

Cribado neonatal de fibrosis quística

J.J. Tellería Orriols, M.J. Alonso Ramos, J.A. Garrote Adrados,
I. Fernández Carvajal y A. Blanco Quirós

Área de Pediatría. Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM). Universidad de Valladolid/CSIC. España.

Objetivo

Analizar la eficacia del método utilizado para el cribado neonatal de fibrosis quística en Castilla y León, realizado con muestras de sangre impregnadas en papel absorbente.

Material y métodos

Se estudiaron 36.086 recién nacidos desde enero de 1999 a junio de 2001 mediante cuantificación de tripsinógeno inmunorreactivo (TIR). Cuando los valores fueron superiores a 60 ng/ml se buscaron mutaciones en el gen *CFTR* con una cobertura del 87,5% de los alelos mutantes en nuestra población. Se solicitó estudio mediante test del sudor en todos los niños en los que se encontró una mutación.

Resultados

Se detectaron valores de TIR > 60 ng/ml en 285 niños (0,79%), se diagnosticó fibrosis quística en 8/285 (2,8%) y en otros 11/285 (3,9%) se encontró una mutación, con test de sudor negativo, por lo que se consideraron portadores sanos. Hasta la actualidad no se tiene noticia de la aparición de ningún falso negativo.

Conclusiones

El método de cribado en dos fases utilizado cumple los criterios exigibles con una sensibilidad del 98,5%. El modelo general del estudio puede utilizarse en otras comunidades, aunque el rastreo de mutaciones deberá ser optimizado realizando programas piloto que identifiquen el espectro local de mutaciones de fibrosis quística.

Palabras clave:

CFTR. Cribado neonatal. Fibrosis quística. Mutaciones genéticas. Recién nacido. Tripsinógeno inmunorreactivo.

NEONATAL SCREENING FOR CYSTIC FIBROSIS

Objective

To analyze the efficiency of the method of neonatal screening for cystic fibrosis (CF) used in Castille and Leon

(Spain), which is carried out with blood from Guthrie spots.

Material and methods

A total of 36,086 newborns were studied from January 1999 to June 2001. Immunoreactive trypsinogen (IRT) was quantified in all samples and genetic study covering 87.5% of mutations in the *CFTR* gene was carried out when IRT levels were > 60 ng/mL. The sweat test was performed in all children in whom at least one mutation was detected.

Results

IRT values of > 60 ng/mL were found in 285 children (0.79%). Of these, eight children (2.8%) were diagnosed with CF and a further 11 children (3.9%) with a negative sweat test were found to have one mutation and were thus classified as healthy carriers. To date, no false negatives have been detected.

Conclusions

The two-stage screening method fulfills the required criteria. Its sensitivity is 98.5% and the basic model can be used in other regions although genetic screening should be optimized by pilot programs to identify the local spectrum of *CFTR* mutations.

Key words:

CFTR. Neonatal screening. Cystic fibrosis. Genetic mutations. Newborn. Immunoreactive trypsinogen.

INTRODUCCIÓN

La fibrosis quística es una enfermedad hereditaria autosómica recesiva cuya incidencia en la población caucásica varía de un área geográfica a otra. En los países de Europa occidental, la incidencia varía entre 1/2.000 y 1/5.000 niños.

El gen causante de la alteración codifica una proteína transportadora de iones cloruro y recibe el nombre de *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane regulator*). La mutación más frecuente es la F508del. Se trata de una deleción de tres bases consecutivas en el exón 10 que provoca la

El programa de cribado neonatal de fibrosis quística está financiado por la Consejería de Sanidad y Bienestar Social de la Junta de Castilla y León.

Correspondencia: Dr. A. Blanco Quirós.

Área de Pediatría. Facultad de Medicina.
Avda. Ramón y Cajal, 7. 47005 Valladolid. España.
Correo electrónico: ablanco@ped.uva.es

Recibido en agosto de 2001.

Aceptado para su publicación en febrero de 2002.

desaparición de una fenilalanina en la posición 508 de la proteína. En poblaciones españolas, la frecuencia de esta mutación entre las causantes de fibrosis quística varía de valores cercanos al 50% en las regiones mediterráneas¹ al 80% observado en Asturias². Este gradiente geográfico es similar al que se encuentra en el continente europeo.

La expectativa de vida de los afectados de fibrosis quística se ha incrementado sustancialmente en las últimas décadas. En los años 1940 la supervivencia era de unos 2 años de vida, mientras que en la actualidad supera los 30. Los signos y síntomas iniciales de la enfermedad pueden parecerse a los de otras enfermedades, lo que a menudo retrasa el diagnóstico³.

Se han propuesto y ensayado programas de cribado neonatal de fibrosis quística desde hace casi 30 años, bajo la premisa de que el diagnóstico precoz y el tratamiento presintomático mejoraría la evolución de la enfermedad⁴. Los materiales biológicos utilizados en los primeros programas incluyeron meconio, heces, saliva y recortes de uñas. No es hasta 1979 cuando se describe el método de cribado mediante la determinación del nivel de tripsinógeno inmunorreactivo (TIR) en manchas de sangre en papel absorbente como las utilizadas en el test de Guthrie⁵. Aunque posteriormente se han propuesto otras determinaciones como la lipasa o la proteína asociada a pancreatitis (PAP)⁶, el análisis de TIR continúa siendo el paso inicial más comúnmente utilizado. El estudio de la PAP es una alternativa potencial o un suplemento al TIR, pero existe por ahora poca experiencia en su uso.

Los primeros programas de cribado neonatal de fibrosis quística obtuvieron una escasa aceptación, debido sobre todo al gran número de falsos positivos del método basado en la detección del TIR. A partir de la identificación de *CFTR* se ensayaron las primeras estrategias en dos fases: determinación del nivel de TIR y estudio de la mutación F508del en los positivos⁷⁻⁹. En el III Encuentro Internacional de Cribado Neonatal que tuvo lugar en Boston en 1996 se propuso una estrategia combinada basada en la detección de TIR seguida del estudio de mutaciones en *CFTR* de las muestras positivas. Todo el estudio puede realizarse con la misma muestra de sangre en papel absorbente.

En nuestro laboratorio se viene realizando el cribado neonatal para hipotiroidismo y fenilcetonuria desde el año 1990. En 1999 se incluyó por primera vez en España el estudio neonatal de la fibrosis quística para toda la población en el Programa de Diagnóstico Neonatal de Enfermedades Congénitas financiado por la Consejería de Sanidad y Bienestar Social de la Junta de Castilla y León.

MATERIAL Y MÉTODOS

El protocolo utilizado para el diagnóstico neonatal de fibrosis quística en nuestro laboratorio se basó en el propuesto en 1999 para su discusión dentro de la European Concerted Action on Cystic Fibrosis (ECACF) y que, con escasas modificaciones, fue aceptado y publicado en 2000¹⁰ (fig. 1). El protocolo propuesto se basa en el estudio secuencial de TIR (y/o PAP) y rastreo de mutaciones en *CFTR* con una capacidad de detección superior al 80%

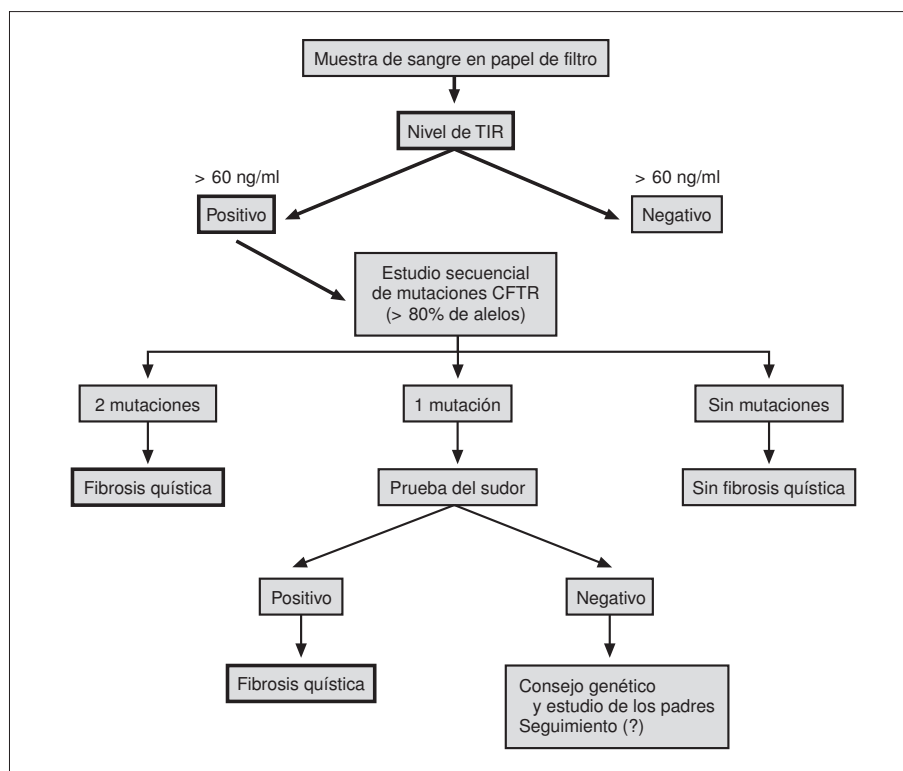


Figura 1. Esquema del protocolo del cribado neonatal de fibrosis quística. TIR: tripsinógeno inmunorreactivo.

de los alelos mutantes fibrosis quística. Para alcanzar esta tasa de mutaciones detectadas, es preciso conocer antes las mutaciones causantes de fibrosis quística en cada población, ya que éstas y sus frecuencias relativas pueden cambiar de una región a otra como ya se ha comentado. Basándonos en un estudio de este tipo que habíamos realizado previamente¹¹, pudimos diseñar el método de análisis de mutaciones óptimo en nuestro caso. En el laboratorio se realizaron las siguientes determinaciones.

1. *Estudio del TIR.* El nivel de TIR se determinó utilizando el AutoDELFLIA® Neonatal IRT (Wallac Oy, Turku, Finlandia). Se estableció el nivel de 60 ng/ml como límite de la normalidad, de acuerdo con las instrucciones del fabricante que coincidieron con el percentil 99 (P₉₉) de 720 muestras analizadas.

2. *Estudio del ADN.* Se extrajo ADN de las muestras positivas para el estudio del TIR utilizando Chelex 100¹². El rastreo de mutaciones de fibrosis quística se realiza según el siguiente protocolo (tabla 1):

a) Detección de la mutación F508del mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de un fragmento del exón 10 del gen *CFTR* y electroforesis en gel de poli-acrilamida al 8%. En nuestra población esta mutación representa el 67,7% de los alelos mutantes.

b) Rastreo de mutaciones mediante electroforesis en gel de gradiente desnaturante (EGGD) de fragmentos amplificados por PCR que incluyen en cada caso uno o

varios exones con sus regiones intrónicas flanqueantes. Esta técnica permite detectar cualquier mutación presente en el fragmento amplificado. Los fragmentos incluidos en el estudio son: multiplex A (exones 11, 14b y 17b); dúplex exones 5 y 18; multiplex C (exones 12, 3 y 23); exón 7, y exón 13 (primer fragmento).

El estudio completo cubre el 87,5% de los alelos mutantes. Cuando se detecta una mutación, el estudio se amplía hasta alcanzar el 95% de las mutaciones¹¹.

c) En los casos en que se detecta la existencia de variaciones en la secuencia de ADN mediante EGGD se identifica la mutación, bien mediante secuenciación directa del fragmento, o mediante digestión específica con enzimas de restricción.

Los resultados, tanto de las muestras que resultaron positivas (portadoras de 2 mutaciones), como de las dudosas (1 mutación detectada) fueron informadas a los hospitales de referencia.

En los casos dudosos se realizó el test del sudor en el hospital, con el fin de aclarar si se trataba de afectados en los que la segunda mutación no había sido encontrada, o bien se trataba de individuos sanos portadores de una mutación. Debe tenerse en cuenta que los portadores sanos de mutaciones de fibrosis quística tienen una probabilidad de dar un resultado falso positivo de entre 2 y 3 veces mayor que la población general¹³.

En los casos en que se identifica una sola mutación, el protocolo de la ECACF propone la realización de una segunda determinación utilizando otro nivel de corte. Con los datos disponibles, el resultado obtenido sólo puede ser orientativo y no puede confirmar ni descartar el diagnóstico de fibrosis quística, al menos mientras no se disponga de más datos relativos al ritmo de disminución de los niveles de TIR en enfermos y en portadores sanos. En nuestro programa se solicitó una segunda muestra en todos los casos en los que se encontró un nivel de TIR por encima del umbral de 60 ng/ml con el fin de obtener información en este sentido que pueda resultar útil en el futuro.

RESULTADOS

Se han estudiado hasta el presente muestras procedentes de 36.086 recién nacidos (tabla 2), de las cuales 285 (0,79%) presentaron valores superiores a 60 ng/ml. El valor de TIR promedio fue de 96,7 ng/ml (desviación estándar [DE], 45,5; límites, 60-334 ng/ml).

En total se detectaron 8 afectados, lo que representa una incidencia de 1 cada 4.510 recién nacidos vivos (2,8% de los positivos para TIR). En este grupo, el valor promedio de TIR fue de 184,4 ng/ml (DE, 88,9; límites, 83-265 ng/ml).

Se han detectado además 11 portadores sanos entre los positivos para TIR (3,9%) con un valor promedio para el TIR de 114,1 ng/ml (DE, 57,1; límites, 60-250 ng/ml).

TABLA 1. Protocolo de estudio secuencial de mutaciones *CFTR* en las muestras positivas para TIR y porcentaje del espectro de mutaciones FQ cubierto

Determinación	Porcentaje acumulado
DF508	67,70
Multiplex A (exones 11,14b y 17b)	76,04
Dúplex exones 5 y 18	79,25
Multiplex C (exones 3, 12 y 23)	81,33
Exón 7	85,50
Exón 13 (primer fragmento)	87,50

TIR: tripsinógeno inmunorreactivo; FQ: fibrosis quística.

TABLA 2. Número de muestras estudiadas por presentar niveles de tripsinógeno inmunorreactivo superiores a 60 ng/ml (identificación de enfermos y portadores)

	1999	2000	2001	Total
TIR > 60 ng/ml	141	97	47*	285 (0,79%)
Enfermos con fibrosis quística	4	2	2*	8 (1/4.510)
Portadores	1	8	2*	11

*Datos referidos a 6 meses.

TIR: tripsinógeno inmunorreactivo.

Las mutaciones identificadas en enfermos y portadores, así como los niveles de TIR que presentaron, se recogen en la tabla 3.

Aunque no puede excluirse la existencia de falsos negativos, no consta que se haya diagnosticado de fibrosis quística en nuestra región a ningún niño que hoy tenga menos de 2 años y medio.

DISCUSIÓN

El hecho de que un programa específico de cribado sea o no recomendado, depende de si la enfermedad en cuestión, así como el test propuesto, satisface unos criterios acordados. Los criterios generales recogidos por Wilson y Jungner en 1998¹⁴, se han estudiado recientemente por Corey en el contexto de la fibrosis quística¹⁵. Básicamente, las cuestiones planteadas se resumen señalando que el cribado neonatal de fibrosis quística está justificado si se demuestra que el diagnóstico precoz mediante cribado mejora las expectativas del niño y de la familia, hasta el punto de justificar el coste del programa. En los últimos años, el número de trabajos publicados a favor de la implantación de programas de este tipo es innumerable, en ellos se toman en consideración aspectos diferentes del problema, desde la mejora en la supervivencia¹⁶, en la función pulmonar^{17,18}, estado nutricional y crecimiento¹⁹, reducción de la mortalidad²⁰, frecuencia de infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*²¹, coste de los tratamientos e, incluso, reducción de la incidencia de nuevos casos^{22,23}.

Aunque el orden cronológico de las pruebas diagnósticas se invierte, el protocolo diagnóstico seguido cumple con los criterios establecidos en el panel consenso para el diagnóstico de la fibrosis quística²⁴, y con el protocolo de diagnóstico de fibrosis quística que establece el Grupo de trabajo de fibrosis quística de la Sociedad Española de Neumología Pediátrica²⁵. En ambos se acepta que la suma de niveles de TIR elevados junto con presencia de dos mutaciones en *CFTR* o una mutación y prueba de sudor positiva son criterios suficientes de diagnóstico de fibrosis quística.

Actualmente, en casi todos los países occidentales existen programas de diagnóstico neonatal de fibrosis quística. Sin embargo, la población cubierta actualmente es muy variable, y va desde el 16% en el Reino Unido³ hasta cerca del 100% en Australia. En Francia, el programa cubre actualmente a más del 60% de los recién nacidos.

Como en todos los programas de cribado neonatal, el consentimiento informado se obtiene a través de una documentación que se entrega en los hospitales en la que se explican los estudios que se van a realizar, plazos e instrucciones para la obtención de la muestra. Ésta es remitida junto con una ficha con datos del recién nacido, dirección y teléfono de contacto. La ficha debe estar firmada por el padre o la madre.

TABLA 3. Relación de mutaciones encontradas en enfermos de fibrosis quística y portadores y nivel de tripsinógeno inmunorreactivo (TIR) detectada en la muestra

	Mutaciones	TIR (ng/ml)
Enfermos		
1	F508del/F508del	265
2	F508del/F508del	221
3	F508del/1812-1G → A	172
4	F508del/1898 + 1G → A	320
5	F508del/?*	100
6	F508del/F508del	97
7	F508del/?*	228
8	F508del/?*	83
Portadores de una mutación		
1	G542X	70
2	F508del	118
3	V562I	85
4	G542X	90
5	F508del	70
6	F508del	100
7	F508del	77
8	Mut. exón 5**	170
9	Mut. exón 12**	80
10	F508 del	124
11	G576A	250

*La segunda mutación no se ha identificado, el diagnóstico final se realizó mediante determinación de electrolitos en sudor.

**La mutación fue localizada, pero aún no se ha identificado.

Según el protocolo propuesto por la ECACF, los laboratorios de cribado deben ser capaces de detectar, como mínimo, el 80% de los alelos mutantes de fibrosis quística, considerando óptima una sensibilidad del 90%. Con estas sensibilidades, seríamos capaces de identificar al menos una mutación en el 96% de los enfermos en el primer caso y en el 99% en el segundo. Con el 87,5% de los alelos mutantes que se están detectando actualmente, la sensibilidad del sistema es del 98,5%.

La detección del 80% de las mutaciones resulta difícil de alcanzar en algunas regiones españolas, debido a la excesiva heterogeneidad de las mutaciones causantes de fibrosis quística. En este aspecto, es particularmente importante conocer la frecuencia relativa de la mutación F508del, ya que mientras en regiones como Asturias el estudio de esta mutación es casi suficiente, en la mayoría de las regiones, entre ellas la nuestra, se requieren estrategias más complejas. En nuestro caso, nos basamos en un estudio anterior¹¹ para diseñar el protocolo expuesto en este trabajo y que, probablemente, fuera suficiente en la gran mayoría de las regiones. Por el contrario, los métodos comerciales disponibles para la detección directa de mutaciones no ofrecen la sensibilidad requerida en la mayor parte de las regiones. El más completo de los existentes es capaz de detectar la mutación F508del y el 30% de las restantes en la población española²⁶ lo que exige que la población que va a estudiarse debe presentar una

frecuencia de F508del superior al 70% para alcanzar la sensibilidad mínima propuesta y del 85% para la óptima.

Debe tenerse en cuenta que los datos que se presentan en el presente trabajo no son extrapolables a otras regiones, debido precisamente a la variabilidad de las mutaciones presentes en cada área geográfica y a sus frecuencias relativas. Los protocolos deben ser diseñados y optimizados después de realizar estudios piloto con el fin de determinar las mutaciones más frecuentes en las respectivas poblaciones¹⁰.

De las 36.086 muestras analizadas hasta hoy en nuestro programa, en el 0,79% se realizó estudio de ADN; sin embargo, como puede observarse en la tabla 2, este porcentaje se redujo desde el año 2000 hasta el 30 de junio de 2001 al 0,54%. Esta disminución se debe a que el análisis de TIR se realiza desde entonces con un sistema automático, lo que mejora la repetitividad del ensayo respecto al método manual.

Desde la implementación del programa se han detectado 8 casos de fibrosis quística de 36.086 muestras analizadas, lo que da una incidencia de uno cada 4.510 recién nacidos; sin embargo, creemos que el tamaño de la muestra estudiada es aún pequeño para asumir este valor como el de incidencia de fibrosis quística en nuestra región.

Entre los niños con niveles de TIR superiores a 60 ng/ml se encontraron 11 casos que mostraron niveles normales de electrolitos en sudor pero que son portadores de una mutación en el gen *CFTR*. Ignoramos si todos ellos son portadores sanos, o si algunos de ellos tiene además alguna mutación leve no detectada que cursa con test del sudor negativo; algunas mutaciones de este tipo se encuentran en formas leves de fibrosis quística o se relacionan con fenotipos atípicos asociados a fibrosis quística como la esterilidad en varones por agenesia de vasos deferentes del testículo, las bronquiectasias diseminadas y otros problemas respiratorios, o la pancreatitis crónica. Es cierto que estos procesos son infrecuentes entre los portadores, pero ignoramos si estos portadores con valores de TIR elevado constituyen un subgrupo del conjunto de portadores.

En relación con los portadores de una sola mutación, debe tomarse en consideración otro aspecto más: cuando una pareja ha tenido un hijo portador, el riesgo de que el siguiente sea enfermo es de 1/100-1/120 si se asume una frecuencia de portadores en la población del 1/25-1/30. Es necesario por lo tanto ofrecer un adecuado asesoramiento genético a estas familias, así como realizar el estudio genético de los padres. Sería discutible si estos análisis deben incluirse en el programa de detección precoz o realizarse desde el hospital de referencia.

Para concluir, puede decirse que el protocolo de diagnóstico neonatal de fibrosis quística que se ha puesto en marcha en nuestra comunidad hace más de 2 años, cumple con los criterios de calidad propuestos por la ECACF

y ha demostrado ser un método sensible. Sólo el tiempo dirá en qué medida un programa como éste mejora las expectativas de los enfermos de fibrosis quística y de sus familias, o si es capaz de reducir la incidencia de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

- Casal T, Ramos MD, Gimenez J, Larriba S, Nunes V, Estivill X. High heterogeneity for cystic fibrosis in Spanish families: 75 mutations account for 90% of chromosomes. *Hum Genet* 1997;10:365-70.
- Coto E, Bousño C, Menendez MJ, Cue R, Toral JF, Benavides A, et al. Cystic fibrosis in Asturias: An elevated frequency of the deltaF508 mutation. *Med Clin* 1994;103:681-3.
- Dodge JA. Why screen for cystic fibrosis? A clinicians view. *Acta Paediatr* 1999;32(Suppl 4):28-32.
- Wilcken B. Newborn screening for cystic fibrosis: Its evolution and a review of the current situation. *Screening* 1993;2:43-62.
- Crossley JR, Elliot RB, Smith PA. Dried blood spot screening for cystic fibrosis in the newborn. *Lancet* 1979;1:472-4.
- Iovanna JL, Ferec C, Sarles J, Dagorn JC. The pancreatitis-associated protein (PAP). A new candidate for neonatal screening of cystic fibrosis. *C R Acad Sci III* 1994;317:561-4.
- Farrell PM, Aronson RA, Hoffman G, Laessig RH. Newborn screening for cystic fibrosis in Wisconsin: First application of population-based molecular genetics testing. *Wis Med J* 1994; 415-21.
- Gregg RG, Simantel A, Farrell PM, Kosciak R, Kosorok MR, Laxova A, et al. Newborn screening for cystic fibrosis in Wisconsin: Comparison of biochemical and molecular methods. *Pediatrics* 1997;99:819-24.
- Larsen J, Campbell S, Faragher EB, Gotz M, Eichler I, Waldherr S, et al. Cystic fibrosis screening in neonates—measurement of immunoreactive trypsin and direct genotype analysis for delta F508 mutation. *Eur J Pediatr* 1994;153:569-73.
- Dequeker E, Cuppens H, Dodge J, Estivill X, Goosens M, Pignatti PF, et al. Recommendations for quality improvement in genetic testing for cystic fibrosis. European Concerted Action on Cystic Fibrosis. *Eur J Hum Genet* 2000;8:S2-S24.
- Tellería JJ, Alonso MJ, Calvo C, Alonso M, Blanco A. Spectrum of CFTR mutations in the Middle-North of Spain and identification of a novel mutation (1341 G → A). *Mutation in Brief* no. 252 Online. *Hum Mutat* 1999;14:89.
- Walch PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* 1991;10:506-13.
- Castellani C, Benetazzo MG, Bonizzato A, Pignatti PF, Mastella G. Cystic fibrosis mutations in heterozygous newborns with hypertrypsinemia and low sweat chloride. *Am J Hum Genet* 1999;64:303-4.
- Wilson JMG, Jungner G. Principles and practice of screening for disease. Genève: WHO, 1968.
- Corey M. Requirements for assessing possible benefits of screening: Fundamental problems of comparing screened and unscreened groups of cystic fibrosis patients. In: Traver G, Wurstey B, editors. *Neonatal Screening for Cystic Fibrosis. Proceedings of the International Conference, Caen. Caen Cedex: Presses Universitaires de Caen, 1999; p. 289-99.*
- Dankert-Roelse JE, Meerman GJ, Martijn A, Kate LP, Knol K. Survival and clinical outcome in patients with cystic fibrosis, with or without neonatal screening. *J Pediatr* 1989;114:362-7.

17. Dankert-Roelse JE, Meerman GJ. Long term prognosis of patients with cystic fibrosis in relation to early detection by neonatal screening and treatment in a cystic fibrosis centre. *Thorax* 1995;50:712-8.
18. Waters DL, Wilcken B, Irwing L, Van Asperen P, Mellis C, Simpson JM, et al. Clinical outcomes of newborn screening for cystic fibrosis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 1999;80:F1-F7.
19. Farrell PM, Kosorok MR, Laxova A, Shen G, Kosciak RE, Bruns WT, et al. Nutritional benefits of neonatal screening for cystic fibrosis. Wisconsin Cystic Fibrosis Neonatal Screening Study Group. *N Engl J Med* 1997;337:963-9.
20. Chatfield S, Owen G, Ryley HC, Williams J, Alfaham M, Goodchild MC, et al. Neonatal screening for cystic fibrosis in Wales and the West Midlands: Clinical assessment after five years of screening. *Arch Dis Child* 1991;66:29-33.
21. Feingold J, Guilloud-Bataille M, De Crozes D. Neonatal screening for cystic fibrosis in France: Possible reduced morbidity in detected patients. En: Traver G, Wursteisen B, editors. Neonatal screening for cystic fibrosis. Proceedings of the International Conference, Caen. Caen Cedex: Presses Universitaires de Caen, 1999; p. 275.
22. Dudding T, Wilcken B, Burgess B, Turner G. Neonatal screening for cystic fibrosis. *Lancet* 2000;356:1930.
23. Dudding T, Wilcken B, Burgess B, Hambly J, Turner G. Reproductive decisions after neonatal screening identifies cystic fibrosis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 2000;82:F124-F7.
24. Vázquez C. Diagnóstico de la fibrosis quística. *An Esp Pediatr* 1999;50:431-8.
25. Grupo de Trabajo Fibrosis Quística de la Soc Esp de Neumología Pediátrica. Protocolo de diagnóstico y seguimiento de los enfermos con fibrosis quística. *An Esp Pediatr* 1999;50:625-34.
26. Estivill X, Bancells C, Ramos C, and the Biomed CF Mutation Analysis Consortium. Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in european populations. *Hum Mutat* 1997;10:135-54.