

MJERENJE HORMONA U KONGENITALNOJ ADRENALNOJ HIPERPLAZIJI - DIJAGNOSTIKA I NOVOROĐENAČKI PROBIR

VESNA KUŠEC*

U laboratorijskoj dijagnostici najčešćeg oblika kongenitalne adrenalne hiperplazije (KAH) uslijed manjka enzima 21-hidroksilaze dijagnostički su važne visoke koncentracije 17-hidroksiprogesterona i androgena, te snižene glukokortikoida i u nekim oblicima bolesti, također mineralokortikoida. Ovisno o ostatnoj enzimskoj aktivnosti 21-hidroksilaze razlikuju se oblici KAH-a na temelju kliničkih obilježja i laboratorijskih nalaza. U potvrdi dijagnoze se provodi test stimulacije sintetičkim ACTH-om s definiranim povećanjem koncentracije 17-hidroksiprogesterona, ali i drugih hormona. Kod bolesnika s manjkom drugih enzima u metaboličkom lancu sinteze kortizola, laboratorijska dijagnostika može biti otežana jer neki metaboliti specifični za taj poremećaj nisu rutinske pretrage kliničkog laboratorija. Metode mjerenja 17-hidroksiprogesterona i većine ostalih hormona važnih u dijagnostici i praćenju KAH-a su preporučene od struke, temeljene na načelu metoda s ligandima, a za njih postoje komercijalni kompleti reagensa za automatsku, poluautomatsku ili ručnu izradu analiza. Novorođenački probir za KAH uslijed manjka 21-hidroksilaze je zasnovan na mjerenju 17-hidroksiprogesterona iz mrlje krvi na filter papiru, ali je u tumačenju rezultata važno odrediti kriterije graničnih vrijednosti normalnih i povišenih koncentracija, te ustanoviti postupnik daljnje potvrde dijagnoze. Poznavanje metodoloških osobitosti i ograničenja postupaka laboratorijske dijagnostike važno je u kvalitetnoj suradnji svih stručnjaka uključenih u medicinsku skrb dijagnostike i praćenja bolesnika s KAH-om.

Deskriptori: KONGENITALNA ADRENALNA HIPERPLAZIJA, 17-HIDROKSIPROGESTERON, 21-HIDROKSILAZA, MJERENJE HORMONA

Uvod

Pravovremena dijagnostika u slučaju bolesnika s kongenitalnom adrenalnom hiperplazijom (KAH) je vrlo važna zbog sprječavanja stanja vitalne ugroženosti i određivanja daljnjih medicinskih postupaka u zbrinjavanju ovih bolesnika, a uključuje suradnju stručnjaka kliničkih medicinskih specijalizacija i onih laboratorijske medicine (1). Uzrok ovoj skupini nasljednih (autosomno recesivnih) bolesti je poremećaje sinteze kortizola iz kolesterola u kori nadbubrežne žlijezde zbog mutacije jednog od pet enzima koji sudjeluju u ovom metaboličkom procesu. Manjak kortizola uzrokuje pojačano lu-

čenje ACTH i hiperplaziju nadbubrežne žlijezde. Nedostatak enzima, potpuni ili djelomični, zaustavlja daljnje metaboliziranje i sintezu glukokortikoida i mineralokortikoida. Uslijed mutacije enzima i nemogućnosti daljnjeg metaboliziranja nastaje nakupljanje preteča u metaboličkom lancu, a koje se dalje metaboliziraju u androgene. Shematski prikaz metaboličkog puta sinteze kortizola i enzima uključenih u ove procese je prikazan na Slici 1, a čitatelj se upućuje na literaturne navode s odgovarajućim shemama (2, 7). Ovisno o mutaciji, nedostatak hormona i nakupljanje njihovih preteča i metabolita će biti različit (Tablica 1). Suvremena dijagnostika uključuje metode molekularne biologije za dokazivanje mutacije enzima.

Laboratorijska dijagnostika hormona kod manjka 21-hidroksilaze

U skupini KAH je najčešći nedostatak 21-hidroksilaze, mikrosomskog enzima citokroma P-450 (CYP21), ali s

različitom opsegom nedostatka. Enzim 21-hidroksilaza katalizira metabolički proces pretvorbe 17-hidroksiprogesterona u 11-deoksikortizol, koji je preteča kortizola. Isti enzim je također važan za metabolizam progesterona u deoksikortikosteron u metaboličkom putu stvaranja aldosterona. U bolesnika s nedostatkom 21-hidroksilaze nije moguća sinteza kortizola, lučenje ACTH je pojačano sa svrhom poticanja sinteze u kori nadbubrežne žlijezde, a također i stvaranje i nakupljanje preteča kortizola. Metaboliziranje preteča kortizola u androgene u prenatalnom razdoblju uzrokuje virilizaciju. Isti poremećaj kod potpunog nedostatka enzima 21-hidroksilaze onemogućuje sintezu aldosterona s posljedicom gubitka soli i rizika vitalno ugroženog stanja šoka (2, 4). Na temelju kliničkih kriterija, pretraga hormona i genetičkih analiza razlikuju se tri oblika uslijed razlike u ostatnoj aktivnosti enzima 21-hidroksilaze; klasični s gubitkom soli, klasični virilizirajući i neklasični (2, 3). U

*KBC Zagreb
Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku

Adresa za dopisivanje:
Prof. dr. sc. Vesna Kušec
KBC Zagreb
Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku
10000 Zagreb, Kišpatičeva 12
E-mail: vkusec@kbc-zagreb.hr

KOLESTEROL			
kolesterol dezmolaza ↓			
PREGNENOLON→	17-hidroksilaza →17-OH PREGNENOLON→	17,20-liaza →	DEHIDROEPIANDROSTERON
↓3-hidroksisteroid dehidrogenaza	↓		
PROGESTERON	17-OH PROGESTERON	ANDROSTENDION→	ESTRON
↓21-hidroksilaza	↓	↓	↑17-hidroksisteroid dehidrogenaza
DEOKSIKORTIKOSTERON	11-DEOKSIKORTIZOL	TESTOSTERON→	ESTRADIOL
↓11-hidroksilaza	↓11-hidroksilaza		
KORTIKOSTERON	KORTIZOL	↓5alfa reduktaza	
↓18-hidroksilaza			
18-OH KORTIKOSTERON	↓ 11beta hidroksisteroid dehidrogenaza	DEHIDROTESTOSTERON	
↓18-oksidaza			
ALDOSTERON	KORTIZON		

Slika 1.

Shema sinteze steroida u kori nadbubrežne žlijezde, preuzeto i prilagođeno prema New, Forest i White (2, 5, 7). Enzimi koji sudjeluju u metabolizmu su prikazani malim slovima u "italic-u".

Figure 1

Pathways of steroid synthesis in the adrenal cortex modified according to New, Forest i White (2, 5, 7). Enzymes involved are in italic lowercase.

klasičnih oblika nema aktivnosti enzima ili je vrlo niska (0-2%), a u neklasičnih je djelomice očuvana (20-60%) (2, 4). Hormonsko obilježje klasičnog oblika su povećane koncentracije progesterona, 17-hidroksiprogesterona, androstendiona i testosterona u krvi, a u mokraći su metaboliti ovih steroida također povišeni. U bolesnika s gubitkom soli postoji nakupljanje androgena i manjak aldosterona, a sinteza aldosterona je očuvana u klasičnom obliku s virilizacijom i u neklasičnom obliku. Mala rezidualna aktivnost enzima od 1-2% je vjerojatno dostatna za adekvatnu sintezu aldosterona u klasičnom obliku bolesti s virilizacijom.

Na dijagnozu KAH se najčešće posumnja već u novorođenčeta na temelju kliničke slike virilizacije i dvosmislenog spolovila u djevojčica. U neliječenih bolesnika s nedostatkom 21-hidroksilaze pri postavljanju dijagnoze su koncentracije 17-hidroksiprogesterona višestruko povišene (>300 nmol/L, u zdrave djece <3-6 nmol/L; referentni interval u odraslih: muškarci 1,5-7 nmol/L, žene luteinska faza 2-15 nmol/L; preračunavanje ng/dL × 0,0303=nmol/L) (5, 8). U bolesnika s virilizirajućim oblikom su koncentracije 17-hidroksiprogesterona povišene (300-

600 nmol/L), ali nešto manje nego u bolesnika s gubitkom soli, u kojih se mogu izmjeriti koncentracije 17-hidroksiprogesterona veće od 600 nmol/L. Rezultati mjerenja androstendiona ne omogućuju razlikovanje kliničkih oblika. Od ostalih pretraga je snižen aldosteron i kortizol, te natrij, a reninska aktivnost i kalij su povišeni. Koncentracija testosterona je povišena u ženske i muške djece (2, 5). U bolesnika s neklasičnim oblikom manjka 21-hidroksilaze laboratorijski su nalazi androgena umjereno povišeni ili normalni te je u njih za dijagnostiku važan rezultat testa stimulacije sintetičkim ACTH "synacten test" (2, 3, 5, 8).

Primjenom testa stimulacije sintetičkim ACTH potvrđuje se dijagnoza KAH-a. Provodi se ujutro zbog dnevnog kolebanja 17-hidroksiprogesterona. Uzorkovanje krvi je prije primjene pripravka sintetičkog ACTH i 60 min poslije za mjerenje 17-hidroksiprogesterona. U slučaju nedostatka enzima 21-hidroksilaze povećat će se koncentracija 17-hidroksiprogesterona uslijed stimulacije ACTH-om i zbog zastoja u daljnjem slijedu sinteze kortizola. Koncentracija 17-hidroksiprogesterona u 60 minuta veća od 60 nmol/L ukazuje na manjak

aktivnosti enzima, a koncentracije androgena će također biti povećane (5). Na temelju rezultata koncentracija 17-hidroksiprogesterona na početku testa i nakon stimulacije moguće je razlikovati skupine bolesnika s klasičnim i neklasičnim KAH-om. Rezultati 17-hidroksiprogesterona nakon stimulacije u bolesnika s gubitkom soli su vrlo visoki (moguće dostižu 3000 nmol/L), u onih s virilizirajućim oblikom visoki, a u onih koji su heterozigoti za mutaciju enzima 21-hidroksilaze se preklapaju s onima zdravih osoba (2, 4, 7, 8). Kortizol u bolesnika s neklasičnim oblikom manjka 21-hidroksilaze je normalan u obje točke mjerenja u testu stimulacije. Od ostalih analiza mogu se mjeriti androstendion, DHEAS i kortizol u oba uzorkovanja krvi u ovom testu (2, 5). Neki autori predlažu u dijagnostici i testu stimulacije mjerenje metabolita nakupljanja 17-hidroksiprogesterona, i to 21-deoksikortizola u bolesnika koji su heterozigotni za mutaciju 21-hidroksilaze primjenom specijalnih tehnika, ali to nije izvedivo u standardnom kliničkom laboratoriju budući da nije rutinska analiza (4, 9).

Tablica 1.

Sažeti prikaz rezultata laboratorijskih pretraga u bolesnika s KAH-om prema nedostatku enzima. Analiti označeni zvjezdicom (*) nisu rutinske pretrage kliničkog laboratorija, već se provode samo u specijalnim ustanovama. Tablica je preuzeta i prilagođena prema New (2).

Table 1

Summary of hormonal profiles in CAH with different enzyme deficiencies. Hormones not routinely performed are marked with an asterisk (*), and their measurement requires complex technology and expertise. The content of the table is modified according to New (2).

Mutacija enzima/klinički oblik Enzyme defect/Clinical type	Povišeni nalaz Increased levels	Sniženi nalaz Decreased levels	Normalan nalaz Normal levels
21-hidroksilaza/klasični s gubitkom soli 21-Hydroxylase/classical salt wasting	17-OH progesteron, progesteron, DHEAS, androstendion, testosteron, renin 17-OH, progesterone, progesterone, DHEAS, androstendione, testosterone, renin	kortizol, aldosteron cortisol, aldosterone	
21-hidroksilaza/klasični virilizirajući 21-Hydroxylase/classical simple virilizing	17-OH progesteron, progesteron, DHEAS, androstendion, testosteron 17-OH progesterone, progesterone, DHEAS, androstendione, testosterone	kortizol cortisol	aldosteron aldosterone
21-hidroksilaza/neklaasični - djelomični nedostak 21-Hydroxylase/nonclassical	17-OH, testosteron, u testu stimulacije sintetičkim ACTH, DHEAS, androstendion 17-OH progesterone, testosterone, after ACTH stimulation: DHEAS, androstendione		kortizol, aldosteron, renin cortisol, aldosterone, renin
11-beta hidroksilaza/klasični/neklaasični 11-beta Hydroxylase/classical/nonclassical	mineralokortikoidi, androgeni, sljedeći analiti su također povišeni i u testu stimulacije sintetičkim ACTH: *deoksikortikosteron, *11-deoksikortizol mineralocorticoids, androgens, after ACTH stimulation: *deoxycorticosterone, *11-deoxycortisol	renin renin	
3-beta hidroksisteroid dehidrogenaza/klasični 3-beta Hydroxysteroid dehydrogenase/classical	preteče androgena i androgeni, *17-OH pregnenolon androgens and its precursors, *17-OH pregnenolone	androstendion, testosteron, aldosteron androstendione, testosterone, aldosterone	
3-beta hidroksisteroid dehidrogenaza/neklaasični 3-beta Hydroxysteroid dehydrogenase/nonclassical	u testu stimulacije sintetičkim ACTH: *17-OH pregnenolon i u omjeru s kortizolom ili 17-OH progesteronom, DHEAS after ACTH stimulation: *17-OH pregnenolone, also ratio with cortisol or 17-OH progesterone		
DHEAS	androstendion, testosteron androstendione, testosterone		
17-alfa hidroksilaza/17-20-liaza 17-alpha-Hydroxylase/17-20-lyase	progesteron, *deoksikortikosteron *kortikosteron, ACTH progesterone, *deoxycorticosterone, *corticosterone, ACTH	kortizol, androstendion, DHEAS testosteron, estradiol, aldosteron, renin cortisol, androstendione, DHEAS, testosterone, estradiol, aldosterone, renin	
StAR (steroidogeni akutni regulatorni protein) StAR (Steroidogenic acute regulatory protein)	ACTH, renin ACTH, renin	poremećaj sinteze svih steroida; kortizol, androstendion, DHEAS, testosteron defect in synthesis of all steroids, cortisol, androstendione, DHEAS, testosterone	

Metodološke osobitosti

U provođenju laboratorijske dijagnostike mjerenjem 17-hidroksiprogesterona

u djece do godine dana starosti potrebno je isključiti interferenciju sličnih metabolita (primjerice 17-hidroksi pregnenolon) naslijeđenih tijekom trudnoće iz organi-

zma majke. To se provodi jednostavnom pripremom seruma putem ekstrakcije eterom, a što se uobičajeno navodi u uputi proizvođača reagensija. Ovim po-

Tablica 2.

Primjeri rezultata mjerenja 17-hidroksiprogesterona u serumu djece mlađe od 1. godine sa i bez ekstrakcije seruma eterom. Nakon ekstrakcije eterom su koncentracije 17-OH progesterona niže budući da su uklonjeni metaboliti zaostali iz fetalnog razdoblja, a koji su uzrokom križne reakcije u postupku određivanja. Prikazani su rezultati bolesnika s KAH-om i drugih dijagnoza koje ne uključuju poremećaj sinteze kortizola (ostali).

Table 2

17-hydroxyprogesterone results in infants (<1 year) before and after extraction. The extraction procedure removed interfering substances remaining in the circulation from the fetal period and resulted in lower 17-hydroxyprogesterone levels. The presented results comprise CAH patients and patients with other diagnoses.

Uzorak Sample	17-OH progesteron u serumu prije ekstrakcije (nmol/L) 17-OH progesteron before extraction	17-OH progesteron u serumu nakon ekstrakcije (nmol/L) 17-OH progesteron after extraction
KAH/CAH	>3000	590
KAH/CAH	>61	46
ostali/others	18,3	2,8
ostali/others	>61	25,1
ostali/others	7,8	1,4
ostali/others	4,7	0,8
ostali/others	18,1	3,1
ostali/others	9,4	1,6
ostali/others	>61	10,2
ostali/others	20	10,9

stupkom se uklone tvari koje mogu vršiti križnu reakciju u postupku mjerenja te rezultirati lažno povišenim nalazima 17-hidroksiprogesterona (Tablica 2).

Metode mjerenja 17-hidroksiprogesterona su standardne i preporučene od strukovnih udruga, uglavnom na načelu metoda s ligandima (radioimunokemijske metode, enzimimunokemijske metode). Za to postoje gotovi kompleti reagensa mnogih proizvođača s primjenom za ručnu, poluautomatsku i automatsku izradu analiza. Po cijeni su pristupačne, izrada rezultata nije dugotrajna i omogućuje brzu obradu velikog broja uzoraka. Ograničenje ovih metoda je manjkava specifičnost protutijela odnosno križna reakcija sa sličnim spojevima u organizmu, te su posljedično rezultat malo povećani (10). U uvjetima rada dijagnostičkog kliničkog laboratorija važno je redovito provođenje unutarnje i vanjske kontrole kvalitete, premda postoje dokazi da varijacije pri proizvodnji reagensija mogu biti uzrokom promjena rezultata i u uvjetima rada osoblja i stručnjaka sa zadovoljavajućim iskustvom (11). Poboljšanje specifičnosti je moguće slož-

nim metodama i posebnim uređajima, primjerice kromatografske metode ili tandem masena spektrometrija s istovremenim mjerenjem nekoliko hormona (12). Ove metode i uređaji će napretkom tehnologije postati dostupni i u rutinskom radu kliničkog laboratorija, uslijed automatizacije, ali i smanjenja troškova i trajanja izrade analize (12).

Mjerenje hormona u amnijskoj tekućini sa svrhom prenatalne dijagnostike u suvremenom pristupu je zamijenjeno metodama molekularna dijagnostike i koristi se samo u iznimnim situacijama kod neadekvatnog uzorkovanja ((13). Za procjenu rezultata 17-hidroksiprogesterona iz amnijske tekućine potrebno je učiniti mjerenja sa i bez ekstrakcije, po potrebi uključiti i druge analite te poznavati koncentracije tih analita u amnijskoj tekućini u normalnoj trudnoći (14-16).

Mjerenje hormona u bolesnika s KAH-om uslijed manjka drugih enzima

Mutacije drugih enzima (Tablica 1, Slika 1) uključenih u sintezu kortizola imaju manju pojavnost u populaciji (2).

U slučaju rjeđih mutacija enzima u sintezi kortizola u laboratorijskoj dijagnostici su važni analiti koji nisu uključeni u standardni opseg pretraga kliničkog laboratorija zbog toga što te pretrage nisu rutinske ili njihovo mjerenje zahtijeva posebne reagencije i tehnologiju. Primjerice kod manjka 11-beta hidroksilaze nastaje prekid u sintezi kortikosterona iz deoksikortikosterona, te kortizola iz 11-deoksikortizola. Posljedično su povećane koncentracije (mineralokortikoida) deoksikortikosterona i 11-deoksikortizola, a renina snižene. U dijagnostici ovih bolesnika je važan test stimulacije sa sintetičkim ACTH.

Manjak enzima 3beta-hidroksisteroid dehidrogenaze (u kori nadbubrežne žlijezde i gonadama) stvara poremećaj daljnje pretvorbe pregnenolona i 17-hidroksipregnenolona. U ovih bolesnika su u krvi niske koncentracije androstendiona, testosterona i aldosterona, a postoji nakupljanje pregnenolona i prekursora koji se metaboliziraju putem DHEA (dehidroepiandrosterona) u androgene te uzrokuju virilizaciju. U blažem neklasičnom obliku stimulacijom sa sintetičkim ACTH povećane su koncentracije 17-hidroksipregnenolona i DHEA.

U bolesnika s manjkom 17alfa-hidroksilaze/17,20-liaze nastaje prekid u metaboliziranju pregnenolona i 17-hidroksipregnenolona prema DHEA, uz nakupljanje kortikosterona, deoksikortikosterona i progesterona. Sintaza kortizola, aldosterona i spolnih hormona koji se stvaraju u nadbubrežnoj žlijezdi je manjkava, a renin snižen.

Najteži oblik ove heterogene skupine bolesti je kongenitalna lipidna adrenalna hiperplazija s poremećajem aktivnosti enzima kolesterol dezmolaze (steroidogeni akutni regulatorni protein) koji vrši promet kolesterola u mitohondrij. Daljnje metaboliziranje kolesterola u pregnenolon je prekinuto kao i sinteza svih steroida. Kolesterol i njegovi esteri se nakupljaju u izvanstaničnom matriksu u obliku lipidnih kapljica s posljedičnim oštećenjem tkiva. U ovih bolesnika su vrlo snižene koncentracija kortizola, testosterona, DHEA, i androstendiona, a povećane ACTH i renina (6).

Novorođenački probir za KAH i metodološki pristup

U opseg pretraga novorođenačkog probira (engl. neonatal screening) mnogih zemalja je uključena dijagnostika nedostatka 21-hidroksilaze u kongenitalnoj adrenalnoj hiperplaziji. Učestalost ovog stanja se procjenjuje na 1:13.000-20.000, ali može biti i znatno veća u nekim populacijskim skupinama. Izbor i opseg pretraga uključenih u takve nacionalne programe ovisi o mogućnostima i preporukama strukovnih udruga pojedinih zemalja (17). Prednost ovakvog programa je pravovremena dijagnostika bolesnika i u onih koji nemaju odgovarajuću kliničku sliku i značajan povoljan učinak na novorođenačku smrtnost (18-24). Primjerice programi novorođenačkog probira nisu jedinstveni za sve savezne države SAD-a, a procjena odnosa troškova i učinka (engl. cost-effectiveness) programa novorođenačkog probira nije jednoznačna (7, 25, 26). Radna grupa za KAH s manjkom 21-hidroksilaze je objavila 2002. preporuke za novorođenački probir i dijagnostiku, a koje se odnose i na laboratorijski pristup (uzorak, metodologija probira, potvrda rezultata), medicinsku procjenu rezultata i organizaciju javljanja rezultata (1). U međuvremenu su suvremene tehnološke mogućnosti poboljšane i omogućuju bolje otkrivanje i potvrdu bolesnika.

Uzorkovanje se provodi u rodilistu nekoliko dana nakon poroda gdje se nekoliko kapi krvi dobivenih ubodom u petu stavi na posebni filter papir. Nakon sušenja na zraku uzorak je stabilan u uvjetima sobne temperature dulje vrijeme. Za biokemijske analize iz osušene kapi krvi na filter papiru danas se primjenjuju posebni uređaji za automatizirano mjerenje 17-hidroksiprogesterona standardnom metodom (metoda s ligandima, prvobitno RIA, kasnije enzimimunokemijska metoda). Analiza je brza i po cijeni pristupačna te omogućuje brzu obradu velikog broja uzoraka. Ograničenje ove metode je slaba specifičnost i križna reakcija sa sličnim spojevima (npr. 17-hidroksi pregnenolon) koji su neki nastali tijekom trudnoće i prešli iz tijela majke u krvotok djeteta. Takva križna reakcija može dati "lažno pozitivan" rezultat odnosno povišene koncentracije

17-OH progesterona te se postavlja sumnja na dijagnozu KAH-a. Posljedice lažno pozitivnih rezultata su višestruke, te uključuju troškove daljnje dijagnostike i praćenja, ali i emocionalno opterećenje roditelja. Metodološko poboljšanje ovakve enzimimunokemijske metode ima prednost u manjem opsegu križnih reakcija uz iste pogodnosti metode (22).

Koncentracija 17-hidroksiprogesterona je povećana u prvim danima života, u djece manje porođajne težine i kraće gestacijske dobi, te u slučaju teže bolesti ili intrauterino stresnog stanja (27, 28). U takvim slučajevima će rezultat 17-hidroksiprogesterona novorođenačkim probirom biti povišen. Stoga za potrebe otkrivanja bolesnika s KAH-om je važno uspostaviti graničnu vrijednost (engl. cut-off) koja omogućuje razlikovanje normalnih od povišenih koncentracije na temelju nekoliko standardnih kriterija. To su životna dob (odnosno dani života) te porođajna težina i/ili gestacijska dob. U području Sjeverne Amerike, odnosno SAD i Kanade, u novorođenačkom probiru se koriste kriteriji graničnih vrijednosti prema porođajnoj težini, a u Europi i Japanu gestacijskoj dobi. U programu novorođenačkog probira vrlo je važno pri definiciji graničnih vrijednosti izbjeći lažno negativne rezultate tj. spriječiti neprepoznavanje bolesnika. To se postiže uvođenjem postupaka ponovljenog mjerenja ili uzorkovanja nakon nekoliko dana kod dvosmislenih rezultata (4, 7). Novorođenački probir ima bolju osjetljivost za teže oblike odnosno klasične oblike KAH-a s višim koncentracijama 17-hidroksiprogesterona, ali probir nije optimalno usmjeren na otkrivanje neklasičnih oblika (29). Varness i sur. ukazuju na iskustvo nekoliko slučajeva lažno negativnih rezultata u djevojčica s KAH-om virilizirajućeg oblika, ali i na činjenicu da su koncentracije 17-hidroksiprogesterona malo ($2 \text{ ng/dL} = 0,06 \text{ nmol/L}$), ali značajno niže u zdravih djevojčica nego u zdravih dječaka (dječaci $17,5 \text{ ng/dL} = 0,53 \text{ nmol/L}$; djevojčice $15,4 \text{ ng/dL} = 0,47 \text{ nmol/L}$) (30).

Olgemoller i sur. su pokazali znatno poboljšanje otkrivanja bolesnika s KAH-om novorođenačkim probirom koristeći istovremeno kriterije tjelesne težine i životne dobi, s graničnim vrijednostima

razvrstanima po više skupina tjelesne težine i više skupina dana poslije rođenja (31). Ovi autori su u početku rada službe novorođenačkog probira koristili slabije razrađene kriterije životne dobi i tjelesne težine, a revizija kriterija proizašla je rezultirala manjim brojem lažno pozitivnih nalaza i bolju predikciju dijagnoze KAH-a (32).

Različitost kriterija u novorođenačkom probiru ukazuju da struka nema za sada jednoznačne stavove i preporuke u ovom području te je odluka prepuštena nacionalnim stručnjacima i stručnim udrugama (17). U postupku novorođenačkog probira radi smanjenja udjela lažno pozitivnih rezultata, osim primjene kriterija graničnih vrijednosti, koriste se dodatne pretrage i postupci. Metodološko poboljšanje može uključiti metode veće specifičnosti, primjerice kromatografske tehnike s prethodnom ekstrakcijom (masena spektrometrija, tekućinska ili plinska kromatografija) koje je moguće primijeniti na uzorak krvi na filter papiru ili uzorak seruma u slučaju potvrđene dijagnostike KAH-a (12, 33, 34). Drugi pristup problematici lažno pozitivnih rezultata uključuje istovremeno mjerenje nekoliko analita iz uzorka krvi na filter papiru, primjerice kortizol, androstendion, testosteron, ali i analita koji nisu u opsegu rutinskih pretraga, primjerice 11-deoksikortizol ili 21-deoksikortizol (34, 35). Primjena rezultata nekoliko pretraga ili njihovi omjeri omogućuju također preciznije razlikovanje pri sumnji na KAH. Dugogodišnje iskustvo nekih ustanova u novorođenačkom probiru je pokazalo da uvođenje strategije postupaka tzv. drugog stupnja probira (engl. second trier) znatno smanjilo opterećenje nalazima povišenog 17-hidroksiprogesterona (34, 36). Ovaj postupnik obuhvaća ponovno mjerenje 17-hidroksiprogesterona metodom veće osjetljivosti (masena spektrometrija) u uzorcima koju su u prvom navratu bili povišeni. Uzorci koji su bili povišeni na temelju mjerenja veće specifičnosti i osjetljivosti su dalje podvrgnuti mjerenjima nekoliko analita steroida metodom povećane osjetljivosti (34, 36, 37). Ovim pristupom je povećana učinkovitost novorođenačkog probira za KAH i smanjen broj lažno pozitivnih nalaza. Provođenje molekularne dijagnostike

istovremeno s hormonskim pretragama također je moguće iz uzoraka krvi na filter papiru, a što provode neke ustanove u okviru svojih programa tzv. drugog reda novorođenčančkog probira (38). U slučaju sumnje na mutaciju 11beta-hidroksilaze u novorođenčeta s pozitivnom obiteljskom anamnezom i umjereno povišenom koncentracijom 17-hidroksiprogesterona u novorođenčančkom probiru, provedena je daljnja endokrinološka dijagnostika analizom istog uzorka krvi na filter papiru primjenom složenih analitičkih metoda (39).

U pristupu laboratorijske dijagnostike i praćenja bolesnika sa sumnjom na KAH uključeno je više pretraga hormona. Od toga su najčešće koristi mjerenje 17-hidroksiprogesterona i androstendiona. Mjerenje ovih analita je danas po cijeni pristupačno, tehnološki dostupno i metodološki jednostavno primjenom automatskih ili poluautomatskih sustava, ali i ručno. Na tržištu je mnogo proizvođača koji nude reagense ili uređaje za ove analite. U procjeni kliničkog značenja rezultat ovih pretrage je neophodna suradnja i dogovor stručnjaka u laboratoriju i na kliničkim odjelima uključenih u medicinsku skrb ovih bolesnika. Pri uvođenju nove metode korisno je uspostaviti razmjenu uzoraka i suradnju s ustanovom koja već ima određeno iskustvo u tom području, a što će omogućiti brzo savladavanje i prihvaćanje saznanja o ograničenjima i mogućnostima dijagnostike.

LITERATURA:

1. Joint LWPES/ESPE CAH Working group. Consensus statement on 21-hydroxylase deficiency from the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society and the European Society for Paediatric Endocrinology. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 4048-53.
2. New MI. Inborn errors of adrenal steroidogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2003; 211: 75-83.
3. New MI. Nonclassical 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 4205-14.
4. Speiser PW, White PC. Congenital adrenal hyperplasia. *New Engl J Med* 2003; 349: 776-88.
5. Forest MG. Recent advances in the diagnosis and anagement of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Human Reproduction Update* 2004; 10: 469-85.
6. Miller WL. Disorders of androgen synthesis - from cholesterol to dehydroepiandrosterone. *Med Princ Pract* 2005; 14 (1): 58-68.
7. White PC Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *Nat Rev Endocrinol* 2009; 4: 490-8.
8. Votava F, Torok D, Kovacs J, Mosllinger D, Baumgartner-Parzer SM, Solyom J, Pribilincova Z, Battelino T, Lebl J, Frisch H, Waldhauser F. Estimation of the false-negative rate in newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Eur J Endocrinology* 2005; 152: 869-74.
9. Cristoni S, Cuccato D, Sciannamblo M, Bernardi LR, Biunno I, Gerthoux P, Russo G, Weber G, Mora S. Analysis of 21-deoxycortisol, a marker of congenital adrenal hyperplasia, in blood by atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization using multiple reaction monitoring. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2004; 18: 77-82.
10. Riepe FG, Sippell WG. Recent advances in diagnosis, treatment, and outcome of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Rev Endocri Metab Disord* 2007; 8: 349-63
11. Meier U, Schnabel C, Kunz D, Driesch R, Gressner AM. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 450-4.
12. Rauh M, Groschl M, Rascher W, Dorr H. Automated, fast and sensitive quantification of 17-alpha-hydroxy-progesterone, androstendione and testosterone by tandem mass spectrometry with on-line extraction. *Steroids* 2006; 71: 450-8.
13. Nimkarn S, New MI. Prenatal diagnosis and treatment of congenital adrenal hyperplasia. *Horm Res* 2007; 67: 53-60.
14. Dumić M, Plavšić V, Ille J, Brkljačić Lj, Dražančić A, Suchanek E, Kaštelan A. Prenatalna dijagnoza kongenitalne adrenalne hiperplazije zbog defekta 21-hidroksilaze - određivanje 17-hidroksi progesterona iz amnijske tekućine. *Liječ Vjesn* 1987; 109: 65-7.
15. Dumić M, Ille J, Brkljačić Lj, Plavšić V, Dražančić A, Baničević M, Radmanović S, Filipović B, Suchanek E, Kaštelan A. Prenatalna dijagnostika kongenitalne adrenalne hiperplazije zbog nedostatka enzima 21-hidroksilaze. *Liječ Vjesn* 1989; 111: 312-7.
16. Wudy SA, Dorr HG, Solleder C, Djalali M, Homoki J. Profiling steroid hormones in amniotic fluid of midpregnancy by routine stable isotope dilution/gas chromatography-mass spectrometry: Reference values and concentrations in fetuses at risk for 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 2724-8.
17. Loeber GJ. Neonatal screening in Europe; the situation in 2004. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30: 430-8.
18. Therrell BL Jr, Berenbaum SA, Manter-Kapanke V, Simmank J, Korman K, Prentice L, Gonzalez J, Gunn S. Results of screening 1.9 million Texas newborns for 21-hydroxylase-deficient congenital adrenal hyperplasia. *Pediatrics* 1998; 101: 583-90.
19. Grosse SC, Van Vliet G. How many deaths can be prevented by newborn screening for congenital adrenal hyperplasia? *Horm Res* 2007; 67: 284-91.
20. Speiser PW. Prenatal and neonatal diagnosis and treatment of congenital adrenal hyperplasia. *Horm Res* 2007; 68 (5): 90-2.
21. Strnadova KA, Votava F, Lebl J, Muhl A, Item C, Bodamer OA, Torresani T, Bouška I, Waldhauser F, Sperl W. Prevalence of congenital adrenal hyperplasia among sudden infant death in the Czech Republic and Austria. *Eur J Pediatr* 2007; 166: 1-4.
22. Gonzalez EC, Marrero N, Perez PL, Rometa A, Zulueta O, Herrera D, Martinez L, Castells. An enzyme immunoassay for determining 17alpha-hydroxyprogesterone in dried blood spots on filter paper using an ultramicroanalytical system. *Clin Chim Acta* 2008; 394: 63-6.
23. Gunieiro-Papendieck L, Chiesa A, Mendez V, Prieto L. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia: experience and results in Argentina. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2008; 21: 73-8.
24. Dumic K, Krnic N, Skrabec V, Stipanec G, Cvijovic K, Kusec V, Stingl K. Classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency in Croatia between 1995 and 2006. *Horm Res* 2009; 72: 247-51.
25. Natowicz M. Newborn screening-setting evidence-based policy for protection. *N Engl J Med*. Sep 1, 2005; 353: 867-70.
26. Yoo BK, Grosse SD. The cost effectiveness of screening newborns for congenital adrenal hyperplasia. *Public Health Genomics* 2009; 12: 67-72.
27. Zaffanello M, Maffei C, Zamboni G. Multiple positive results during a neonatal screening program: a retrospective analysis of incidence, clinical implications and outcome. *J Perinat Med* 2005; 33: 246-51.
28. Ersch J, Beinder E, Stallmach T, Bucher HU, Torresani T. 17-Hydroxyprogesterone in premature infants as a marker of intrauterine stress. *J Perinat Med* 2008; 36: 157-60.
29. Merke DP, Bornstein SR. Congenital adrenal hyperplasia. *Lancet* 2005; 365: 2125-36.
30. Varness TS, Allen DB, Hoffman GL. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia has reduced sensitivity in girls. *J Pediatr* 2005; 147: 493-8.
31. Olgemoller B, Roscher AA, Liebl B, Fingerhut R. Screening for congenital adrenal hyperplasia: Adjustment fo 17-hydroxyprogesterone

- cut-off values to both age and birth weight markedly improves the predictive value. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 88: 5790-4.
32. Cavarzere P, Camilot M, Teofoli F, Tato L. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia in North-Eastern Italy: a report three years into the program. *Horm Res* 2005; 63: 180-6.
33. Turpeinen U, Itkonene O, Ahola L, STenman UH. Determination of 17-alpha-hydroxyprogesterone in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and immunoassay. *Scand J Clin Lab Invest* 2005; 65: 3-12.
34. Lacey JM, Minutti CZ, Magera MJ, Tauscher AL, Casetta B, McCann M, Lymp J, Hahn H, Rinaldo P, Matern D. Improved specificity of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia by second-tier steroid profiling using tandem mass spectrometry. *Clinical Chemistry* 2004; 50: 621-5.
35. Schwarz E, Liu A, Randall H, Haslip C, Keune F, Murray M, Longo N, Pasquali M. Use of steroid profiling by UPLC-MS/MS as a second tier test in newborn screening for congenital adrenal hyperplasia: the Utah experience. *Pediatr Res* 2009; 66: 230-5.
36. Matern D, Tortorelli S, Oglesbee D, Gavrilov D, Rinaldo P. Reduction of the false-positive rate in newborn screening by implementation of MS/MS-based second-tier tests: The Mayo clinic experience (2004-2007). *J Inherit Metab Dis*; 2007; 30: 585-92.
37. Janzen N, Peter M, Sander S, Steuerwald U, Merhardt M, Holtkamp U, Sander J. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia: Additional steroid profile using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 2581-9.
38. Kosel S, Burggraf S, Fingerhut R, Dorr H, Roscher AA, Olgemoller B. Rapid second-tier molecular genetic analysis for congenital adrenal hyperplasia attributable to steroid 21-hydroxylase deficiency. *Clinical Chemistry* 2005; 51: 298-304.
39. Peter M, Janzen N, Sanders S, Korasch E, Riepe FG, Sander J. A case of 11beta-hydroxylase deficiency detected in a newborn screening program by second-tier LC-MC/MS. *Horm Res* 2008; 69: 253-6.

Summary

HORMONAL ASSESSMENT IN CONGENITAL ADRENAL HYPERPLASIA - DIAGNOSIS AND SCREENING

V. Kušec

Hormone measurement in the most common form of congenital adrenal hyperplasia (CAH) due to 21-hydroxylase deficiency is based on increased levels of 17-hydroxyprogesterone and androgens, decreased levels of glucocorticoids and mineralocorticoids in some CAH forms. Depending on the residual 21-hydroxylase activity different clinical forms with characteristic hormonal profiles can be distinguished. Stimulation test with synthetic ACTH resulting in defined 17-hydroxyprogesterone rise is an important diagnostic tool, and may include measurement of other hormones. Deficiency of other enzymes involved in the cortisol metabolic pathway presents with different hormonal profiles and their measurement is not routinely performed. Concentration of 17-hydroxyprogesterone and other hormones is measured by recommended methods based on immunoassays with commercial reagents manufactured for automated, semi-automated or manual procedure. Neonatal screening for 21-hydroxylase deficiency CAH by 17-hydroxyprogesterone assay from blood spots on filter paper requires established criteria for cut-off values and a protocol for diagnosis confirmation. Awareness of properties and limitations of hormonal measurement is essential in collaboration of all experts involved in medical diagnosis, monitoring and care of CAH patients.

Descriptors: CONGENITAL ADRENAL HYPERPLASIA, 17-HYDROXYPROGESTERONE, 21-HYDROXYLASE, HORMONE MEASUREMENT