



## UMELISA® TIR NEONATAL: ultramicroensayo para la pesquisa neonatal de la fibrosis quística

Elisa María Castells Martínez <sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0002-1841-2690>  
Aramís Sánchez Gutiérrez <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-6528-7848>  
Amarilys Frómeta Suárez <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-8120-1669>  
Ernesto Carlos González Reyes <sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-2131-1073>  
Yanin Moksde Beltrán <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-8558-8733>  
Eladio Silva Cabrera <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-4219-4603>  
Fidel Rodríguez Cala <sup>3</sup> <https://orcid.org/0000-0003-1175-7335>  
Teresa Collazo Mesa <sup>4</sup> <https://orcid.org/0000-0002-3984-9189>  
Elvia Nelemis Santos González <sup>4</sup> <https://orcid.org/0000-0001-7836-1681>  
Nelson Ozunas Fernández <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-3867-8269>  
Tania Licourt Otero <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-4938-7758>  
Ana Luisa Arteaga Yera <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-0207-7821>  
Maryeris Espinosa Morales <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-8120-1669>  
Lesley del Río Fabre <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-4328-3947>  
Odalys Martín González <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-9798-738X>  
Greilys Morejón García <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-1052-0785>  
Pedro Lucio Pérez Morás <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-1794-4983>  
Claudia Almira Rizo <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-8734-9392>  
Zoe Núñez Lamothe <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-8819-1291>

<sup>1</sup> Centro de InmunoEnsayo. La Habana, Cuba

<sup>2</sup> GK Pharmaceuticals CMO. Manatí, Puerto Rico

<sup>3</sup> Ministerio de Salud Pública. La Habana, Cuba

<sup>4</sup> Centro Nacional de Genética Médica. La Habana, Cuba

\*Autor para la correspondencia: elimai77@gmail.com

### RESUMEN

**Introducción:** La fibrosis quística es la enfermedad autosómica recesiva más común en la población caucásica y afecta aproximadamente 1:3000 recién nacidos. **Objetivo:** Estandarizar y validar un ultramicroELISA para la pesquisa neonatal de la fibrosis quística y analizar los resultados de la generalización de esta prueba en la red de laboratorios SUMA de Cuba. **Métodos:** Ensayo inmunoenzimático heterogéneo para cuantificar tripsina inmunorreactiva en muestras de sangre seca sobre papel de filtro. Se evaluaron parámetros de desempeño y se realizó un estudio piloto en 6 provincias de Cuba. **Resultados:** El tiempo de ejecución es de 20 h, el rango útil de la curva de (0-500) ng/mL y la concentración mínima detectable de 1,5 ng/mL. Se obtuvo una buena correlación con el kit comercial AutoDELFLIA Neonatal IRT (n = 3958; r = 0,88; p < 0,01, κ = 0,976). Durante el estudio piloto se evaluaron 6470 muestras, obteniéndose un valor medio de TIR de 12,1 ng/mL. Un bebé fue confirmado mediante prueba de sudor, constituyendo el primer recién nacido con fibrosis quística pesquisado y diagnosticado precozmente en Cuba. Se obtuvo el registro sanitario en 2018 y se han producido

#### Editor

Lisset González Navarro  
Academia de Ciencias de Cuba.  
La Habana, Cuba

#### Traductor

Darwin A. Arduengo García  
Academia de Ciencias de Cuba.  
La Habana, Cuba

32 lotes del ensayo. Hasta diciembre de 2021 se pesquisaron 281 717 bebés de los cuales 686 resultaron repetidamente elevados para un 0,24 % de positividad. Hasta este resultado 21 bebés han sido diagnosticados con fibrosis quística. **Conclusiones:** El UMELISA® TIR Neonatal es un ensayo preciso y exacto que constituye una herramienta novedosa y eficaz para ser empleada satisfactoriamente en la pesquisa neonatal de fibrosis quística en Cuba y en otros países de nuestro continente.

**Palabras clave:** fibrosis quística; pesquisa neonatal; tripsina inmunorreactiva; ultramicroELISA

## UMELISA® TIR NEONATAL: ultramicroassay for neonatal screening of cystic fibrosis

### ABSTRACT

**Introduction:** Cystic fibrosis is the most common autosomal recessive disorder in the Caucasian population and affects approximately 1: 3,000 newborns. It is one of the pathologies recommended to be included in newborn screening programs of inherited-metabolic diseases worldwide. **Objective:** To standardize and validate an ultramicroELISA for cystic fibrosis newborn screening and analysis of the results of the generalization of this test in the network of SUMA laboratories in Cuba. **Methods:** Heterogeneous enzyme-linked immunosorbent assay to quantify immunoreactive trypsin in dried blood samples on filter paper. They were evaluated performance parameters and it was carried out a pilot study in six Cuban provinces. **Results:** The run time is 20 hours, the useful range of the curve is 0-500 ng/mL, and the minimum detectable concentration is 1.5 ng/mL. The recovery percentages and the coefficients of variation are adequate for this type of method. A good correlation was obtained with the commercial AutoDELFLIA Neonatal IRT kit ( $n = 3\ 958$ ,  $r = 0.88$ ,  $p < 0,01$ ,  $\kappa = 0.976$ ). During the pilot study, they were studied 6470 samples, obtaining a mean IRT value of 12,1 ng/mL. A baby was confirmed by sweat test and molecular biology technique, constituting the first cystic fibrosis newborn to be investigated and early diagnosed in Cuba. It was obtained the sanitary registration in 2018 and thirty-two lots of reagents have been produced (14,475 kits equivalent to 4,168,800 determinations). Up to December 2021, 281,717 babies had been screened, of which 686 were repeatedly elevated for 0,24% positivity rate. Twenty one babies have been diagnosed with cystic fibrosis. **Conclusions:** The UMELISA® TIR Neonatal is a precise and exact test that constitutes a novel and effective tool to be used successfully in cystic fibrosis neonatal screening in Cuba and other countries of our continent.

**Keywords:** cystic fibrosis; neonatal screening; immunoreactive trypsin; ultramicroELISA

## INTRODUCCIÓN

La base principal de la pesquisa neonatal (PN) es la captación de todos los recién nacidos (RN) para la determinación de las enfermedades cuyos síntomas clínicos pueden ser imperceptibles en el momento del nacimiento y que con el tiempo pueden ocasionar al niño graves daños físicos y mentales. Además, la PN permite comenzar el tratamiento de forma oportuna antes de que los efectos de las enfermedades sean irreversibles. Generalmente se practica en gotas de sangre obtenidas del talón, colectadas y secadas en papel de filtro. <sup>(1)</sup>

En Cuba el desarrollo del Sistema Ultramicro Analítico (SUMA) y de técnicas de ultramicroELISA, las cuales usan sólo 10 µL de reactivos, creó las bases para el establecimiento de programas masivos orientados al diagnóstico de errores congénitos. La fibrosis quística (FQ) cumple con los criterios para ser incluida en los programas de PN y forma parte del cuadro básico de patologías (hipotiroidismo congénito, fenilcetonuria, hiperplasia adrenal congénita, galactosemia, deficiencia de biotinidasa, enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce, siclemia, toxoplasmosis congénita, deficiencia

de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa) que de forma obligatoria se recomienda incluir en los programas para la PN de enfermedades heredo-metabólicas a nivel mundial.

La FQ es la enfermedad autosómica recesiva más común en la población caucásica y afecta aproximadamente entre 1:2000 y 1:4000 bebés nacidos vivos. <sup>(2)</sup> Es una enfermedad multisistémica, que generalmente se presenta en la infancia, y se caracteriza principalmente por infecciones respiratorias recurrentes, insuficiencia pancreática exocrina y aumento de la concentración de electrolitos en el sudor. <sup>(3)</sup> Es causada por mutaciones en el gen regulador de la conductancia transmembrana de la FQ (CFTR). <sup>(4)</sup> Desde su descubrimiento en 1989 se han descrito más de 2000 mutaciones en la base de datos de mutaciones de FQ, siendo la F508del la más común de todas. <sup>(5)</sup>

Los programas de PN para la FQ se han implementado desde principios de la década de 1970, utilizando medicamentos iniciales de proteínas de meconio y luego de tripsina inmunorreactiva (TIR) en muestras de sangre seca sobre papel de filtro (SSP), generalmente en combinación con análisis de mutaciones. <sup>(6,7)</sup> Esta prueba todavía se usa ampliamente en los protocolos de detección de FQ a nivel mundial. La concentración de TIR es alta en la sangre de los lactantes con FQ, probablemente debido a la filtración de la proteína a la circulación después de una lesión pancreática exocrina. <sup>(8,9)</sup> La PN para la FQ ofrece la oportunidad de un diagnóstico temprano y calidad de vida en pacientes con esta enfermedad.

Según estudios realizados se plantea que la FQ afecta a entre 1:1600 y 1:14 000 RN en América Latina <sup>(10)</sup> y la incidencia en la población cubana se ha estimado en 1: 9862 neonatos, según datos de la Comisión Nacional de FQ. <sup>(11)</sup> Sin embargo, este valor se basa en estudios aislados y no existe un registro sobre la incidencia real de la enfermedad en nuestro país, porque hasta el año 2019 no se había establecido ningún programa de detección de esta patología en el período neonatal.

Los objetivos de este trabajo fueron el diseñar, estandarizar y validar un ultramicroensayo para la PN de la FQ, el desarrollo de un programa piloto para la PN de la FQ en 16 laboratorios SUMA de 6 provincias de Cuba y analizar los resultados de la generalización de esta prueba diagnóstica en la red de laboratorios de Cuba.

## MÉTODOS

Se diseñó un ultramicroensayo enzimático heterogéneo de doble anticuerpo, para la cuantificación de TIR en SSP. Este proyecto se llevó a cabo en el Centro de InmunoEnsayo (CIE) entre los años 2014-2021.

Para desarrollar este trabajo fue necesario evaluar los anticuerpos monoclonales (AcM) anti-TIR obtenidos en el CIE <sup>(12)</sup>

y determinar las condiciones óptimas de funcionamiento del ensayo. Los AcM fueron recubiertos directamente en la fase sólida y conjugados a fosfatasa alcalina (FA) y biotina siguiendo el método del glutaraldehído <sup>(13)</sup> y el método del éster de succinamida <sup>(14)</sup> respectivamente. Para la preparación de calibradores y controles se emplearon eritrocitos lavados y hemolizados ajustados al 55 % de hematocrito con plasma humano libre de TIR por el método del carbón activado. Se evaluaron los inhibidores de proteasas ShPI-1, rShPI-1A y aprotinina en una relación de 6 µg de inhibidor por cada 20 µg de tripsina. Se evaluaron tiempos de elución de 1 h y de 16 h-18 h. La validación interna del ensayo incluyó pruebas de precisión, recuperación, paralelismo, especificidad, determinación de límite de detección y cuantificación, comparación de métodos y evaluación de muestras de recién nacidos (RN) normales y RN confirmados con la enfermedad.

Se realizó un estudio piloto para la PN de la FQ en varios laboratorios SUMA de distintas regiones del país. Se estudiaron 6470 muestras de sangre del talón de RN colectadas como promedio entre el quinto y el séptimo días de nacido correspondientes al programa cubano de PN de enfermedades heredo-metabólicas. Se escogió el protocolo TIR/TIR/ADN (figura 1) y se empleó un nivel de corte (NC) de 50 ng/mL para ambas determinaciones de TIR. El estudio molecular se realizó en colaboración con el Centro Nacional de Genética Médica (CNGM) mediante el uso de un panel de 8 mutaciones. <sup>(15)</sup>

Se calcularon la media, mediana, desviación estándar (DE), varianza y los percentilos de la distribución. Además, se evaluó la influencia de la edad gestacional (EG), el peso al nacer (PAN), el sexo, la forma de parto, el número de fetos, la edad del RN al momento de colecta de la muestra (tiempo de muestreo) y el tiempo de procesamiento de las muestras (TPM) sobre los niveles de TIR.

A partir de enero del 2019 la FQ se incluyó dentro del programa nacional para la PN ampliada de enfermedades heredo-metabólicas, siguiendo el mismo protocolo empleado durante el estudio piloto. Este programa es dirigido por el Departamento Materno-Infantil del Ministerio de Salud Pública, el cual coordina las acciones de las instituciones de salud encargadas del diagnóstico, la confirmación, el control de los casos, el tratamiento, el seguimiento de los pacientes y la atención a sus familiares.

Los gráficos se realizaron con la hoja de cálculo de *Microsoft Excel* 2007. El análisis estadístico de los datos se realizó a través del programa *Statistica for Windows*, versión 4.5. Se utilizaron pruebas no paramétricas (prueba U de Mann-Whitney y prueba de medias para variables independientes) tomando como nivel de significación  $p < 0,05$ .

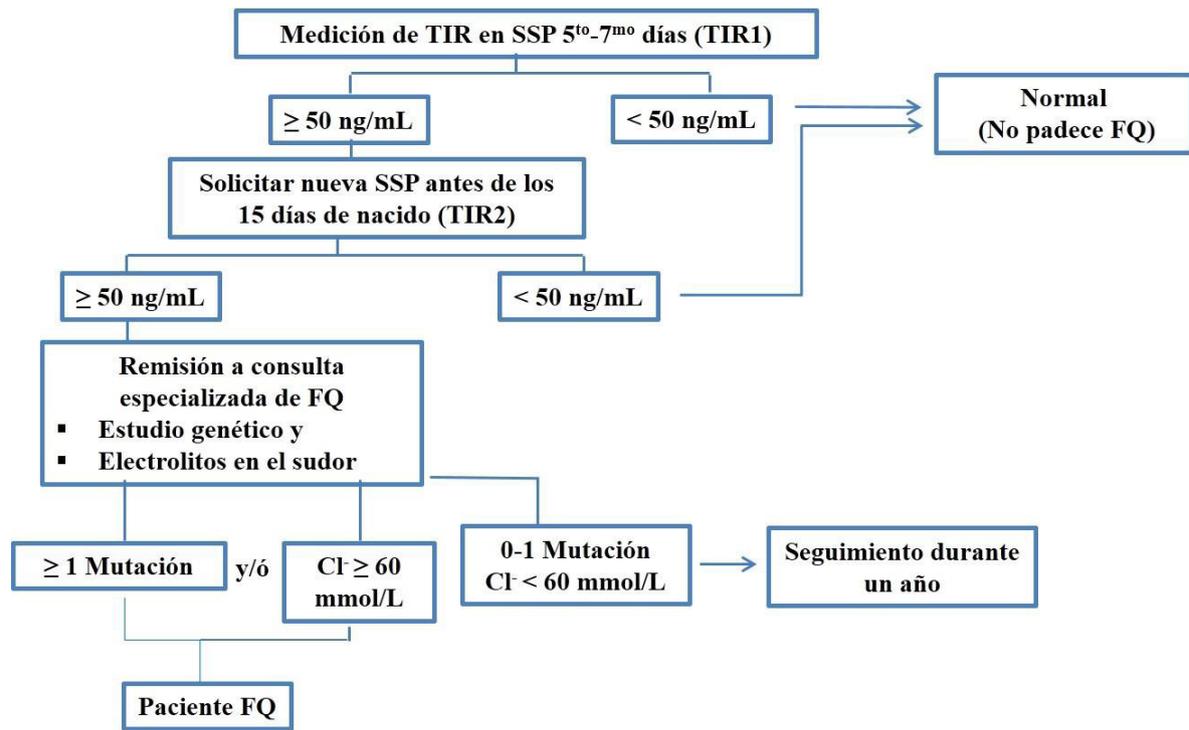


Fig. 1. Protocolo escogido en el estudio piloto para la pesquisa neonatal de la fibrosis quística

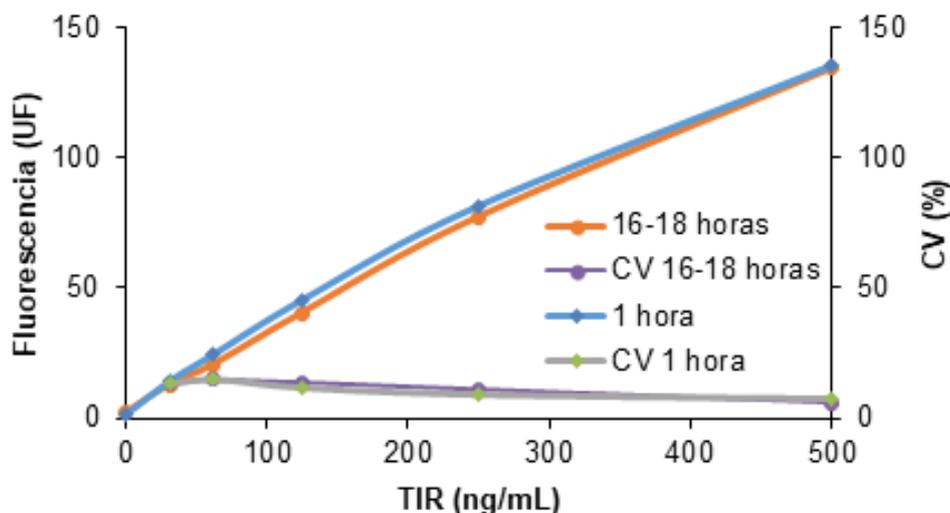
## RESULTADOS

Las pruebas de normalización arrojaron que los mejores resultados se obtuvieron al recubrir las placas con el AcM anti-TIR 4C9C9 en solución de Tris- HCl 0,05 M pH 8, a partir de una concentración de 6 µg/mL. El rango útil de la curva de calibración oscila entre 0 ng/mL-500 ng/mL empleando la aprotinina como inhibidor de proteasas. No se observaron diferencias en el comportamiento de la curva de calibración para los 2 tiempos de elución evaluados (figura 2); sin embargo, el efecto del tiempo de elución sobre los niveles de TIR en muestras de RN fue diferente al obtenido para la curva de calibración. En este caso sí se observaron diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) al comparar las medias de TIR para los 2 tiempos evaluados. Al evaluar 3173 muestras se observó que los valores de TIR fueron más elevados en aquellas muestras que se eluyeron por un período de 16 h-18 h ( $12,9 \pm 11,8$  ng/mL) respecto a las que se eluyeron durante 1 h ( $10,6 \pm 10,0$  ng/mL), influyendo directamente en los percentilos calculados (51,7 ng/mL para muestras eluidas entre 16 h y 18 h vs 42,5 para muestras eluidas 1 h, valores calculados para el percentil 98,5), de ahí que se determinó que el tiempo de ejecución del ensayo fuera de 20 h.

Los coeficientes de variación intra e interensayo para 3 muestras fueron inferiores al 10 %. El porcentaje de recuperación promedio obtenido, al evaluar controles comerciales

con concentraciones de TIR conocidas fue de  $100,3 \% \pm 11,3$ . En la prueba de paralelismo el recobrado medio de las concentraciones calculadas, después de la corrección con el factor de dilución, fue de  $100,1 \% \pm 12$  y los porcentajes individuales oscilaron entre 89 % y 118 %. La concentración mínima detectable fue de 1,5 ng/mL y el límite de cuantificación fue de 4,5 ng/mL. La reactividad cruzada con proteínas relacionadas estructuralmente con la TIR mostró ser inferior al límite de detección del ensayo. Se evaluaron 4406 muestras de RN cubanos, obteniéndose una media de  $12,8$  ng/mL  $\pm 11,8$  y un valor límite de concentración de 50 ng/mL calculado para el percentilo 98,5 de la distribución, el cual se implementó como NC en el programa piloto de PN de la FQ. Se compararon los resultados obtenidos de 3958 muestras entre nuestro método y el ensayo AutoDELFLIA® Neonatal IRT de la firma norteamericana Perkin Elmer, obteniéndose una buena correlación ( $r = 0,88$ ) (figura 3). El cálculo del coeficiente kappa de Cohen mostró una concordancia casi perfecta para el 95 % de confianza entre el UMELISA TIR NEONATAL y el ensayo de Perkin Elmer ( $\kappa = 0,976$ ). Las muestras confirmadas de pacientes fibroquísticos mostraron niveles TIR superiores a 70 ng/mL.

Como parte del estudio piloto para la PN de la FQ de enero a junio del 2018 se procesaron los resultados de 6470 muestras de neonatos, cifra que representa aproximadamente el 5,6 % de todos los RN en Cuba en dicho año. La edad promedio de muestreo fue de 6 días con resultados disponibles a los



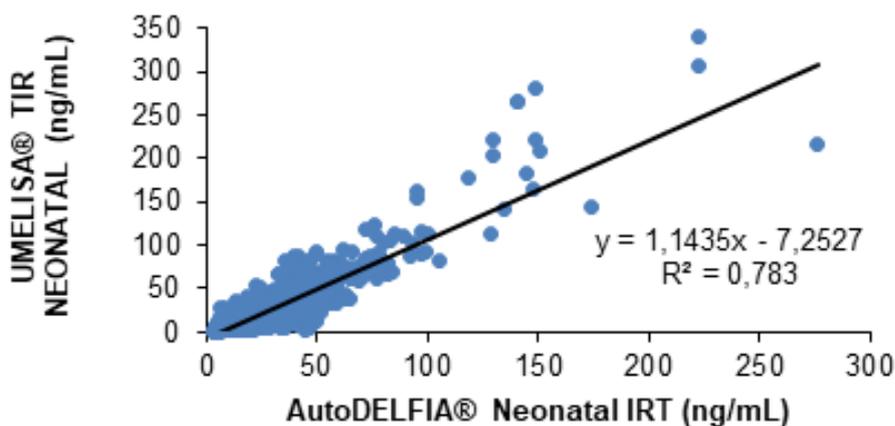
**Fig. 2** Curva de calibración típica y perfil de precisión del ensayo con los 2 tiempos de elución evaluados

9 días de vida. El valor medio de TIR fue de  $12,1 \text{ ng/mL} \pm 13,2$  (rango  $0 \text{ ng/mL}$ - $358 \text{ ng/mL}$ ) y la mediana fue de  $9,0$  (RIQ  $4,9$ - $15,5$ )  $\text{ng/mL}$ . Los valores de los percentilos 97,5; 98,5 y 99,5 fueron ( $39,6$ ;  $44,0$  y  $76,6$ )  $\text{ng/mL}$ , respectivamente. Como promedio, las muestras se procesaron 3 días después de su recolección y 2 d después de recibirse en el laboratorio.

Entre los RN estudiados 6418 neonatos tuvieron una concentración de TIR1 por debajo del nivel de decisión y se informó como fibrosis quística negativa. Hubo 52 muestras que mostraron valores  $\geq 50 \text{ ng/mL}$  y se solicitó otra muestra para determinar nuevamente la concentración de TIR (tasa de recitación  $0,8 \%$ ). En 16 de estos RN ( $0,24 \%$ ) los valores de TIR2 fueron superiores a  $50 \text{ ng/mL}$  y se remitieron a centros especializados en FQ para evaluación clínica e indicación de

prueba del sudor y biología molecular. Estas muestras se recolectaron como promedio a los 14 d y se procesaron en el laboratorio a los 16 d con lo que se garantizó que se indicaran las pruebas confirmatorias antes del mes de nacido. La relación varón/hembra fue de  $1,13$ ; un paciente fue bajo peso y 2 pacientes fueron prematuros. Una de estas muestras se evaluó como positiva para la FQ por la técnica de biología molecular ( $F508\text{del} / 3120 + 1G > A$ ) y se confirmó posteriormente por la prueba de electrolitos en el sudor constituyendo el primer RN con FQ pesquisado y evaluado precozmente en Cuba. Al resto de los RN no confirmados se les dio seguimiento durante 1 año en consulta especializada de FQ.

Se evaluaron algunos factores que pueden influir sobre la cuantificación de los niveles de TIR en manchas de SSP y



**Fig. 3** Correlación entre el ultramicroensayo y el estuche comercial de la firma Perkin Elmer

sus efectos en los percentilos calculados para la población en estudio. Se estudió la influencia de la edad de gestación (EG), el peso al nacer (PAN), el sexo, la forma de parto, el número de fetos, el tiempo de muestreo y el TPM sobre los niveles de TIR. Se recopilaron datos demográficos de 6313 muestras de RN. El valor medio de TIR fue significativamente menor en los RN prematuros ( $n = 544$ ;  $10,3 \pm 9,6$  ng/mL;  $p = 0,0002$ ). Este grupo se dividió en 2 subgrupos, RN prematuros (EG 35-36,9) semanas y RN muy prematuros (EG < 35 semanas). Los valores medios de TIR de ambos subgrupos fueron estadísticamente diferentes del grupo con EG > 37 sem ( $p = 0,004$  y  $p = 0,0162$ ; respectivamente) influyendo directamente sobre los percentilos calculados.

Un comportamiento similar se aprecia al evaluar la influencia del PAN sobre los niveles de TIR. El valor medio de TIR fue significativamente menor en los RN con PAN < 2500 g ( $n = 518$ ;  $10,9 \pm 10,2$  ng/mL,  $p = 0,0411$ ). Este grupo también se dividió en 2 subgrupos, los RN con bajo peso [(1500-2499) g] y los RN con muy bajo peso (< 1500 g). El valor medio de TIR del primer subgrupo no fue significativamente diferente del grupo con PAN > 2500 g ( $n = 455$ ;  $11,3 \pm 10,5$  ng/mL,  $p = 0,2576$ ). Sin embargo, se observaron diferencias significativas cuando se analizó el segundo subgrupo ( $n = 63$ ;  $8,6 \pm 8,0$  ng/mL,  $p = 0,0033$ ), lo que afectó los percentilos calculados e influyó en las diferencias entre los grupos.

Con relación a la influencia del sexo sobre los niveles de TIR las hembras tuvieron niveles medios de concentración ligeramente superiores a los de los varones. Al comparar ambas poblaciones, utilizando la prueba U de Mann-Whitney, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas con un valor de  $p < 0,0001$ , sin embargo, esta ligera diferencia no tuvo efecto en los percentilos calculados para cada grupo.

Los nacidos a partir de partos distócicos o por cesárea presentaron niveles de TIR inferiores a los de parto eutócico; sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa entre el grupo nacido por cesárea en comparación con los RN por sección vaginal ( $p = 0,0726$ ). Lo contrario ocurrió con los RN a partir de partos instrumentados donde la disminución de los valores de TIR con respecto a los nacidos por parto eutócico sí fue significativa y se afectaron los percentilos calculados ( $p = 0,002$ ).

En el estudio de la influencia del número de fetos sobre los niveles de TIR se observó que en gemelos los valores de la enzima fueron inferiores a los obtenidos en la muestra control, sin que esta diferencia resultara estadísticamente significativa entre ambas poblaciones, al aplicar la prueba U de Mann-Whitney ( $p = 0,3453$ ).

También se analizaron el tiempo de muestreo y el TPM a partir de que esta fue colectada. A pesar de que los valo-

res de TIR en las muestras recolectadas entre 0 d-4 d ( $n = 81$ ;  $9,9 \pm 7,9$  ng/mL) fueron menores que en las muestras recolectadas entre 5 d-7 d ( $n = 5\ 939$ ;  $12,1 \pm 13,5$  ng/mL), no hubo diferencias estadísticas entre estos grupos ( $p = 0,1785$ ), aunque los percentilos calculados fueron diferentes. Tampoco se encontraron diferencias significativas al comparar los valores medios de TIR en aquellas muestras recolectadas entre los 8 d y 14 d de vida ( $n = 293$ ;  $14,5$  ng/mL  $\pm 19,2$ ;  $p = 0,0945$ ), y los percentilos no se vieron afectados. En el grupo de muestras colectadas después de los 14 d de vida se observó una ligera tendencia a disminuir los valores de TIR sin que esta diferencia resultara estadísticamente significativa ( $n = 46$ ;  $11,6$  ng/mL  $\pm 15,8$ ;  $p = 0,7843$ ), aunque los percentilos se vieron afectados.

A pesar de que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas al evaluar diferentes TPM ( $p > 0,05$  para todos los grupos) se observó que los valores de TIR disminuyeron cuando las muestras se procesaron después de 10 d de recolectadas ( $12,2$  ng/mL  $\pm 13,8$  vs  $10,1$  ng/mL  $\pm 08,2$ ) y los percentilos se afectaron más en la medida en que la muestra se procesó más tarde.

Los resultados de la normalización y validación del ensayo, así como los obtenidos durante el estudio piloto, permitieron que el UMELISA® TIR NEONATAL recibiera en el año 2018 el certificado de registro sanitario que otorga el Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED). De ahí que a partir de enero del 2019 se generalizó el uso de este diagnosticador a lo largo de todo nuestro país. Hasta diciembre de 2021 se pesquisarón 281 717 bebés de los cuales 686 resultaron repetidamente elevados para un 0,24 % de positividad. Han sido diagnosticados con FQ 21 bebés mediante prueba de electrolitos en el sudor y técnica de biología molecular. La edad media de diagnóstico fue 4,0 meses  $\pm 1,5$  [rango entre (2-7) meses]. De todos los RN diagnosticados 85 % eran portadores de la variante F508del, ya sea en forma homocigótica o estado heterocigoto. Una de las muestras correspondió a 1 bebé con íleo meconial y 2 eran de gemelos. Se reportó un caso falso negativo en la provincia de Guantánamo, con un valor de TIR1 de 46 ng/mL, el cual fue referido a consulta de genética por presentar síntomas compatibles con la enfermedad y antecedentes de FQ en su familia, siendo posteriormente evaluado por técnica de biología molecular (F508del/R334W) y prueba de sudor. La edad de diagnóstico fue de 7 meses. La sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos (VPP) fueron 95,45 %; 99,76 % y 3,1 %, respectivamente.

La distribución por provincias de los RN examinados durante los primeros 6 meses del programa demostró que La Habana fue la provincia con mayor número de neonatos estudiados, sin embargo, fue Santiago de Cuba quien informó el

mayor número de resultados elevados ( $n = 7\ 916$ ; 0,2% TIR2 elevado vs.  $n = 5\ 027$ ; 0,44 % TIR2 elevado).

Del total de neonatos evaluados en el programa se recolectaron los datos demográficos de las primeras 32 764 muestras correspondientes a 3 provincias del occidente del país (La Habana, Mayabeque y Matanzas), así como del municipio especial Isla de la Juventud. La edad promedio de toma de muestra fue de 6 d con resultados disponibles a los 11 d de vida. El 1,7 % de las muestras se colectaron a los 20 d de nacido el niño y de ellas el 0,84 % correspondió a muestras tomadas después de los 30 d.

El valor medio de TIR fue de  $11,8\text{ ng/mL} \pm 11$  [rango (0-344) ng/mL] y la mediana fue de 9,8 (RIQ 5,2-15,2) ng/mL. Los valores de los percentilos 98,5; 99 y 99,5 fueron (41,2; 44 y 52,2) ng/mL, respectivamente. En la figura 4 se muestra la distribución de frecuencias obtenidas para este grupo de muestras en comparación con los resultados del estudio piloto. Como promedio, las muestras se procesaron 5 d después de su recolección y 2 d después de recibidas en el laboratorio.

## DISCUSIÓN

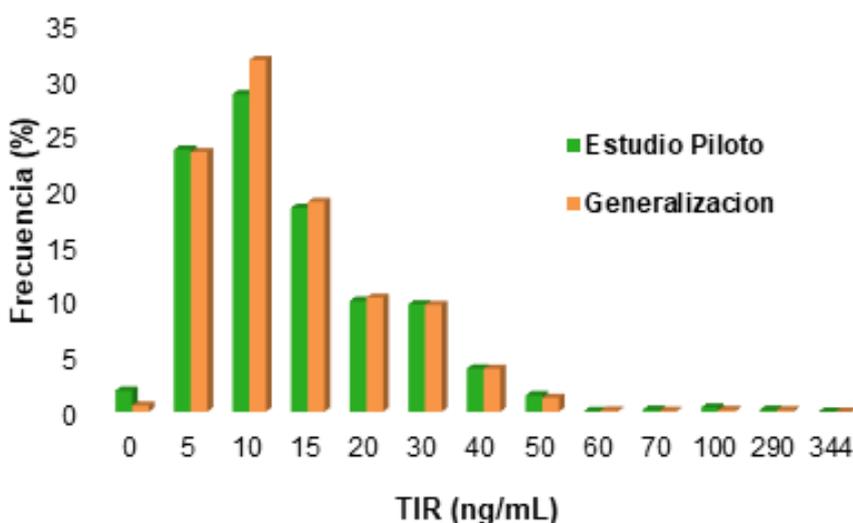
La PN de la FQ se hizo posible a partir del año 1979 mediante el desarrollo de una metodología para la determinación de los niveles de TIR en manchas de SSP.<sup>(7)</sup> Desde entonces, se han desarrollado programas nacionales o regionales de PN en muchos países, donde se ha demostrado la efectividad de realizar el diagnóstico temprano, lo que ha permitido mejorar la calidad y esperanza de vida de los pacientes que la padecen.<sup>(16-18)</sup>

Por las características de la TIR, la mayoría de los ensayos que se comercializan en la actualidad para cuantificar los niveles de esta enzima en muestras de SSP son ensayos inmunoenzimáticos (EIE) heterogéneos de doble anticuerpo,<sup>(19)</sup> de ahí que se trabajó en la evaluación de los AcM anti TIR obtenidos y caracterizados en el CIE, con el objetivo de desarrollar un ultramicroensayo con las características analíticas requeridas para su utilización en la PN de la FQ.

Se estudiaron un total de 6 AcM altamente específicos por la TIR<sup>(12)</sup> y se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados para las 2 disoluciones amortiguadoras para el recubrimiento evaluadas, demostrándose que la disolución de TRIS fue la más adecuada, con independencia del AcM empleado. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Valdivia en el 2013, para AcM de la clase IgG1.<sup>(20)</sup>

La meseta de recubrimiento con el AcM 4C9C9 se alcanzó a una concentración de  $6\ \mu\text{g/mL}$  y no se encontraron diferencias entre los valores incluidos en la zona de meseta, lo que significa que a esta concentración la fase sólida quedó saturada de AcM y aunque se incremente la cantidad de los mismos en el recubrimiento, la señal de fluorescencia no varía. Por tal motivo se decidió fijar la concentración óptima de recubrimiento del ensayo a  $8\ \mu\text{g/mL}$ . Resultados similares han sido obtenidos por varios autores durante la normalización de técnicas UMELISA empleando AcM de la clase IgG1 en la fase sólida.<sup>(20,21)</sup>

La TIR es una molécula que sufre autólisis o puede ser hidrolizada por otras proteasas que se encuentran en los gló-



**Fig. 4** Comparación de la distribución de las concentraciones de TIR en recién nacidos cubanos empleando el UMELISA® TIR NEONATAL durante el estudio piloto y la fase de generalización

bulos rojos o en el suero. <sup>(22)</sup> Por tal razón se decidió utilizar plasma libre de TIR con carbón activado para ajustar el hematocrito al 55 %. Adicionalmente se observó que adicionando aprotinina como inhibidor, se obtuvieron curvas lineales a lo largo de todo el rango de medición y buenas pendientes. Este resultado concuerda con un estudio realizado por Li y cols., donde se reporta un incremento de la recuperación de TIR de 35 % a 51 % cuando preparan los controles mezclando eritrocitos hemolizados con suero tratado con carbón activado. <sup>(23)</sup> así como un incremento significativo del porcentaje de recuperación de los valores de TIR al comparar preparaciones con y sin inhibidor (13 % sin inhibidor y 88 % con inhibidor). <sup>(23)</sup>

Otro de los parámetros evaluados fue el tiempo de elución de calibradores, controles y muestras. La curva de calibración presentó el mismo comportamiento para los 2 tiempos de elución estudiados. Sin embargo, la media de la concentración de TIR de las muestras que se eluyeron entre 16 h-18 h fue estadísticamente superior que la obtenida para las muestras que se eluyeron durante una hora, lo que se refleja directamente sobre los percentilos calculados para cada tiempo de elución evaluado. Este fenómeno está directamente relacionado con la calidad de la muestra de SSP, la cual es un paso clave en la PN, donde la normalización de los procedimientos y el entrenamiento integral del personal en la toma de la muestra son esenciales en el aseguramiento de la efectividad de los programas. <sup>(24)</sup>

La confiabilidad de las manchas de SSP depende de la estabilidad de los analitos en las muestras almacenadas. <sup>(24)</sup> Para el caso específico de los ensayos que miden TIR se requiere una muestra con calidad superior en comparación con la requerida para otros analitos empleados en los programas de PN. <sup>(25)</sup> Se ha demostrado que los factores ambientales provocan variaciones en los niveles de TIR. En un estudio informado por Therrell y cols. en el 2012 <sup>(26)</sup> se encontró que la concentración de TIR en muestras de SSP disminuyó un 40 % cuando fueron almacenadas a 27 °C y 80 % de humedad durante una semana. Según resultados del programa de PN de Wisconsin, las concentraciones de TIR en manchas de SSP disminuyeron un 2 % cuando las muestras se almacenaron a una temperatura entre 20 °C -25 °C durante 24 h. <sup>(27)</sup> Esto conlleva a la obtención de resultados falsos negativos, lo cual tiene implicaciones graves pues se reporta como sano a un niño aquejado por la enfermedad, afectándose el inicio del tratamiento y poniendo en riesgo la vida del paciente. Es por esta razón que se decidió escoger la variante de elución de calibradores, controles y muestras durante 16 h-18 h como fase inicial de la prueba pues de esta forma se garantiza una elución total y homogénea de la TIR presente en la muestra.

De acuerdo con los resultados obtenidos se demostró que el UMELISA TIR NEONATAL es un ensayo preciso y exacto, según los criterios de calidad establecidos para este tipo de ensayos. <sup>(28,29)</sup> En los EIE la precisión intraensayo no debe superar el 10 %, mientras que la interensayo debe ser menor del 20 %. <sup>(28)</sup>

El porcentaje de recobrado permite evaluar la exactitud de una forma sencilla y eficaz. En los inmunoensayos estos valores deben encontrarse entre 80 % y 120 %. <sup>(29)</sup> Los porcentajes obtenidos con nuestro ensayo, tanto en la prueba de recuperación como en la de paralelismo, estuvieron dentro de los intervalos referidos con anterioridad.

Para la TIR no existe un estuche de referencia o "estándar de oro". Para el estudio de correlación se empleó el estuche AutoDELFLIA® Neonatal IRT, de la firma Perkin Elmer, por su reconocido prestigio y amplio uso en varios programas de PN de la FQ. <sup>(16,30)</sup> En las pruebas de comparación de métodos, a medida que los coeficientes y la pendiente se acercan a uno y el intercepto tiende a cero, son más semejantes el método evaluado y el de referencia. <sup>(28)</sup>

El coeficiente kappa de Cohen es una medida estadística que ajusta el efecto del azar en la proporción de la concordancia observada y se calculó como una medida de la confiabilidad entre los ensayos. Valores de  $\kappa$  entre 0,81 y uno indican una concordancia casi perfecta entre los métodos evaluados. <sup>(31)</sup>

Durante la fase de validación del UMELISA TIR NEONATAL se evaluaron 4406 muestras de RN provenientes del programa cubano de PN de enfermedades heredo-metabólicas. Este estudio permitió definir el NC de 50 ng/mL (calculado para el percentilo 98,5 de la distribución), que se utilizó en el estudio piloto para la PN de la FQ, realizado en 6 provincias de Cuba.

En los últimos años se ha incrementado el número de países que han incluido la FQ dentro de sus programas de PN de enfermedades heredo-metabólicas. Sin embargo, a pesar de que todos los programas de PN de la FQ utilizan una primera determinación de TIR en sus algoritmos, una única medición de esta enzima trae aparejado un elevado porcentaje de resultados falsos positivos, por lo que se requiere de pruebas adicionales para mejorar la especificidad de la pesquisa. <sup>(32)</sup> La mayoría de las estrategias combinan la determinación de TIR con estudios de paneles de mutaciones o análisis genético extendido por secuenciación. <sup>(25)</sup>

El algoritmo de PN elegido para nuestro estudio fue TIR/TIR/ADN teniendo en cuenta los resultados obtenidos por Sontag y col. que demostraron que este protocolo es más sensible que el algoritmo TIR/TIR y proporciona la más baja tasa de detección de portadores entre todas las estrategias que emplean análisis de mutaciones del gen CFTR, por lo cual su impacto es mínimo en la comunidad no fibroquística, y a pesar de que requiere una segunda co-

lecta de muestra, el diagnóstico puede materializarse en el primer mes de vida del paciente. <sup>(30)</sup>

En nuestro estudio los laboratorios informaron semanalmente el desempeño de la pesquisa. Los parámetros estadísticos y los percentilos calculados fueron equivalentes a los obtenidos durante la validación interna de nuestro método. El valor medio de TIR para la población estudiada fue similar al reportado por Torresani y cols. en un estudio piloto realizado en Suiza en el año 2013, empleando en este caso una estrategia TIR/ADN/TIR. <sup>(33)</sup>

Los indicadores de eficacia evaluados mostraron un efectivo funcionamiento del programa, logrando que la colecta de la segunda muestra ocurriera como promedio a los 14 d y que la misma fuera procesada en el laboratorio a los 16 d, con lo que se garantizó que se indicaran las pruebas confirmatorias antes del mes de nacido. Se detectó una muestra que tenía 2 mutaciones causantes de FQ (F508del/3120 + 1G > A), constituyendo el primer RN con FQ pesquisado y evaluado precozmente en Cuba. Estas mutaciones se encuentran entre las más comunes reportadas en la población cubana. <sup>(15)</sup> Un estudio reciente ha informado que el 50 % de los pacientes cubanos incluidos en el registro nacional de FQ tiene el defecto genético F508del, y el 13 % de ellos son homocigotos para esta mutación. <sup>(34)</sup>

El diagnóstico temprano del paciente con FQ mediante PN tiene muchos beneficios. Cuando la FQ se diagnostica y trata precozmente, mejora el estado nutricional, la curva de crecimiento, el desarrollo cognitivo y la función pulmonar del lactante y disminuyen las colonizaciones crónicas, las exacerbaciones, la necesidad de ciclos de antibióticos y las hospitalizaciones. La literatura indica que es más probable que se beneficien de las intervenciones tempranas aquellos pacientes con FQ diagnosticados dentro de los 2 primeros meses de vida. <sup>(18)</sup>

Se obtuvo una tasa de recitación de 0,8 % y el 0,24 % de las muestras resultaron repetidamente elevadas. La especificidad fue del 99,2 % y la sensibilidad de 100 %. Lo anterior demostró que es factible emplear un NC de 50 ng/mL correspondiente al 98,5 percentilo de la distribución.

En este trabajo también se evaluó la influencia de varios factores perinatales sobre los niveles de TIR en muestras de RN cubanos, así como sobre los percentilos calculados. Se evidenció el efecto de la EG y el PAN sobre la cuantificación de TIR, obteniéndose valores más bajos de la enzima en los neonatos con EG < 37 semanas o PAN < 2500 g con respecto a los otros grupos evaluados. Aunque algunos autores han observado niveles elevados de TIR en aquellos RN de menos de 37 semanas o con PAN < 2500 g, <sup>(35)</sup> los resultados del presente estudio concuerdan con los informados por Bourguignon y cols. en 1986, que encontraron que los valo-

res medios de TIR en RN prematuros con EG < 32 semanas eran inferiores respecto al otro grupo de prematuros (32-37) semanas y al grupo de RN a término (> 37 semanas). <sup>(36)</sup> Un estudio más reciente realizado en la población mexicana, declara resultados similares reportando un valor medio de TIR de 15,3 ng/mL para los RN a término y de 14,6 ng/mL para los RN con EG < 37 semanas. <sup>(37)</sup> La disminución de los valores de TIR en RN prematuros se atribuye a que la función pancreática no está desarrollada por completo en estos pacientes. <sup>(36)</sup>

Al evaluar el efecto del género se pudo observar que las hembras presentan niveles medios de TIR ligeramente superiores a los de los varones. Esto concuerda con lo informado por Korzeniewski y cols. en el 2011, que encontraron que los valores medios de TIR en hembras (28 ng/mL, n = 57 506) fueron estadísticamente superiores a los encontrados en varones (27 ng/mL, n = 60 073), aunque la magnitud de esta diferencia es despreciable y no repercute sobre los percentilos calculados. <sup>(35)</sup>

Con respecto al tipo de parto y el número de fetos hay muy escasos reportes en la literatura que hayan analizado la influencia de estos factores sobre los niveles de TIR. En un trabajo realizado por Yau en el 2018 se llegó a la conclusión de que el perfil metabólico de los RN por cesárea planificada es diferente al de los RN por parto vaginal espontáneo (eutócico). <sup>(38)</sup> Como en Cuba no se practica la cesárea de elección, los RN por esta vía transitan por una etapa previa de labor de parto, lo cual podría explicar que no se hayan observado diferencias entre los niveles de TIR de estos 2 grupos. Por otra parte, el parto distócico es un tipo de parto vaginal donde la labor de parto se induce mediante el uso de fármacos o procedimientos tales como fórceps o vacío. <sup>(38)</sup> En este estudio se obtuvieron valores de TIR inferiores en aquellos RN por parto distócico lo que repercutió de forma negativa sobre los percentilos calculados. Si bien es cierto que el número de muestras analizadas en este grupo es pequeño, sería de mucho interés estudiar más a fondo las causas que provocaron este resultado. Lo mismo ocurre con el grupo de gemelos, cuyo tamaño de muestra también es pequeño para determinar el comportamiento de esta variable. Sin embargo, en este grupo el 50 % de los RN tenían un PAN < 2500 g y el 47 % fueron prematuros, lo cual se correlaciona perfectamente con los resultados discutidos con anterioridad.

También se evaluó la influencia de la edad de toma de muestra, así como el TPM, sobre los niveles de TIR. Se ha observado que los niveles de TIR disminuyen durante las primeras 24 h de vida y luego permanecen prácticamente constantes hasta el décimo día de nacido. <sup>(26)</sup> Por otra parte, los resultados informados por el programa de PN de Massachusetts refieren que los niveles de TIR (calculados para el 95 per-

centilo) durante los primeros 8 días de vida son muy variables, lo que dificulta establecer un NC confiable para muestras colectadas más tardíamente. <sup>(26)</sup> En cambio, los programas de PN del Reino Unido, que colectan la muestra a los 5 días de nacido, reportan una variabilidad menor en los valores de TIR cuantificados, lo cual conlleva a una mejor discriminación entre pacientes FQ y RN que no padecen la enfermedad. <sup>(26)</sup> En el presente estudio se obtuvieron resultados similares a los reportados en la literatura; los valores de TIR correspondientes a las muestras colectadas de (0 a 4) d fueron menores que los obtenidos para las muestras tomadas entre 5 d y 14 d, disminuyendo nuevamente en aquellas muestras colectadas después de los 14 d de nacidos. Si bien contamos con un pequeño número de muestras correspondientes a los primeros días de vida del RN y las colectadas después de los 14 d, se debe tener especial cuidado en la interpretación de los resultados correspondientes a las mismas para evitar la ocurrencia de algún resultado falso negativo, dado que el programa cubano de PN de enfermedades heredo-metabólicas establece que la toma de muestra debe realizarse entre el quinto y séptimo días de vida del neonato.

A pesar de que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios de TIR con respecto al TPM, los valores de la enzima en las muestras procesadas después de 10 d de colectadas fueron menores, lo que incidió directamente sobre los percentilos calculados, fenómeno que se acentuó más en las muestras que fueron procesadas 15 d después de la colecta. Dadas las características de la TIR, la muestra que se requiere para los ensayos que cuantifican esta enzima debe tener una mejor calidad con respecto a la de los otros analitos que se determinan en el período neonatal. <sup>(25)</sup> Se ha demostrado que los niveles de TIR en muestras almacenadas durante 5 semanas disminuyen con respecto a los valores de las muestras frescas, <sup>(39)</sup> siendo esta caída diferente en muestras de pacientes FQ y en aquellas correspondientes a RN no fibroquísticos, pero con hipertripsinemia, lo que sugiere que al menos 2 tipos de TIR pueden estar presentes en la sangre de pacientes con FQ. <sup>(40)</sup>

Estos resultados demuestran la importancia de la evaluación de todos aquellos factores que influyen o que pueden afectar los valores de TIR en neonatos, para considerarlos al establecer NC que mejoren la eficiencia de los programas de PN de la FQ. En la actualidad la mayoría de los programas de PN de FQ no emplean NC fijos, sino que utilizan NC flotantes, basados en los percentilos calculados de corrida en corrida. Existen varios percentilos y protocolos para la determinación de estos NC flotantes los cuales son sometidos a diferentes manipulaciones estadísticas, por lo que algunos autores refieren que el número de muestras debe ser elevado

(> 300 muestras por corrida) para que el método de cálculo sea estadísticamente validado. <sup>(26)</sup>

A pesar de que ningún programa de PN de FQ existente en el mundo es capaz de detectar el 100 % de los pacientes afectados con la enfermedad, estudios realizados en Holanda y Canadá han demostrado que la relación costo-beneficio es positiva para aquellas poblaciones donde se lleve a cabo la PN de esta patología con respecto a las poblaciones no pesquisadas, independientemente de la estrategia de pesquisa elegida en cada caso. <sup>(41,42)</sup> Se ha demostrado que cuando los costos asociados al tratamiento se reducen un 5 % como consecuencia del diagnóstico temprano, la pesquisa traerá como resultado ahorros a largo plazo. <sup>(41)</sup>

Los valores de especificidad y sensibilidad obtenidos durante los 3 primeros años de generalización del UMELISA TIR NEONATAL en el programa cubano para la PN de la FQ son similares a los reportados en la literatura. <sup>(26,43)</sup> No existe consenso hasta el presente de cuál es la estrategia ideal para la PN de la FQ, sin embargo, para todos los algoritmos (independientemente del marcador que se utilice como segunda muestra) la especificidad reportada es superior al 99 %. <sup>(43)</sup> No ocurre lo mismo con la sensibilidad, donde los porcentajes calculados difieren de un programa a otro de acuerdo a la estrategia seguida en cada caso particular. En los EUA cada estado realiza un algoritmo diferente para la PN de la FQ y la sensibilidad reportada se encuentra en un rango entre 85 % y 95 %. En un estudio piloto realizado en Alemania, que combinaba la determinación de TIR con la proteína asociada a pancreatitis (PAP), lograron valores de sensibilidad entre 86 % y 96 %. Este valor osciló entre 90 % y 95 % en Francia y Reino Unido empleando un algoritmo TIR/ADN/TIR y en Australia mediante un esquema TIR/ADN. <sup>(43)</sup>

Durante el transcurso de este estudio se reportó un caso falso negativo con un valor de TIR1 inferior al NC empleado en el programa de PN. Este RN, además de desarrollar sintomatología característica de la enfermedad, presentaba antecedentes familiares de FQ. Se confirmó su diagnóstico mediante técnica de biología molecular: heterocigótico compuesto para las mutaciones F508del y R334W, 2 de las más comunes en nuestra población. <sup>(44)</sup> A pesar de que F508del es la mutación más frecuente y severa, hay varios estudios poblacionales donde se han encontrado RN tanto heterocigóticos como homocigóticos para esta mutación cuyos niveles de TIR1 fueron muy inferiores a los NC establecidos por dichos programas, <sup>(18)</sup> lo cual indica que, indistintamente del NC escogido para la pesquisa, siempre existe la posibilidad de que se obtengan falsos negativos fisiológicos legítimos. Es por esta razón que el personal de atención primaria de salud desempeña un papel fundamental en la identificación de aquellos

niños que presenten síntomas consistentes con FQ, aunque los resultados de la pesquisa hayan sido negativos, con el objetivo de indicar los estudios diagnósticos correspondientes, como ocurrió en el caso presentado en este estudio.

La obtención de resultados falsos negativos para FQ es más común que para otros desórdenes genéticos incluidos en los paneles de PN, lo cual viene dado fundamentalmente por: los NC empleados en los programas de PN que utilizan TIR como marcador, las variaciones estacionales asociadas con la temperatura y las variables analíticas relacionadas con el desempeño del estuche de reactivos. <sup>(26)</sup> Adicionalmente, las propias características de la enfermedad determinan que la variabilidad biológica individual sea relevante debido a que no todas las mutaciones del gen CFTR resultan en niveles elevados de TIR, <sup>(45)</sup> lo que deja abierta la posibilidad de que se presenten resultados falsos negativos. También hay que considerar que se ha reportado un número considerable de mutaciones para el gen CFTR (muchas de las cuales se presentan en la población a muy baja frecuencia) y resulta imposible que los paneles comerciales de biología molecular las incluyan todas. Por lo tanto, la práctica internacional recomienda que todo niño con síntomas sugestivos de la enfermedad, aunque tenga un resultado de PN o de biología molecular normal, debe ser referido al test del sudor para confirmar o descartar la patología.

Se recomienda que los paneles de mutaciones disponibles para la PN de la FQ se adecuen a la genética de la población pesquisada y se destaca la importancia de incluir mutaciones encontradas en casos clínicos confirmados en dicha población. En un estudio reciente realizado en nuestro país se reportó el desarrollo de un nuevo ensayo basado en PCR alelo-específica y HRMA, para la detección de 18 mutaciones del gen CFTR causantes de FQ, presentes en Cuba y América Latina. <sup>(46)</sup> El mismo incorpora 10 nuevas variantes al panel de mutaciones de este gen que se detectan actualmente en pacientes cubanos con sospecha de FQ. <sup>(15)</sup> Este nuevo ensayo tiene como ventaja que utiliza manchas de SSP, lo cual resultaría muy beneficioso para lograr un mejor desempeño del protocolo de PN, incluso se podría valorar la posibilidad de aplicar otra de las estrategias que se emplean a nivel mundial, si se considera que el estudio de mutaciones puede realizarse directamente en la muestra del RN colectada entre el quinto y séptimo días de nacido (TIR1). Pensamos que la combinación de esta metodología con el empleo de un NC flotante en las determinaciones de TIR podría contribuir en gran medida a una mejora en la sensibilidad del programa.

Entre las mutaciones encontradas durante estos primeros 3 años de programa destaca la presencia de F508del en la mayoría de los pacientes diagnosticados con la enfermedad, lo cual concuerda con lo reportado por Armas y cols. en el

2018 acerca de la frecuencia de aparición de esta mutación en la población cubana. <sup>(44)</sup> El análisis de ADN detecta tanto formas clásicas como leves de la enfermedad, así como portadores de mutaciones. <sup>(47)</sup> Existe desacuerdo sobre los efectos ocasionados por la identificación de portadores de FQ debido a la posible afectación psicológica de pacientes y familiares, <sup>(47)</sup> aunque pensamos que su identificación puede contribuir a reducir la incidencia de la enfermedad, a través de un adecuado consejo genético.

En el presente estudio se detectó un mayor número de muestras repetidamente elevadas a la pesquisa en la provincia de Santiago de Cuba con respecto a lo observado en el resto del país. Esto podría estar asociado a errores de manipulación durante la realización de la técnica ya que la mayoría de resultados repetidamente elevados a la pesquisa (19 casos) se obtuvo en los primeros 2 meses a partir de que se comenzó la generalización del programa.

Otra posible explicación a este fenómeno podría estar asociada al color de la piel. Existen estudios que reportan el incremento de los niveles de TIR en RN afrodescendientes en relación al resto de los grupos poblacionales. <sup>(35,48,49)</sup> En un estudio realizado en el año 2005 en la población francesa, Cheillan y cols. encontraron que los valores medios de TIR en RN provenientes de familias del norte de África (21,17 ng/mL, n = 8817) fueron estadísticamente superiores a los encontrados en RN de origen caucásico (19,74 ng/mL, n = 26 310), diferencia que repercutió sobre los percentilos calculados, duplicándose el porcentaje de resultados con valores de TIR por encima del NC establecido para la prueba, sin que estos RN se confirmaran posteriormente como FQ. <sup>(48)</sup> En otro estudio realizado por Giusti y cols en el 2008, donde se analizan los resultados del programa de PN de FQ durante 4 años en el estado de Nueva York, se demostró que el riesgo de tener valores de TIR elevados se duplicó en los RN afroamericanos respecto al resto de los grupos poblacionales. <sup>(49)</sup> A pesar de que no se sabe con exactitud la razón por la cual los niveles de TIR se elevan en estos RN, el hecho de que ocurra en estos 2 grupos (norafricanos y afroamericanos) realza la posibilidad de que exista una explicación común de base genética. <sup>(49)</sup>

Según datos de la Oficina Nacional de Estadística e Información de la República de Cuba, el color de la piel de la población del país varía notablemente por territorios, siendo Santiago de Cuba una de las provincias cubanas con el mayor porcentaje de población que se considera con color de la piel negro y mestizo. <sup>(50)</sup> En un estudio realizado por Marcheco y cols en el 2015 se demostró que la población de las provincias Santiago de Cuba y Guantánamo presentaban el mayor porcentaje de genes de ancestralidad africanos (39 % y 40 %, respectivamente) y que los individuos que se reportaron con color de la piel

negro presentaron un 65,5 % de sus genes de origen africano. También se encontró que en estas provincias el porcentaje de ancestralidad africano es ligeramente superior en aquellos individuos que se reportaron con color de la piel blanco. <sup>(51)</sup>

Los resultados obtenidos a partir del análisis de los datos demográficos de las muestras correspondientes a la región occidental del país son muy similares a los hallados durante el estudio piloto, lo cual demostró la reproducibilidad de la cuantificación de los niveles de TIR mediante el uso de diferentes lotes de reactivos del UMELISA TIR NEONATAL. Se procesó un pequeño porcentaje de muestras que fueron colectadas después de los 30 d de nacido, indicador que se debe mejorar en lo que avanza el programa para prevenir la ocurrencia de falsos negativos, dado que la TIR no es un marcador eficaz después de finalizado el período neonatal. <sup>(25,45)</sup>

Según el registro nacional de pacientes con FQ la prevalencia de la enfermedad en Cuba es similar en todas las regiones del país. <sup>(34)</sup> Sin embargo, el 80 % de los RN diagnosticados con FQ, luego de la implementación del programa de PN corresponden a niños del oriente de la nación, lo cual podría indicar que haya existido un subdiagnóstico de esta patología en dicha zona a lo largo de los años. De manera similar se comportan el resto de las enfermedades heredo-metabólicas incluidas en el programa cubano de PN, observándose una mayor frecuencia de aparición de estas patologías en las regiones central y oriental de nuestro territorio (comunicación personal, Vicedirección de Programas Nacionales, CIE).

Aunque el programa de PN de FQ en Cuba está recién comenzando y se deben estudiar un mayor número de RN para definir la incidencia real de esta enfermedad en nuestro país, de acuerdo a los resultados obtenidos hasta la fecha se puede predecir que la FQ, dentro del programa cubano de PN de enfermedades heredo-metabólicas, constituirá una de las más frecuentes en la población cubana (comunicación personal, Vicedirección de Programas Nacionales, CIE).

## Conclusiones

El UMELISA® TIR Neonatal es un ensayo preciso y exacto que permite la cuantificación de TIR en manchas de SSP de RN. Su desempeño en la red de laboratorios SUMA ha resultado satisfactorio y los indicadores de eficacia resultan adecuados para la pesquisa, demostrándose que constituye una herramienta novedosa para ser empleada satisfactoriamente en la PN de FQ en Cuba y en otros países de nuestro continente que utilicen la Tecnología SUMA.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hiraki S, Green NS. Newborn Screening for Treatable Genetic Conditions: Past, Present and Future. *Obstet Gynecol Clin N Am* 2010; 37:11-21.

2. Kosorok MR, Wei WH, Farrell PM: The incidence of cystic fibrosis. *Stat Med* 1996;15:449-62.

3. Robinson P. Cystic fibrosis. *Thorax* 2001;56:237-41.

4. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B *et al*. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989;245:1066-73.

5. Cystic Fibrosis Mutation Database [Internet] 2017 [citado Oct 2017]. Disponible en: <http://www.genet.sickkids.on.ca/Home.html>

6. Prosser R, Owen H, Bull F *et al*. Screening for cystic fibrosis by examination of meconium. *Arch Dis Child* 1974;49:597-601.

7. Crossley JR, Elliott RB, Smith PA. Dried-blood spot screening for cystic fibrosis in the newborn. *Lancet* 1979;1:472-4.

8. Balascakova M, Holubova A, Skalicka V *et al*. Pilot newborn screening project for cystic fibrosis in the Czech Republic: defining role of the delay in its symptomatic diagnosis and influence of ultrasound-based prenatal diagnosis on the incidence of the disease. *J. Cyst. Fibros* 2009;8:224-7.

9. Rodrigues R, Magalhaes PKR, Fernandes MIM *et al*. Neonatal screening for cystic fibrosis in São Paulo State, Brazil: a pilot study. *Braz. J. Med. Biol. Res* 2009;42:973-8.

10. Silva Filho, Castaños C, Hernán H. Cystic fibrosis in Latin America-Improving the awareness. *J Cyst Fibros* 2016;15 (6):791-3.

11. González JA, Suárez GA, Rodríguez F. Reseña histórica de la fibrosis quística y su estudio y tratamiento en Cuba. *Rev Cubana Pediatr* 2014;86(4):535-40.

12. Morejón G, García I, Feal S, Castells EM, Stable IC, Quintana JM, Hernández L, Lafita Y, Pérez PL, Pupo M, Figueredo JE, González EC. Generation and characterization of murine monoclonal antibodies against immunoreactive trypsinogen for newborn screening of cystic fibrosis. *Analytical Biochemistry* 2020;591(113569).

13. Avrameas S. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. *Immunochemistry* 1969;6(1):43-52.

14. Tijssen P. Non-immunologic molecular recognition systems used in immunoassays. En: Burdon RH, van Knippendber PH, editors: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*. 1st ed. London, Elsevier; 1993. 21-37 p.

15. Collazo T, Bofill AM, Clark Y, Hernandez Y, Gómez M, Rodríguez F *et al*. Common mutations in Cuban cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros* 2009;8(1):47-9.

16. Sommerburg O, Hammermann J, Lindner M, Stahl M, Muckenthaler M, Kohlmüller D *et al*. Five years of experience with biochemical cystic fibrosis newborn screening based on IRT/PAP in Germany. *Pediatr Pulmonol* 2015;50(7):655-64.

17. Therrell BL, Padilla CD, Loeber G, Kneisser I, Saadallah A, Borrajo G *et al*. Current status of newborn screening worldwide: 2015. *Semin Perinat* 2015;39(3):171-87.

18. Kharrazi M, Yang J, Bishop T, Lessing S, Young S, Graham S, *et al*. Newborn screening for cystic fibrosis in California. *Pediatrics* 2015;136(6):1062-72.

19. Wilcken B. Newborn screening for cystic fibrosis: Techniques and strategies. *J Inherit Metab Dis* 2007;30(4):537-43.

20. Valdivia I. Detección y confirmación del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B por ultramicroelisa de nueva generación [tesis doctoral]. La Habana: Centro Nacional de Investigaciones Científicas; 2013. 170 p.

21. Castells EM, del Valle R, González EC, Melchor A, Pérez PL, González I *et al.* An enzyme immunoassay for determining epidermal growth factor (EGF) in human serum samples using an ultramicroanalytical system. *J Immunoassay Immunoch* 2017;38(2):190-201.
22. Abbott F, Gomez JE, Birnbaum ER, Darnall DW. The location of the calcium ion binding site in bovine alpha-trypsin and beta-trypsin using lanthanide ion probes. *Biochem* 1975;14(22):4935-43.
23. Li L, Zhou Y, Bell CJ, Earley MC, Hannon WH, Mei JV. Development and characterization of dried blood spot materials for the measurement of immunoreactive trypsinogen. *J Med Screening* 2006;13(2):79-84.
24. Cedillo B, Estrada RA, Jonguitud V, Parra I. Factores que afectan algunas de las pruebas del tamiz neonatal. *Med Univer* 2007;9(34):3-6.
25. Castellani C, Massie J, Sontag M, Southern KW. Newborn screening for cystic fibrosis. *Lancet Respir Med* 2016;4(8):653-61.
26. Therrell B, Hannon HW, Hoffman G, Ojodu J, Farrel PM. Immunoreactive trypsinogen (IRT) as a biomarker for cystic fibrosis: Challenges in newborn dried blood spot screening. *Mol Gen Met* 2012;106(1):1-6.
27. Kloosterboer M, Hoffman G, Rock M, Gershan W, Laxova A, Li Z *et al.* Clarification of laboratory and clinical variables that influence cystic fibrosis newborn screening with initial analysis of immunoreactive trypsinogen. *Pediatrics* 2009;123(2):e338-e46.
28. Ochoa R. Validación de los inmunoensayos empleados para evaluar la inmunogenicidad de vacunas. En: Finlay Ediciones. Bases metodológicas para la evaluación de anticuerpos en ensayos clínicos de vacunas mediante técnicas inmunoenzimáticas. 2da edición; 2008. 46-67 p.
29. Andreasson U, Perret-Liaudet A, van Waalwijk van Doorn LJC, Blennow K, Chiasserini D, Engelborghs S *et al.* A practical guide to immunoassay method validation. *Front. Neurol* 2015;6:179. DOI: 10.3389/fneur.2015.00179.
30. Sontag MK, Lee R, Wright D, Freedenberg D, Sagel SD. Improving the sensitivity and positive predictive value in a cystic fibrosis newborn screening program using a repeat immunoreactive trypsinogen and genetic analysis. *J Pediatr* 2016;175:150-8.e1.
31. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977;33(1):159-74.
32. Southern KW, Munck A, Pollitt R, Travert G, Zanolli L, Dankert-Roelse J *et al.* A survey of newborn screening for cystic fibrosis in Europe. *J Cyst Fibros* 2007;6(1):57-65.
33. Torresani T, Fingerhut R, Ruegg CS, Gallati S, Kuehni CE, Baumgartner MR *et al.* Newborn screening for cystic fibrosis in Switzerland-Consequences after analysis of a 4 months pilot study. *J Cyst Fibros* 2013;12(6):667-74.
34. Rodríguez F, Suárez R, Venero SJ, Smyth A, Carr SB, Fogarty AW. The prevalence, clinical status and genotype of cystic fibrosis patients living in Cuba using national registry data. *J Cyst Fibros* 2018;18(4):522-4.
35. Korzeniewski SJ, Young WI, Hawkins HC, Cavanagh K, Nasr SZ, Langbo C *et al.* Variation in immunoreactive trypsinogen concentrations among Michigan newborns and implications for cystic fibrosis newborn screening. *Pediatr Pulmonol* 2011;46(2):125-30.
36. Bourguignon JP, Deby-Dupontl G, Reuter A, Senterre J, Gerard A, Franchimont P. Variations in dried blood spot immunoreactive trypsin in relation to gestational age and during the first week of life. *Eur Pediatr* 1986;144(6):547-9.
37. Ibarra I, Campos FJ, Herrera LA, Martínez P, Moreno CM, Contreras SN *et al.* Newborn cystic fibrosis screening in southeastern Mexico: Birth prevalence and novel CFTR gene variants. *J Med Screen* 2018;25(3):119-25.
38. Yau J. Association of newborn screening analytes with type of delivery among preterm and term births [tesis de maestría]. Ottawa: Universidad de Ottawa; 2018. 148 p.
39. Kirby CT, Applegarth DA, Davidson AGF, Wong LTK, Hardwick DF. Use of a dried blood spot in immunoreactive-trypsin assay for detection of cystic fibrosis in infants. *Clin Chem* 1981;27(5):678-80.
40. Dhondt JL, Farriaux JP. What do immunoreactive trypsin assays measure? *Screening* 1994;3(1):33-8.
41. van der Ploeg CPB, van den Akker-van Marle ME, Vernooij-van Langen AMM, Elvers LH, Gille JJP, Verkerk PH *et al.* Cost-effectiveness of newborn screening for cystic fibrosis determined with real-life data. *J Cyst Fibros* 2015;14(2):194-202.
42. Nshimyumukiza L, Bois A, Daigneault P, Lands L, Laberge AM, Fournier D *et al.* Cost effectiveness of newborn screening for cystic fibrosis: A simulation study. *J Cyst Fibros* 2014;13(3):267-74.
43. Gonska T, Ratjen F. Newborn screening for cystic fibrosis. *Exp Rev Respir Med* 2015;9(5):619-31.
44. Armas A, Figueredo JE, González Y, Collazo T, Santos E, Barbón C, et al. Perfil de las mutaciones del gen CFTR en una cohorte de pacientes cubanos con fibrosis quística. *Genética Médica y Genómica* 2019;3(3):67-73.
45. Borrajo G. Pesquisa neonatal de enfermedades congénitas [tesis doctoral]. La Plata: Universidad Nacional de La Plata; 2011. 500 p.
46. Figueredo JE. Novedoso ensayo de detección de mutaciones del gen CFTR para la confirmación del diagnóstico de la fibrosis quística [tesis de maestría]. La Habana: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología; 2019. 84 p.
47. Kay DM, Maloney B, Hamel R, Pearce M, DeMartino L, McMahon R *et al.* Screening for cystic fibrosis in New York State: Considerations for algorithm improvements. *Eur J Pediatr* 2016;175(2):181-93.
48. Cheillan D, Vercherat M, Chevalier-Porst F, Harcosset M, Rolland MO, Dorche C. False-positive results in neonatal screening for cystic fibrosis based on a three-stage protocol (IRT/DNA/IRT): Should we adjust IRT cut-off to ethnic origin? *J Inherit Metab Dis* 2005;28:813-8.
49. Giusti R, New York State Cystic Fibrosis Newborn Screening Consortium. Elevated IRT levels in African-American infants: implications for newborn screening in an ethnically diverse population. *Pediatr Pulmonol* 2008;43(7):638-41.
50. Centro de Estudios de Población y Desarrollo. El color de la piel según el censo de población y viviendas de 2012. Oficina Nacional de Estadística e Información. Cuba. Edición febrero 2016. Disponible en: [www.onei.gob.cu](http://www.onei.gob.cu)
51. Marcheco B, Parra EJ, Fuentes E, Salas A, Buttenschøn H, Demontis D *et al.* Cuba: Exploring the history of admixture and the genetic basis of pigmentation using autosomal and uniparental markers. *PLoS Genet* 10(7):e1004488.

---

 Recibido: 02/04/2024

 Aprobado: 02/05/2024
 

---

### Agradecimientos

Los autores agradecen, al grupo de compañeros de las instituciones participantes, por su valioso aporte y colaboración en el desarrollo del estudio UMELISA® TIR NEONATAL o en las investigaciones realizadas con el mismo. Queremos agradecer especialmente a Antonio Melchor Rodríguez, Irinia Valdivia Álvarez, Vivian Sánchez Castillo, Miguel Álvarez Abreu, Adriana González Quintero; todos del CIE. Margaret Fernández Carpio, Mirella Marrero Pacheco, Yokiro López Negrín, Graciela Duthil Ferrera, Mayrelys González Reyes, Maisili González Pérez, Yanet Bosch Ruiz, Elva Rosaval Nieves, Amarilis Martínez Piedra, Nieves Julia Morales, Pablo Sierra Hernández, Emilia Denís Morales, Mirian Ruiz Roche, Olga Castañeda Betancourt, Valia Fernández Hernández; del MINSAP.

### Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de interés en relación con la investigación presentada.

### Contribuciones de los autores

Conceptualización: Elisa María Castells Martínez, Aramis Sánchez Gutiérrez, Amarilys Frómeta Suárez, Ernesto Carlos González Reyes  
Curación de datos: Yanin Moksde Beltrán, Eladio Silva Cabrera, Nelson Ozunas Fernández, Tania Licourt Otero, Ana Luisa Arteaga Yera  
Análisis formal: Elisa María Castells Martínez, Ernesto Carlos González Reyes  
Investigación: Elisa María Castells Martínez, Amarilys Frómeta Suárez, Teresa Collazo Mesa, Elvia Nelemis Santos González, Pedro Lucio Pérez Morás  
Metodología: Elisa María Castells Martínez, Aramis Sánchez Gutiérrez, Eladio Silva Cabrera, Fidel Rodríguez Cala  
Administración del proyecto: Elisa María Castells Martínez, Aramis Sánchez Gutiérrez

Recursos: Greilys Morejón García

Supervisión: Elisa María Castells Martínez, Aramis Sánchez Gutiérrez  
Validación: Elisa María Castells Martínez, Amarilys Frómeta Suárez, Maryeris Espinosa Morales, Lesley del Río Fabre, Odalys Martín González

Visualización: Elisa María Castells Martínez

Redacción-borrador original: Elisa María Castells Martínez

Redacción-revisión y edición: Elisa María Castells Martínez, Ernesto Carlos González Reyes, Amarilys Frómeta Suárez, Aramis Sánchez Gutiérrez, Eladio Silva Cabrera

### Financiamientos

Los autores de la investigación que se presenta no recibieron fondos u otros honorarios para su realización.

### Cómo citar este artículo

Castells Martínez EM, Sánchez Gutiérrez A, Frómeta Suárez A, González Reyes EC, Moksde Beltrán Y, Silva Cabrera E et al. UMELISA® TIR NEONATAL: ultramicroensayo para la pesquisa neonatal de la fibrosis quística. An Acad Cienc Cuba [internet] 2024 [citado en día, mes y año];14(2):e1562. Disponible en: <http://www.revistaccuba.cu/index.php/revacc/article/view/1562>

El artículo se difunde en acceso abierto según los términos de una licencia Creative Commons de Atribución/Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0), que le atribuye la libertad de copiar, compartir, distribuir, exhibir o implementar sin permiso, salvo con las siguientes condiciones: reconocer a sus autores (atribución), indicar los cambios que haya realizado y no usar el material con fines comerciales (no comercial).

© Los autores, 2024.

