μmol/L/h	ACTIVIDAD en individuos enfermos sanos • μmol/L h	Comentarios
Duffey et al. 2010a	Neonatos: 5.990 <u>Enfermos:</u> Pompe: 11 Fabry: 5 MPS I: 8	<i>Medias/Medianas:</i> Pompe:19,0/17,6 Fabry:11,5/10,2 MPS I (Hurler): 3,5/3,3	<i>Medias / rango:</i> Pompe: 0,52/0,17-0,71 Fabry:0,54/0,52-0,80 MPS I: 0,42/0,28-0,74	Optimización de un ensayo con una mezcla de reacción única para tres enzimas lisosomales. Estiman las actividades de las enzimas en neonatos y en pacientes, y el ensayo distingue los enfermos de los sanos.
Kasper et al. 2010	Neonatos: 51 <u>Enfermos:</u> Pompe:2 Fabry:7 Niemann-Pick: 1 Gaucher: 7	<i>Medias/rango:</i> Pompe:10,39/ 4,35-26,1 Fabry:5,29/ 1,89-28,28 Niemann-Pick: 0,09/ 1,11-5,76 Gaucher: 4,85/ 2-14,27	<i>Medias/rango:</i> Pompe:0,25/0,15-0,35 Fabry:1,67/0,38-2,54 Niemann-Pick: 0,36/ - Gaucher: 0,34/0,18-0,55	Estos datos indicaban que se habrían detectado todos los casos positivos en tres de las cuatro enfermedades. Solamente en el caso de Fabry existía solapamiento de las actividades entre los casos positivos y negativos.

LD: límite de detección, LC: límite de cuantificación, V- intra: variabilidad intra-ensayo, V- enter: variabilidad entre ensayos, nd: no determinado, ABG: enzima afectada en Gaucher; ASM: enzima afectada en Niemann-Pick; GAA: enzima afectada en Pompe; GALT: enzima afectada en Krabbe, GLA: enzima afectada en Fabry.

Estudios de cribado

Las referencias que aportaban datos sobre cribado de enfermedades lisosomales por MS/MS correspondían a dos estudios piloto de cribado de las enfermedades de Fabry y Pompe y a un programa de cribado para la enfermedad de Krabbe llevado a cabo por el estado de Nueva York.

Las referencias sobre el cribado piloto, mediante MS/MS y utilizando DBS como fuente de enzima, realizado en Austria de las enfermedades de Pompe [Bodamer *et al.*, 2008b] y Fabry [Bodamer *et al.*, 2008c] se correspondían a comunicaciones a congresos con escasa información por lo que no fue posible valorar de manera adecuada los resultados del cribado. Las comunicaciones aportaban datos preliminares sobre las medidas de actividad detectadas en las DBS de los neonatos, de individuos sanos y de individuos adultos enfermos y demostraban que las actividades en los sanos y neonatos eran inferiores a las encontradas en los pacientes diagnosticados. El estudio del pilotaje de la enfermedad de Fabry (enfermedad ligada al cromosoma X) [Bodamer *et al.*, 2008c] estimaba que en la población masculina sana la actividad enzimática lisosomal responsable de la misma era $> 1,0 \mu\text{mol/L h}$ mientras que en la población masculina enferma la actividad era $< 0,3 \mu\text{mol/L h}$. Aunque no mencionaba el número de muestras analizadas de las que se obtenía esta estimación. Por su parte, en el estudio piloto de la enfermedad de Pompe [Bodamer *et al.*, 2008b] que analizó una población de 10.000 neonatos y utilizó como control la actividad enzimática de 29 enfermos, los enfermos presentaban niveles de actividad enzimática $< 0,8 \mu\text{mol/L h}$ y 2 de 7500 neonatos presentaron actividades comprendidas entre 1,0 y $2,0 \mu\text{mol/L h}$. y ningún caso con actividad inferior a $1,0 \mu\text{mol/L h}$. El estudio no aportaba datos sobre la actividad media de los 10.000 neonatos estudiados.

En resumen, ambos estudios piloto concluían que el cribado era factible aunque no aportaban datos sobre la sensibilidad y especificidad del programa de cribado ni información sobre los beneficios en salud de los mismos [Bodamer *et al.*, 2008b; 2008c].

Por otra parte, se ha localizado el programa de cribado para la enfermedad de Krabbe puesto en marcha en agosto de 2006 en el Estado de Nueva York [Duffner *et al.* 2009a]. El programa describía el protocolo de cribado y posterior evaluación de aquellos niños identificados como casos positivos. El tratamiento disponible para la enfermedad es el trasplante de células hematopoyéticas y el trasplante parece ser beneficioso sólo en niños asintomáticos, por lo que el cribado podría

identificar aquellos candidatos adecuados para el tratamiento. El protocolo está basado en el algoritmo para la enfermedad de Krabbe propuesto por Orsini *et al.* 2009 y establecía los siguientes puntos:

- El cribado se realizaba mediante espectrometría de masas en tándem utilizando DBS como fuente de la enzima.
- Diariamente se estimaba el porcentaje medio de actividad de la enzima galactosilceramidasa calculado a partir de las medias de todos los niños analizados ese día.
- Los niños cuya actividad fuera $< 20\%$ de la actividad media diaria eran analizados de nuevo para minimizar los falsos positivos debidos a posible contaminación.
- Los reanalizados cuya actividad fuera $\leq 8\%$ de la actividad media diaria eran enviados a los centros de análisis de ADN.
- Se realizaba el análisis genético del gen *GALC* para identificar mutaciones; y así poder distinguir entre individuos enfermos (homocigotos) y portadores (heterocigotos).
- Los casos positivos eran confirmados mediante ensayos de actividad en células sanguíneas y enviados a centros de referencia de tratamiento de TMH.
- Los casos positivos eran clasificados en tres categorías de riesgo según los niveles de actividad enzimática en leucocitos: alto riesgo (0,0-0,15 nmol/h/mg proteína), riesgo moderado (0,16-0,29 nmol/h/mg proteína) y bajo riesgo (0,3-0,5 nmol/h/mg proteína).

Los datos recogidos hasta 2008 por el programa mostraron que de 550.000 recién nacidos analizados en el cribado 25 dieron positivo en la prueba. De los 25 casos positivos 4 casos fueron catalogados de alto riesgo, 6 de riesgo moderado y 15 de bajo riesgo. De los 4 casos de alto riesgo sólo 2 fueron, mediante análisis genéticos, diagnosticados con la presentación infantil temprana de la enfermedad. Los dos casos confirmados con el tipo infantil de la enfermedad fueron tratados mediante trasplante de células hematopoyéticas de cordón umbilical antes de los 28 días de vida. Uno de los niños falleció durante la intervención y el otro no había desarrollado hasta el momento los síntomas de la enfermedad aunque presentaba retraso en su desarrollo. Los otros dos recién nacidos identificados como de alto riesgo y no tratados no habían desarrollado la enfermedad a los 16 y 8 meses. Estos resultados supondrían un valor predictivo positivo de la prueba del 8% (2/25), los 21 casos con riesgo moderado o bajo no desarrollaron síntomas [Duffner *et al.* 2009a].

Discusión

La espectrometría de masas en tándem (MS/MS) es una técnica analítica rápida que permite analizar los productos metabólicos a partir de una muestra pequeña como las que se obtienen para la prueba de talón (DBS). Además, tiene la ventaja de poder analizar de manera simultánea los productos resultantes de varias actividades enzimáticas, facilitando la elaboración del perfil metabólico de los individuos analizados. Esta técnica está disponible en un gran número de laboratorios lo que ha impulsado su incorporación reciente en los cribados neonatales.

En los últimos años la incorporación de MS/MS ha permitido la ampliación de los cribados neonatales a enfermedades metabólicas entre las que se incluyen la enfermedad de la orina del jarabe de arce, la homocistinuria, la aciduria isovalérica, la deficiencia de acil-CoA-deshidrogenasa de cadena larga etc. Los cribados neonatales realizados con esta técnica no siempre han sido evaluados, por lo que en muchos casos no se ha podido confirmar de manera concluyente su utilidad clínica. El informe sobre la efectividad clínica del cribado neonatal de los TMH por MS/MS del Ministerio de Sanidad y Consumo, elaborado por Avalia-T en 2007 [Paz Valiñas *et al.*, 2007], puso de manifiesto que la MS/MS era una técnica rápida y altamente sensible y específica para la detección del déficit de MCAD (deficiencia de acil-CoA-deshidrogenasa de cadena media) y de la fenilcetonuria, pero no encontró evidencia suficiente para el resto de errores congénitos. En la misma línea, el informe del 2010 de la Fundación PHG concluyó que la evidencia disponible era favorable a la inclusión en el cribado neonatal de: la enfermedad de la orina del jarabe de arce, la homocistinuria, la acidemia isovalérica, la deficiencia de acil-CoA-deshidrogenasa de cadena larga y la aciduria glutárica tipo I; aunque recomendaba la realización de un estudio piloto a gran escala con el fin de evaluar su impacto en el sistema y su utilidad [Burton y Moorthie, 2010].

Para que una enfermedad sea incluida dentro de un cribado neonatal debe de cumplir una serie de condiciones [Watson *et al.* 2006] que la mayoría de las enfermedades metabólicas no cumplen, de ahí que solamente unas pocas hayan sido incorporadas a los programas de cribado neonatal. Dentro de las enfermedades metabólicas no incluidas en los cribados neonatales se encuentran las enfermedades de almacenamiento lisosomal que presentan un amplio espectro de manifestaciones clínicas que en la mayoría de los casos afectan al SNC (Sistema Nervioso Central). Entre los tratamientos disponibles para estas enfermedades se encuentran el trasplante de células

hematopoyéticas y la terapia de sustitución enzimática, y aunque parecen reducir parcialmente la sintomatología de los pacientes, la eficacia de estos tratamientos no está demostrada de forma concluyente. Las enzimas lisosomales recombinantes intravenosas aportadas en las TSE no atraviesan la barrera hematoencefálica por lo que no evitan el daño cerebral causado por estas enfermedades. Esta falta de eficacia de la TSE a nivel del SNC hace que sea conveniente abordar el inicio de los tratamientos antes de que estos daños cerebrales tengan lugar y sean graves e irreversibles. Para ello, es de vital importancia identificar aquellos individuos asintomáticos que desarrollaran la enfermedad en algún momento de su vida. Aunque las enfermedades lisosomales no cumplen algunas de las condiciones establecidas para ser incluidas en un cribado neonatal como son la de ser enfermedades de alta incidencia y la de disponer de terapias efectivas [Watson *et al.* 2006], la seriedad de los síntomas que en muchas EAL aparecen en los primeros meses de vida, pone de manifiesto la necesidad de una identificación precoz de las personas afectadas con el fin de modificar el curso natural de la enfermedad. Para esta identificación precoz se ha propuesto la inclusión de estas enfermedades en los programas de cribado neonatal, lo que podría ser en principio una solución adecuada dadas las características de las enfermedades.

En cualquier caso es necesaria una evaluación de la efectividad del cribado de estas enfermedades para poder confirmar su beneficio a la población.

La evidencia disponible sobre cribado de EAL se centra principalmente en estudios de puesta a punto de las pruebas analíticas de detección de las enfermedades para identificar correctamente a los individuos sanos de los enfermos. Esta puesta a punto se desarrolla generalmente mediante la optimización de los ensayos de medida de actividad de las enzimas afectadas en cada enfermedad.

A lo largo del tiempo los protocolos han ido desarrollándose con el objetivo de optimizar la prueba analítica, simplificar lo máximo posible el proceso y adaptarlo a un cribado neonatal. De ahí que los estudios encontrados recorran un amplio rango temático que abarca desde la puesta a punto de ensayos de cada una de las enzimas lisosomales de interés y de análisis de los productos por MS/MS [Li *et al.* 2004b] pasando por el desarrollo de métodos conjuntos de análisis de los productos de diferentes reacciones enzimáticas por MS/MS de forma simultánea hasta llegar a métodos como el propuesto por Duffey *et al.* 2010 donde se realizan varias reacciones de forma simultáneamente para el posterior análisis por MS/MS de todos los productos obtenidos en la reacción multienzimática.

La actividad de cada enzima depende de una serie de parámetros críticos como el pH, la concentración de detergentes, la composición de los tampones o el sustrato. Esto significa que para poder analizar e identificar simultáneamente mediante MS/MS los productos de diferentes reacciones enzimáticas es necesario encontrar previamente una mezcla de reacción donde pueda tener lugar la actividad de varias enzimas de manera simultánea. Ello puede resultar una tarea difícil que requiera un proceso de optimización laborioso que no siempre conduce a un resultado satisfactorio. Una mezcla de reacción única debe reunir condiciones óptimas para todas las reacciones sin que se favorezca a una enzima en detrimento de otras y así poder tener una medida precisa y fiable de todas. La mayoría de los estudios analíticos identificados en esta revisión, tanto los centrados en una enzima como algunos de los multiensayos enzimáticos, realizaban las reacciones enzimáticas de manera independiente para cada una de las enzimas lisosomales. Los estudios centrados en una única actividad enzimática analizaban directamente los productos obtenidos de la misma mediante MS/MS, mientras que la mayoría de los estudios con multiensayos eran denominados así porque lo que realizaban era un análisis conjunto de los productos procedentes de varias reacciones enzimáticas, para ello realizaban las reacciones enzimáticas de forma independiente, posteriormente mezclaban los productos resultantes de cada una de ellas y los analizaban de forma simultánea por MS/MS.

En el desarrollo de métodos de cribado para las EAL mediante la utilización de MS/MS se ha observado que existen dos factores limitantes a la hora de estandarizar las pruebas analíticas que permitan cuantificar las actividades de las enzimas lisosomales implicadas en cada una de las enfermedades. Estos factores son básicamente el sustrato y el estándar interno utilizado en el ensayo, estos factores son importantes ya que la cantidad de producto sintetizado depende de la cantidad de sustrato inicial suministrada en la reacción y además su estimación se calcula en función del estándar interno utilizado. Otro factor limitante es la denominada interferencia isobárica que se describe a continuación: la alta especificidad de los métodos de MS-MS está unida al análisis combinado de las moléculas precursoras ionizadas (analizadas en analizador de masas 1) y los fragmentos resultantes de las mismas (analizador de masas 2). Pero, aunque esto le confiere una gran especificidad, la presencia de dos moléculas con el mismo peso molecular (PM) que se fragmenten de modo similar, provoca una interferencia en la cuantificación de las mismas. Todas estas consideraciones técnicas hacen necesario el análisis de diferentes sustratos sintéticos, diferentes estándares internos, y diferentes combinaciones de ambos para minimizar o evitar las interferencias y lograr resultados fiables.

La validación analítica de los diferentes ensayos se llevó a cabo evaluando la precisión y reproducibilidad de las medidas mediante la estimación de los coeficientes de variabilidad intra-ensayo y entre-ensayo. Los ensayos mostraron unos valores de variabilidades intra y entre-ensayo inferiores al 10-15 %, valores que son considerados de forma consensuada aceptables y que reflejarían una buena reproducibilidad del ensayo.

Una vez comprobada las propiedades analíticas de los ensayos, los estudios pasaron a analizar su posible validez clínica realizando la prueba a individuos neonatos sanos y a individuos enfermos con el fin de comparar los resultados y comprobar si la prueba permitía distinguir entre ambas poblaciones. Los estudios han comparando las actividades enzimáticas obtenidas de las cartas de cribado neonatal con las actividades de las enzimas procedentes de pacientes diagnosticados con la enfermedad de interés. Los pacientes, en la mayoría de los casos, eran adultos o niños no recién nacidos. Esta comparación de medidas de actividad permitiría en un principio tener una idea aproximada de los niveles de actividad en individuos sanos y enfermos. El disponer de cartas de cribado procedentes de neonatos que se han desarrollado como individuos sanos ha permitido conocer de manera retrospectiva los niveles de actividad enzimática en ellos aunque se desconocen los valores de actividad enzimática en neonatos sintomáticos. No se puede estimar la especificidad y sensibilidad del cribado mediante esta técnica ya que los estudios no aportaron información prospectiva de los individuos del cribado. Es necesario comprobar si los resultados positivos de la técnica en neonatos son confirmados como verdaderos positivos o qué porcentaje de falsos positivos y negativos se obtendrían.

Todos estos estudios realizados hasta la fecha con resultados prometedores deben confirmarse de forma prospectiva en estudios piloto con un mayor número de individuos que permita realizar una adecuada y clara interpretación (validez analítica) de los resultados. Por lo tanto, la evidencia disponible procedente de datos preclínicos muestra la viabilidad de ensayos enzimáticos para el cribado neonatal de las EAL pero no permite una estimación realista a largo plazo de su utilización en programas de cribado y de su potencial beneficio en salud. Es necesario esperar a la optimización de las técnicas de cribado con estos métodos de MS/MS para poder valorar el resultado en la salud de los pacientes detectables por ellos y determinar su utilidad clínica. Estos resultados permitirían evaluar los beneficios y riesgos de los pacientes afectados.

En la actualidad se disponen de pocos datos prospectivos sobre el cribado neonatal de enfermedades lisosomales. Uno de estos estudios prospectivos fue el programa piloto de cribado de la enfermedad de Pompe llevado a cabo en Taiwan entre 2005 y 2007. En este estudio se

analizaron 132.538 recién nacidos mediante un ensayo de fluorimetría, al 0,9% de los niños (1.093) se les realizó un segundo análisis con una muestra independiente y 121 neonatos (0,091%) fueron evaluados mediante pruebas adicionales para el diagnóstico. Se confirmaron 4 casos de recién nacidos con enfermedad de Pompe, por lo que el cribado con el ensayo fluorométrico presentó un VPP de 3,3%. Esta experiencia mostró que el cribado era viable y capaz de detectar los niños afectados por la enfermedad [Chien *et al.* 2008]. Además se observó que el tratamiento precoz de los casos positivos mediante sustitución enzimática mejoraba la sintomatología [Chien *et al.* 2009]. Si bien, aunque el programa de cribado destaca por su elevada sensibilidad, también se observó un elevado número de falsos positivos (117 de 121, 96,7%). No hay que olvidar que una alta proporción de falsos positivos además de llevar asociado un alto nivel de estrés y ansiedad en las familias afectadas [Waisbren *et al.* 2003], supone un coste económico que el sistema de salud debe tener en consideración ya que los casos positivos deben ser seguidos y evaluados mediante otras técnicas para la confirmación del diagnóstico, sin olvidar que estamos hablando de una enfermedad con muy baja prevalencia. Esto sugiere la necesidad de una técnica que sea a la vez muy sensible, ya que se trata de un cribado, y que no produzca tantos falsos positivos. Por otra parte, no se dispone información de los posibles falsos negativos, puesto que no se detectó ningún caso de presentación tardía y se desconoce la posible aparición de los mismos. Estos casos también son importantes ya que su identificación permitiría la incorporación de los pacientes en programas especiales de seguimiento.

La optimización de las técnicas de los ensayos enzimáticos y MS/MS hace esperable una mejora en la sensibilidad y especificidad de los métodos de cribado en un futuro próximo. Dentro de esta línea, datos preliminares de la comparación las medidas de actividad enzimática obtenidas por los métodos de cribado de MS/MS y de fluorimetría han mostrado que la MS/MS parece ser más sensible que la fluorimetría. También, se ha observado que la fluorimetría es una prueba válida para el diagnóstico de las enfermedades de Fabri, Niemann-Pick y Pompe pero no para la enfermedad de Gaucher [Lukacs *et al.* 2009]. Algunos autores sugieren la utilización del método fluorométrico como segunda prueba confirmatoria con el fin de aumentar la especificidad del cribado [Matern *et al.* 2009].

Actualmente se están realizando en diferentes países estudios piloto de cribado mediante MS/MS aunque aún no se han publicado sus resultados definitivos. Los datos preliminares aportados de forma prospectiva por el cribado de la enfermedad de Krabbe mediante MS/MS llevado a cabo en Nueva York ha puesto de manifiesto que no existe una buena correlación entre el fenotipo, la actividad enzimática de la galactoceremidasa y el genotipo.

El cribado ha analizado 550.000 neonatos y ha identificado 25 casos positivos, 4 de ellos fueron catalogados (según el algoritmo utilizado) como de alto riesgo; de estos 4 positivos de alto riesgo 2 no desarrollaron síntomas, y de los 21 casos positivos catalogados como de riesgo moderado o bajo ninguno había desarrollado síntomas hasta la fecha de publicación de los datos. Por lo tanto, ni los resultados de actividad enzimática ni los análisis de ADN han permitido predecir los individuos que van a desarrollar los síntomas y la gravedad de los mismos. Hasta la fecha de publicación, no es posible establecer de manera clara las propiedades diagnósticas del procedimiento (sensibilidad, especificidad, VPP, VPN) al no disponer de la suficiente información sobre el seguimiento de los casos positivos así como de los casos negativos del cribado, si bien el estudio presentó un VPP del 8% (2/25) éste puede aumentar si desarrollaran nuevos individuos la enfermedad [Duffner *et al.* 2009a]. Estos resultados, ponen de manifiesto la dificultad que supone el establecer los puntos de corte de las medidas de actividad enzimática lisosomal para ajustar de manera fiable los criterios que permitan clasificar de manera lo más precisa posible los casos de los no casos y reducir de esta manera los falsos positivos sin perder sensibilidad. El establecimiento de los límites de corte es un punto difícil en el cribado neonatal debido a la heterogeneidad de fenotipos (diferentes grados de severidad de las enfermedades) que complica la identificación de los casos. De hecho el cribado de Nueva York ha puesto de manifiesto que una actividad baja o moderada de la enzima galactocerebrosidasa y el análisis genético de las mutaciones no parecen ser suficientes como predictores del desarrollo de los síntomas clínicos, por lo que se ha planteado la necesidad de buscar otros datos clínicos y neurológicos que ayuden a resolver esta cuestión. Para la búsqueda de estos nuevos biomarcadores se está utilizando el registro internacional de pacientes con la enfermedad de Krabbe establecido en 2008 [Duffner *et al.* 2011]. En un estudio de cribado realizado en Austria con un multiensayo enzimático que analizaba las enfermedades de Pompe, Gaucher, Niemann-Pick A y B y Fabry y que ha sido publicado con fecha posterior a la de la búsqueda bibliográfica, se ha mostrado que en el cribado de 34.736 recién nacidos se detectaron 38 casos positivos (4 de Gaucher, 5 de pompe, 28 de Fabry y 1 de Niemann-Pick) de los cuales sólo 15 fueron confirmados por análisis genético por lo que el VPP total del cribado fue del 40% (IC95% 24-57%). Si bien para cada enfermedad los VPP encontrados fueron para Gaucher un VPP=50% (IC95% 7-93%), para Pompe un VPP=80% (IC95% 28-99%), para Fabry un VPP=32% (IC95% 16-52%) y para Niemann-Pick un VPP=0 (IC95% 0-95%). Los autores no detectaron

correlación entre la mutación y la baja actividad enzimática. Además, la proporción de neonatos portadores de alteraciones génicas fue mayor de la esperada y el 75% de las mutaciones estaban asociadas a fenotipos de presentación tardía o progresión lenta de la enfermedad [Mechtler *et al.* 2012].

Los datos aportados por los cribados que actualmente se están realizando podrán servir en un futuro para ajustar y valorar de manera precisa los programas de cribado para estas enfermedades. Aunque algunos estudios sugieren que el cribado es factible, todavía quedan muchos puntos de incertidumbre sobre los que es necesario profundizar como son el establecimiento de los puntos de corte para determinar los casos positivos y negativos, las diferencias de actividades enzimáticas entre mujeres y hombres (ejemplo en la enfermedad de Fabry) así como la falta de correlación entre las medidas de actividad enzimática y los fenotipos a desarrollar por los afectados.

En resumen, actualmente el cribado por MS/MS de las EAL se encuentra todavía en una fase muy temprana de su desarrollo, existiendo áreas de incertidumbre que deben de ser aclaradas antes de su incorporación en una posible ampliación del cribado neonatal de TMH. Además, no se dispone de evidencia que demuestre la utilidad clínica del cribado neonatal de las EAL mediante MS/MS al no haberse demostrado su impacto o beneficio sobre la salud de la población.

En cualquier caso, el desarrollo de estas técnicas de cribado debe ir acompañado de una seria reflexión ética. Hasta el momento, no se dispone de tratamiento terapéutico eficaz para una gran parte de las EAL conocidas y sobre los tratamientos disponibles, principalmente la terapia enzimática sustitutiva y el trasplante de células de cordón umbilical, se desconoce su eficacia y seguridad a largo plazo aunque algunos estudios presentan resultados de eficacia a corto plazo. Así, la perfusión de las enzimas recombinantes de los TSE lleva asociada un riesgo de desarrollo de anticuerpos que pueden inhibir la acción de la enzima. Este tipo de reacciones se ha observado en pacientes con MPS I, II y VI y con Gaucher [Valayannopoulos *et al.* 2011]. En el mismo sentido, estudios recientes han encontrado que la TSE en enfermos de Pompe de aparición tardía estimulaba la respuesta de las células T y la formación de anticuerpos específicos lo que podría afectar a la eficacia del tratamiento [Banati *et al.* 2011].

En el caso concreto de la enfermedad de Krabbe, para la cual ya se dispone de resultados de implementación y medidas de corte para clasificar a los individuos en sanos y enfermos con vistas a un cribado poblacional [Orsini *et al.* 2009; Duffner *et al.* 2009a], los datos disponibles a largo plazo de los pacientes asintomáticos tratados (transplantados con

células hematopoyéticas procedentes generalmente de sangre de cordón umbilical) han mostrado que si bien sobrevivían más tiempo que los no tratados, la mayoría de ellos desarrollaban microcefalia, y deficiencias motoras y neurológicas a lo largo del seguimiento. Los modelos animales también han mostrado que el trasplante aunque aumenta el tiempo de supervivencia no cura la enfermedad y todos los animales transplantados morían finalmente a causa de ella [Duffner *et al.* 2009b]. Dentro de esta reflexión ética también hay que tener en consideración que muchas de estas enfermedades son hereditarias y de difícil diagnóstico lo que hace del cribado una herramienta muy útil para su detección precoz y así, permitir el consejo genético a los padres afectados antes de tener varios hijos con la misma enfermedad.

La falta de datos sobre la eficacia a largo plazo de los tratamientos disponibles junto con el desconocimiento en muchos casos del momento más adecuado para el inicio del tratamiento y la complejidad existente entre la relación genotipo-fenotipo de estas enfermedades hacen necesario el consejo genético en estas enfermedades. El consejo genético en estos casos es vital para la comprensión de la enfermedad por parte de las familias afectadas lo que facilita la adecuación de sus expectativas a la realidad de la enfermedad. El consejo genético puede por lo tanto ayudar y facilitar la toma de decisiones a las familias portadoras de mutaciones ya que les permitirá conocer la probabilidad de tener más descendientes afectados antes de un nuevo embarazo. En el caso concreto de las EAL originadas por mutaciones autosómicas recesivas la probabilidad de tener un hijo enfermo es de un 25%.

Este es un claro ejemplo de la necesidad de la responsabilidad compartida entre médico y paciente/familia en la toma de decisiones.

Referencias

- AAP Newborn Screening Task Force (2000). Serving the family from birth to the medical home: Newborn screening: a blueprint for the future– a call for a medical agenda on state newborn screening programs. *Pediatrics*, 106, 386-427.
- Agency for Healthcare Research and Quality (AHRQ). (2012). *Hematopoietic Stem-Cell Transplantation in the Pediatric Population*. Rockville: AHRQ Publication No. 12-EHC018-EF.
- Banati, M., Hosszu, Z., Trauninger, A., Szereday, L., Illes, Z. (2011). Enzyme replacement therapy induces T-cell responses in late-onset Pompe disease. *Muscle nerve*, doi: 10.1002/mus.22136. [Epub ahead of print].
- Barba-Romero, M.A., Rivera-Gallego, A., Pintos-Morell, G., on behalf of the Spanish FOS-Study Group. (2011). Fabry disease in Spain: description of Spanish patients and comparison with other European countries using data from the Fabry Outcome Survey (FOS): *Int J Clin Pract.*, doi: 10.1111/j.1742-1241.2011.02695.x. [Epub ahead of print].
- Barr, C., Clarke, J.T.R., Ntwari, A., Drouin, R., Auray-Blais, C. (2009). Fabry disease urinary globotriaosylceramide/creatine biomarker evaluation by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in healthy infants from birth to 6 months. *Mol Genet Metab.*, 97, 278-283.
- Blanchard, S., Sadilek, M., Scott, C.R., Turecek, F., Gelb, M.H. (2008). Tandem mass spectrometry for the direct assay of lysosomal enzymes in dried blood spots: application to screening newborn for Mucopolysaccharodosis I. *Clin Chem.*, 54, 2067-2070.
- Bodamer, O.A. (2008c). Newborn screening in Fabry disease: what can be achieved with early diagnosis? *Clin Ther.*, 30 (suppl B), S41.
- Bodamer, O.A., Dajnoki, A., Fekete, G., Keutzer, J., Orsini, J., De Jesus, V. *et al.* (2008a). Newborn screening of lysosomal storage disorders in Austria. *Clin Ther.*, 30 (suppl 3), S78.

- Bodamer, O.A., Dajnoki, A., Fekete, G., Keutzer, J., Orsini, J., De Jesus, V. *et al.* (2009). Newborn screening for Fabry disease by measuring GLA activity using tandem mass spectrometry. *Mol Genet Metab.*, 98, 108.
- Bodamer, O.A., Keutzer, J., Zhang, K., Hwu, W-L., Muhl, A. (2008b). Screening of newborn for Pompe disease and/or other lysosomal storage disorders. *Clin Ther.*, 30 (suppl 1), S8.
- Burton, H., Moorthie, S. (2010). Expanded newborn screening. A review of the evidence. (2nd Edition) Cambridge: PHG Foundation.
- Chabrol, B. (2010). La maladie de Niemann-Pick type C: aspects thérapeutiques. *Arch Pediatr.*, 17 Suppl 2, S54-57.
- Chien, Y-H., Chiang, S-C., Zhang, X.K., Keutzer, J., Lee, N-C., Huang, A-C. *et al.* (2008). Early detection of Pompe disease by newborn screening is feasible: results from the Taiwan Screening Program. *Pediatrics*, 122, e39-e45.
- Chien, Y-H., Lee, N-C., Thurberg, B.L., Chiang, S-C., Zhang, X.K., Keutzer, J. *et al.* (2009). Pompe disease in infants: improving the prognosis by newborn screening and early treatment. *Pediatrics*, 124, e1116-1125.
- Cox, T. M., and Schofield, J. P. (1997) *Gaucher's disease: Clinical features and natural history*. En *Gaucher's Disease: Bailliere's Clinical Haematology* (Zimran, A., Ed.), Vol. 10, pp. 657–689. Saunders, Cambridge, UK.
- Cruse RP. Overview of Niemann-Pick disease. Patterson MC, Firth HV Eds. UpToDate [Internet: consultada 21 julio 2011]. Disponible en: http://www.uptodate.com/contents/overview-of-niemann-pick-disease?source=related_link.
- Dajnoki, A., Fekete, G., Keutzer, J., Orsini, J., De Jesus, V.R., Chien, Y-H. *et al.* (2010). Newborn screening for Fabry disease by measuring GLA activity using tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta.*, 411, 1428-1431.
- Dajnoki, A., Mühl, A., Fekete, G., Keutzer, J., Orsini, J., DeJesus, V. *et al.* (2008). Newborn screening for Pompe disease by measuring acid α -Glucosidase activity using tandem mass spectrometry. *Clin Chem.*, 54, 1624-1629.

- Duffey, T.A., Bellamy, G., Elliot, S., Fox, A.C., Glass, M., Turecek, F. *et al.* (2010a). A tandem mass spectrometry triplex assay for the detection of Fabry, Pompe and Mucopolysaccharidosis I (Hurler). *Clin Chem.*, 65, 1854-1861.
- Duffey, T.A., Sadilek, M., Scott, C.R., Turecek, F., Gelb, M.H. (2010b). Tandem mass spectrometry for the direct assay of lysosomal enzymes in dried blood spots: application to screening newborns for Mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy Syndrome). *Anal Chem.*, 82, 9587-9591.
- Duffner, P.K., Barczykowski, A., Jalal, K., Yan, L., Kay, D.M., Carter, R.L. (2011). Early infantile Krabbe disease: results of the World-wide Krabbe Registry. *Pediatr Neurol.*, 45, 141-148.
- Duffner, P.K., Caggana, M., Orsini, J.J., Wenger, D.A., Patterson, M.C., Crosley, C.J. *et al.* (2009a). Newborn screening for Krabbe disease: the New York State model. *Pediatr Neurol.* 40, 245-252.
- Duffner, P.K., Caviness Jr, V.S., Erbe, R.W., Patterson, M.C., Schultz, K.R., Wenger, D.A. *et al.* (2009b). The long-term outcomes of presymptomatic infants transplanted for Krabbe disease: report of the workshop held on July 11 and 12, 2008, Holiday Valley, New York. *Genet Med.* 11, 450-454.
- El Dib, R.P., Pastores, G.M. (2010). Enzyme replacement therapy for Anderson-Fabry disease. Cochrane Database of Systematic Reviews, Issue 5.Art. Nº: CD006663.DOI: 10.1002/14651858.CD006663.pub2.
- Fernández- Lainez, C., Vela-Amieva, M., Ibarra-González, I. (2009). Espectrometría de masas en tándem: una nueva herramienta para el estudio de la metabolómica en pediatría. *Acta Pediatr Mex.*, 30, 258-263.
- Giugliani, R., Federhen, A., Muñoz Rojas, M.V., Vieira, T., Artigalá, O., Pinto, L.L. *et al.* (2010). Mucopolysaccharidosis I, II, and VI: Brief review and guidelines for treatment. *Genet Mol Biol.*, 33, 589-604.
- Hopkin, R.J.; Grabowski, G.A. (2009). *Enfermedades por almacenamiento lisosómico*. En: Anthony S. Fauci, Eugene Braunwald, Dennis L. Kasper, Stephen L. Hauser, Dan L. Longo, J. Larry Jameson, and Joseph Loscalzo, Eds. Harrison Principios de Medicina Interna 17ª edición. [Internet]. México DF: McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. [Consultada 14 junio 2011]. Disponible en: <http://www.harrisonmedicina.com/>

- Kasper, D.C., Herman, J., De Jesus, V.R., Mechtler, T.P., Metz, T.F., Shushan, B. (2010). The application of multiplexed, multidimensional ultra-high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry to the high-throughput screening of lysosomal storage disorders in newborn dried bloodspots. *Rapid Commun Mass Spectrum.*, 24, 986-994.
- Khaliq, T., Sadilek, M., Scott, C.R., Turecek, F., Gelb, M.H. (2011). Tandem mass spectrometry for the direct assay of lysosomal enzymes in dried blood spots: application to screening newborns for Mucopolysaccharidosis IVA. *Clin Chem.*, 57, 128-131.
- Kemper, A.R., Hwu, W-L., Lloyd-Puryear, M., Kishnani, P.S. (2007). Newborn screening for Pompe disease: synthesis of the evidence and development of screening recommendations. *Pediatrics*, 120, e1327-1334.
- Kemper, A.R., Knapp, A.A., Green, N.S., Comeau, A.M., Metterville, D.R., Perrin, J.M. (2010). Weighing the evidence for newborn screening for early-infantile Krabbe disease. *Genet Med.*, 12, 539-543.
- Labrousse, P., Chien, Y.H., Pomponio, R.J., Keutzer, J., Lee, N.C., Akmaev, V.R. *et al.* (2010). Genetic heterozygosity and pseudodeficiency in the Pompe disease newborn screening pilot program. *Mol Genet Metab.*, 99, 379-383.
- la Marca, G., Casetta, B., Malvagia, S., Guerrini, R., Zammarchi, E. (2009). New strategy for the screening of lysosomal storage disorders: the use of the online trapping-and-cleanup liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem.*, 81, 6113-6121.
- Legini, E., Orsini, J.J., Hung, C., Martin, M., Showers, A., Scarpa, M. *et al.* (2011). Analysis of glucocerebrosidase activity in dry blood spots using tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta.*, 412, 343-346.
- Li, Y., Brockmann, K., Turecek, F., Scott, C.R., Gelb, M. (2004a). Tandem mass spectrometry for the direct assay of enzymes in dried blood spots: application to newborn screening for Krabbe disease. *Clin Chem.*, 50, 638-640.
- Li, Y., Scott, C.R., Chamoles, N.A., Ghavami, A., Pinto, B.M., Turecek, F. *et al.* (2004b). Direct multiplex assay for lysosomal enzymes in dried blood spots for newborn screening. *Clin Chem.*, 50, 1785-1796.

- Lukacs, Z., Keil, A., Hartung, R., Mengel, E., Beck, M., Santer, R. *et al.* (2009). Fluorometry and mass spectrometry for the determination of lysosomal enzyme activities in dried blood-possibilities for neonatal screening. *Mol Genet Metab.*, 98, 66.
- Matern, D., Lacey, J., Sanders, K., Magera, M., Bentz Pino, G., Grycki, E. *et al.* (2010). First steps towards determination of the most efficient and effective newborn screening (NBS) approach for LSD. *Mol Genet Metab.*, 99, S27.
- Mechtler, T.P., Stary, S., Metz, T.F., De Jesús, V.R., Greber-Platzer, S., Pollak, A. *et al.* (2012). Neonatal screening for lysosomal storage disorders: feasibility and incidence from a nationwide study in Austria. *The Lancet*, 379, 335-341.
- Meikle, P.J., Hopwood, J.J., Clague, A.E., Carey, W.F. (1999). Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA.*, 281, 249-254.
- Menéndez Saínz, C., Zaldívar Muñoz, C., González-Quevedo Monteagudo, A. (2002). Errores innatos del metabolismo. Enfermedades lisosomales. *Rev Cubana Pediatr.*, 74, 68-76.
- Muenzer, J. (2004). The mucopolysaccharidoses: a heterogeneous group of disorders with variable pediatric presentations. *J Pediatr.*, 144, S27-S34.
- Nakamura, K., Hattori, K., Endo, F. (2011). Newborn screening for lysosomal storage disorders. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet.*, 157, 63-71.
- Orsini, J.J., Morrissey, M.A., Slavin, L.N., Wojcik, M., Biski, C., Martin, M. *et al.* (2009). Implementation of newborn screening for Krabbe disease: population study and cutoff determination. *Clin Biochem.*, 42, 877-884.
- Pineda, M., Wraith, J.E., Mengel, E., Sedel, F., Hwu, W.L., Rohrbach, M. *et al.* (2009). Miglustat in patients with Niemann-Pick disease Type C (NP-C): a multicenter observational retrospective cohort study. *Mol Genet Metab.*, 98, 243-249.
- Pinto, R., Caseiro, C., Lemos, M., Lopes, L., Fontes, A., Ribeiro, H. *et al.* (2004). Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. *Eur J Hum Genet.*, 12, 87-92.
- Pintos-Morell, G., Beck, M. (2009). Fabry disease in children and the effects of enzyme replacement treatment. *Eur J Pediatr.*, 168, 1355-1363.

- Poorthuis, B.J.H.M., Wevers, R.A., Kleijer, W.J., Groener, J.E.M., de Jong, J.G.N., van Weely, S. *et al.* (1999). The frequency of lysosomal storage diseases in the Netherlands. *Hum Genet.*, 105, 151-156.
- Poupová, H., Ledvinová, J., Berná, L., Dvořáková, L., Kožich, V., Elleder, M. (2010). The birth prevalence of lysosomal storage disorders in the Czech Republic: comparison with data in different populations. *J Inherit Metab Dis.*, 33, 387-396.
- Rozaklis, T., Ramsay, S.L., Whitfield, P.D., Ranieri, E., Hopwood, J.J., Meikle, P.J. (2002). Determination of oligosaccharides in Pompe disease by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Clin Chem.*, 48, 131-139.
- Scott, C.R., Bellamy, G., Daiker, J., Fox, A.C., Shaunak, S., Gelb, M.H. *et al.* (2009). Evaluation of MS/MS for the detection of lysosomal storage disorders by newborn screening: Fabry disease. *Mol Genet Metab.*, 98, 74.
- Sunyer, B., Paladio, N., Almazán, C. (2011). *Tratamiento de sustitución enzimática en pacientes con mucopolisacaridosis I, II y VI.* (Informe de Evaluación de Tecnologías Sanitarias, AIAQS núm. 2009/05). Madrid: Ministerio de Ciencia e Innovación. Plan de Calidad para el Sistema Nacional de Salud del Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad. Agència d'Informació, Avaluació i Qualitat en Salut de Catalunya.
- Tomatsu, S., Montañó, A.M., Oguma, T., Dung, V.C., Oikawa, H., Gutierrez, M.L. *et al.* (2010b). Validation of disaccharide compositions derived from dermatan sulfate and heparin sulfate in mucopolysaccharidosis and mucopolipidoses II and III by tandem mass spectrometry. *Mol Genet Metab.*, 99, 124-131.
- Tomatsu, S., Montañó, A.M., Oguma, T., Dung, V.C., Oikawa, H., de Carvalho, T.G. *et al.* (2010a). Validation of keratin sulfate level in mucopolysaccharidosis type IVA by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Inherit Metab Dis.* DOI: 10.1007/s10545-009-9013-x.
- Valayannopoulos, V., Brassier, A., Chabli, A., Caillaud, C., Lemoine, M., Odent, T. *et al.* (2011). Le traitement par enzymothérapie des maladies lysosomales. *Arch Pediatr.*, 18, 1119-1123.

- Waisbren, S.E., Albers, S., Amato, S., Ampola, M., Brewster, T.G.; Demmer, L. *et al.* (2003). Effect of expanded newborn screening for biochemical genetic disorders on child outcomes and parental stress. *JAMA.*, 290, 2564-2572.
- Wang, D., Eadala, B., Sadilek, M., Chamoles, N.A., Turecek, F., Scott, C.R. *et al.* (2005). Tandem mass spectrometric analysis of dried blood spots for screening of Mucopolysaccharidosis I in newborns. *Clin Chem.*, 51, 898-900.
- Wang, D., Wood, T., Sadilek, M., Scott, C.R., Turecek, F., Gelb, M.H. (2007). Tandem mass spectrometry for the direct assay of enzymes in dried blood spots: application to newborn screening for Mucopolysaccharidosis II (Hunter disease). *Clin Chem.*, 53, 137-140.
- Wolfe, B.J., Blanchard, S., Sadilek, M., Scott, C.R., Turecek, F., Gelb, M.H. (2011). Tandem mass spectrometry for the direct assay of lysosomal enzymes in dried blood spots: application to screening newborns for Mucopolysaccharidosis II (Hunter Syndrome). *Anal Chem.*, 83, 1152-1156.
- Young, S.P., Stevens, R.D., An, Y., Chen, Y-T., Millington, D.S. (2003). Analysis of a glucose tetrasaccharide elevated in Pompe disease by stable isotope dilution-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal biochem.*, 316, 175-80.
- Zhang, X.K., Elbin, C.S., Chuang, W.L., Cooper, S.K., Marashio, C.A., Beauregard, C. *et al.* (2008). Multiplex enzyme assay screening of dried blood spots for lysosomal storage disorders by using tandem mass spectrometry. *Clin Chem.*; 54, 1725-1728.

Parte II: Estudio de eficiencia

Introducción

El rápido desarrollo de las tecnologías sanitarias y su implantación en el sistema sanitario no van acompañados, en la mayoría de los casos, del estudio de evaluación económica correspondiente sobre los costes adicionales o evitados que dichas tecnologías van a suponer en el presupuesto general del sistema sanitario público en relación a los potenciales beneficios clínicos que puedan generar.

Los resultados mostrados por la revisión sistemática realizada en el capítulo I de este informe han puesto de manifiesto la falta de evidencia sobre la eficacia del cribado neonatal de enfermedades de almacenamiento lisosomal mediante espectrometría de masas en tándem. Esto es debido al hecho de que el cribado de estas enfermedades se encuentra todavía en fase de estudio a la espera de una evaluación adecuada de su eficacia. Esta falta de evidencia no significa que no sea necesaria una evaluación económica de lo que supondría su incorporación a la cartera de servicios, ya que en muchos países ya se están llevando a cabo estudios piloto con el fin de ir incorporando estas enfermedades a los actuales programas de cribado neonatal. La gravedad de estas enfermedades junto a la aparición en los últimos tiempos de tratamientos terapéuticos para algunas de ellas, han generado una gran expectación social que no puede ignorarse y que de alguna manera apoya la incorporación de estos cribados.

Como se ha mencionado anteriormente, los programas de cribado neonatal de enfermedades metabólicas, entre las que se encuentran las enfermedades lisosomales, son distintos en las diferentes comunidades autónomas dentro del territorio nacional, y la ampliación de este cribado supondría un incremento en el gasto sanitario que es necesario conocer para poder valorar su factibilidad y su implantación, una vez quede demostrada su eficacia.

Objetivos

Evaluar la viabilidad del cribado neonatal de enfermedades lisosomales mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS) en términos de:

- Costes intrínsecos: equipamiento, fungible y mantenimiento.
- Costes derivados: consumo de tiempo, personal necesario e idoneidad de implantación según pruebas disponibles y previsión de solicitudes (por unidad de tiempo).

Realizar una estimación del impacto económico que tendría en el Sistema Nacional de Salud la posible incorporación del cribado de enfermedades de almacenamiento lisosomal por MS/MS.

Material y Métodos

Revisión sistemática

Revisión sistemática de la literatura de estudios económicos sobre el cribado neonatal de enfermedades de almacenamiento lisosomal o lisosomales mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS).

Búsqueda bibliográfica: bases de datos y estrategia

Se ha realizado una búsqueda bibliográfica enfocada a identificar revisiones sistemáticas o informes de evaluación en la biblioteca Cochrane, en la base de datos del CRD (Centre for Reviews and Dissemination), ECRI, ISI Web of Knowledge e INAHTA. Además, se realizaron búsquedas de estudios en las bases de referencias MEDLINE (incluido Pre-MEDLINE mediante OVID) y EMBASE, hasta el 18 de enero del 2012. Las estrategias utilizadas se describen en el anexo 2.

Selección de artículos relevantes

Los criterios de inclusión en la selección de los estudios fueron:

- Población: recién nacidos.
- Intervención: cribado neonatal mediante espectrometría de masas.
- Resultados: Costes directos, costes indirectos, costes evitados, coste por caso detectado, casos evitados, AVG (años de vida ganados), AVAC (años de vida ajustados por calidad), coste por AVG, coste por AVAC, y beneficio neto.
- Diseño: Los estudios considerados en este informe fueron revisiones sistemáticas y cualquier tipo de estudio con datos primarios que aportara información sobre el coste del cribado neonatal de cualquier enfermedad lisosomal mediante MS/MS. A priori se admitieron evaluaciones económicas completas (análisis de minimización de costes, análisis coste-efectividad, análisis coste-utilidad y análisis coste-beneficio) y evaluaciones económicas no completas (análisis comparativos o descriptivos de costes y análisis de impacto presupuestario).

En la selección no se estableció límite de idioma.

Análisis del impacto económico en el SNS

El análisis económico propuesto en este informe, al no haber prueba de comparación con la prueba de estudio, ha sido la estimación del impacto económico que tendría en el Sistema Nacional de Salud la ampliación del cribado neonatal a las enfermedades lisosomales. Por lo tanto, el escenario en el que se ha centrado el análisis económico ha sido el territorio español y la perspectiva del estudio ha sido la del Sistema Nacional de Salud español. La prueba de cribado elegida para este estudio fue el multiensayo enzimático descrito en Mechtler *et al.* 2012 que incluía las enfermedades de Fabri, Gaucher, Pompe y Niemann-Nick tipo A y B. Puesto que el protocolo de las pruebas de multiensayo se encuentra en fase de optimización, se ha elegido este protocolo en concreto por ser el más novedoso y el más automatizado, lo que facilitaría en principio el cribado.

Para la estimación económica, se han considerado los costes intrínsecos y derivados de la técnica de cribado (siguiendo el esquema propuesto por Ramos Goñi *et al.* 2008):

- Coste de la toma de muestra.
- Coste de de instrumentación o aparataje: no se ha incluido el coste el espectrómetro en tándem masas, así como su instalación y mantenimiento ya que se considera que la prueba a evaluar sería una ampliación de su uso.
- Costes de los productos y materiales fungibles de la prueba.
- Costes adicionales: el coste del personal del laboratorio, el coste de la repetición en la recogida de muestra.
- Costes de los análisis genéticos de confirmación de diagnóstico de los casos positivos obtenidos en el cribado.

Métodos de estimación de los costes

Coste del cribado neonatal

a. Costes de la toma de muestra

Al hacerse el cribado a partir de gotas de sangre seca, esta recogida de sangre se realizaría al mismo tiempo que la recogida de muestras de sangre del talón que actualmente se realiza para el cribado de otras enfermedades metabólicas. Por consiguiente, esta toma de muestras supondría un coste prácticamente despreciable, ya que sólo supondría de 3-5 minutos más de tiempo en el proceso y que se utilizaría en informar a los padres del programa de cribado. Este coste ha sido estimado en unos 10 céntimos de euro [Ramos Goñi *et al.* 2008].

En aquellos casos positivos o en los que hubiera habido algún problema se realizará una segunda toma de muestra para la repetición de la prueba. Los costes de esta repetición han sido estimados en 30 céntimos de euro y se ha considerado entre un 2%-4% la tasa de repetición de toma de muestra [Ramos Goñi *et al.* 2008].

b. Costes de instrumentación

En este apartado no se ha incluido el coste el espectrómetro en tándem masas, así como su instalación y mantenimiento ya que se considera que la prueba a evaluar sería una ampliación de su uso. La existencia de este equipamiento en algunas regiones del territorio nacional requeriría de un análisis de las necesidades y posibilidades de realización de pruebas de forma pormenorizada que escapa al objetivo de este trabajo. Por ello se supone que se utilizarán los espectrómetros disponibles intensificando su uso.

c. Costes de la prueba de cribado

Los protocolos disponibles sobre los ensayos de actividad enzimática ponen de manifiesto lo laboriosa que es la preparación de la muestra teniendo que realizarse extracciones líquido-líquido o líquido-sólido. El protocolo que se ha elegido, supone una automatización de este proceso y por consiguiente un ahorro en el tiempo necesario para su realización.

El coste total por muestra analizada según el protocolo descrito por Metchler *et al.* ha sido estimado por los autores del mismo, utilizando los precios de catálogo de los reactivos y de los materiales fungibles necesarios. Este coste ascendía a 0,92€. Esta estimación, junto con el protocolo detallado para la realización de los ensayos de actividad enzimática de los cinco EAL estudiadas, fueron descritos en un apéndice complementario del artículo.

d. Costes para la confirmación de los casos positivos

La confirmación de los casos se haría mediante análisis genético de las muestras. El análisis implicaría la realización de los siguientes procesos:

1. Extracción de ADN genómico mediante el QIAamp DNA micro Kit (Quiagen) diseñado para la extracción de ADN de muestras de sangre procedente de gotas secas en papel. El coste del Kit es de 320,09€ y permite el análisis de 50 muestras.
2. Síntesis de los oligonucleótidos utilizados como “primers” o cebadores para la amplificación de los genes por PCR y para su secuenciación.
3. Amplificación por PCR de los exones e intrones correspondientes a los genes *GBA* (Gaucher), *GAA* (Pompe), *ASM* (Niemann-Pick A/B) y *GLA* (Fabri) mediante los reactivos JumpStart RED Taq Ready Mix (Sigma-Aldrich).
4. Secuenciación de los productos de PCR obtenidos.

Los precios, a fecha de 2012, se han obtenido de las empresas proveedoras en España de los productos, el listado de los precios públicos de los servicios sanitarios prestados por Centros dependientes del Sistema Sanitario Público de Andalucía (ORDEN de 14 de octubre de 2005, BOJA número 210 del 27/10/2005), la consulta específica a los servicios de logística y compras del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla y la Resolución SC0182/2011 de 7 de julio sobre Retribuciones del personal de Centros e Instituciones Sanitarias.

Para la amplificación de los genes y su secuenciación es necesario sintetizar los siguientes oligonucleótidos [Metchler *et al* 2012, supplementary webappendix]:

- Enfermedad de Fabri: 2 oligonucleótidos por cada uno de los siete exones del gen. En total 14 oligonucleótidos de 20-25 nucleótidos.
- Enfermedad de Gaucher: 2 oligonucleótidos por cada uno de los 13 exones del gen. En total 26 oligonucleótidos de 15-28 nucleótidos.
- Enfermedad de Pompe: 2 oligonucleótidos para 18 de los 20 exones del gen y 4 para los 2 exones restantes. En total 44 oligonucleótidos de 15-28 nucleótidos.
- Enfermedad de Niemann-Pick: 2 oligonucleótidos para 3 de los 6 exones del gen, 4 oligonucleótidos para 2 exones y 6 oligonucleótidos para el último de los exones del gen. En total 20 oligonucleótidos de 20-28 nucleótidos.

En el caso de la enfermedad de Gaucher además de los oligonucleótidos mencionados se necesitan 28 oligos adicionales, de 17-28 nucleótidos, específicos para la secuenciación del gen. En los otros casos se utilizaron los mismos oligos tanto para la amplificación por PCR como para la secuenciación.

El coste de cada oligonucleótido se ha estimado en función de su tamaño considerando un precio de 0,34€ por base según los precios proporcionados por el fabricante (SIGMA-ALDRICH). La cantidad de oligonucleótido sintetizada en cada pedido es de unos 25 nmoles (25.000 pmoles) utilizándose unos 12,5 pmoles por reacción de PCR y 5 pmoles por reacción de secuenciación, de manera que cada pedido de oligonucleótido permite realizar 2.000 reacciones de PCR y 5.000 reacciones de secuenciación.

e. Costes de personal

Según la información del cribado en Austria [Mechtler *et al.*, 2012] el tiempo necesario para el análisis de 100 muestras es de 3 horas de trabajo de un técnico de laboratorio, los costes salariales considerados han sido de 26.894,38€ anuales (Resolución SC0182/2011 de 7 de julio sobre Retribuciones del personal de Centros e Instituciones Sanitarias, considerando costes completos de seguridad social).

El coste debido a las horas de trabajo del personal encargado de elaborar el informe final con los resultados de las pruebas realizadas y las recomendaciones para aquellos casos positivos en el cribado y confirmados por las posteriores pruebas complementarias se ha estimado en 111,82 € por caso positivo confirmado [Ramos Goñi *et al.* 2008].

Datos poblacionales

Para la adaptación del estudio a las características de España, se extrajeron los datos referentes a la población, tasa de natalidad y número de neonatos anuales de la página web del Instituto Nacional de Estadística [disponible en: <http://www.ine.es>], para poder estimar el número de niños que podrían entrar en el programa de cribado poblacional; tanto del conjunto del territorio español como de cada Comunidad Autónoma. Estos últimos datos se consideraron con el fin de poder ajustar el gasto que supondría a cada comunidad. La población de estudio susceptible de entrar en el programa de cribado, se ha estimado como el valor medio de nacimientos anuales de los últimos cinco años disponibles (2006-2010) resultando ser de 494.088 neonatos.

Los datos de prevalencia de las cinco enfermedades incluidas en la prueba de cribado se han obtenido de la literatura, en la tabla 5 se muestran las prevalencias encontradas en varios países europeos así como la descrita en el informe de Orphanet de noviembre del 2011 (Orphanet, 2011).

Tabla 5: Prevalencia en Europa de las enfermedades lisosomales por cada 100.000 neonatos.				
	Portugal*	R. Checa*	Holanda*	Datos Orphanet 2011
Fabri	0,12	0,52	0,21	1,75
Gaucher	1,35	1,13	1,16	2,0
Pompe	0,17	-	2,0	1,1
Niemann-Pick A+B	0,60	0,33	0,53	0,65
*Poupětová <i>et al.</i> 2010; Pinto <i>et al.</i> 2004.				

Resultados

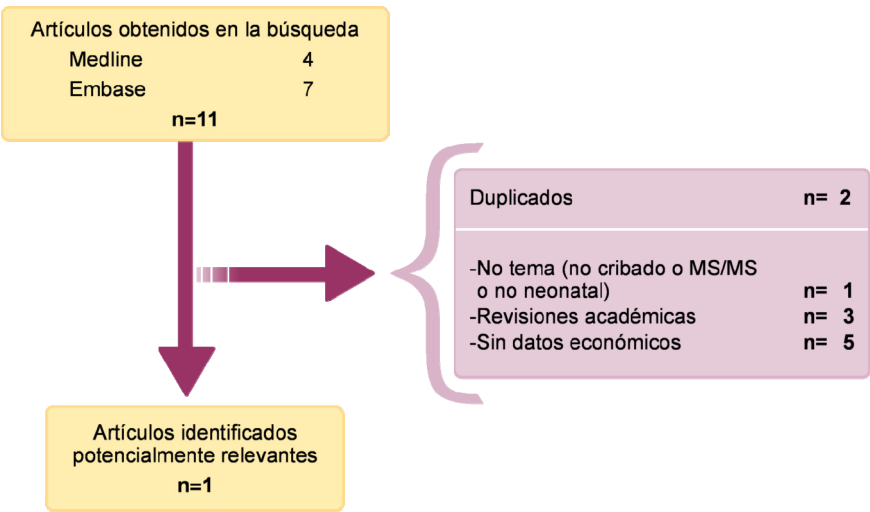
Resultados de la búsqueda

La búsqueda bibliográfica no identificó ningún estudio económico sobre el cribado de enfermedades lisosomales.

En las bases de referencias Medline y Embase se identificaron 4 y 7 referencias respectivamente, pero ninguna de ellas aportaban información económica sobre el cribado neonatal de enfermedades de almacenamiento lisosomal. Las estrategias de búsqueda realizadas se muestran en el anexo 2. Por otra parte en el CRD se identificaron 27 estudios de los cuales 12 eran estudios económicos sobre cribado neonatal por espectrometría de tándem masas de enfermedades metabólicas aunque ninguno de ellos era de cribado de enfermedades lisosomales.

El resultado de la búsqueda es consecuente con el hecho de que no se ha demostrado hasta el momento la eficacia del cribado, los estudios sobre el tema aún están en una fase preliminar lo que explica la falta de estudios económicos que evalúen el coste de su implantación.

Figura 2: Flujo de selección de referencias identificadas en las bases de datos MedLine y Embase. Estudios económicos.



La búsqueda identificó un estudio piloto publicado con fecha posterior a la búsqueda llevada a cabo en la revisión sistemática realizada para la valoración de la eficacia, por lo que no está incluido en el capítulo anterior. El estudio describía un multiensayo enzimático con un protocolo modificado del propuesto por Zhang *et al.* 2008 para las medidas de actividad. Este protocolo modificado introducía una automatización de la preparación de las muestras, paso importante ya que la preparación de muestras es laboriosa, lo que según los autores supone un ahorro de tiempo al poder analizar 100 muestras en aproximadamente 3 horas. El estudio es el primero que utiliza el multiensayo enzimático en un cribado piloto y se han tomado los datos del mismo para realizar las estimaciones económicas. Además, el estudio aportaba información de los costes por muestra del ensayo enzimático modificado [Mechtler *et al.* 2012].

Resultados del estudio económico

Los costes ocasionados, en el ámbito del Sistema Nacional de Salud, exclusivamente por el cribado neonatal de las enfermedades lisosomales de Fabri, Pompe, Gaucher y Niemann-Pick A y B sin considerar la confirmación de los casos positivos se muestran en la tabla 6.

En las tablas 7 a 10 se recogen los costes de las pruebas de confirmación de los casos positivos de cada una de las enfermedades incluidas en el cribado.

Tabla 6: Costes del cribado neonatal para el SNS			
	Precio/muestra	Muestras anuales	Gasto anual
Recogida de muestras	0,10€	494.088	49.409€
Segunda recogida de muestras	0,30€	9.882-19.764	2.965-5.929€
Prueba de cribado	0,92€	494.088	454.561€
Personal prueba de cribado	13€/h trabajo	1.647 h.	21.411€
TOTAL	-	-	528.345-531.309€

h:horas.

Tabla 7: Costes de la prueba de confirmación de los casos positivos de la enfermedad de Fabri detectados en el cribado neonatal

Proceso	Producto	Muestras/ envase	Precio envase	Precio/ muestra
Síntesis de oligos 14 oligos = 318 pb	25 nmoles /oligo	2000 PCR/ 25nmoles	108,12€	0,054€
Extracción de DNA*	QIAamp DNA micro kit (Quiagen)*	50	320,09€	6,40€
PCR	JumpStart RED Taq Ready Mix**	100	252,00€	2,52€
Fragmentos a amplificar 7 exones	-	-	-	7x2,52€=17,64€
Secuenciación 7 exones de ≈300pb Total 1,418kb	-	-	10€/kb	14,18€
Total	-	-	-	38,27€

* C. Viral, ** Sigma-Aldrich.

Tabla 8: Costes de la prueba de confirmación de los casos positivos de la enfermedad de Gaucher detectados en el cribado neonatal

Proceso	Producto	Muestras/ envase	Precio envase	Precio/ muestra
Síntesis de oligos PCR 26 oligos= 577 pb	25 nmoles /oligo	2000 PCR /25nmoles	196,18€	0,098€
Síntesis de oligos secuenciación 28 oligos= 584 pb	25 nmoles /oligo	5.000 reacciones /25nmoles	198,56	0,04€
Extracción de DNA*	QIAamp DNA micro kit (Quiagen)	50	320,09€	6,40€
PCR	JumpStart RED Taq Ready Mix**	100	252,00€	2,52€
Fragmentos a amplificar 13 exones	-	-	-	13x2,52= 32,76€
Secuenciación Total 2,324 kb	-	-	10€/kb	23,24€
Total	-	-	-	62,54€

* C. Viral.

Tabla 9: Costes de la prueba de confirmación de los casos positivos de la enfermedad de Pompe detectados en el cribado neonatal

Proceso	Producto	Muestras/ envase	Precio envase	Precio/muestra
Síntesis de oligos 44 oligos = 878 pb	25 nmoles /oligo	2000 PCR /25nmoles	298,52€	0,15€
Extracción de DNA*	QIAamp DNA micro kit (Quia- gen)	50	320,09€	6,40€
PCR	JumpStart RED Taq Ready Mix**	100	252,00€	2,52€
Fragmentos a amplificar Total 20exones	-	-	-	20x2,52€= 50,4€
Secuenciación 3,782 kb	-	-	10€/kb	37,82€
Total	-	-	-	94,77€

* C. Viral.

Tabla 10: Costes de la prueba de confirmación de los casos positivos de la enfermedad de Niemann-Pick A y B detectados en el cribado neonatal

Proceso	Producto	Muestras/ envase	Precio envase	Precio/ muestra
Síntesis de Primers 20 oligos=455 pb	25 nmoles /oligo	2000 PCR /25nmoles	154,7€	0,08€
Extracción de DNA*	QIAamp DNA micro kit (Quia- gen)	50	320,09€	6,40€
PCR	JumpStart RED Taq Ready Mix**	100	252,00€	2,52€
Fragmentos a amplificar Total 6 exones	-	-	-	6x2,52= 15,12€
Secuenciación 2,473kb	-	-	10€/kb	24,73€
Total	-	-	-	46,33€

* C. Viral.

La falta de existencia de un registro nacional de enfermedades lisosomales que aportara datos de la prevalencia o incidencia de las enfermedades lisosomales incluidas en el ensayo de cribado, no ha permitido obtener los casos positivos esperados para la población española. Por lo tanto, se han estimado tomando de la literatura los datos de prevalencia de dichas enfermedades en Europa descritos en la tabla 5 y se han aplicado sobre la población esperada de neonatos obteniendo un rango de valores que se presenta en la tabla 11.

Tabla 11: Coste total de la confirmación de casos positivos del cribado según la prevalencia.			
Enfermedad	Posibles casos a confirmar*	Coste confirmación	Total
Fabri	0,59-8,64	38,27€	38,27-344,4€
Gaucher	5,58-9,88	62,54€	375,2-625,4€
Pompe	0,83-9,88	94,77€	94,77-947,7€
Niemann-Pick A y B	0,16-3,21	46,33€	46,33-185,32€
Total	9-33 casos	-	554,57-2.102,82€
* Al tratarse de casos a confirmar se han considerado números enteros por enfermedad para el cálculo del coste total.			

El coste de realización de los informes de los casos positivos se encontraría entre 1.006,2 - 3.689,4€ (111,82€ por informe).

Por tanto, el coste total del cribado, más el de confirmación de los casos positivos detectados en el mismo y los informes correspondientes, oscilaría bajo las condiciones consideradas, entre 529.906 - 537.101€.

Discusión

Los TMH se han incorporado en los últimos años a los programas de cribado neonatal. La incorporación a los mismos de las EAL se está realizando de forma gradual en diferentes países, donde se han ido llevando a cabo estudios piloto para determinar su factibilidad e intentar discernir su utilidad. Las EAL son consideradas enfermedades raras ya que afectan a menos de 5 de cada 10.000 individuos. Su carácter crónico y su alto grado de incapacidad hacen que la detección precoz pueda ser una herramienta útil para su tratamiento y posible mejora clínica, aunque los tratamientos disponibles en la actualidad no permitan la curación de las mismas.

Los estudios pilotos realizados y de los que se disponen datos, muestran que los cribados de EAL tienen una sensibilidad del 100% presentan unos valores predictivos muy bajos, de hecho el cribado más reciente realizado en Austria y que utiliza el multiensayo enzimático para 5 enfermedades: Gaucher, Pompe, Fabri y Niemann-Pick A y B; ha encontrado que los VPP (valores predictivos positivos) eran de 50%, 80%, 32% y 0% respectivamente [Mechtler *et al.* 2011]. Estos VPP ponen de manifiesto el alto número de falsos positivos encontrados en el cribado. Los datos aportados por el estudio junto con el hecho de muchos de los casos positivos, confirmados por análisis genético, no muestran síntomas clínicos hasta una edad tardía vuelven a plantear el debate de la utilidad de los cribados de estas enfermedades. La alta tasa de falsos positivos lleva asociado un incremento en el gasto sanitario debido a las pruebas de confirmación aunque dicho gasto no sea muy elevado.

El estudio económico por su parte ha mostrado que aunque la tecnología de la espectrometría de masas en tándem es actualmente utilizada en el cribado neonatal de TMH, la incorporación de las EAL a dicho cribado cabría plantearla como una ampliación de su uso y no como la adquisición de gran aparataje. En este caso el incremento del gasto anual del SNS que supondría dicha incorporación sería de aproximadamente 0,53 millones de euros, gasto que sería muy superior si se adquiriese nuevo equipamiento.

Las limitaciones de este estudio son las derivadas de la metodología del mismo, ya que no se dispone de datos fiables y reales de prevalencia o incidencia de las diferentes EAL en nuestro país al no disponer de un registro nacional donde se recojan los casos. Por lo tanto, lo que se ha hecho ha sido intentar estimar el impacto económico de la inclusión de estas enfermedades en el programa de cribado neonatal con los datos disponibles de la literatura.

En la estimación económica de la confirmación de los casos positivos detectados en el cribado no se han considerado las horas adicionales de trabajo de un técnico de laboratorio, que incluirían el tiempo de extracción de ADN y amplificación por PCR por falta de información fiable al respecto, aunque el coste de la secuenciación de cada gen sí lleva incluido el coste de personal de dicha tarea. Dado el escaso impacto económico que supone la confirmación de los casos se podría considerar el dicho gasto de personal poco significativo frente al coste total del cribado. Aunque los datos tomados de la literatura en principio podrían subestimar el tiempo de trabajo necesario al proceder tal dato de un laboratorio donde está puesta a punto la técnica del cribado de estas enfermedades y el personal dispone de la experiencia necesaria. La implantación de este cribado en España supondría un periodo de aprendizaje durante el cual el tiempo de trabajo de los técnicos de laboratorio se esperaría que fuese mayor del considerado en el presente informe.

La incorporación de tecnologías en la práctica clínica y en los programas de salud, muchas veces no va acompañada de los estudios económicos de coste-efectividad que avalen su utilización. En este caso, a pesar del esfuerzo realizado para valorar el impacto de la incorporación a los programas de cribado de nuevas pruebas, no ha sido posible realizar un estudio de coste-efectividad al no disponerse de datos concluyentes sobre la eficacia del cribado ni de la utilidad clínica del mismo, por lo que no es posible valorar de manera precisa los gastos asociados a los casos positivos ya que no se puede prever la manifestación de la enfermedad. Por lo tanto, aunque cabe esperar que la ratio coste-efectividad se haría más favorable cuanto mayor es el volumen anual de muestras a procesar con la MS/MS, la falta de evidencia de la efectividad del cribado no nos permite asegurar que la incorporación de las EAL en el programa de cribado neonatal vaya a mejorar la relación coste-efectividad de esta tecnología.

El gasto de la ampliación de los programas de cribado a las enfermedades lisosomales analizadas es considerable frente a la incertidumbre sobre su posible beneficio clínico. Debería considerarse la problemática individual de cada enfermedad a la hora de tomar la decisión sobre qué enfermedades de almacenamiento lisosomal deben ser incluidas en el programa de cribado neonatal de TMH mediante MS/MS.

Referencias

- Mechtler, T.P., Stary, S., Metz, T.F., De Jesús, V.R., Greber-Platzer, S., Pollak, A. et al. (2012). Neonatal screening for lysosomal storage disorders: feasibility and incidence from a nationwide study in Austria. *The Lancet*; 379, 335-341.
- Orphanet (2011) Prevalencia de las enfermedades raras: Datos bibliográficos (Informes periódicos de Orphanet, Noviembre 2011 Número 1). http://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/ES/Prevalencia_de_las_enfermedades_raras_por_orden_alfabetico.pdf. Última visita mayo 2012.
- Pinto, R., Caseiro, C., Lemos, M., Lopes, L., Fontes, A., Ribeiro, H. et al. (2004). Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. *Eur J Hum Genet.*, 12, 87-92.
- Poupová, H., Ledvinová, J., Berná, L., Dvořáková, L., Kožich, V., Elleder, M. (2010). The birth prevalence of lysosomal storage disorders in the Czech Republic: comparison with data in different populations. *J Inher Metab Dis.*, 33, 387-396.
- Ramos Goñi, J.M., Serrano Aguilar, P.G., Espada Sáenz-Torres, M., Posada de la Paz, M. (2008). Coste-efectividad del cribado neonatal de los errores congénitos del metabolismo mediante espectrometría de masas en tándem. (Informes de Evaluación de Tecnologías Sanitarias: SESCS Nº 2006/21). Madrid: Plan Nacional para el SNS del MSC. Servicio de Evaluación del Servicio Canario de la Salud.
- Zhang, X.K., Elbin, C.S., Chuang, W.L., Cooper, S.K., Marashio, C.A., Beauregard, C. et al. (2008). Multiplex enzyme assay screening of dried blood spots for lysosomal storage disorders by using tandem mass spectrometry. *Clin Chem.*; 54, 1725-1728.

Conclusiones del informe

- Los estudios existentes se centran en la validez analítica de las medidas de actividades enzimáticas lisosomales mediante MS/MS.
- La evidencia disponible hasta el momento muestra la viabilidad de la detección de algunas actividades enzimáticas lisosomales mediante MS/MS utilizando gotas de sangre en papel como fuente de la enzima.
- No se dispone de un método estandarizado de los ensayos enzimáticos para el cribado de enfermedades de almacenamiento lisosomal, estando aún este método en fase de optimización.
- No hay evidencia sobre la validez clínica y utilidad clínica del cribado neonatal de enfermedades lisosomales mediante MS/MS.
- Se necesitan estudios prospectivos a largo plazo que permitan estimar de manera fiable la capacidad diagnóstica de la tecnología (sensibilidad, especificidad y valores predictivos).
- La ampliación del cribado neonatal a las enfermedades lisosomales en el Sistema Nacional de Salud supondría un impacto económico en el gasto anual de 0,53 millones de euros.
- El cribado neonatal ampliado a las enfermedades de almacenamiento lisosomal es factible aunque su beneficio potencial en términos de mejora de la salud es incierto.

Anexos

Anexo 1: Estrategias de búsqueda de estudios de eficacia

Ovid-MEDLINE (sin límite inferior de fecha hasta 19 Mayo 2011)

1. exp *Lysosomal Storage Diseases/
2. (Lysosomal or Gangliosidosis or "Tay-Sachs disease" or "Sandhoff disease" or Fabry or Gaucher or "Metachromatic leukodystrophy" or "Niemann Pick" or Farber or Lypogranulomatosis or "Wolman disease" or "Cholesterol ester storage disease" or Mucopolysaccharidosis or "Hurler Syndrome" or "Hunter Syndrome" or Sanfilippo or Morquio or "Sly Syndrome" or "Multiple sulfatase deficiency" or Mannosidosis or Fucosidosis or Aspartylglucosaminuria or Mucolipidosis or Aspartylglucosaminuria or "Schindler disease" or "Neuronal Ceroid Lipofuscinosis" or "Jansky Bielschowsky disease" or "Batten disease" or "Progressive Epilepsy with mental retardation" or EPMR or "Glycogen storage disease" or Pompe or "I Cell disease" or Sialolipidosis or Pycnodysostosis or Cystinosis or "Infantile Sialic acid storage disorder" or "Salla disease" or Saposins).ti,ab.
3. 1 or 2
4. *Tandem Mass Spectrometry/or*Neonatal Screening/
5. (((neonatal or newborn) and screening) or "Tandem Mass Spectrometry").ti.
6. 4 or 5
7. 3 and 6
8. Comment/ or Letter/ or Editorial/ or News/ or (animal/ not (animal/ and human/))
9. 7 not 8

EMBASE (sin límite inferior de fecha hasta 20 Mayo 2011)

1. 'lysosome storage disease'/exp/mj
2. lysosomal:ab,ti or gangliosidosis:ab,ti or 'tay-sachs disease':ab,ti or 'sandhoff disease':ab,ti or fabry:ab,ti or gaucher:ab,ti or 'metachromatic leukodystrophy':ab,ti or 'niemann pick':ab,ti or farber:ab,ti or lypogranulomatosis:ab,ti or 'wolman disease':ab,ti or 'cholesterol ester storage disease':ab,ti or mucopolysaccharidosis:ab,ti or 'hurler syndrome':ab,ti or 'hunter syndrome':ab,ti or sanfilippo:ab,ti or morquio:ab,ti or 'sly syndrome':ab,ti or 'multiple sulfatase deficiency':ab,ti or mannosidosis:ab,ti or fucosidosis:ab,ti or mucopolipidosis:ab,ti or aspartylglucosaminuria:ab,ti or 'schindler disease':ab,ti or 'neuronal ceroid lipofuscinosis':ab,ti or 'jansky bielschowsky disease':ab,ti or 'batten disease':ab,ti or 'progressive epilepsy with mental retardation':ab,ti or epmr:ab,ti or 'glycogen storage disease':ab,ti or pompe:ab,ti or 'i cell disease':ab,ti or sialolipidosis:ab,ti or pycnodysostosis:ab,ti or cystinosis:ab,ti or 'infantile sialic acid storage disorder':ab,ti or 'salla disease':ab,ti or saposins:ab,ti
3. 1 or 2
4. 'newborn screening'/mj or 'tandem mass spectrometry'/mj
5. neonatal:ti or newborn:ti and screening:ti or 'tandem mass spectrometry':ti
6. 4 or 5
7. letter:it or editorial:it or note:it or ('animal'/de not ('human'/de and 'animal'/de))
8. 3 and 6 not 7 and [embase]/lim

Anexo 2: Estrategias de búsqueda de estudios económicos

Ovid-MEDLINE (sin límite inferior de fecha hasta 18 Enero 2012)

1. exp *Lysosomal Storage Diseases/
2. (Lysosomal or Gangliosidosis or "Tay-Sachs disease" or "Sandhoff disease" or Fabry or Gaucher or "Metachromatic leukodystrophy" or "Niemann Pick" or Farber or Lypogranulomatosis or "Wolman disease" or "Cholesterol ester storage disease" or Mucopolysaccharidosis or "Hurler Syndrome" or "Hunter Syndrome" or Sanfilippo or Morquio or "Sly Syndrome" or "Multiple sulfatase deficiency" or Mannosidosis or Fucosidosis or Aspartylglucosaminuria or Mucolipidosis or Aspartylglucosaminuria or "Schindler disease" or "Neuronal Ceroid Lipofuscinosis" or "Jansky Bielschowsky disease" or "Batten disease" or "Progressive Epilepsy with mental retardation" or EPMR or "Glycogen storage disease" or Pompe or "I Cell disease" or Sialolipidosis or Pycnodyostosis or Cystinosis or "Infantile Sialic acid storage disorder" or "Salla disease" or Saposins).ti,ab.
3. 1 or 2
4. *Tandem Mass Spectrometry/or*Neonatal Screening/
5. (((neonatal or newborn) and screening) or "Tandem Mass Spectrometry").ti.
6. 4 or 5
7. 3 and 6
8. Economics/ OR "costs and cost analysis"/ OR Cost allocation/ OR Cost-benefit analysis/ OR Cost control/ OR Cost savings/ OR Cost of illness/ OR Cost sharing/ OR "deductibles and coinsurance"/ OR Medical savings accounts/ OR Health care costs/ OR Direct service costs/ OR Drug costs/ OR Employer health costs/ OR Hospital costs/ OR Health expenditures/ OR Capital expenditures/ OR Value of life/ OR Exp economics, hospital/ OR Exp economics, medical/ OR Economics, nursing/ OR Economics, pharmaceutical/ OR Exp "fees and charges"/ OR Exp budgets/ OR (low adj cost).mp. OR (high adj cost).mp. OR (health?care adj cost\$).mp. OR (fiscal or funding or financial or finance).tw. OR (cost adj estimate\$).mp. OR (cost adj variable).mp. OR (unit adj cost\$).mp. OR (economic\$ or pharmacoeconomic\$ or price\$ or pricing).tw. OR cost.ti.
9. 7 and 8

EMBASE (sin límite inferior de fecha hasta 18 Enero 2012)

1. 'lysosome storage disease'/exp/mj
2. lysosomal:ab,ti or gangliosidosis:ab,ti or 'tay-sachs disease':ab,ti or 'sandhoff disease':ab,ti or fabry:ab,ti or gaucher:ab,ti or 'metachromatic leukodystrophy':ab,ti or 'niemann pick':ab,ti or farber:ab,ti or lypogranulomatosis:ab,ti or 'wolman disease':ab,ti or 'cholesterol ester storage disease':ab,ti or mucopolysaccharidosis:ab,ti or 'hurler syndrome':ab,ti or 'hunter syndrome':ab,ti or sanfilippo:ab,ti or morquio:ab,ti or 'sly syndrome':ab,ti or 'multiple sulfatase deficiency':ab,ti or mannosidosis:ab,ti or fucosidosis:ab,ti or mucolipidosis:ab,ti or aspartylglucosaminuria:ab,ti or 'schindler disease':ab,ti or 'neuronal ceroid lipofuscinosis':ab,ti or 'jansky bielschowsky disease':ab,ti or 'batten disease':ab,ti or 'progressive epilepsy with mental retardation':ab,ti or epmr:ab,ti or 'glycogen storage disease':ab,ti or pompe:ab,ti or 'i cell disease':ab,ti or sialolipidosis:ab,ti or pycnodysostosis:ab,ti or cystinosis:ab,ti or 'infantile sialic acid storage disorder':ab,ti or 'salla disease':ab,ti or saposins:ab,ti
3. 1 or 2
4. 'newborn screening'/mj or 'tandem mass spectrometry'/mj
5. neonatal:ti or newborn:ti and screening:ti or 'tandem mass spectrometry':ti
6. 4 or 5
7. analysis'/mj OR 'cost of illness'/mj OR 'cost control'/mj OR 'economic aspect'/mj OR 'financial management'/mj OR 'health care cost'/mj OR 'health care financing'/mj OR 'health economics'/mj OR 'hospital cost'/mj OR 'cost'/exp OR fiscal:ab,ti OR financial:ab,ti OR finance:ab,ti OR funding:ab,ti OR 'cost minimization analysis'/mj OR (cost:ab,ti AND estimate\$:ab,ti) OR (cost:ab,ti AND variable\$:ab,ti) OR (cost NEAR/4 effectiveness):ab,ti OR (unit NEAR/5 cost\$):ab,ti OR cost:ti
8. 3 and 6 and 7 and [embase]/lim

