

HIPERPLASIA CONGENITA DE SUPRARRENALES POR DEFICIT DE 21 HIDROXILASA Y SU LIGADURA CON EL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD (HLA)*

Cruz-Marín F. **, Raffoux C. ***, Gilgenkrantz S. ***, Janot C. ***
Streiff F. ***, Pierson M. ****

Key Words: Congenital adrenal hiperplasia, 21-hidroxilase deficiency, inborn error metabolism, genetic linkage, HLA.

Resumen

La hiperplasia congénita de suprarrenales, por déficit en la 21 hidroxilasa, es un disturbio metabólico que se hereda como un carácter autosómico recesivo. Recientemente Dupont y colaboradores han demostrado una estrecha ligadura entre hiperplasia congénita de suprarrenales y el complejo HLA.

Nosotros hemos estudiado 9 familias de origen francés, en las cuales los grupos HLA fueron determinados, así como otros marcadores genéticos localizados sobre el cromosoma 6. En 8 de ellas, los hallazgos son semejantes a los ya publicados en la literatura, pero en una familia hemos encontrado un paciente portador de una hiperplasia congénita de suprarrenales, quien tiene un hermano idéntico por los grupos HLA —A, B, C, D, Dr y Bf (Factor activador de la properdina), y que no porta el déficit de la 21 hidroxilasa. Las posibles explicaciones de este hecho se discuten.

Esta ligadura es importante porque abre nuevas probabilidades para la detección de los portadores al estado heterocigoto, así como también el diagnóstico prenatal de esta enfermedad. (Rev. Cost. Cienc. Méd. 1982, 3(1):j —12).

Introducción

La etiología de la hiperplasia congénita de suprarrenales es, en 95 por ciento de los casos, un déficit en la enzima 21 hidroxilasa, que actúa a nivel de la zona fascicular suprarrenal, catalizando el paso de la 17 hidroxiprogesterona a 17,21 dihidroxiprogesterona. A la vez actúa, en la capa glomerular de la glándula para intervenir en el paso de progesterona a 21 hidroxiprogesterona.

El bloqueo enzimático produce principalmente un déficit de glucocorticoides (cortisol) y de mineralocorticoides (aldosterona). Provoca un aumento en la síntesis de hormonas androgénicas responsables de la virilización del feto femenino "in útero", que se manifiesta como una ambigüedad sexual o por excesiva masculinización fetal (10).

En dos terceras partes de los casos, el déficit en la síntesis de la aldosterona conduce a una pérdida salina urinaria; en un tercio de los casos esta pérdida no es aparente.

La enfermedad se hereda en forma autosómica recesiva, siendo su frecuencia muy variada. En Alaska, Hirschfeld (9) reporta que 1/490 recién nacidos vivos portan la forma severa. La frecuencia más baja es reportada por Chield en Maryland, de 1:67.000. Otras frecuencias citadas por Werder (24) se resumen en la Tabla 1.

* Trabajo presentado en el Club Europeo de Consejo Genético en su octava reunión en Viana de Castelo, 30 de setiembre de 1980, Porto-Portugal.

** Servicio de Genética Médica, Hospital Nacional de Niños. Dr. Carlos Sáenz Herrera, San José, Costa Rica.

*** Laboratorio Regional de Transfusión Sanguínea de Brabois, 54.500 Vandoeuvre, Nancy, Francia.

**** Servicio B. de Pediatría, Centro Regional Universitario de Nancy. 23 avenue de l'attre de Tassigny 54.037. Nancy Francia.

TABLA I
HIPERPLASIA CONGENITA DE SUPRARRENALES, FRECUENCIA DE LOS HOMOCIGOTOS Y HETEROCIGOTOS
RECESIVOS EN DIFERENTES POBLACIONES*

REGION	AUTOR	AÑO	FRECUENCIA DE HOMOCIGOTOS	HETEROCIGOTOS
Maryland, Estados Unidos	Childs	1956	1/67.000	1/28
Zurich, Suiza	Prader	1963	1/5.041	1/37
Birmingham, Inglaterra	Hubble	1966	1/7.255	1/43
Alaska, Estados Unidos	Hirschfeld	1969	1/490	1/11
Toronto, Canadá	Thompson	1972	1/15.000	1/62
Munich, Alemania	Mauthe	1977	1/9831	1/50
Suiza	Werder	1980	1/15.472	1/63

* Tomado de Werder *et al* (24) y de Thompson y Thompson *Cálculo de la frecuencia de los heterocigotos según la ley de Hardy-Weinberg*. Salvat Ed, segunda edición 1977; 283-285.

La frecuencia de los heterocigotos es igualmente variable, va de 1/11 hasta 1/128 (Tabla 1), pero para poder conocer una frecuencia real de esta alteración metabólica, es necesario efectuar un programa de diagnóstico sistemático precoz. Esta posibilidad ha sido sugerida por Pang (18), en 1977, quien describe la técnica de dosificación de la 17 hidroxiprogesterona en gotas de sangre seca sobre papel de filtro, que dará el diagnóstico en forma temprana y sistemática.

En 1977 Dupont *et al.* (5) demostraron en 6 familias con más de 2 hijos afectados de este déficit, la existencia de una ligadura muy estrecha entre “el” o “los genes” responsables del déficit en 21 hidroxilasa y el complejo mayor de histocompatibilidad (HLA). En este estudio se demostró que la segregación de estos genes se hace en conjunto con el locus HLA B y dicha ligadura ha sido analizada por medio del método de “scores”, descrito por Morton en 1955 (17).

Estudios posteriores (2, 4, 7, 11, 12, 15, 16, 21, 23, 26, 28) han corroborado estos resultados y han permitido localizar el gene responsable de este déficit en la región del sistema HLA, sobre el brazo corto del cromosoma 6 entre el locus HLA B y el locus de la glioxalasa 1 (GLO 1).

Esta ligadura entre la hiperplasia congénita de suprarrenales y el sistema HLA ha abierto la posibilidad de detectar a los portadores del estado heterocigota dentro de estas familias, así como de encontrar formas no diagnosticadas clínicamente (27)

El diagnóstico prenatal de esta enfermedad es posible a la 16a semana de gestación, por medio de la identificación de los antígenos HLA sobre las células cultivadas de líquido amniótico, que permitirá identificar “in útero” los portadores del déficit enzimático, así como los niños sanos (3, 6, 13, 19, 20). Serán los padres con un hijo enfermo los que decidirán la conducta a seguir en cada caso. Esto amplía las posibilidades del consejo genético en estas familias afectadas.

A pesar de los estudios efectuados, quedan todavía algunos puntos oscuros sobre el conocimiento clínico y biológico de esta ligadura, lo cual nos ha motivado a efectuar nuestro estudio y comunicar nuestra experiencia.

Material y métodos

Se estudian 9 familias de origen francés compuestas por 41 miembros sin antecedentes de consanguinidad reconocidos.

El grupo está formado por 11 niños portadores del déficit de 21 hidroxilasa y cuyo diagnóstico ha sido comprobado por dosificación hormonal.

Además fueron estudiados 17 progenitores, heterocigotos “obligados” del déficit enzimático y 13 hermanos sanos.

Entre los 11 enfermos, 6 son de sexo femenino y 5 de sexo masculino, 9 de ellos tienen una forma clínica severa, con pérdida de sal y 2 pacientes con la forma leve, sin pérdida de sal aparente.

Marcadores genéticos estudiados sobre el cromosoma 6

1. La determinación de los grupos HLA, A, B, C, fueron efectuados a los 41 miembros de las 9 familias de este estudio y se realizó en linfocitos de sangre periférica, por el método de linfotoxicidad (22). En 3 familias se determinó el grupo HLA, Dr, y en 4

hermanos se efectuaron cultivos mixtos de linfocitos, para determinar la identidad antigénica.

En total se utilizaron 106 antisueros, de los cuales 58 eran específicos, el resto eran poliespecíficos y del locus HLA, Dr.

2. El fenotipo del factor B de la properdina fue determinado por la técnica de electroforesis sobre gel de agar, a alto voltaje seguido de inmunofijación según el método de Alper y Johnson (1).

3. **Dosificación del Factor Bf.**

Fue efectuada por un método nefelométrico con precipitación de complejo anticuerpo Bf y la proteína Bf por el polietilenglicol (8).

4. **Función suprarrenal. Pruebas de estimulación**

En 2 familias con un niño enfermo y con un hermano idéntico por los haplotipos HLA, A, B, C, una prueba de estimulación a la ACTH (Synacthene®) se hizo para demostrar la reactividad de la glándula suprarrenal, por medio de una prueba corta, siguiendo el protocolo del servicio B de pediatría del Centro Hospitalario Universitario de Nancy, que usa una dosis de ACTH de 0,25 mg/m² dada en inyección intramuscular a las 8 horas am. Se toma una muestra de sangre en tiempo cero y una segunda muestra a los 60 minutos después de iniciada la prueba. Se efectuó la dosificación hormonal de 17 hidroxiprogesterona testosterona, cortisol, dosificaciones con las técnicas de radioinmunoensayo respectivas.

Resultados

La familia Gu ... con 3 hijos, todos enfermos con hiperplasia congénita de suprarrenales presentan sus 3 hijos una constitución HLA idéntica entre ellos, al contrario en la familia Cor ... que posee 2 hijos, una niña enferma y un hijo sano, se encuentra que la constitución HLA es diferente en ambos niños (Fig. 1-A).

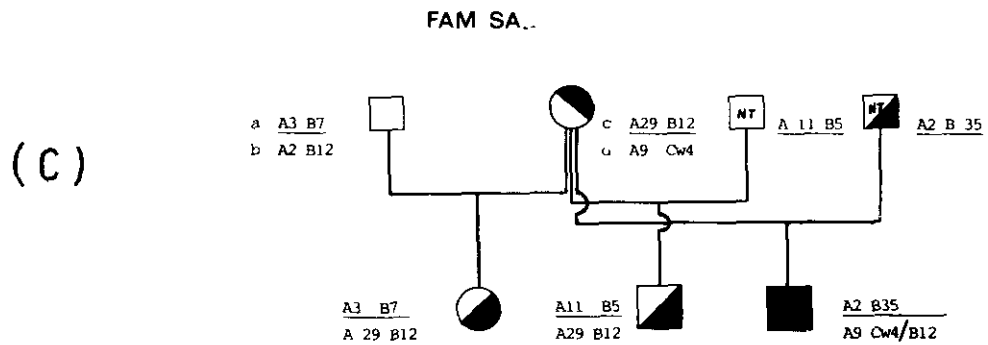
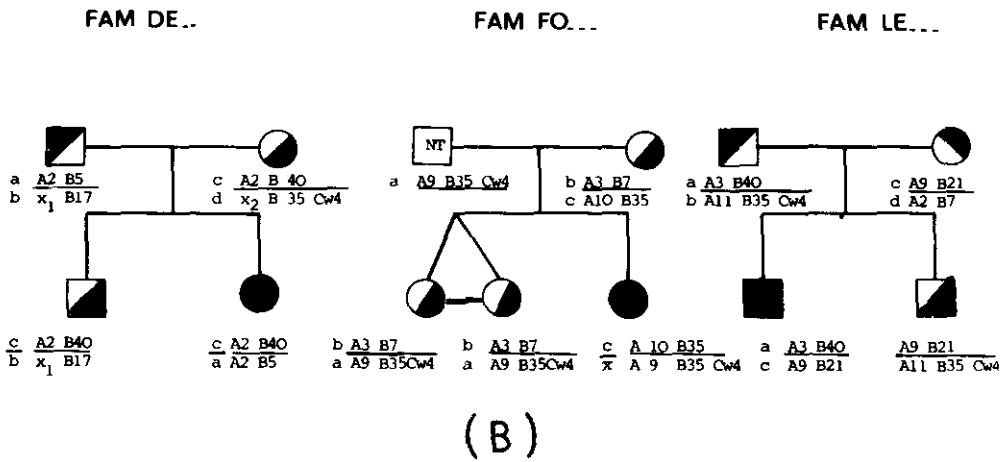
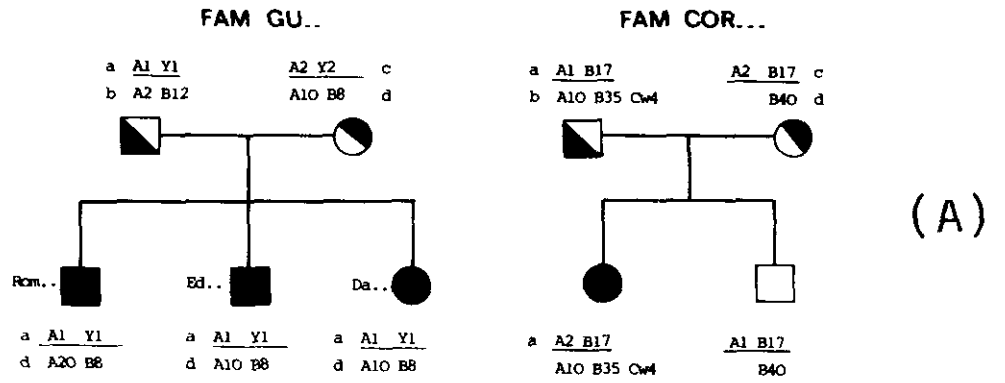
En 3 familias Des ..., Fol ..., Les ..., todas tienen solamente un hijo enfermo, y cada uno de sus hermanos porta un haplotipo HLA en común con el paciente, lo cual los convierte en portadores heterocigotos del gene deficitario de la 21 hidroxilasa. Grosse-Wilde (7) y Lorenzen (15), al estudiar a padres y hermanos de un grupo de enfermos, encontraron pruebas de estimulación alteradas que confirman la condición de heterocigotos, en estos pacientes (Fig. 1.B).

La familia Sa ... tiene una hija primogénita con un haplotipo de su padre A3 B7 y de su madre A29 B12; un segundo hijo con el haplotipo A11 B5 que no corresponde a ninguno de los haplotipos del padre, manteniendo el A29 B12 haplotipo procedente de su madre, resultado que excluye la paternidad de su marido oficial sobre este hijo.

Un tercer hijo, el propositus, con una forma severa de hiperplasia congénita de suprarrenales presenta pérdidas electrolítica y salina.

Este niño tiene un fenotipo HLA diferente a sus hermanos; pues en el haplotipo paterno ha heredado los antígenos A2B35, no presentes en su padre legal, y en el haplotipo de origen materno ha heredado una recombinación A9CW4/B12 la cual nos demuestra claramente que la segregación del gen que rige el déficit en 21 hidroxilasa se ha efectuado ligado al grupo HLA B12 en esta familia; y nos permite localizar al gene responsable de este déficit dentro del complejo mayor de histocompatibilidad ligado estrechamente al locus HLA B, y sobre el brazo corto del cromosoma 6 (Fig. 1-C).

FIGURA 1
GENEALOGIA DE LAS FAMILIAS ESTUDIADAS POR HIPERPLASIA
CONGENITA DE SUPRARRENALES Y LOS ANTIGENOS HLA.



En la familia Nic ... compuesta por 3 hijos, el propositus, una niña portadora del déficit de la 21 hidroxilasa y su hermano STEP poseen los mismos grupos HLA — A, B, C, pero sin presentar este último un solo signo clínico (Fig. 1-D).

La determinación de los grupos HLA Dr demostraron la presencia de grupos diferentes, y un cultivo mixto de linfocitos fue positivo demostrando la no identidad genética total de ambos hermanos.

Es una recombinación materna la que hace a este niño diferente de su hermana pero a nivel del grupo HLA Dr, pudiéndose decir que ligado a HLA Dr debe haber heredado el gen normal que regula la enzima 1 hidroxilasa.

La familia Ren ... presenta una situación idéntica: la propositus, una niña con déficit comprobado hormonalmente, tienen un hermano idéntico por los locus HLA — A, B, C. Se le efectuó a este una prueba de estimulación a la ACTH que mostró una elevación anormal de la 17 hidroxiprogesterona, por lo tanto se consideró como un portador heterocigoto del gen. Suponemos que una recombinación a nivel del grupo Dr hace a estos 2 hermanos diferentes, aunque dicho estudio no fue posible efectuarlo en esta familia (Fig. 1-E).

La familia Beug ...

Esta familia está formada por 2 niñas completamente sanas y 2 varones. El mayor Chris ... portador de una hiperplasia congénita de suprarrenales comprobada, y su hermano, presentan una constitución por grupos HLA — A, B, C, Dr idénticos, y el cultivo mixto de linfocitos negativo. El fenotipo Bf idéntico, lo que demuestra una identidad genética entre ambos hermanos.

Todos los exámenes clínicos y biológicos efectuados a Man ... el hermano idéntico al propositus fueron negativos, y una prueba de estimulación fue reportada normal, no pudiéndose demostrar bloqueo en la 21 hidroxilasa, a pesar de su identidad genética (Fig. 1-F).

Los antígenos presentes en los 12 pacientes fueron comparados con los antígenos presentes en un grupo testigo de 340 personas de la región de Lorena, Francia.

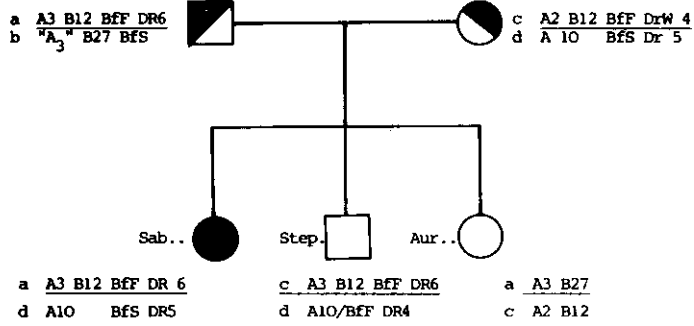
En este grupo de enfermos se encontró una frecuencia más elevada de los antígenos HLA A10 y HLA B35 que en el grupo testigo.

El riesgo relativo calculado para HLA A10 fue de 7,7 y para el antígeno HLA B35 de 3,4. Sometidos estos valores a χ^2 chi cuadrado, obtuvimos un valor de 18,08 para A10 y de 10,1 para B35, lo que es altamente significativo.

Discusión

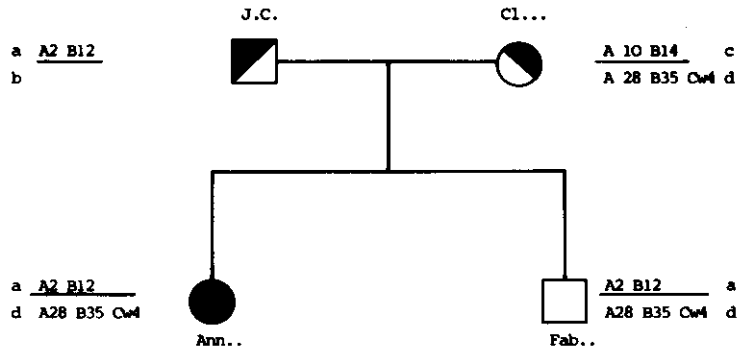
Del estudio efectuado de comparación de antígenos entre un grupo testigo y el de nuestros pacientes, hemos encontrado dos antígenos más frecuentes A10 y B35, este último ha sido también reportado por Zappacosta en Italia (28). En un estudio efectuado en París por Coullin (4) se reporta una relación negativa con el antígeno HLAB8. Cada

FAM NIC..



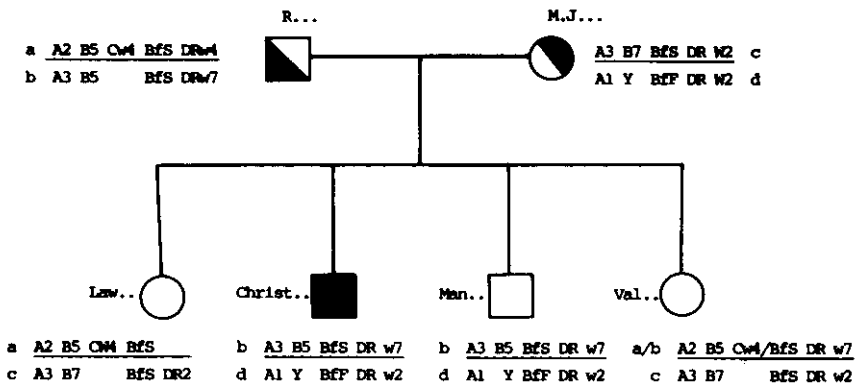
(D)

FAM REN..

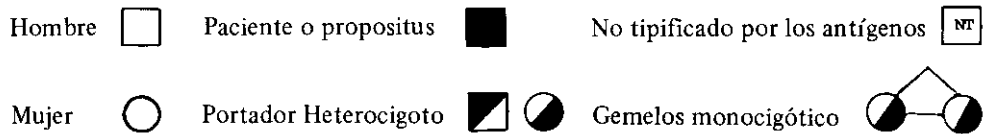


(E)

FAM BEUG



(F)



autor ha mencionado un antígeno diferente, por lo tanto, parece que la relación de la enfermedad a un antígeno específico no existe, tal como se ha demostrado en otras enfermedades.

Una situación especial es la que se presenta en las últimas tres familias analizadas; en las 2 primeras Nic . . . y Ren . . . ambos niños son diferentes a nivel del grupo HLA Dr, lo cual nos lleva a concluir que para poder efectuar un diagnóstico antenatal acertado y 100 por ciento seguro, debemos efectuar el grupo, HLA Dr. Pero como no es posible efectuarlo todavía en líquido amniótico, debe complementarse la determinación de grupos HLA con una dosificación hormonal.

La tercera familia Beug . . . (Fig. 1-F), presenta una situación no resuelta completamente en el momento actual, como es la presencia de 2 hermanos idénticos en su constitución genética, según los marcadores estudiados, y uno presenta el déficit de la 21 hidroxilasa y el otro hermano es normal.

Dentro de las hipótesis capaces de explicar esta divergencia del fenotipo y la función normal de la enzima podemos evocar la forma "críptica" de la hiperplasia congénita de suprarrenales propuesta por Levine (14), pero nosotros excluimos esta posibilidad al no encontrar respuesta anormal a la ACTH.

Tenemos un sujeto con fenotipo normal, en el cual suponemos que los genes de estructura y de regulación de la enzima 21 hidroxilasa, son normales. Debemos pensar que la ligadura no concierne a todos los genes que determinan la enfermedad y quizás existan genes fuera del complejo HLA, que sean los responsables de la ausencia de déficit enzimático en este joven.

Esta posibilidad de la existencia de varios genes reguladores de la síntesis de la 21 hidroxilasa ya ha sido propuesta por varios autores. Ha sido demostrada, por ejemplo, para factores del complemento como es la fracción C₄ la cual es codificada por 2 genes ligados al sistema HLA como lo ha demostrado O' Neil y mencionado por Grosse-Wilde (7). Este autor a la vez sugiere la existencia de múltiples genes para la regulación y síntesis de la 21 hidroxilasa, y en base a ellos explica la existencia de formas leves sin pérdida de sal, que sería un estado de doble heterocigotismo por el déficit en la enzima 21 hidroxilasa. Explica la forma severa como un estado de homocigotismo por todos los genes reguladores, originando un bloqueo completo de la síntesis de esteroides.

Esta posibilidad permite suponer una recombinación de genes que serían responsables del polimorfismo del fenotipo clínico y las respuestas biológicas discordantes en las pruebas de estimulación. Este poliformismo genético puede ser capaz de explicar las respuestas normales del joven Beug a las pruebas de estimulación.

Por último, West (25) ha dado argumentos en favor de la hipótesis de la existencia de dos sistemas o enzimas de hidroxilación, necesarios a la síntesis de esteroides suprarrenales, por medio de determinaciones continuadas de cortisol, 17 hidroxiprogesterona, ACTH, corticosterona, y progesterona. Demuestra que la corticosterona y la progesterona son normales o elevadas en sujetos con un cuadro clínico de hiperplasia congénita de suprarrenales (17 OH progesterona elevada y cortisol bajo).

Estos resultados sugieren que hay dos vías sobre las que actúa la 21 hidroxilasa. Estas pueden estar comprometidas sin que sea influenciada una vía intermedia de la corticosterona, regulada por una 21 hidroxilasa. Implica la existencia de 3 alelos reguladores de la síntesis de esteroides y quizás uno de ellos pudiera estar fuera de la región HLA.

En conclusión, un estudio más amplio, con un mayor número de familias podrá permitirnos definir y aclarar mejor las hipótesis planteadas.

TABLA 2

ESTUDIO DE LA DISTRIBUCION DE LOS ANTIGENOS HLA – A y B,
EN UNA POBLACION DE ENFERMOS CON HIPERPLASIA CONGENITA
DE SUPRARRENALES (déficit de la 21 hidroxilasa) Y
DENTRO DE UNA POBLACION NORMAL

HLA A	ENFERMOS %	CONTROLES	HLA B	ENFERMOS %	CONTROLES
A1	27,20	24,71	B5	9,09	23,24
A2	54,50	42,35	B7	9,09	17,94
A3	27,20	23,24	B8	18,18	15,00
A9	36,30	24,11	B12	36,30	23,53
A10	45,40	9,71	B17	9,09	4,70
A28	9,09	5,29	B18	0,00	12,64
			B21	9,09	4,70
			B35	36,30	14,11
			B40	18,10	10,29
			B27	0,00	7,94

ABSTRACT

Congenital adrenal hiperplasia (CAH) with 21-hydroxylase deficiency is an inborn error of metabolism transmitted by an autosomal recessive gene.

Recently, Dupont et al. (1977) demonstrated genetic linkage between the hydroxylase deficiency gene(s) and the HLA blood group system. We determined the HLA genotype in nine families of French origin, and the factor B phenotype and other genetic markers for chromosome 6. In eight families, we found results similar to those reported in the medical literature. In one family, a propositus and his brother had identical HLA and factor B phenotype, but the brother was healthy and the propositus presented a 21-hydroxylase deficiency.

This linkage provides a method for identification of CAH carries and for prenatal diagnosis of affected children.

Bibliografía

1. Alper, C. A., Johnson, A. M. Immunofixation electrophoresis: A technique for the study of protein polymorphism. *Vox Sang.* 1969; 17:445—452.
2. Boué, A., Boué, J., Couillin, P. Liaison Génétique Hyperplasia Congénitales des surrénales et système HLA. Aplicaciones diagnósticas. Comunicación Séptimas jornadas Europeennes de conseil Génétique. Paris 28/30, Sept. 1979.
3. Couillin, P., Nicolas, H, Boué, J., Boué, A. HLA typing of amniotic-fluid cells applied to prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia. *Lancet.* 1979; 1:1076.

4. Couillin, P., Kottler, Missonnier, M. L., Grisard, M. C., Hors, J. Feingald, J., Boué, J. *et al.* HLA., A, B, C, Dr. Alleles in congenital adrenal hyperplasia. *Hum. Genet.* 1980; 53:389—392.
5. Dupont Bo., Oberfield, S. E., Snithwick, E. M., Lee, T. D., Levine, L. S. Close Genetic Linkage Between HLA and Congenital adrenal Hyperplasia (21 Hydroxylase deficiency). *Lancet.* 1977; 11:1309—1312.
6. Floret, D., Plauchu, H., Berlín, F., Betuel, H., Forest, M. Dépistage anténatal de l'hyperplasie surrénale congenitale déficit en 21 hydroxylase. *Nouv. Presse Méd.* 1980; 9(28):1960—1961.
7. Grosse-Wilde, H., Weil, J., Albert, E., Schols, S., Bilding-Mairr, F., Sippel, W. G. *et al.* Gentic linkage studies between congenital adrenal hyperplasia and the HLA blood group system. *Immunogenetics* 1979; 8:41—49.
8. Hauptmann, G., Tongio, M. M., Klen, J., Mayer, S. La liaison génétique HLA — Bf Etude de 19 familles informatives. *Rev. Fr. Transf. Immuno-Hémat.* 1978; 21 (5):1053—1059.
9. Hirschfeld, A. J., Fleshman, J. K. An unusually high incidence of salt-losing congenital adrenal hyperplasia in the Alaskan Eskimo. *J. Pediatr.* 1969; 75:492—494.
10. Job, J. C. Pierson, M. Endocrinologie. Pédiatrique et croissance Flammarion *Médecine Sciences.* Paris, 1978; 200—218.
11. Klouda, P. T., Harris, R., Price, D. A., HLA and congenital adrenal hyperplasia. *Lancet* 1978; 11:1046.
12. Levine, L. S., Zachmann, M. I., New, M. I., Prader, A., Pollack, M. J., O' Neil, G. J. *et al.* Genetic mapping of the 21 hydroxylase deficiency gene within the HLA linkage groupe. *N. Engl. J. Med.* 1978; 299(17):911—915.
13. Levine, L. S., New, M. I., Pollack, M., Dupont, B. Prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia. *Lancet.* 1979; 2(8143):637—638.
14. Levjine, L. S., Dupont, B., Lorenzen, F., Pang, S., Pollack, M. S., Oberfield, S. *et al.* Cruptic 21-hidroxilase deficiency in families of patients with classical congenital Adrenal Hyperplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1980;51:1316—1324.
15. Lorenzen, F., Pang, S., New, M. I., Pollack, M. S. Oberfields, S., Dupont, B. *et al.* Studies of the c-21 and c-19 steroids and HLA genotyping in siblings and parents of patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21 hydroxylase deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1980; 50(3): 572—577.
16. Lorenzen, F., Pang, S., New, M. I., Dupont, Bo., Pollack M. S., Chow, D. M., *et al.* Hormonal phenotype and HLA genotype in families of patients with congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency). *Pediatr. Res.* 1979; 13:1356—1360.
17. Morton, E., Sequential test for the detection de linkage. *Am. J. Hum. Genetics* 1955; 7:277—318.
18. Pang, S., Hotchkiss, J., Drash, A. L., Levine, L. S., New, M. I. Microfilter paper method for 17 hidroxyprogesterone radioimmunoassay: its application for rapid screening for congenital adrenal hyperplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1977; 45:1003.
19. Pollack, M. S., Maurer, D., Levine, L. S., New, M. I., Pang, S., Duchon, M. A. *et al.* HLA typing of amniotic cells. The prenatal diagnosis of Congenital Adrenal Hyperplasia (21 OH deficiency type). *Transplant proc.* 1979; XI(4): 1726—1728.
20. Pollack, M. S., Levine, L. S., Pang, S., Owers, R. P., Nitowsky, H. M., Maurer, D. *et al.* Prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia (21 hidroxilasa deficiency) by HLA typing, *Lancet.* 1979; 1:1107—1108.
21. Price, D. A., Klouda, P. T., Harris, R. HLA and congenital adrenal hyperplasia linkage confirmed. *Lancet*, 1978; 1:930—931.
22. Ray, J. G., Hare, D. B., Perersen, P. D., Mullally, D. I. Manual of tissue typing techniques. National Institute of Allergy and Infections Disease National Institutes of Health Bethesda, Maryland 20014 Sept. 1976.
23. Weiskamp, L. R., Brysoj, M., Bacon, G. E. HLA and congenital adrenal hyperplasia linkage confirmed. *Lancet.* 1978; 1:931—932.
24. Werder, E. A., Siebenmann, R. E., KnorrMursert, G. The incidence of congenital adrenal hyperplasia in Switzerland. A survey of patients born in 1960 to 1964. *Helv. Paediat. Acta* 1980; 35: 5—11.

25. West, Ch., D., Atcheson, J. B., Stanchfield, J. B., Rallison, M. L., Chavré, U. J., Typer, F. H., Multiple or single 21 Hydroxylase in Congenital Adrenal Hyperplasia? *J Steroid. Biochem.* 1979; 11:1413—1419.
26. Yang, S. Y., Levine, L. S., Zachmann, M. Mapping of the 21 hydroxylase deficiency gene with the HLA linkage group. *Transplant proc.* 1978; 10(4):753—755.
27. Zachmann, M., Prader, A. Unusual heterozygote of congenital adrenal hyperplasia due to 21 hydroxylase deficiency confirmed by HLA tissue typing. *Acta Endocrinol.* 1979; 92: 542—546.
28. Zappacosta, S., Felice, D. E., Minozzi, M., M, de Lombardi, G., Valentino, R., Vanocore, G. HLA and congenital hyperplasia. *Lancet.* 1978; 11:524.