

## **UMELISA<sup>®</sup> TIR NEONATAL: ensayo inmunoenzimático para la determinación de tripsina inmunorreactiva en manchas de sangre seca en papel de filtro.**

Castells Martínez, Elisa María<sup>1</sup>  
González Reyes, Ernesto Carlos<sup>2</sup>  
Frómeta Suárez Amarilys<sup>1</sup>  
Tejeda Gómez, Yileidis<sup>3</sup>  
Perea Hernández, Yenitse<sup>1</sup>  
Martín González, Odalys<sup>1</sup>  
Del Río Fabre, Lesley<sup>1</sup>  
Pérez Morás, Pedro Lucio<sup>1</sup>  
Morejón García, Greilys<sup>4</sup>  
Espinosa Morales, Maryeris<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Inmunoensayo/Laboratorio de Pesquisa Neonatal, La Habana, Cuba, elisa.castells@cie.cu

<sup>2</sup> GK Pharmaceuticals CMO/ Laboratorio R&D, Guayama, Puerto Rico, ernesto730@gmail.com

<sup>3</sup> Universidad ETAC/Docente Académico, Estado de México, México, juanaelastic@gmail.com

<sup>4</sup> Centro de Inmunoensayo//Laboratorio de Anticuerpos Monoclonales, La Habana, Cuba, greilys.morejon@cie.cu

### **Resumen:**

**Introducción:** La fibrosis quística (FQ) es un trastorno autosómico recesivo grave con una incidencia aproximada de 1/3000 recién nacidos. Es causada por mutaciones en el gen regulador de la conductancia transmembrana de la FQ. El diagnóstico precoz de esta patología se realiza mediante la determinación de tripsina inmunorreactiva (TIR) en manchas de sangre seca sobre papel de filtro de recién nacidos.

**Objetivo:** Desarrollar un ensayo de ultramicroELISA (UMELISA<sup>®</sup>) tipo sándwich para la medición de TIR en manchas de sangre seca en papel de filtro de recién nacidos.

**Materiales y Métodos:** Se utilizó como fase sólida tiras recubiertas con un anticuerpo monoclonal de alta afinidad dirigido contra TIR para garantizar la especificidad del ensayo.

**Resultados:** El rango útil de la curva es de 0-500 ng/mL y la mínima concentración detectable fue de 4,8 ng/mL. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron inferiores al 10%. El valor medio de recuperación fue  $100,3 \pm 11,2\%$ . La reactividad cruzada con proteínas estructuralmente relacionadas con la TIR fue menor que el límite de detección del ensayo. Se analizaron 3953 muestras de recién nacidos del Programa cubano de Pesquisa Neonatal y la concentración media de TIR fue de 12,6 ng/ml. El análisis de regresión mostró una buena correlación con el estuche AutoDELFIA<sup>®</sup> Neonatal IRT (n =4033, r = 0,83 k = 0,976 p <0,01).

**Conclusiones:** Las características de desempeño analítico de nuestro UMELISA<sup>®</sup> TIR NEONATAL sugieren que se puede utilizar para la pesquisa neonatal de la FQ.

**Palabras clave:** Fibrosis Quística, tripsina inmunorreactiva, pesquisa neonatal, UMELISA<sup>®</sup>

## I. INTRODUCCIÓN

La fibrosis quística (FQ) es uno de los trastornos hereditarios autosómicos recesivos más comunes en las poblaciones caucásicas, causado por mutaciones en el gen regulador de la conductancia transmembrana de la FQ, que afecta aproximadamente a 1 de cada 3000 recién nacidos (1-4). La identificación temprana de la FQ mediante la pesquisa neonatal (PN) se asocia con mejoras en la función nutricional, respiratoria, gastrointestinal y cognitiva, así como en la supervivencia general de los pacientes que padecen la enfermedad (5, 6, 7, 8).

En 1979, el desarrollo de una prueba para medir el tripsina inmunorreactiva (TIR) en manchas de sangre seca hizo factible la PN universal para la FQ y proporcionó a los laboratorios una posible prueba de detección para identificar a los bebés con FQ en las primeras semanas de vida, a menudo antes de presentar signos clínicos (9).

En la década de 1980, comenzó el desarrollo de una tecnología en Cuba que permitió el estudio de una gran cantidad de muestras con el menor costo posible. A partir de estos esfuerzos iniciales se desarrollaron las técnicas Ultra Micro Analíticas (SUMA) y ultramicroELISA (UMELISA<sup>®</sup>). Estas pruebas combinan la alta sensibilidad de los ensayos micro-ELISA actuales con el uso de ultramicro volúmenes de muestras y reactivos.

En Cuba, la PN se introdujo en 1986 para la detección del hipotiroidismo congénito, utilizando una mancha de sangre seca sobre papel de filtro en el quinto día de vida del bebé. Con el transcurso de los años, se añadieron otras cuatro enfermedades a la PN, que incluyen fenilcetonuria, hiperplasia suprarrenal congénita, galactosemia y deficiencia de biotinidasa (10).

Teniendo en cuenta estas experiencias exitosas, el objetivo de este trabajo fue diseñar, desarrollar y validar un ensayo tipo UMELISA<sup>®</sup> para medir TIR en manchas de sangre seca en papel de filtro de recién nacidos que podría emplearse en la pesquisa neonatal de la FQ.

## II. MÉTODO

### *A. Reactivos químicos y anticuerpos monoclonales:*

Todos los reactivos fueron de grado analítico y las soluciones se prepararon en agua destilada. Los anticuerpos monoclonales anti-TIR fueron obtenidos en el Centro de Inmunoensayo y son altamente específicos por la TIR (11)

### *B. Equipos y accesorios*

Se utilizó la tecnología del Sistema Ultra Micro Analítico (SUMA). El sistema, fabricado por el Centro de Inmunoensayo (CIE), incluye reactivos e instrumental. El equipo comprende un fotómetro espectrofluorímetro totalmente computarizado para la lectura, cuantificación, validación e interpretación automática de los resultados (PR-621) y un lavador de placas (MW-2001). Los reactivos se presentan en formato de kits con cantidades suficientes para 288 determinaciones (volúmenes de 10  $\mu$ L de muestras y reactivos).

### *C. Controles*

Se usaron controles preparados en el Laboratorio de Pesquisa Neonatal del CIE con una concentración conocida de TIR que abarcaban el rango analítico de la curva estándar para la evaluación del ensayo. Además, se evaluaron controles comerciales, con el objetivo de determinar la exactitud relativa de nuestro método.

Adicionalmente, se evaluaron 3943 muestras de sangre seca del Programa Cubano de Pesquisa Neonatal. Las muestras se obtuvieron rutinariamente mediante punción de talón y se recogieron en tarjetas de papel de filtro Whatman 903. Se calcularon la media y la desviación estándar de la concentración de TIR.

### *C. UMELISA<sup>®</sup> TIR NEONATAL*

Para la medición de concentraciones de TIR, se poncharon discos de sangre de 3 mm de calibradores, controles y muestras y se colocaron en cada pocillo de las microplacas de elución, seguido de la adición de 70  $\mu$ L del conjugado AcM anti TIR-fosfatasa alcalina. Después de la etapa de elución en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante 16-18 horas, se transfirieron 10  $\mu$ l de eluato al pocillo de las placas recubiertas con anticuerpos monoclonales específicos anti-TIR. La reacción inmunológica se produjo durante 2 horas a temperatura ambiente en una cámara húmeda y luego a las placas se les aplicaron 6 ciclos de lavado. Se añadieron 10  $\mu$ l de sustrato fluorogénico y se incubaron a temperatura ambiente en una cámara húmeda durante 30 minutos. Finalmente, la fluorescencia fue medida automáticamente en el lector de fotómetro fluorimétrico. La validación e interpretación automática de los resultados fueron realizadas utilizando un software específico para este ensayo.

### *C. Correlación de métodos*

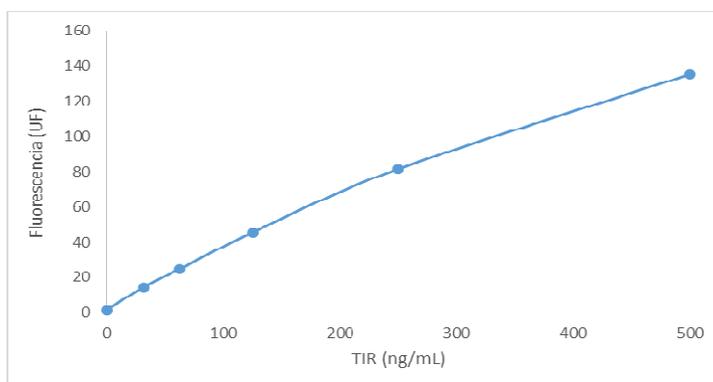
La correlación con el kit comercial AutoDELFIA<sup>®</sup> Neonatal IRT fue estudiada utilizando 4033 muestras de sangre seca sobre papel de filtro de recién nacidos. Los parámetros estadísticos evaluados se obtuvieron usando Excel 2000. La correlación de Pearson y los coeficientes Kappa de Cohen (valores r y k) se usaron para calcular la correlación entre los niveles de TIR en sangre usando UMELISA<sup>®</sup> y el kit de IRT Neonatal AutoDELFIA<sup>®</sup>.

## III. RESULTADOS

### *A. Curva de calibración*

En la Fig. 1 se muestra la curva estándar típica obtenida con el UMELISA<sup>®</sup> TIR Neonatal. La curva de calibración fue construida automáticamente por el software, trazando en un gráfico los valores medios de fluorescencia para cada estándar (eje y) y sus concentraciones teóricas esperadas (eje x). La Fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de TIR presente en la muestra.

Fig. 1 Curva de calibración típica del UMELISA® TIR NEONATAL



Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) se determinaron de acuerdo con las Directrices CLSI (12). El LOD, definido como la menor cantidad de TIR presente en una muestra que se puede detectar con una probabilidad del 95%, fue de 4,8 ng/mL.

El LOQ, la cantidad más baja de TIR presente en una muestra que puede determinarse cuantitativamente en nuestro UMELISA® con una precisión y exactitud adecuadas, fue de 19 ng/ml.

### B. Precisión y Recuperación

La precisión y la recuperación se determinaron siguiendo las Directrices CLSI (13). Para evaluar la precisión, se analizaron muestras que representan 3 niveles diferentes de concentraciones de TIR que abarcan el rango analítico de la curva de calibración. Se calculó la media, DS y CV intra e interensayo obteniéndose valores entre 5,6-7,0 % y 8,6-9,7 % respectivamente, dependiendo de las concentraciones de TIR evaluadas (Tabla 1).

Tabla 1. Precisión del UMELISA® TIR NEONATAL

Concentración de la muestra (ng/mL)	Intraensayo (n=24)		Interensayo (n=10)	
	DE	CV (%)	DE	CV (%)
30,5	1,7	5,6	2,6	8,6
67,9	4,4	6,5	6,6	9,7
133,1	9,3	7,0	11,8	8,9

Los resultados obtenidos cuando se evaluaron los controles comerciales se muestran en la Tabla 2. Las recuperaciones porcentuales oscilaron entre 90,8-110,7% con un valor promedio de  $100,3 \pm 11,2\%$ .

Tabla 2. Recuperación del UMELISA® TIR NEONATAL

Controles	Esperado (ng/mL)	Determinado (ng/mL)	% Recuperación
CDC USA)			
A1609	15,1	17,6	116,7
B1609	65,1	57,5	88,3
C1609	138,2	134,5	97,3
D1609	231,1	263,5	114
PEEC (Argentina)			
90-179	126	116	92,1
90-180	292,3	290,7	99,5
91-182	396,4	443,5	111,9
93-185	56,9	62,1	109,3
93-186	132,4	118,2	89,3
95-189	15,4	15,5	100,6
95-190	119	100,3	84,3

### C. Reactividad Cruzada

Las reacciones cruzadas con algunos compuestos que son similares a la TIR o pueden estar presentes en concentraciones anormalmente altas en la sangre de recién nacidos, se muestran en la Tabla 3. La especificidad fue satisfactoria debido a que la fluorescencia de tales enzimas no excedió la correspondiente a una concentración de tripsina de 4,8 ng / ml.

Tabla 3. Reactividad Cruzada del UMELISA® TIR NEONATAL

Analito	Concentración	RC obtenida con el UMELISA® TIR Neonatal
$\alpha$ 1-antitripsina (humana)	2 mg/mL	< 4,8 ng/mL
$\alpha$ 2-Macroglobulina (humana)	5 mg/mL	< 4,8 ng/mL
$\alpha$ -Quimotripsina (humana)	1 $\mu$ g/mL	< 4,8 ng/mL
$\alpha$ -Quimotripsinógeno tipo VII (bovino)	1 $\mu$ g/mL	< 4,8 ng/mL
$\alpha$ - Quimotripsinógeno A tipo II (bovino)	1 $\mu$ g/mL	< 4,8 ng/mL
$\alpha$ - Quimotripsinógeno tipo I-S (bovino)	1 $\mu$ g/mL	< 4,8 ng/mL
Trypsinógeno (bovino)	1 $\mu$ g/mL	< 4,8 ng/mL
Tripsina type IX-S (porcino)	1 $\mu$ g/mL	< 4,8 ng/mL
Fosfolipasa A2 (bovino)	1 $\mu$ g/mL	< 4,8 ng/mL

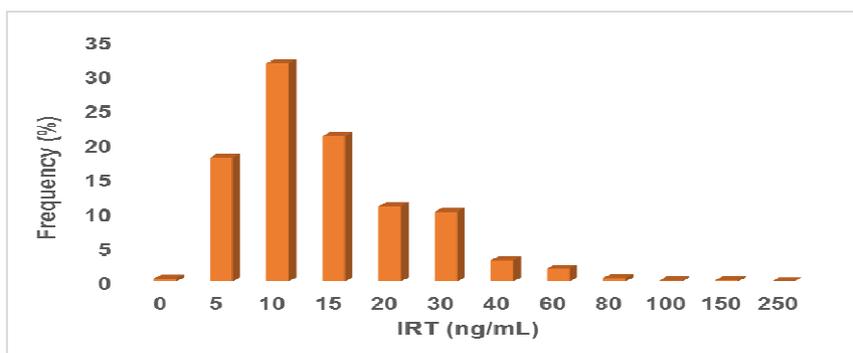
### D. Análisis de muestras y correlación de métodos

Los resultados de la primera aplicación del ensayo a la detección de la FQ en recién nacidos se muestran en la Fig. 2. La concentración media de TIR en muestras de sangre seca de 3953 recién nacidos sanos (edades 5-7 días) fue  $12,6 \pm 11,2$ . Todas las muestras se obtuvieron de neonatos aparentemente sanos.

Durante el transcurso de este estudio, se analizaron retrospectivamente muestras de sangre seca de 6 niños con FQ, confirmadas mediante la técnica de biología molecular y la prueba del sudor. Las man-

chas de sangre de estos niños tenían niveles de TIR por encima de nuestro punto de corte, y se habrían identificado correctamente si hubiera existido un programa de detección con UMELISA® TIR NEONATAL.

Fig. 2 Distribución de los valores de TIR en población cubana de neonatos utilizando el UMELISA® TIR NEONATAL

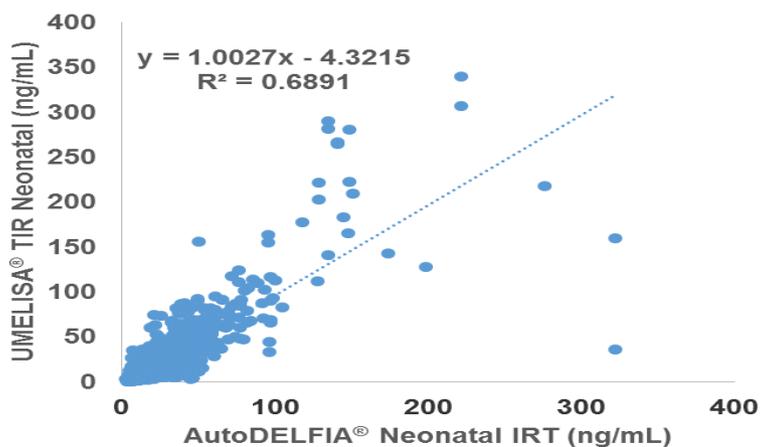


Utilizando nuestro ensayo y el kit comercial comercial AutoDELFIA® Neonatal IRT, se evaluaron 3948 muestras de sangre seca del Programa brasileño de pesquisa neonatal. Los resultados de los análisis de correlación se muestran en la Fig.3.

Los resultados de estos ensayos estuvieron altamente correlacionados por la correlación de Pearson ( $r = 0,83$ ,  $p < 0.01$ ) en el amplio rango de la curva de calibración de nuestro ensayo.

La fiabilidad entre evaluadores entre los ensayos se cuantificó utilizando el estadístico kappa. El coeficiente kappa de Cohen (k), si se usa e interpreta adecuadamente, proporciona información valiosa sobre la confiabilidad de los procedimientos de diagnóstico. Los resultados mostraron una alta concordancia general entre UMELISA® TIR NEONATAL y AutoDELFIA® Neonatal IRT kit ( $k = 0,976$ ).

Fig. 3 Correlación entre UMELISA® TIR NEONATAL y AutoDELFIA® Neonatal IRT kit



#### IV. CONCLUSIONES

Se ha desarrollado un UMELISA<sup>®</sup> tipo sándwich para medir TIR en manchas de sangre seca sobre papel de filtro de recién nacidos usando conjugado de AcM anti TIR-fosfatasa alcalina y anticuerpos monoclonales específicos inmovilizados en placas de poliestireno.

La evaluación general de los resultados muestra que el UMELISA<sup>®</sup> TIR NEONATAL tiene características similares a otros ensayos comercialmente disponibles en términos de precisión, exactitud y utilidad clínica, por lo que podría ser potencialmente útil en la pesquisa neonatal de la FQ.

A partir del 1<sup>o</sup> de enero de 2018, se iniciará un programa piloto cubano de detección de FQ con UMELISA<sup>®</sup> TIR NEONATAL. Los resultados de este programa permitirán analizar los valores de TIR en relación con estos factores con el fin de modificar el nivel de corte preliminar y mejorar la eficacia y el valor predictivo de nuestro programa de detección de FQ.

En resumen, el UMELISA<sup>®</sup> TIR NEONATAL, como parte de la tecnología SUMA, es un ensayo simple, preciso, y exacto que puede utilizarse para llevar a cabo un programa de detección de FQ en recién nacidos.

#### REFERENCIAS

*Referencias:*

1. Parad RB, Comeau AM. Newborn screening for cystic fibrosis. *Pediatr Ann* 2003; 32:528-35.
2. Sontag MK, Hammond KB, Zielenski J, Wagener JS, Accurso FJ. Twotiered immunoreactive trypsinogen-based newborn screening for cystic fibrosis in Colorado: screening efficacy and diagnostic outcomes. *J Pediatr* 2005; 147:S83-8.
3. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science (New York, NY)* 1989; 245:1066-73.
4. Massie RJ, Curnow L, Glazner J, Armstrong DS, Francis I. Lessons learned from 20 years of newborn screening for cystic fibrosis. *Med J Aust* 2012; 196:67-70.
5. Dijk FN, Fitzgerald DA. The impact of newborn screening and earlier intervention on the clinical course of cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev* 2012; 13:220–225.
6. 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; 337:963–969.
7. Grosse SD, Rosenfeld M, Devine OJ, Lai HJ, Farrell PM. Potential impact of newborn screening for cystic fibrosis on child survival: a systematic review and analysis. *J Pediatr* 2006; 149:362–366.
8. VanDevanter DR, Pasta DJ, Konstan MW. Improvements in lung function and height among cohorts of 6-year-olds with cystic fibrosis from 1994 to 2012. *J Pediatr* 2014; 165:1091–1097.
9. Crossley JR, Elliott RB, Smith PA. Dried-blood spot screening for cystic fibrosis in the newborn. *Lancet* 1979; 1:472–4.

10. González EC, Castells EM, Frómeta A, Arteaga AL, Del Río L, Tejeda Y, et al. SUMA Technology and Newborn Screening Tests for Inherited Metabolic Diseases in Cuba: An Overview of the First 30 Years. *Journal of Inborn Errors of Metabolism & Screening* 2016; 4: 1-9.

11. Morejón G, Feal S, Lafita Y, Castells E, Quintana JM, Hernández L, et al. “Obtención y caracterización de anticuerpos monoclonales antitripsina humana para el diagnóstico de la fibrosis quística”. Poster presented at: X Jornada Latinoamericana de Hematología, Inmunología y Medicina Transfusional. V Taller Internacional de Hemofilia y Trastornos de la Coagulación. III Taller de Inmunodeficiencias Primarias. VIII Congreso Cubano de Hematología; May 8-12, 2017, Havana, Cuba

12. CLSI Protocols for determination of limits of detection and limits of quantitation; Approved guideline. CLSI document EP17-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087–1898 USA, 2004.

13. CLSI Protocols for evaluation of precision performance of quantitative measurement methods; Approved guideline. CLSI document EP05-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087–1898 USA, 2004.

14. Farrell PM, Kosorok MR, Rock MJ, et al. Early diagnosis of cystic fibrosis through neonatal screening prevents severe malnutrition and improves longterm growth. Wisconsin Cystic Fibrosis Neonatal Screening Study Group. *Pediatrics* 2001; 107: 1–13.

15. Castellani C, Massie J, Sontag M, Southern KW. Newborn screening for cystic fibrosis. *Lancet Respir Med* 2016; 4:653–61.

16. Silva Filho LVRF, Castaños C, Hernán H. Cystic fibrosis in Latin America—Improving the awareness. *J Cyst Fibros* 2016; 15 (6): 791-793.