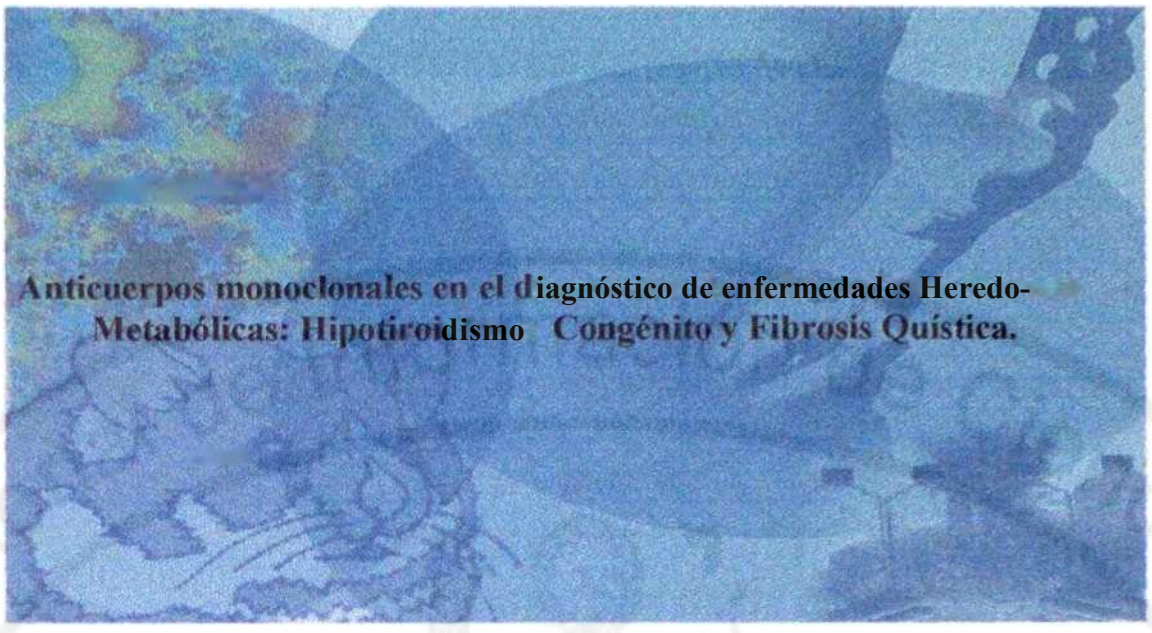
T409-05

Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana.
Centro de Inmunoensayo.



Tesis presentada en opción al grado de Doctor en Ciencias de la Salud

Autor: Lic. Carmen Acosta Bas
Tutor: Dr. Ángel Mauro Alfonso Fernández

Ciudad de La Habana, 2004

Centro Nacional de Ciencias Médicas
Dirección B M.N
CNICM INFOMED

Dedicatoria

Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas
Dirección B M.N
CNICM INFOMED

A mis hijos, a mis padres y
a mi compañero de vida.

Agradecimientos

A mis compañeras del laboratorio, por su valiosa ayuda en todo el trabajo experimental, así como por los lazos de amistad que hemos establecido a lo largo de estos años.

A mi tutor Dr. Mauro Alfonso, por sus valiosas sugerencias durante toda la etapa de realización de esta tesis.

A los compañeros del laboratorio de Pesquisaje Neonatal, por todo su apoyo en demostrar la aplicación de los AcM obtenidos.

A los Ms. Antonio Melchor y la Lic. Liliana sin los que hubiera sido imposible la purificación de los AcM como la Tripsina.

Al Dr. Marta Sonia Robaina. por su ayuda con la información actualizada, a nivel nacional, del Programa Cubano de Prevención de Hipotiroidismo Congénito así como por los consejos que me dio durante la elaboración de esta Tesis.

A la Lic. Bety, quien desde las primeras etapas de concepción de este trabajo me apoyo con la búsqueda de la información más actualizada.

Finalmente, a mis padres quienes siempre creyeron en mi, a mis hijos, motor impulsor en mi desarrollo profesional, a mi esposo, por el amor y comprensión que me a brindado A todos ellos mi agradecimiento especial.

Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas
Dirección B M.N
CNICM INFOMED

Bibliografía del autor

Artículos publicados.

I. Ileana B. Baluja Conde, Adys I. Brito Moreno, Isis Amores Sánchez, **Carmen Acosta Bas** Obtention. production and characterization of specific monoclonal antibodies of the human thyroid stimulating hormone. Hvbridoma 2000: 19 (4): 335-338.

II. **Carmen Acosta Bas.** Ileana B. Baluja Conde, Adys **I** Brito Moreno, Maya Rosa Rodriguez López, Antonio Melchor. Liliana Fernández, Amarilys Frómcta.Specific monoclonal antibody against the human trypsin. Hybridoma 2002: 21(4).

III. **Carmen Acosta Bas.** Ileana B. Baluja Conde. Adys I. Brito Moreno. Maya Rosa Rodriguez López. Antonio Melchor. Liliana Fernández. Amarilys Frometa.

Monoclonal antibody against human trypsin: production, characterization, and use for diagnosis. Hybridoma 2002: 21(6).

IV. Ileana Blanca Baluja Conde, **Carmen Acosta Bas.** Advs Irene Brito Moreno. Isis Amores Sánchez. Nimia Fanego Serral, Julio Ventura Paz, Pedro Lucio Pérez. Determinación de la constante de afinidad para anticuerpos monoclonales mediante un método inmunoenzimático empleando la tecnología suma. Revista CNIC de Ciencias Biológicas. 2002. 34(2):79-85

V. **Carmen Acosta Bas.** Ileana B. Baluja Conde. Adys I. Brito Moreno. Maya Rosa Rodríguez López, Fidel Bencomo, Marta Sonia Robaina. Susana García. Impac of the introduction of monoclonal antibodies in UMELISA tecnicques. Hybridoma and Hyibridomics. 2003. 22(6).

Presentaciones en eventos.

1. Inmunoensayo 97. Primer Congreso Latinoamericano de Pesquisaje Neonatal y Enfermedades Heredo-metabólicas. Primer Encuentro Internacional de Inmunodiagnóstico. 14 - 18 de Septiembre de 1997. Ciudad de La Habana.
   - Determinación de la constante de afinidad para anticuerpos monoclonales mediante un método inmunoenzimático empleando la tecnología SUMA.
   - Obtención, producción y caracterización de anticuerpos monoclonales específicos a la β-TSH

2. Biotecnología Habana'97. 1 - 6 de Diciembre de 1997. Ciudad de La Habana.
   - Determinación de la constante de afinidad para anticuerpos monoclonales mediante un método inmunoenzimático empleando la tecnología SUMA.
   - Obtención, producción y caracterización de anticuerpos monoclonales específicos a la β-TSH.

3. 9na conferencia internacional “Hybridomas and human antibodies’. 16-18 de Septiembre de 2002. Berna Suiza.
   - Obtention. production and characterization of specific monoclonal antibodies of the human thyroid stimulating hormone.
   - Specific monoclonal antibody against the human trypsin.

4. 6to Congreso Latinoamericano de Inmunología. 3er Congreso Cubano de Inmunología. Diciembre 2002.
   - Monoclonal antibody against human trypsin: production, characterization, and use for diagnosis.
   - Human trypsinogen purification from pancreatic tissue for cystic fibrosis immunodiagnosis.
5. Congreso Latinoamericano de Errores Innatos del Metabolismo y Pesquisa Neonatal. Argentina 2003.
   - Anticuerpos monoclonales contra la tripsina humana: Producción, caracterización y uso en la purificación por inmunoafinidad y el diagnóstico.
   - Normalización de un ultramicroensayo inmunoenzimático para la determinación de los niveles de tripsina inmunoreactiva (TIR) en muestras de sangre sobre papel de filtro.

6. I Congreso Cubano de endocrinología pediátrica y de la adolescencia. I Encuentro de Sociedades Cubana y Española de endocrinología pediátrica. IV Taller del Programa Nacional de Diagnóstico Precoz de Hipotiroidismo Congénito.
   - Impacto de la introducción de AcM de alta afinidad en el UMELISA TSH.

7 Forum de Ciencia y Técnica
   - XIII FORUM de Ciencia y Técnica. Nivel Nacional. Obtención y caracterización de AcM anti ɓ-TSH (Mención especial).
   - XIV FORUM de Ciencia y Técnica. Nivel Base. Obtención de un anticuerpo monoclonal contra la tripsina humana (Destacado).
   - XIV FORUM de Ciencia y Técnica. Nivel Base. Purificación de la tripsina por inmunoafinidad empleando un anticuerpo monoclonal (Destacado).

- XIV FORUM de Ciencia y Técnica. Nivel Base. Obtención, producción y caracterización de anticuerpos monoclonales específicos a la tripsina humana. (Destacado).
- XV FORUM de Ciencia y Técnica. Nivel Base. Estabilidad de los AcM anti- Tripsina (Destacado).
- XV FORUM de Ciencia y Técnica. Nivel Base Impacto de la introducción de AcM en las técnicas de UMELISA: UMELISA HBsAg PLUS, UMELISA TSH.

Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas
Dirección B M.N
CNICM INFOMED

1. INTRODUCCION 1
2. REVISION BIBLIOGRAFICA 7
2.1. Enfermedades heredo-metabólicas 7
2.2. Hipotiroidismo Congénito 8
2.2.1 Etiología del Hipotiroidismo Congénito Aspectos bioquímicos y genéticos... 9
2.2.2. Diagnóstico y Tratamiento 11
2.2.3. Terapia y Seguimiento Clínico de niños con Hipotiroidismo Congénito diagnosticados 12
2.3. Fibrosis Quistica 12
2.3.1. Etiología de la Fibrosis Quistica. Aspectos bioquímicos y genéticos 13
2.3.2. Diagnóstico y tratamiento 15
2.4 Anticuerpos en el desarrollo de los ensayos inmunoenzimáticos 18
2.4.1. Anticuerpos monoclonales para inmunopurificación por afinidad 20
2.4.2. Adsorción de Anticuerpos 27
2.4.3. Mareaje de anticuerpos Y sistema de detección 23
2.4.4. Inmunoensayos para el Hipotiroidismo congénito y la Fibrosis Quistica 25
2.5. Tendencias actuales en la Pesquisa Neonatal 29
2.5.1. Programas de Pesquisa Neonatal de Hipotiroidismo Congénito 30
2.5.2. Programas de Pesquisa Neonatal de la Fibrosis Quistica 37
2.6. El costo- beneficio de los programas de pesquisa neonatal 33
3.- MATERIALES Y METODOS 34
3.1. Antígenos 34
3.2. Inmunización y generación de los hibridomas 34
3.2.1. Pesquisaje y clonaje de los hibridomas 34
3.3. Determinación de la clase, subclase y tipo de inmunoglobulina de cada AcM 36
3 4 Producción de liquido ascítico y purificación de los AcM 36
3.5. Ensayos de UMELISA para la determinación de la especificidad de los AcM obtenidos 37
3.6. Conjugación de anticuerpos policlonales anti cadena a TSH con la fosfatasa alcalina 37
3.7. Conjugación de la Tripsina a biotina 37
3.8 Preparación del conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina 37
3.9. Reconocimiento de los antígenos en solución por los diferentes AcM 38
3.9.1 Reconocimiento de la Tripsina en solución 38
3.9.2. Reconocimiento de la TSH en solución 38
3.9.3. Determinación del reconocimiento de epítopos 39
3.10. Preparación de los AcM anti-Tripsina 3H9 y 2G6 biotinilados 40
3.10.1. Determinación del reconocimiento de la Tripsina por los AcM 2G6-Biotina y 3H9-Biotina 40
3.11. Determinación de la constante de afinidad 41
3.12. Determinación del punto isoeléctrico 42
3.13. Estudio de los AcMs como inmunoligando 42
3.13.1. Selección del AcM con características adecuadas para inmunopurificar Tripsina a partir de páncreas mediante un sistema UMELISA 42
3 13.2. Empleo de AcM para la Purificación de Tripsina por Inmunoafinidad 42
3.13.3. Selección del AcM con características adecuadas para inmunopurificar TSH a partir de Hipófisis mediante un sistema UMELISA 43

3.13.4. Empleo de AcM para la Purificación de TSH por Inmunoafinidad 44
3.13.5 UMELISA para la cuantificación de la IgG de ratón 44
3.14. Obtención de anticuerpos policlonales en conejo empleando la Tripsina purificada. 44
3.14.1. Purificación de los anticuerpos policlonales anti Tripsina humana 45
3.15. Análisis de los costos de producción 46
3.16 Impacto del UMELISA TSH 47
4.- RESULTADOS 48
4 1. Resultados de las fusiones y pesquisaje de los hibridomas 48
4.1.1. Producción de fluido ascítico y purificación de los AcM 51
4.2. Caracterización de los AcMs obtenidos 52
4 3. Reconocimiento de los antígenos en solución 52
4.4. Determinación del reconocimiento de epítopos 55
4.5 Reconocimiento de la Tripsina por los AcM 2G6 y 3H9 biotinilados 58
4.6. Determinación de la constante de afinidad 59
4.7. Determinación del punto isoleléctrico 60
4.8. Estudio de los AcMs como inmunoligando 61
4 8 1. Selección del AcM con características adecuadas para inmunopurificar TSH a partir de Hipófisis mediante un sistema UMELISA. Purificación por Inmunoafinidad. 61
4.8.2. Selección del AcM con características adecuadas para inmunopurificar Tripsina a partir de páncreas mediante un sistema UMELISA. Purificación por inmunoafinidad 63
4.9. Obtención de anticuerpos policlonales en conejo empleando la Tripsina purificada. 65
4.9.1. Evaluación del titulo de los Conejos 65
4.10. Resultados del programa Cubano para la detección de Hipotiroidismo congénito. 70
4.11Resultados de la Utilización del UMELISA TSH Neonatal en Programas de Pesquisa Neonatal en Brasil y México 72
4 . 1 1 1 - Resultados del programa en Minas Gerais, Brasil (Test do pezinho) 72
4.11.2. Resultados del programa del IMSS en México 77
4.12. Análisis de los costos de producción de los AcMs anti P-TSH 73
4.13. Impacto del programa de Hipotiroidismo Congénito 74
5. DISCUSION 76
5 1 Obtención y caracterización de los AcM anti p-TSH y anti-Tripsina 77
5 11 Selección y caracterización de los AcM anti p-TSH y anti-Tripsina 79
5.2. Evaluación de los AcM como inmunolIE?ándos 80
5.2 1 Purificación de TSH por inmunoafinidad 81
5.2.2. Purificación de Tripsinógeno por inmunoafinidad 87
5.4 Aplicación de los AcM obtenidos en el desarrollo técnicas de UMELISA 83
5.5. Aplicación de las técnicas de UMELISA en el Programa Nacional de Salud 86
5.6. Análisis de los costos de producción de los AcMs anti P-TSH 87
5.7. Análisis del impacto del proi>rama de HC en Cuba 88
6. CONCLUSIONES 90
7 RECOMENDACIONES 91
8 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 97

I. INTRODUCCIÓN

En el mundo actual, el pesquisaje neonatal se ha convertido en una práctica sistemática para la estrategia de prevención en la atención materna infantil y el diagnóstico de diferentes enfermedades Heredo-Metabólicas e infecciosas.

El reconocimiento y cuantificación de la enfermedad genética y/o congénita sirve de base para el desarrollo de programas que miden su impacto en la población y desarrollan estrategias para prevenirlas (Binkel y cols., 1953).

El desarrollo por Guthrie, en los primeros años de la década del 60, de metodologías más simples basadas en técnicas de inhibición del crecimiento bacteriano para la detección de fenilalanina, aplicable también a otros metabolitos y la utilización de la colección de muestras de sangre en papel de filtro, posibilitaron la rápida extensión del pesquisaje a escala masiva para la fenilcetonuria (Guthrie y Sici, 1963).

Las enfermedades Heredo-Metabólicas comprenden el 1% de las admisiones en hospitales pediátricos y se ha calculado una incidencia global de 2.5 por mil recién nacidos. Esta cifra resulta al calcular la totalidad de las enfermedades Heredo-Metabólicas en conjunto, puesto que cada una en particular es infrecuente (Alliende y cols., 1999).

Las base principal del pesquisaje neonatal es la captación de todos los recién nacidos para la determinación de las enfermedades cuyos síntomas clínicos pueden ser imperceptibles en el momento del nacimiento. Estas enfermedades provocan daños irreversibles en caso que no se realice el diagnóstico temprano o no se aplique el tratamiento sustitutivo y precoz (Abreu y Dodge, 1999; Serrat-Prat, 2000).

Dentro de los requisitos para el establecimiento de los programas de Pesquisaje Neonatal está el análisis de la incidencia de estas enfermedades en la población, además del empleo de métodos simples de colección de muestras, el diseño de ensayos reproducibles y altamente confiables, para lo cual es necesario una aceptada sensibilidad y especificidad, una alta relación costo-beneficio y la existencia de métodos adecuados para la confirmación y el seguimiento de los casos detectados, así como la aplicación del tratamiento lo más temprano posible (Rosenfeld y cols., 1997; Pollit, 1997; Abreu y Dodge, 1999; Murray, 1999; Serrat-Prat, 2000).

El pesquisaje masivo sostenible ha sido un criterio defendido por muchos investigadores en la búsqueda de métodos prácticos en la atención preventiva para el alcance de las grandes masas poblacionales.

Se han desarrollado un grupo de criterios que funcionan como condicionales para el establecimiento de programas de pesquisaje, los mismos son:

1. Prevalencia y severidad de la enfermedad
2. Disponibilidad de tratamiento efectivo
3. Posibilidad de prevención
4. Justificación ética y médica
5. Beneficio evidente para las personas y la sociedad.
6. Método de pesquisaje apropiado (prueba de bajo costo)
7. Acceso al pesquisaje
8. Aceptabilidad de la prueba
9. Voluntad política y social
10. Personal técnico motivado y entrenado

En la década de los 80 se comenzó en Cuba el desarrollo de una tecnología que podía compatibilizar las necesidades de un sistema de salud altamente socializado con las posibilidades de un país en desarrollo (Fernández y cols., 2002). A partir de estos esfuerzos iniciales se desarrolló el Sistema Ultra Micro Analítico (SUMA) y la técnica de ultramicroELISA (UMELISA), las que con el uso de ultramicrovolúmenes de muestras y reactivos, así como la automatización permiten el estudio de un gran número de muestras, resultando atractiva para la realización de estudios a escala masiva (Fernández y cols., 2002, Carlos, 1998).

En Cuba, la estandarización en 1986 de un inmunoensayo enzimático de tipo “sandwich" soportado en el sistema SUMA, constituyó la base analítica que permitió el desarrollo del Programa Nacional de Detección Precoz de Hipotiroidismo Congénito (HC), basado en la medición de la hormona estimulante del tiroides (TSH) en muestras de suero de cordón umbilical.

La red nacional de laboratorios de diagnóstico SUMA, conjuntamente con los departamentos provinciales de endocrinología pediátrica, constituyeron el soporte logistico,

analítico y clinico respectivamente para el diagnóstico y tratamiento de los casos detectados.

Por otra parte, a partir de la experiencia en el establecimiento de Programas Nacionales y teniendo como premisa la experiencia en el ámbito mundial, demostrada a través de más de veinte estudios prospectivos para la detección en la etapa neonatal de Fibrosis Quistica (FQ), mediante la determinación de la Tripsina Inmunoreactiva Humana (TIR) sola o conjuntamente con la detección de las mutaciones más frecuentes que conducen a esta patología, pretendimos estandarizar un ensayo inmunoenzimático de tipo "sandwich", a partir de la obtención de AcMs específicos a la TIR, que permita a través de la infraestructura creada en el país, dar respuesta práctica al diagnóstico de FQ en la etapa neonatal.

Las premisas del establecimiento de la pesquisa neonatal para FQ en Cuba, fueron dadas por Guerra y cols., en 1984. En ese estudio se evaluaron cerca de 23 mil recién nacidos utilizando como marcador albúmina en meconio, a través del uso del BM-Test (ensayo para la determinación semicuantitativa de albúmina en meconio) y la inmunodifúsión radial simple, empleando un suero monoespecífico a la albúmina (Fernández y cols., 1976), obteniéndose una prevalencia de 1:4558 nacidos vivos y una tasa estimada de portadores de 2,9%.

Los inmunoensayos que utilizan anticuerpos presentan una amplia versatilidad, experimentándose en las ultimas décadas, a partir del desarrollo de la tecnología de anticuerpos monoclonales, un incremento notable en la especificidad de las técnicas (Kloler y Milsten, 1975; Borrebaeck, 2000).

Teniendo en cuenta los éxitos mostrados por la aplicación del sistema SUMA y las técnicas de UMELISA en la solución de diferentes problemas de salud en el ámbito nacional (Fernández y cols., 2002) y para respuesta práctica al pesquisaje masivo y el diagnóstico de enfermedades Heredo-Metabólicas, decidimos obtener anticuerpos monoclonales específicos y de alta afinidad por lo que nos propusimos la siguiente ***hipótesis de trabajo A partir de la obtención de los anticuerpos monoclonales específicos y de alta afinidad por la TSH y la Tripsina pueden ser diseñados ensayos inmunoenzimáticos para el pesquisaje neonatal del Hipotiroidismo Congénito y Fibrosis Quistica***

Para la realización de nuestro trabajo nos trazamos los siguientes *objetivos*

Obtener anticuerpos monoclonales específicos y de alta afinidad para la TSH y la tripsina.

Demostrar ¡a aplicación de los AcM obtenidos en diagnóstico neonatal del Hipotiroidismo Congénito y la Fibrosis Quistica.

- *Analizar los resultados de los Programa para la detección Precoz del Hipotiroidismo Cóngénito.*

TAREAS

1. *Obtener anticuerpos monoclonales contra β-TSH humana y definir la capacidad de estos de reconocer específicamente β-TSH en solución unci vez fijados a un soporte sólido.*
2. *Sustitución de anticuerpos policlonales empleados hasta el momento en el UMELISA TSH por AcM específicos y de alta afinidad.*
3. *Obtener anticuerpos monoclonales contra Tripsina humana y definir la capacidad de estos de reconocer específicamente Tripsina en solución una vez fijados a un soporte sólido o luego de ser conjugados a biotina.*
4. *Emplear un protocolo sencillo de purificación de la Tripsina humana y la TSH por inmunoafinidad.*
5. *Obtener anticuerpos policlonales contra Tripsina humana y definir la capacidad de estos de reconocer específicamente Tripsina en solución una vez fijados a un soporte sólido o luego de ser conjugados a biotina.*
6. *Evaluar e! funcionamiento de los Programas para la Prevención del Hipotiroidismo Congénito.*

Si bien existen trabajos previos en la literatura sobre la obtención de AcMs murinos contra la TSH y Tripsina humanas, la *novedad científica* de estos resultados radica en la obtención de AcMs específicos y de alta afinidad que permitieron el desarrollo de técnicas de UMELISA empleando la tecnología SUMA.

El diseño de una metodología fácil y reproducible en la purificación de la Tripsina humana así como la TSH (cromatografía de Inmunoafinidad), nos permitirá disponer de una de las materias primas indispensables en el desarrollo del estándar para el UMELISA TIR

Neonatal y de inmunógeno para la obtención de nuevos AcMs y policlonales, además de su empleo en las técnicas de UELISA para el seguimiento productivo de los AcM.

Por otra parte se demostró el impacto en el funcionamiento del Programa Nacional para la prevención del Hipotiroidismo Congénito luego de la sustitución de los anticuerpos policlonales por anticuerpos monoclonales específicos y de alta afinidad, lo que ha repercutido en el incremento de la eficiencia del programa y de esa forma lograr que luego del establecimiento del tratamiento temprano, el desarrollo neuropsíquico de casi todos los niños diagnosticados por el Programa y tratados, sea similar al de otros niños sanos estudiados, y los que han arribado a la edad escolar se encuentren cursando la enseñanza primaria y secundaria normal. El Programa de evaluación y estimulación neuropsíquica ha resultado altamente satisfactorio en la detección y estimulación de las habilidades y destrezas que comúnmente se afectan en el desarrollo psicomotor.

Adicionalmente se presentan los resultados obtenidos en Brasil y México con el empleo del UMELISA TSH Neonatal comercializado por la Tecnología SUMA.

El aporte práctico principal del trabajo de tesis ha sido precisamente la obtención de AcM específicos y de alta afinidad que han posibilitado el desarrollo de técnicas de UMELISA para el diagnóstico precoz del Hipotiroidismo Congénito (HC) y la Fibrosis Quistica (FQ), esta última, no pesquisada en la etapa neonatal en nuestro país. Además estos ensayos constituyen un importante renglón exportable, ya que en un conjunto de países latinoamericanos, la tecnología SUMA y las técnicas de UMELISA han posibilitado la pesquisa neonatal de HC y existe un mercado disponible a partir de legislaciones que establecen la obligatoriedad de la pesquisa de FQ en la etapa neonatal. Todo esto, nos permitirá penetrar en el mercado de estos países y adquirir divisas que contribuyan a soportar los Programas Nacionales establecidos, además de contribuir con el diagnóstico de estas enfermedades en nuestro continente que pueden ser limitantes en el desarrollo normal de los niños.

Partes de la tesis ha sido presentada en diversos eventos científicos nacionales e internacionales así como en el Forum de Ciencia y Técnica a nivel nacional, donde el trabajo de los AcM anti TSH obtuvo mención especial y a nivel de base el trabajo sobre la generalización de los AcM anti TSH resultó relevante. A nivel de base el trabajo de obtención de los AcM anti Tripsina y la purificación por inmunoafinidad de la Tripsina

empleando los AcM resultó relevante en el año 2001, 2002 y 2003. Los resultados de esta tesis han sido publicados en cuatro artículos en la revista Hybridoma and Hybridomics en los años 2000, 2002 y 2003 y cuatro en la revista del CENIC de Ciencias Biológicas en el año 2002 y 2004.

El trabajo de la tesis consta de las siguientes partes: Introducción, Revisión Bibliográfica, Materiales y Métodos, Resultados, Discusión, Conclusiones, Recomendaciones y Referencias Bibliográficas.

Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas
Dirección B M.N
CNICM INFOMED

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1. Enfermedades heredo-metabólicas.

Los "Errores Congénitos del Metabolismo" son trastornos que afectan todas las fases del metabolismo y son heredados como características mendelianas simples las que devienen en una anomalía funcional de una proteína específica. Estas enfermedades se heredan en su mayoría como caracteres autosómicos recesivos, otras se heredan ligadas al cromosoma X

o como caracteres autosómicos dominantes (Marrero, 2001).

Estos trastornos presentan una frecuencia variable de aparición. En algunos casos aparece la predominancia racial o étnica y en otros casos se distribuye de manera uniforme en las diferentes razas y grupos.

La aparición de las manifestaciones clínicas es también variable, apareciendo algunas desde el nacimiento o antes, otras solo en la vida adulta o ni siquiera entonces. Algunos trastornos son mortales, otros son compatibles con una vida de duración normal y en estado normal de salud (Raimann y cols., 1999).

Las enfermedades metabólicas hereditarias en su gran mayoría reflejan una mutación de un gen específico y a partir de su estudio puede ser dilucidada la afectación en cuatro niveles:

1- a nivel del gen.

2- a nivel de la proteína que codifica.

3- a nivel del paso metabólico en el cual la proteína actúa.

4- a nivel del fenotipo clínico o químico.

Entre las más de 300 enfermedades que han sido reconocidas hasta el momento, cerca de 100 pueden ser reveladas en el período neonatal o muy tempranamente en la infancia, estas comprenden el 1% de las admisiones en hospitales pediátricos y se ha calculado una incidencia global de 2.5 por mil recién nacidos. Esta cifra resulta al calcular la totalidad de las enfermedades metabólicas en conjunto, ya que cada una en particular es infrecuente (Raimann y cols., 1999).

Las enfermedades genéticas junto con los defectos de nacimiento son los mayores contribuyentes a las alteraciones en el desarrollo que generan mortalidad y morbilidad en la niñez. En América Latina entre el 10 y el 20% de los niños sufren de alguna enfermedad crónica y dentro de este grupo cerca del 10% sufre de alguna enfermedad crónica severa

que afecta seriamente sus actividades de la vida diaria, siendo el retraso mental una de las discapacidades más graves. La mayoría de estas enfermedades son genéticas o tienen un componente genético (Marrero, 2001).

2.2. Hipotiroidismo Congénito.

El Hipotiroidismo Congénito (HC) es una enfermedad provocada por la deficiencia en la producción de hormonas tiroideas, constituyendo la causa más frecuente de retraso mental evitable en el niño, con una frecuencia aproximada a escala mundial de 1:4 000 recién nacidos. El déficit de hormonas tiroideas en las primeras etapas de la vida, cuando se está llevando a cabo la maduración y el desarrollo del sistema nervioso central (SNC), trae por consecuencia un daño severo, la mayor parte de las veces irreversible, del desarrollo neuropsíquico del niño (Dussault, 1993).

La primera asociación entre el hipotiroidismo y el retardo mental se realizó hace más de 400 años por Paracelsus en 1527 y es Thomas Curling el primero que describe el Hipotiroidismo Esporádico en 1850 (Foley, 1996; Dussault, 1997).

La deficiencia de hormona tiroidea ha sido reconocida hace más de dos siglos como una causa significativa de retardo en el crecimiento y el desarrollo (Fisher, 1986). El síndrome de HC se conoció antes del advenimiento del tamizaje masivo para esta enfermedad. Curling en 1850, describió el primer niño con manifestaciones de HC y la ausencia de la glándula tiroides en la autopsia, mientras que Osler (1870) relacionó la deficiencia de la función tiroidea con cambios característicos encontrados en el hipotiroidismo esporádico. En 1891 Murray demuestra que el extracto de tiroides puede mejorar varios de los hallazgos en el cretinismo, pero no es hasta la década de 1970 que se demuestra convincentemente la importancia del tratamiento temprano de HC para evitar las secuelas neuropsicológicas de esta enfermedad (Foley, 1996; Dussault, 1997).

Bruchy y McCune (1944) describieron el desarrollo mental de niños Hipotiroideos con tratamiento adecuado y esto se amplió por otros investigadores. Diferentes grupos de trabajo demostraron que el tratamiento antes del tercer mes de edad mejora el pronóstico del desarrollo mental en los infantes con HC y demostraron que ocurría un daño cerebral irreversible si el tratamiento no era iniciado antes de los tres meses de vida (Dussault, 1993). Por otra parte Jacobsen y Brandt, describieron que solo un tercio de los niños recién nacidos afectados se diagnosticaron clínicamente antes de la edad crucial debido a la

subjetividad de los signos y síntomas, por lo cual la escasez de los primeros signos y síntomas en infantes con HC entorpecieron el diagnóstico primario y el tratamiento en muchos casos (DussauIt, 1993).

2.2.1. Etiología del Hipotiroidismo Congénito. Aspectos bioquímicos y genéticos.

La casi totalidad de los recién nacidos hipotiroideos no presentan signos clínicos apreciables para ser diagnosticados por examen físico, solo el 5% puede ser identificado y diagnosticado al nacer (La Franchi, 1999). La incidencia a escala mundial de Hipotiroidismo Congénito permanente es aproximadamente 1:4000 (incluyendo los transitorios aproximadamente 1.3000) (Fisher, 1991).

En el Programa Cubano se han evaluado, empleando el UMELISA TSH policlonal, más de dos millones de recién nacidos, con cerca de 700 niños diagnosticados, para una frecuencia de 1: 3201 (Carvajal y cols., 2001). Aproximadamente el 8% de los casos son esporádicos, debido a disgenesia de la glándula tiroides y el resto se debe a factores hereditarios originados por errores en la síntesis de tiroxina o por la presencia de anticuerpos matemos (Macchia y cols., 1999; Gruters y Krude, 1999).

Las causas fundamentales de HC y su etiología se muestran en la tabla 1:

Tabla 1. Etiología e Incidencia de! Hipotiroidismo Congénito.

Etiología	Incidencia
Hipotiroidismo Congénito (total)	1:3000-11:4000
Disgenesia de la tiroides	1:4500
Errores innatos en la síntesis de tiroxina	1:30 000
HC mediado por anticuerpos matemos	1:25 000-1 100 000
Hipotiroidismo hipotalámico-hipofisiario	1:25 000-1 100 000

La disgenesia de la glándula, como causa más común de HC, se caracteriza por ser 3 veces más frecuente en hombres que en mujeres (Carvajal y cols., 2001). Se presenta en el 35- 40% de los casos con ausencia total de la glándula, entre el 30-45% se evidencia una glándula ectópica en cualquier localización, desde la base de la lengua hasta la posición

habitual de la tiroides y en el 5% solamente están presente algunos rudimentos de ésta, y se denomina funcional mente hipoplasia (Devos y cols., 1999; Hernández y cols., 1999).

Los principales avances en la comprensión de estos mecanismos se derivan del descubrimiento de genes que codifican tres factores de transcripción: factor 1 de transcripción tiroidea (TTF-1) (DeVriendt y cols., 1998), factor 2 de transcripción tiroidea (TTF-2) (Zannini y cols., 1997) y el PAX-8 (De Felice y cols., 1998; Fabbro y cols., 1998). Estos factores de transcripción son importantes durante la morfogénesis y diferenciación de la tiroides (Gagne y cols., 1998).

La dishormogénesis de la glándula tiroidea está dada por errores innatos en la síntesis de tiroxina, la que ocurre a nivel de los pasos metabólicos que tienen lugar en la tiroides (Pohlenz y cols., 1998). Además se ha descrito otro defecto que consiste en el error en la síntesis del receptor de la TSH (Porcellini y cols., 1997; Levine y cols, 1995), causado por mutaciones en el gen de la proteína Gsa (proteína unida a guanina).

El HC puede ser consecuencia del Hipotiroidismo Central (hipotalámico-hipofíciario) que se caracteriza por niveles persistentemente bajos de la hormona T4. Las causas fundamentales del Hipotiroidismo Central están dadas por el desarrollo anormal, ya sea del hipotálamo o de la hipófisis, y por la deficiencia aislada en la síntesis de la TSH. Esta última causa se encuentra asociada a la herencia (De Zegher y cols., 1995).

En el caso del Hipotiroidismo Transitorio las causas de su aparición pueden estar asociadas a la administración de drogas anti-tiroideas durante el embarazo o al final del mismo y el empleo de antisépticos yodados en los neonatos (Chun-Po y cols., 1994). El Hipotiroidismo Transitorio es más común en niños prematuros con mayor incidencia en aquellos de menor edad gestacional (Delange y cols., 1984), esta situación se incrementa aun más en las zonas con deficiencia de yodo, ya que el niño prematuro necesita más entrada de yodo a su organismo para mantener un balance positivo de este elemento (Boeber y cols., 1996).

Otro factor que propicia la aparición del HC es la presencia de anticuerpos matemos, los cuales después del paso a través de la placenta provocan el bloqueo de los receptores específicos de la TSH (Inomata y cols., 1999). Esta condición es denominada Enfermedad Autoinmune de la Tiroides (A1TD), la cual puede caracterizarse por la presencia de anticuerpos anti-Tiroglobulina y anti-Tioperoxidasa (Delange y cols., 1983; Sunthornthepvarakul y cols., 1995).

2.2.2. Diagnóstico y Tratamiento.

El diagnóstico del HC en el recién nacido se realiza mediante mediciones de la concentración en sangre de la hormona T4 o de la TSH por técnicas de inmunoensayo. Como marcadores del diagnóstico temprano se emplean la determinación de las hormonas TSH y Tiroxina en suero de cordón (Programa Cubano) o en muestras de sangre seca sobre papel de filtro. En esta tesis abordaremos el empleo de la TSH ya que es el marcador primario del Programa Cubano.

2.2.2.1 Hormona Estimulante de la Tiroides (TSH) o Tirotropina.

La TSH juega un papel importante en la regulación de la actividad de la glándula tiroidea a través del receptor específico de la TSH; el gen que codifica esta proteína de membrana se encuentra localizado en la posición 14q 31 del cromosoma humano (Ahlbom y cols., 1997). En la década del 20 del pasado siglo se descubrió de la actividad estimulante de la tiroides (Magner 1994; Grossmann y cols., 1997) y en la década del 70 se realizó la determinación de la secuencia aminoacídica primaria de las subunidades de la TSH (Pierce, 1981), posteriormente se realizó la clonación de los genes para la subunidad a y p (Hayashizaki y cols., 1985; Wondisford y cols., 1988a; Wondisford y cols., 1988b), así como del gen que codifica para el receptor de la TSH (Parmentier y cols., 1989; Nagayama y cols., 1989; Misrahi y cols., 1990; Libert y cols., 1989).

Otro paso de avance en el conocimiento de la estructura de la TSH ocurrió en el año 1994 con la obtención de la estructura cristalizada de una hormona estructuralmente relacionada, la gonodatropina corionica humana (hCG) (Lapthom y cols., 1994; Wu y cols., 1994), lo que mostró que las hormonas glicoproteicas pertenecen a la superfamilia de los factores de crecimiento cisteínicos (cystine knot growth factors).

La TSH es un heterodímero compuesto por dos subunidades unidas no covalentemente (Grossmann y cols, 1997; Magner, 1994). El peso de la molécula deducido por la secuencia aminoacídica de ambas subunidades es aproximadamente de 28.000 Da y un 15% adicional dado por los carbohidratos. La subunidad a de la TSH es común a las hormonas folículo estimulante (FSH), luteinizante (LH) y gonadotropina corionica humana (hCG) (Grossmann y cols., 1997). La subunidad β le confiere a la molécula la posibilidad de interactuar con el receptor celular de la TSH de forma específica, el cual regula la

formación de la proteína madura (heterodíniero). La subunidad β es inactiva y requiere la unión no covalente con la subunidad α para expresar su bioactividad hormonal.

2.2.3. Terapia y Seguimiento Clínico de niños con Hipotiroidismo Congénito diagnosticados.

La L-tiroxina sintética es el tratamiento de elección para el HC. Es necesario establecer la presencia de la enfermedad y su causa, pues los pacientes con Hipotiroidismo Transitorio pueden requerir solo un corto tiempo de terapia. De esta terapia no se conocen efectos adversos en morbilidad, mortalidad o calidad de vida (Kaplan, 1993).

La respuesta a la terapia de reemplazo con L-tiroxina confirma que la hipótesis de diagnóstico precoz y tratamiento con esta, garantiza un desarrollo normal del niño e incluso coeficientes de inteligencia con valores normales (Buist y cols., 1992; Kaplan, 1993).

2.3. Fibrosis Quistica.

La Fibrosis Quistica (FQ) constituye la enfermedad hereditaria letal más frecuente en la raza blanca, con una incidencia de 1:3.200 recién nacidos (RN) en EUA (Garred y cols., 1999). En nuestro país, si bien no disponemos de datos definitivos, los estudios realizados constatan la existencia de cerca de 300 casos para una incidencia aproximada de 1 cada 4000 y la prevalencia de portadores sanos en la población general de aproximadamente 1:31 (Guerra, 1984).

En 1938 Andersen realizó la primera descripción de la enfermedad, y la llamó Fibrosis Quistica del páncreas (Murray, 1999). La también conocida mucoviscidosis, posteriormente fue identificada como un desorden de las glándulas exocrinas (Murray, 1999).

En la década del 50 del pasado siglo crece notablemente el conocimiento acerca de esta enfermedad con el primer ensayo diagnóstico basado en la determinación de los valores elevados de sales en el sudor (Di Santi'Agnese y cols, 1953). Tres décadas después fue descrito el defecto bioquímico básico dado por el canal de cloro situado en la membrana apical dependiente de adenil monofosfato ciclasa, (AMP cíclico). En 1989 fue demostrado a escala molecular la composición de este desorden a través del descubrimiento del gen que codifica para la proteína reguladora de transmembrana de la Fibrosis Quistica (CFTR) y las mutaciones más frecuentes (Karem y cols., 1989)

2.3.1. Etiología de la Fibrosis Quistica. Aspectos bioquímicos y genéticos.

La FQ es una enfermedad que en la mayoría de los casos se manifiesta en la infancia, con síntomas respiratorios y gastrointestinales, ya que la acumulación de secreciones a nivel de bronquiolos condiciona infecciones secundarias (Rainisio y cols., 2000) y producto del aumento del tejido conjuntivo (fibroso) y del tejido adiposo a nivel del páncreas, se produce atrofia de los acinos pancreáticos (Serra-Prat, 2000).

Las manifestaciones clínicas más frecuentes de la FQ suelen aparecer durante las primeras 48 horas de nacido; destacándose el el íleo meconial, que es la obstrucción del intestino delgado por un meconio viscoso (aproximadamente el 15% de todos los niños con FQ presentan íleo meconial al nacimiento), insuficiencia pancreática, impacto intestinal (equivalente al íleo meconial), prolapso rectal, retraso del crecimiento e intolerancia a la glucosa. Entre los signos clínicos menos frecuentes (entre el 2 y el 10% de los pacientes) tenemos la cirrosis hepática, hipertensión portal (várices esofágicas), diabetes clínica, deficiencia vitamínica (A, E, K), deficiencia de lactosa (Wilfond y cols., 1994). Menos del 2% de los pacientes suele presentar hipoproteinemia con edema (Cuasiorcor agudo) (Lai y cols., 1997), invaginación intestinal, pancreatitis aguda recurrente, calcificación del páncreas, úlcera duodenal, colelitiasis, colecistitis y neumatosis intestinal.

Otras manifestaciones clínicas de la FQ son la enfermedad pulmonar obstructiva crónica severa, puede notarse la repetición de episodios rino-bronquiales y de bronquitis (Wang y cols., 2000), azoospermia obstructiva por anomalías anatómicas del tracto urogenital en casi todos los varones (Chillón y cols., 1995; Mak y cols., 1999), altas concentraciones de iones Na+ y Cl- en el sudor (Denning y cols., 1980), asi como niveles elevados de tripsina en sangre de recién nacidos (Vázquez, 1999; Landeira, 2002).

La enfermedad es causada por mutaciones en el gen que codifica para la proteína reguladora de la conductancia transmembrana de la FQ, que funciona como un canal de CT ubicado en la membrana apical de diferentes tejidos. Este canal iónico presenta 12 dominios de transmembrana, 2 dominios de unión a nucleótidos y 1 dominio R con función reguladora de la conductancia iónica (Welsh y Smith, 1993; Stutts y cols., 1995; Davis y cols., 1996; Posadas, 2002).

En 1953 se observó que el sudor de los pacientes fibroquísticos contenía niveles elevados de electrolitos (Perera y cols, 1953) Recientemente varios investigadores han demostrado

que los pacientes fibroquísticos presentan una conductancia anormal de iones CI- dentro y fuera de las células (Schulz, 1969; Quinton y Bijman, 1983). Normalmente las secreciones isotónicas viajan desde los acinos de las glándulas sudoríparas hacia la superficie de la piel y las células epiteliales reabsorben el cloruro de sodio (NaCl), lo que resulta en un sudor hipotónico (con bajas concentraciones de sales), sin embargo los conductos sudoríparos de los pacientes con FQ son impermeables al Cl- por lo tanto el NaCl permanece en las secreciones y el sudor es salado (Guggino, 1999; Lyczac y cols., 2002).

En pacientes con FQ, las glándulas mucosas del sistema respiratorio producen grandes cantidades de secreciones espesas que se adhieren a las vías respiratorias y bloquean los bronquiolos. Esto condiciona la entrada de microorganismos infecciosos tales como: Staphilococcus aureus y Pseudomona aeruginosa (Salcedo, 1999; Wine, 1999; None y cols., 2000), que debilitan el movimiento de mucus por el epitelio ciliar, lo que conlleva a la obstrucción e infección de las vías respiratorias, convirtiéndose en un ciclo (Abreu y Dodge, 1996; Bronsveld y cols, 1999).

Los niños con FQ tienen pulmones normales al nacer (Chow y Landau. 1982; Hausler y cols., 1999), pero pueden presentar infecciones persistentes en las vías aéreas a los pocos días de nacidos (Khan y cols., 1995; Nixon y cols., 2002), causando hiperinflación, obstrucción e inflamación de las vías respiratorias a partir del primer año de vida (Gappa y cols., 2001; Rarganathan y cols., 2001).

De las enzimas pancreáticas, potencialmente utilizadas como marcadores de disfunciones pancreáticas, sólo la tripsina es producida en el páncreas, por lo que el análisis de los niveles de Tripsina Inmunoreactiva (TIR) en sangre constituye un indicador específico de la función pancreática (Rock y cols., 1990; Waters y cols., 1990).

En las fases iniciales de la enfermedad en los pacientes con FQ, se detectan concentraciones séricas de tripsina anormalmente elevadas debido a la obstrucción de los conductos pancreáticos, lo que provoca el reflujo de la reserva funcional acinar al torrente circulatorio (Crossley y cols., 1979) como consecuencia de la autodigestión pancreática secundario a la previa acumulación de la tripsina en el páncreas (Abreu y Dodge, 1996).

Se ha observado una mayor correlación entre el fenotipo y el genotipo en relación con la suficiencia pancreática Las mutaciones más frecuentes se diferencian en suficientes pancreáticas o insuficientes pancreáticas.

2.3.2. Diagnóstico y tratamiento.

Existe el consenso de que el diagnóstico de la FQ se debe basar fundamentalmente en la presencia de uno o más rasgos fenotípicos presentes en la FQ como: enfermedad pulmonar obstructiva crónica severa, enfermedad sinusal crónica, anormalidades gastrointestinales o nutricionales, azoospermia obstructiva en varones (Mak y cols., 1999), síndrome de pérdida de sales, FQ en familiares de primer grado y un ensayo de pesquisa neonatal positivo como resultado de niveles elevados de la Tripsina Inmunoreactiva Humana (TIR) (Larsen y cols., 1994; Stern, 1997; Rosemstein y Curting, 1998).

Son necesarias además para la confirmación del diagnóstico pruebas de laboratorio que indiquen disfunción del CFTR documentadas por una concentración de iones Cl- elevada en el sudor (prueba de sudor positiva, alteraciones características en el transporte iónico a través del epitelio nasal; diferencia de potencial nasal transepitelial anormal) (Knowles y cols., 1995) y mutaciones causantes de la enfermedad en ambas copias del gen CFTR (Larsen y cols., 1994; Segal, 1999).

Para llegar al diagnóstico de la FQ se emplean diferentes pruebas de laboratorio: Prueba del sudor, para determinar las concentraciones de iones Cl' y Na en el sudor (Birnkrant y Stern, 1991; Callen y cols., 2000); pruebas genéticas para determinar la presencia de alguna mutación del gen CFTR (Dork y cols., 1991); análisis de semen en adultos para determinar azoospermia obstructiva, lo que se debe confirmar con una biopsia testicular (Handelsman y cols., 1984; Mak y cols., 1999); prueba de la función pancreática exocrina (Nousia- Arvanitakis y cols., 1978; Blyte y Farrel, 1984); medición de la diferencia de potencial nasal (Knowles y cols., 1995). Estas pruebas deben combinarse para obtener un diagnóstico preciso sobre la presencia de la enfermedad.

La combinación de ensayos para la determinación cuantitativa de la Tripsina Inmunoreactiva humana y la detección de las mutaciones más frecuentes (TIR/ADN), han demostrado su alta sensibilidad debido al amplio rango de mutaciones conocidas para la proteína CFTR y han sido designados como los ensayos más efectivos para implementar en los programas de pesquisa neonatal, por la Conferencia Internacional de Pesquisaje Neonatal de FQ (Seltzer y cols., 1991; Corbeta y cols., 2002).

2.3.2.1. Tripsinógenos.

Los Tripsinógenos fueron de las primeras enzimas aisladas y caracterizadas, además han sido empleadas como modelo de estructura de proteína y su función. El Tripsinógeno se cristalizó del páncreas bovino por Kunitz y Northrop en 1936, y en el jugo pancreático humano por Haverback y cols., en I960 y fue parcialmente purificado de los extractos de páncreas humano por Buck y cols., en 1962.

La tripsina en sintetizada y secretada por las células acinares del páncreas exocrino en forma de su precursor, tripsinógeno. Se han estudiado dos isoformas del tripsinógeno, las cuales son convertidas en tripsina activa por acción de la enteroquinasa duodenal, que en presencia de iones calcio (Ca^{2+}) la cual remueve el hexapéptido valina-(aspártico)$_4$-lisina del tripsinógeno, liberando la forma activa de tripsina.

El jugo pancreático humano contiene tres isoenzimas del Tripsinógeno que difieren en el punto isoeléctrico (pI) (Guy cols., 1978).

2.3.2.2. Expresión de los Tripsinógenos.

Tripsinógeno-1 y -2 representan aproximadamente el 19% de la proteína total en el jugo pancreático y el Tripsinógeno-1 está dos veces más concentrado que el Tripsinógeno-2 (Figarella y cols., 1969; Guy y cols., 1978). La isoenzima minoritaria, el Tripsinógeno-3, se encuentra en muy bajas concentraciones y representa menos del 0.5% de las proteínas de las secreciones normales del páncreas humano normal (Rinderknecht y cols., 1984). En el suero de los individuos sanos las concentraciones medias del Tripsinógeno-1 y -2 son de 15 a 26 µg/L y 5.5 µg/L respectivamente (Borgström y Ohlsson, 1976; Geokas y cols., 1979; Florholmen y cols., 1984)

Las Tripsinas fueron encontradas por primera vez fuera del tracto gastrointestinal por Stenman y colaboradores (Stenman y cols., 1988) en quistes de tumores ováricos donde las concentraciones son mayores que 2600 µg /L (Koivunen y cols., 1990). En pacientes pancreatomisados es posible detectar bajas concentraciones de las isoenzimas tripsinógeno- 1 y -2 con los valores de pl similares a los tripsinógenos pancreáticos, lo cual indica que los Tripsinógenos en el suero no sólo son de origen pancreático (Itkonen y cols., 1996, Fujimura T, y cols., 1998).

La forma mayoritaria circulante en el torrente sanguíneo es el tripsinógeno, la tripsina en el suero humano se encuentra asociada a alguno de los inhibidores séricos que reconocen esta proteína. Un 50% de la tripsina circulante se asocia con la α-2 macroglobulina (A2M). Otra gran parte de la tripsina interacciona con la α-antitripsina formando un complejo. Sólo se mantiene libre un pequeño porcentaje de la tripsina total. La determinación de tripsinógeno y tripsina tiene un impacto importante en la detección, diagnóstico y tratamiento de la FQ (Crossley y cols., 1979). Los ensayos que cuantifican la presencia de tripsinógeno se basan en el reconocimiento de las moléculas ya estén libres o asociadas a sus inhibidores (Crossley y cols., 1979).

La presencia del tripsinógeno en el suero humano en cantidades por encima de 70 ng/mL se interpreta como indicativo de FQ, aunque puede estar relacionada con causas tan diversas como: (a) hipertripsinemia transitoria, (b) distres respiratorio, (c) taquipnea neonatal transitoria, (d) aspiración de meconio, (e) bajo adgar en el 1er y 5to minutos de nacido por asfixia; todas presentan un nivel de tripsina dos veces mayor que la de los neonatos aparentemente normales (Pollit, 1998).

2.3.2.3. Tratamiento.

La atención de los pacientes con FQ debe ser abordada por un equipo multidisciplinario y estar dirigida a evitar complicaciones y mejorar su calidad de vida. El tratamiento actual pone énfasis en dos cuestiones: mejorar el estado nutricional del paciente y actuar enérgicamente con antibióticos adecuados cuando aparecen las primeras infecciones respiratorias con *Staphylococcus aureus* y *Psetidomonas sp.* (Brinson y cols., 1998; Salcedo, 1999; Skov y cols., 2000; Boyle y cols., 2001; Vlahakis y Aksamit, 2001).

Como tratamiento nutricional se incluyen enzimas pancreáticas que sustituyen las que el páncreas no puede enviar al intestino debido a la obstrucción de sus conductos, se requiere la supresión ácida y el suministro de complementos de vitaminas A, D, E y K. El íleo meconial es tratado con enemas hiperosmolares en el 50% de los recién nacidos, el resto de los casos requiere cirugía (Segal, 1999). Las lesiones hepáticas pueden retrasarse e incluso, revertirse, con el uso de ácido ursodeoxicólico En general, se recomienda a los pacientes el consumo de dietas hipercalóricas, libres de sal (Abreu y Dodge, 1996; Steinkamp y cols., 2001).

Otras propuestas de tratamiento, un más avanzadas, son la terapia génica, en la cual el ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) para el gen CFTR, que ya ha sido clonado (Elton y Geddes, 1995) se introduce en las células epiteliales afectadas, corrigiendo el defecto del canal de Cf en aproximadamente un 10% de las células respiratorias (Drumm y cols., 1993), aunque con una baja eficiencia debido a las respuestas inflamatorias sistémicas que ocurren (Crystal y cols., 1994; Slattery y cols., 2001). También se ha propuesto la modulación farmacológica del transporte iónico, ya que el defecto fisiológico asociado con el producto anormal del gen CFTR es la combinación de una defectuosa secreción de Cl' (Riordan, 1993) y una excesiva absorción de Na^{2+}, lo que promueve una absorción pasiva de agua desde el lumen y por tanto, la inhibición de la absorción de Na con un antagonista como la amilorida mejora la condición del paciente (Boucher, 1992). La activación de canales alternativos de Cl' con nucléotidos trifosfato (Sprague K y cols., 2000) puede contribuir a mantener las concentraciones efectivas de ambos electrolitos en la superficie apical de las células (Prados C y cols., 2000).

2.4. Anticuerpos en el desarrollo de los ensayos inniunoenzimáticos.

Los orígenes de los inmunoensayos se encuentran estrechamente vinculados en primera instancia al descubrimiento de los anticuerpos a finales del siglo XIX, asi como al primer mareaje exitoso realizado a inicios de los años 30 del pasado siglo y las referencias del mareaje fluorescente de anticuerpos para la técnica de inmunofluorescencia. Sin embargo, sólo mediante el desarrollo ulterior de la inmunoquímica, la química de las proteínas y la enzimología es que se consigue llegar a la etapa actual de desarrollo (Fernández y cols, 2002).

El primer avance alcanzado por los inmunoensayos fue el desarrollo de ensayos competitivos empleando isótopos radiactivos y posteriormente los ensayos inmunoenzimáticos (Engvall E, y Perlman P, 1971). Estos resultados trazaron las pautas para la expansión en el uso de estas tecnologías y particularmente en las investigaciones de biomoléculas y la química clínica.

En la primera etapa del desarrollo de los ensayos inmunoenzimáticos se empleaban anticuerpos policlonales obtenidos a partir de conejos inmunizados, los que presentaban buena respuesta inmune contra los diferentes inmunógenos aunque se observaban dificultades con relación al nivel de la respuesta con algunas preparaciones de antígenos.

Un cambio radical se produjo con el desarrollo de los anticuerpos monoclonales (AcM) descrito por Kohler y Milstein en 1975, esta tecnología permite la obtención de AcM murinos, los que además de ser altamente específicos poseen dos atributos que han contribuido al éxito de los mismos como reactivos analíticos. En primer lugar, son sustancias químicamente bien definidas, su naturaleza y estructura son bien conocidas y esto permite la formulación de preparaciones estables y además facilita considerablemente los procedimientos para su conjugación a trazadores tales como sustancias fluorescentes, enzimas, radioisótopos, oro coloidal, moléculas electrón-densas (ferritina), biotina, etc. En segundo lugar, son reactivos susceptibles de ser preparados en forma pura, en condiciones muy controladas y en grandes cantidades.

En lo concerniente a aplicaciones biomédicas, los AcM han desplazado de muchas aplicaciones a los anticuerpos policlonales, han permitido el desarrollo y avance de numerosas y nuevas pruebas diagnósticas y son en la actualidad los reactivos de elección para aplicaciones analíticas. En las últimas décadas se ha experimentado un incremento notable en la especificidad de las técnicas de inmunoensayo que emplean anticuerpos. Esto se puede constatar en la gran variedad de ensayos desarrollados con diferentes principios ya sean competitivos o no competitivos, dependiendo del número de epítopos disponibles para ser detectados por los anticuerpos. Otro paso importante fue el empleo de los anticuerpos unidos a un soporte sólido capturando antígenos y cuantificándolos a través del empleo de otro anticuerpo (que reconoce otro epitopo del antígeno) marcado (Wide, 1971; Macolini y Masseyeff, 1975).

En la década del 90 se impulsó además la automatización, la cual repercutió en la reducción del tiempo de los ensayos sin comprometer la sensibilidad de los mismos, como son ensayos para el , diagnóstico temprano de embarazo (Baluja y cols., 2000, Baluja, y cols, 2002), proteínas asociadas a ciertos tipos de cáncer como el PSA (ANN ARBOR, MI, 2002) y el CEA (Gunther y cols., 2002), o proteínas indicadoras de infecciones por virus como Hepatitis B (Acosta y cols., 2000a) y para el desarrollo de técnicas de cuantificación de TSH (hormona estimulante de la tiroides) en el pesquisaje del HC. En la actualidad los ensayos para la detección y/o cuantificación de estas moléculas utilizan AcM y en su mayoría son inmunoensayos en los que una enzima (ELISA), un radioisótopo (RIA) o un colorante (“dipstick”) sirven como medio de detección.

Se pueden producir anticuerpos contra cualquier componente biológico, como las proteínas, lípidos, carbohidratos o ácidos nucleicos. También se han producido anticuerpos específicos a proteínas desnaturalizadas, empleado agentes desnaturalizantes y empleando proteínas sintéticas y recombinantes (Acosta y cols., 2000a; Acosta y cols., 2000b; Acosta y cols., 2000c).

En la pasada década se incrementó el uso del concepto de afinidad de un anticuerpo por su ligando en el análisis de los fenómenos inmunológicos. Aparejado a esto se analizaron los factores que influyen en la afinidad de los anticuerpos, particularmente la diversidad, la regulación de la respuesta humoral, la multivalencia y otras propiedades relacionadas (Glaser y cols 1993; Morton y cols., 1995; Nieba y cols., 1996).

Las fuerzas que estabilizan esta unión son no covalentes y están determinadas por la naturaleza química de la solución reguladora empleada. Entre las fuerzas que estabilizan esta unión se encuentran: uniones electrostáticas, puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals y fuerzas de dispersión de London (Glaser y col 1993; Morton y cols., 1995).

La determinación de la constante de afinidad (Kaf) se puede realizar por diferentes métodos que incluyen el equilibrio de diálisis, la electroforesis capilar y la emisión de “quenching" de fluorescencia; y más recientemente los ensayos inmunoenzimáticos, la resonancia y los biosensores ópticos (Englebienne, 1998; Chiem y Harrison, 1998; Ricoux y cols., 2000, Novo y cols., 2001).

La ley de acción de masas provee las bases para el cálculo de la Kaf de un anticuerpo en ensayos en fase sólida, y un gran número de ecuaciones matemáticas se han desarrollado para facilitar los cálculos experimentales de la Kaf en la interacción antigeno-anticuerpo. Las más empleadas son las descritas por Scatchard (1949) y Erp y colaboradores (1991).

En 1987 Beatty y colaboradores desarrollaron un método para la determinación de la Kaf empleando un ensayo inmunoenzimático no competitivo, basado en la concentración de anticuerpo que corresponde al 50% de la densidad optica en las curvas sigmoides que son obtenidas en el inmunoensayo.

2.4.1. Anticuerpos monoclonales para inmunopurificación por afinidad.

Una de las formas de disponer de las proteínas indispensables para la preparación de los calibradores y controles para los ensayos inmunoenzimáticos han sido a través de la purificación por inmunoafinidad. La inmunoafinidad es una de las técnicas más poderosas

en la purificación de proteínas. Los ligandos inmovilizados pueden ser tanto antígenos como anticuerpos. Estos pueden ser empleados para la purificación de proteínas solubles y péptidos, proteínas de membranas solubilizadas, virus y hasta células intactas. Tradicionalmente se empleaban anticuerpos policlonales y estos fueron remplazados por AcM. A través del empleo de métodos de pesquisaje apropiados es posible obtener hibridomas raros, productores de anticuerpos de elevada especificidad y afinidad, útiles para su empleo en la purificación de antígeno.

En la purificación por inmunoafinidad el empleo de AcM presenta una serie de ventajas. Una de estas es la posibilidad de realizar la purificación en una sola etapa cuando se emplean AcM de moderada a alta afinidad (K_{af} 10^{-6} a 10^{-9} L/moles) preservando la integridad estructural del antígeno con una recuperación mayor al 90% e incrementando el tiempo de vida del inmunadsorbente pudiendo llegar hasta cientos de ciclos. La elución de los antígenos normalmente ocurre en un rango de pH (pH 2 ó 3) y la capacidad de unión es por lo menos 10 veces mayor cuando se emplean AcM, que si se utilizan anticuerpos policlonales.

En principio, los AcM son sin lugar a duda una garantía en la constancia de su producción, homogeneidad, lo que conlleva a una gran reproducibilidad de lote a lote de inmunoadsorbente.

Los AcM pueden ser unidos covalentemente a diferentes matrices, empleado variedades de métodos de acoplamiento. Es recomendado el empleo de agarosa al 4% y el método de bromuro de cianógeno. El empleo de AcM en la purificación por inmunoafinidad es ampliamente discutido por Goding (Goding, 1986).

Chase y colaboradores demostraron que existe una relación lineal entre la capacidad de unión del inmunoadsorbente y por lo tanto del anticuerpo inmovilizado (Chase, 1984). La habilidad de un inmunadsorbente de unir bajas concentraciones de antígeno depende de la constante de disociación. No se observan cambios en la constante de disociación a bajas concentraciones de anticuerpos; por el contrario; las propiedades cinéticas mejoran. De esto se infiere que los experimentos de inmunoadsorción deben realizarse en corridas a altos flujos.

2.4.2. Adsorción de Anticuerpos.

La unión de antígenos o anticuerpos a un soporte sólido puede hacerse de forma covalente o por adsorción no-covalente (Voller y cols., 1979; Oellerich, 1984; Fayol y Ville, 1991; Tijssen, 1993; Harlow, y cols., 1998; Guttormsen y Kasper, 2001; Ochoa, 1998; Ochoa y col 2000).

En los ELISA es extremadamente importante el paso de sensibilización de la fase sólida. En estos ensayos hay una proporcionalidad entre el número de moléculas inmovilizadas en la primera capa sobre la matriz sólida y las que reaccionan en la segunda capa, esta proporcionalidad continúa en capas ulteriores y es responsable de la sensibilidad del ensayo (Voller y cols., 1979; Lovborg, 1984; Esser, 1988; Tijssen, 1993; Harlow y cols., 1998; Ochoa y cols., 2000; Steinitz y Baraz, 2000). Además es vital que la orientación de las moléculas inmovilizadas sea la correcta; por ejemplo, los anticuerpos deben unirse por el fragmento constante del anticuerpo (Fe) para permitir una interacción adecuada con el antígeno.

La adsorción de las biomoléculas depende principalmente de las débiles pero numerosas fuerzas de atracción intermoleculares, basadas en polaridades eléctricas intramoleculares; alternativas y estacionarias, mediadas principalmente en el primer caso por grupos hidrofóbicos y en el segundo por grupos hidrofilicos (Lovborg, 1984, Ochoa y cols., 2000, Tijssen, 1993; Steinitz y Baraz., 2000; Labsystems Research Centre, 1998; Suzuki y cols., 1997).

Aunque existe un gran número de materiales (cloruro de polivinilo, polipropileno, acrílico, nitrocelulosa, entre otros) el poliestireno es el más usado por su excelente cualidad óptica, por facilitar enlaces estables y su dureza mecánica (Lovborg, 1984, Ochoa y cols., 2000, Tijssen, 1993; Steinitz y Baraz, 2000; Labsystems Research Centre, 1998; Suzuki y cols., 1997). Las microplacas de poliestireno pueden ser estándares o de alta captación. Estas últimas además de los grupos hidrofóbicos característicos de este material, tienen una fina red de grupos hidrofilicos capaces de establecer puentes de hidrógeno. La alta energía requerida para la introducción de átomos de oxígeno, nitrógeno u otros grupos polares al poliestireno puede ser producida por irradiación gamma o beta. Esta modificación produce una superficie con excelentes propiedades para la captación de moléculas hidrofilicas (Harlow y cols., 1998; Ochoa y cols., 2000, Steinitz y Baraz 2000).

La inmovilización del material biológico a emplear depende principalmente de las características de soporte sólido, propiedades de la biomolécula, la concentración de la biomolécula, el tiempo y la temperatura del proceso en el recubrimiento, el empleo de soluciones reguladoras de pH

La concentración óptima de recubrimiento a una temperatura, tiempo y solución reguladora de pH definidos, habitualmente se determina cuando el punto de mayor del concentración de la curva estándar para el analito de empleado para este fin, se alcance en el ensayo la mayor señal de fluorescencia, generalmente mantenida a concentraciones superiores ("meseta") (Harlow y cols., 1998; Ochoa y cols., 2000, Steinitz y Baraz, 2000). En la práctica se prefiere recubrir a un ligero exceso de material biológico, siempre y cuando se cumplan las condiciones anteriores. Los posibles espacios libres se bloquean con moléculas que no interfieran con el inmunoensayo enzimático, como la albúmina sérica bovina, gelatina, leche descremada, caseína, sueros de diferentes especies animales y el tween 20 que además de ser un efectivo detergente es un verdadero agente bloqueador (Lovborg, 1984; Tijssen, 1993; Steinitz y Baraz, 2000; Labsystems Research Centre, 1998; Suzuki y cols., 1997; Ochoa y cols., 2000).

2.4.3. Mareaje de anticuerpos y sistema de detección.

Desde los años 1930s se han realizado estudios para la evaluación de la capacidad de los anticuerpos de mantener sus fúnciones inmunológicas después de la manipulación. Se han aplicado anticuerpos marcados con enzimas, sustancias quimioluminiscentes sustancias fluorescentes para la detección de diferentes antígenos (Reiner, 1930; Bronfenbrenner, 1930; Marrack, 1934; Eagle, 1936; Coons, 1971).

La utilización de antígenos y anticuerpos marcados con diferentes sustancias posibilitó el desarrollo de inmunoensayos ultrasensibles, que son capaces de detectar sustancias en el orden de los pocos nanogramos por mililitro y a veces menos. Las técnicas ultrasensibles pueden en general agruparse de acuerdo a la naturaleza del marcador empleado. Aunque la literatura recoge un número importante de sustancias de diferentes naturaleza empleadas como marcadores de antígenos y anticuerpos, realmente solo un grupo de ellas han devenido en métodos de inmunoensayo de gran aplicación. Dentro de los marcadores mas utilizados podemos señalar los siguientes:

■ Radioisótopos

- Enzimas
- Iones lantánidos
- Sustancias fluorescentes
- Sustancias quimioluminiscentes

La utilización de enzimas como marcadores de antigenos, haptenos y anticuerpos con propositos de inmunoensayos cuantitativos, se describió por primera vez de manera independiente y casi simultánea por dos grupos de trabajo: (Engvall y Perlmann, 1971 y Van Weemen y Schuurs, 1971) apoyados en los trabajos realizados por Nakane y Pierce en 1966 y por Catt y Tregear en 1967 marcando anticuerpos con enzimas para estudios histológicos.

Se han presentado varios métodos para la unión de enzimas a los anticuerpos (Campbell y Bhatnagar, 1976; SufTin y cols., 1979; Johnson, y cols., 1980). La mayoría de éstos usan reactivos que forman uniones covalentes entre la enzima y el anticuerpo. El método del glutaraldehído, introducido por Avrameas, ha sido el de mayor aceptación (Avrameas y Ternynck, 1969; Avrameas, 1969a). El glutaraldehído produce los complejos de la enzima- proteína con la preservación parcial de actividades enzimáticas e inmunológicas.

En 1979, se introdujo el uso de interacción avidina-biotina en las técnicas inmunoenzimáticas (Guesdon y cols., 1979). La avidina es un glicoproteina (68 kDa) y la biotina es una vitamina soluble en agua de pequeño tamaño (244 Da); existe una afinidad excepcionalmente fuerte entre estas moléculas (constante disociación 10^{15} moles) lo cual se explota en las técnicas inmunoenzimáticas (Bayer y cols., 1979; Hsu y Raine, 1983). La aplicación en los ELISA de este método de amplificación depende del anticuerpo biotinilado (Bayer y cols., 1979), del anticuerpo primario específico o el anticuerpo secundario marcado y de la enzima biotinilada o el conjugado avidina - enzima. No se ha observado ninguna disminución en la capacidad de reconocimiento antigeno - anticuerpo marcado con biotina, comparándolos con los anticuerpos sin marcar (Guesdon y cols., 1979; Hsu y Raine, 1983; Hsu, 1990). La avidina tiene un punto isoeléctrico alto de aproximadamente 10 y a pH neutro cambia positivamente. Por consiguiente, puede unirse de forma inespecífica a las estructuras cargadas negativamente como el núcleo. Otra desventaja es que la avidina es un glicoproteina y reacciona con moléculas como las lectinas a través de los carbohidratos.

La introducción y sustitución de la avidina por la estreptavidina ha superado las desventajas del sistema de detección de avidina-biotina. (Buckland, 1986). La estreptavidina es una proteina (60kDa) y al igual que avidina presenta una afinidad alta por la biotina. La estreptavidina tiene un punto isoeléctrico cerca del pH neutro y por consiguiente posee sólo unos pocos grupos que pueden reaccionar a pH neutro. Además la estreptavidina no es un glicoproteina y por consiguiente no se une a las lectinas. Una tercera desventaja, tanto de la avidina como la estreptavidina, es la unión a biotina endógena (Hsu, y Raine, 1990) problema que puede superarse bloqueando el sitio de unión.

2.4.4. Inmunoensayos para el Hipotiroidismo congénito y la Fibrosis Quistica.

Los inmunoensayos son ampliamente usados en los laboratorios clínicos ya que son los más eficientes y seguros de los métodos analíticos disponibles. En la década pasada se perfeccionaron nuevos sistemas y reactivos para inmunoensayos. La mayor tendencia ha sido alejarse de los ensayos en fase líquida que involucran marcadores radioisotópicos y en su lugar se han desarrollado ensayos homogéneos rápidos o de fase sólida que resultan de fácil operación en cualquier lugar, semiautomatizados o automatizados, ensayos precisos, confiables y capaces de medir los analitos de interés en el orden de pico o atomoles. (Voller y cols., 1981).

Los ensayos diseñados para la cuantificación de TSH y Tripsina se basan en el principio de doble anticuerpo o “sandwich” en el cual el analito reacciona con un exceso de anticuerpo unido a la fase sólida. El segundo anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal conjugado con una enzima, radioisótopos o con moléculas que tienen alta actividad de emisión de luz (Crossly y cols., 1979).

En el campo del diagnóstico durante muchos años se emplearon antisueros policlonales obtenidos por métodos convencionales a partir de la sangre de animales inmunizados. Estos antisueros aún cuando estén dirigidos contra un mismo antígeno, en muchos casos no poseen la suficiente especificidad y sensibilidad que requieren los ensayos modernos y además su carácter agotable hace difícil la repetibilidad necesaria para muchas de sus posibles aplicaciones diagnósticas (Davis y Rao, 1984). También presentan reactividades cruzadas imposibles de resolver cuando alguno de los determinantes relevantes del antigeno posee una alta homología estructural con los de otro antigeno.

Los problemas de falta de homogeneidad y reproducibilidad de los antisueros convencionales han sido resueltos mediante preparaciones estables y reproducibles de AcM, con especificidad, afinidad y clase conocidas, capaces de producirse de manera continua y controlada para garantizar su disponibilidad permanente.

Los AcM no pueden reproducir enteramente el comportamiento observado con las preparaciones policlonales y pueden tener un funcionamiento distinto en ensayos inmunológicos de diferentes tipos dependiendo de las características de la interacción del par AcM-epítopo y de las alteraciones en la afinidad que pueden producirse cuando los anticuerpos se unen a matrices o fases sólidas (Zenke y cols., 1991). La solución de estos problemas es la combinación controlada de diferentes AcM contra un antígeno, hasta lograr una preparación que posea las propiedades requeridas. El uso de mezclas de anticuerpos monoclonales puede incrementar la sensibilidad de un ensayo hasta hacerlo comparable con el ensayo biológico más sensible (Fazekas de StG y Scheidegger, 1980). Por todas estas razones los anticuerpos monoclonales se han convertido en un elemento importante del mercado biotecnologico actual.

2.4.4.1. Inmunoensayos para el diagnóstico del Hipotiroidismo Congénito.

Hasta la década del 79 y principios del 80 los radioinmunoensayos fueron los métodos más usados para la determinación de TSH en el pesquisaje neonatal de HC. Sin embargo los problemas asociados con los métodos radioisotópicos condujeron al desarrollo de nuevas metodologías que usan enzimas o sustancias fluorescentes como marcadores (Engvall y Perlman, 1971; Woodhead y Weeks, 1991). Las nuevas técnicas de ensayos para cuantificar TSH, tales como ensayos quimioluminiscentes, inmunoensayos fluorimétricos de tipo ELISA son más ventajosos ya que tienen buena sensibilidad y no usan marcadores radioactivos (Camargo, 1991).

Las pruebas quimioluminiscentes son las menos utilizadas en el diagnóstico de HC. En estos ensayos una reacción química, proporciona la energía necesaria para inducir la emisión de luz en una molécula y se utiliza generalmente una sustancia llamada luminol o éster de acridinio como marcador, lo cual le proporciona buena sensibilidad a los mismos (Hemmila y cols, 1984; Torresani y Sherz, 1986a).

La metodología de la fluorescencia resuelta en el tiempo o fluoroinmunometría de resolución, conocidos como ensayos DELFIA (Dissociation Enhancement lanthanide

Fluoro **Immuno** Assay) (Torresani y cols., 1986b), utiliza iones lantánidos como el europio, samario y el terbio, que forman quelatos muy estables donde el tiempo de caída de la fluorescencia es muy largo, lo cual permite un incremento considerable de la sensibilidad. Esta es una de las pruebas más utilizadas para el pesquisaje neonatal de HC.

Otros ensayos que son ampliamente utilizados para este propósito son los inmunoensayos enzimáticos, en los cuales la detección del compuesto a determinar se realiza al evaluar los cambios de concentración en el producto de una reacción enzimática. Los ensayos inmunoenzimáticos heterogéneos utilizan un soporte sólido en el cual se fija uno de los componentes de la reacción (Volbracht y cols., 1987) y es necesario la realización de lavados intermedios para separar los componentes que han reaccionado con la sustancia fijada en el soporte, de los que no lo han hecho, sin que se modifique la actividad de la enzima utilizada en el sistema. Son ensayos muy sensibles y específicos. Dentro de estos se pueden citar los enzimoinmunoensayos (EIA), en los cuales el producto de la reacción provoca un cambio de color que puede medirse en un espectrofotómetro (Tuuminen y cols , 1991). También se emplean los inmunoensayos enzimáticos fluorescentes, que utilizan sustratos fluorigénicos y la fluorescencia obtenida por la reacción enzimática se mide en un fluorímetro. Otros ensayos con este mismo principio cuya fase sólida son discos de papel de filtro con fibras de vidrio, entre los que se encuentran los del sistema Stratus, son muy poco utilizados para el pesquisaje ya que son muy costosos (Rugg y cols., 1988; Castiñeiras y cols., 1991).

Una variante de los inmunoensayos enzimáticos fluorescentes son los LJMELISA (Fernández y cols., 1991), cuya fase sólida son tiras de ultramicroELISA que usan sólo 10 fiL como volumen de reacción, lo cual los hace muy económicos y particularmente ideales para el pesquisaje.

En la actualidad los métodos diseñados para medir niveles de TSH en el diagnóstico neonatal de HC, generalmente utilizan anticuerpos monoclonales o mezclas de ellos, bien en el recubrimiento de la fase sólida o acoplados al marcador. Algunas de las firmas comerciales que ofertan estuches para el pesquisaje de HC en recién nacidos como la FUJIREBIO INC, DELFIA y Labsystems utilizan un sistema de doble anticuerpo, con lo cual han logrado incrementar la sensibilidad y especificidad de estos ensayos (Torresani y Sherz, 1986a; Torresani y cols., 1986b, Tuuminen y cols., 1991).

Se ha cuantificado TSH, básicamente, por inmunoensayos. El radioinmunoensayo (RIA), si bien constituyó en su momento un paso de avance tecnológico, limitaba la utilidad clínica de la TSH al diagnóstico del Hipotiroidismo Primario (Odell y cols., 1965) El desarrollo de inmunoensayos no competitivos tipo "sandwich" con potencialidades analíticas y clínicas superiores, ha ampliado la utilidad clínica de esta prueba (Quinn y cols., 2002). Actualmente, estos ensayos son ampliamente usados desplazando a los RíAs en la evaluación de disfunción tiroidea. Por sus características, los ensayos sandwich cumplen con una serie de directivas, tanto analíticas como clínicas, que los catalogan de primera linea para la evaluación funcional tiroidea, de forma que permiten diseñar estrategias que proporcionan una máxima información con la mejor eficiencia y un mínimo de costo para la generalidad de las situaciones clínicas encontradas en las consultas de tiroides Los avances en el campo de la metodología diagnóstica han permitido que hoy podamos contar con este tipo de ensayo de mejor precisión, especificidad, mayor amplitud de rango de trabajo, sensibilidades de 10 a 100 veces mejor que los RIAs y la posibilidad de realizar protocolos sencillos y rápidos (<3 hs) que lo hacen muy prácticos para la asistencia clínica.

2.4.4.2. Inmunoensayos para el diagnóstico de la Fibrosis Quistica.

Existe el consenso de que el diagnóstico de la FQ se debe basar fundamentalmente en la presencia de uno o más rasgos fenotípicos consistentes con la FQ como: enfermedad pulmonar obstructiva crónica severa, enfermedad sinusal crónica, anormalidades gastrointestinales o nutricionales, azoospermia obstructiva en varones (Mak y cols., 1999), síndrome de pérdida de sales, FQ en familiares de primer grado y un ensayo de pesquisa neonatal positivo (TIR) (Larsen y cols., 1994; Stem, 1997; Rosemstein y Curting, 1998).

Son necesarias pruebas de laboratorio que indiquen disfunción del CFTR documentadas por una concentración de iones Cl- elevada en el sudor (prueba de sudor positiva, alteraciones características en el transporte iónico a través del epitelio nasal (diferencia de potencial nasal transepitelial anormal) (Knowles y cols., 1995) y mutaciones causantes de la enfermedad en ambas copias del gen CFTR (Larsen y cols., 1994; Segal, 1999).

Para llegar al diagnóstico de la FQ se emplean diferentes pruebas de laboratorio: Prueba del sudor, para determinar las concentraciones de iones CP y Na en el sudor (Birnkrant y Stern, 1991; Callen y cols., 2000); pruebas genéticas para determinar la presencia de alguna mutación del gen CFTR (Dork y cols., 1991) análisis de semen en adultos para determinar

azoospermia obstructiva, lo que se debe confirmar con una biopsia testicular (Handelsman y cols., 1984; Mak y cols., 1999) prueba de la función pancreática exocrina (Nousia- Arvanitakis y cols., 1978, Blyte, 1984) medición de la diferencia de potencial nasal (Knowles y cols., 1995) lavado bronco-alveolar (Khan y cols., 1995). Estas pruebas deben combinarse para obtener un diagnóstico preciso sobre la presencia de la enfermedad.

La tripsina inmunoreactiva ha sido mediada por diferentes métodos en los últimos 20 años. Inicialmente fueron empleados los ensayos de tipo RIA (Radioinmunoensayos) donde empleaban anticuerpos policlonales (Crossly y cols., 1979).

Desde octubre de 1987 con el desarrollo de los ensayos de tipo inmunoenzimáticos empleando el principio "sadwich" comenzaron a emplear anticuerpos monoclonales y en julio de 1992 los fluoroinmunoensayos empleando diferentes anticuerpos monoclonales La combinación de ensayos TIR/ADN, que recientemente han demostrado su alta sensibilidad, debido al amplio rango de mutaciones conocidas para la proteína CFTR y han sido designados como los ensayos más efectivos, para implementar en los programas de pesquisa neonatal, por la Conferencia Internacional de Pesquisaje Neonatal de FQ (Seltzer y cols., 1991; Corbeta y cols., 2002).

2.5. Tendencias actuales en la Pesquisa Neonatal.

En los últimos años ha ganado terreno la convicción de que la solución global a diversos problemas de salud solo puede alcanzarse mediante la realización de estudios a escala masiva, dependiendo del desarrollo de métodos de Pesquisaje que estudien a todos los componentes del grupo poblacional (Hannon y Therrell, 1991; Armas y cols., 1994; Rosenfeld y cols., 1997).

Los criterios aceptados para incluir una enfermedad en un programa de Pesquisa Neonatal para Errores Congénitos del Metabolismo son los siguientes (Buist y Tuerck, 1992; Monagan, 2002).

1) La enfermedad resulta en una morbilidad (mental o física) y/o mortalidad severa si no se diagnostica en el período neonatal.

2) El diagnóstico clínico por un simple examen físico no es totalmente efectivo y no se podría identificar la enfermedad.

3) Existe disponible el tratamiento efectivo

4) Existe una mejoría significativa con el tratamiento temprano.

5) La enfermedad tiene una incidencia relativamente alta.
6) Existen métodos de detección simples, rápidos, confiables y baratos.

2.5.1. Programas de Pesquisa Neonatal de Hipotiroidismo Congénito.

La Organización Mundial de la Salud recomienda la realización de pesquisajes masivos como "Una actividad primaria en medicina preventiva y como contribución a la recolección de información científica sobre una población así como a la práctica inmediata de salud pública (Hannon y Rherrell 1991; Fernández y cols., 2002).

Ellos exploran los riesgos individuales de una población dada y una vez encontrados, se requiere de pruebas confirmatorias y el diagnóstico. El pesquisaje clásico en una población de recién nacidos, se lleva a cabo para enfermedades clínicamente no detectables y que sean tratables antes que los efectos sean irreversibles.

El Hipotiroidismo Congénito reúne todos los criterios para incluir esta enfermedad en un programa de pesquisa neonatal para errores congénitos del metabolismo (Buist y Tuerck, 1992).

La escasez de signos y síntomas clínicos en el recién nacido en los primeros momentos de la vida y la necesidad de comenzar un tratamiento temprano para prevenir el retardo mental aparejado con la disponibilidad de métodos altamente sensibles para la medición de T4 y TSH en líquidos biológicos, condujo al desarrollo de programas experimentales de pesquisa de HC en neonatos en Québec (1972) y Pittsburgh (1973) seguidos por programas regionales en los estados de Oregon y Nueva Inglaterra en los Estados Unidos (Fisher y cols., 1979). Estos programas comenzaron la pesquisa basándose en la determinación primaria de tiroxina.

Teniendo en cuenta que el déficit de hormonas tiroideas condiciona un aumento en la secreción de TSH en sangre, Irie y colaboradores desarrollaron un programa con objetivo similar pero fundamentado en la determinación de esta última hormona (Fernández y cols., 2002). Los trabajos posteriores de Naruse y colaboradores (Naruse, 1983) favorecen la utilización de la determinación de TSH sobre la determinación de T4 en el diagnóstico precoz de HC. El uso de la TSH posibilita además la confirmación del diagnóstico de HC primario y disminuye el número de resultados falsos positivos en el pesquisaje cuando se utiliza T4 como determinación primaria.

En los programas de pesquisaje de HC se utilizan dos tipos de muestras para el diagnóstico, en dependencia de la estructura establecida para los mismos (Pass, 1996). En la mayoría de los paises se utilizan muestras de sangre seca sobre papel de filtro, obtenidas por punción del talón del recién nacido entre el tercer y séptimo día de vida (Lemonnier y cols., 1996) lo cual ofrece algunas ventajas:

- No interfieren factores perinatales en la determinación de TSH, ya que la muestra no se toma del cordón umbilical y se reduce considerablemente el número de niños a recitar para la confirmación.
- La utilización de muestras de sangre seca colectadas sobre papel de filtro facilita la extracción, manipulación, transporte y conservación del material biológico.
- El pesquisaje puede realizarse en regiones de difícil acceso o en lugares con recursos limitados.

El Programa Cubano se inició a partir del 1986, después del desarrollo en Cuba de un ensayo inmunoenzimático para la detección de la hormona estimulante del tiroides, TSH, usando placas de UltramicroELISA con los fundamentos tecnológicos establecidos para el SUMA (American Academy of Pediatrics, 1993).

Los casos positivos (TSH > 30 mUI/L) son citados a la consulta con el pediatra endocrinólogo para su evaluación integral y se toma una segunda muestra del talón; simultáneamente se le indica tratamiento preventivo con levotiroxina hasta que se reciba el resultado de la segunda muestra. Si esta muestra es normal, se suspende el tratamiento. Si se confirma la segunda prueba como positiva, se establece el diagnóstico de Hipotiroidismo Congénito.

En algunos países como Cuba se utilizan muestras de suero del cordón umbilical, lo cual es posible ya que casi el 100% de los partos son institucionales y de esta forma se garantiza el pesquisaje a todos los recién nacidos. En este caso la toma de la muestra es muy precoz lo cual garantiza el diagnóstico y el tratamiento oportuno de los niños afectados (Guell y cols., 1988).

A pesar del evidente beneficio que implican para el niño, la familia y la sociedad la disponibilidad de tales programas, esto ha sido un privilegio para países con alto grado de desarrollo económico debido en parte al alto costo de los reactivos necesarios para ejecutarlos. La organización de programas con carácter masivo en países en vías de

desarrollo se ha dificultado no sólo por las condiciones económicas y sociales, sino por la carencia de un sistema analítico capaz de combinar ensayos económicos con tecnología avanzada.

En Latinoamérica la pesquisa de HC se inició en San Paulo en 1976. En el 4to Congreso de la Sociedad Internacional de Pesquisaje Neonatal (ISNS) realizada en Estocolmo, Suecia en junio de 1999, los representantes de los países de América Latina presentes (Cuba, Chile, Uruguay, Costa Rica, Brasil, Argentina y México) aportaron sus datos para tener un panorama de la situación del pesquisaje de HC en estas áreas. Más de 6 000 000 de niños nacen cada año en estos países y solo 3 251 000 eran pesquisados (53.5% del total) (Iorcansky, 1999). Los porcentajes de cobertura son variables: Cuba 98%; Chile 96.5%; Uruguay 99%; Costa Rica 91%; Brasil 60%; Argentina 44.5% y México 38.6%.

En nuestro país el desarrollo del Sistema Ultramicro Analítico (SUMA) creó las bases para el establecimiento de programas masivos orientados al diagnóstico de errores congénitos. La introducción de esta tecnología en otros países, principalmente de América Latina, ha permitido la creación y desarrollo de programas dirigidos al diagnóstico neonatal preventivo (Prometa, 2000).

2.5.2. Programas de Pesquisa Neonatal de la Fibrosis Quistica.

El objetivo de la pesquisa neonatal es diagnosticar y prevenir las consecuencias graves de las enfermedades heredo-metabólicas antes del desarrollo de la sintomatología clínica. Existe el consenso en la necesidad de contar con sistemas de pesquisa de estas enfermedades que sean simples, confiables, económicos y que permitan estudiar a grupos relativamente grandes de la población (Armas y cols., 1994; Rosenfeld y cols., 1997; Murray, 1999).

Pocas enfermedades reúnen todos los criterios para ser incluidas en un programa de pesquisa masivo. La pesquisa del hipotiroidismo congénito y la fenilcetonuria constituyen los programas más extendidos en el mundo y cuentan con una experiencia de tres decadas de funcionamiento (Monaga, 2002). Actualmente en muchos países se ha incluido la pesquisa de otras enfermedades, entre las que se encuentra la FQ (Abreu y Dodge, 1996; Serra-Pratt, 2000).

Sin una estrategia de detección precoz, la FQ se suele diagnosticar hacia los 3 ó 4 años de vida (Farrel y Mischler, 1992; Serra-Pratt, 2000). En ese momento los pacientes ya pueden

presentar síntomas graves de la enfermedad Es por esto que la pesquisa neonatal y el diagnóstico temprano de la enfermedad permiten mejorar la calidad y la esperanza de vida de los pacientes (Audrézet y cols., 1993; Hasselbald y Hedges, 1995; Stern, 1997).

Desde los años 90 del pasado siglo, se han establecido diversos protocolos de pesquisa de la FQ, considerando las siguientes estrategias: 1) una sola determinación de TIR durante la primera semana de vida (Rock y cols., 1990; Flume y cols., 2001); 2) realización de una primera determinación de TIR durante la primera semana de vida y en los recién nacidos con una pesquisa positiva, realización de una segunda determinación de TIR en otra muestra de sangre un mes más tarde, 3) combinación de la determinación de TIR y el estudio de mutaciones específicas del ácido desoxirribonucleico (ADN) en una misma muestra de sangre obtenida durante la primera semana de vida (Rock y cols., 1989, Gregg y cols., 1997; Serra-Pratt, 2000).

Contar con ensayos que permitan el diagnóstico de la FQ en muestras de sangre seca sobre papel de filtro de recién nacidos, es una herramienta valiosa en los programas de detección temprana de enfermedades metabólicas heredables (Peres y cols., 1990; Murray, 1999).

2.6. El costo- beneficio de los programas de pesquisa neonatal.

Varios estudios han sido realizados acerca de la relación costo-beneficio de los programas de pesquisa de HC de recién nacidos en EE.UU. y Canadá (OMS, 1991). El costo beneficio en la mayoría de los casos se basa en un estimado de la carga que representa para la sociedad un retardado mental que necesita de cuidado institucional

Todos los estudios demuestran un ahorro sustancial para la sociedad sin considerar la contribución de una mejor calidad de vida para el niño y la familia. La oficina americana de asesoría tecnológica reporta que por cada caso detectado se ahorran 93 000 dólares estadounidenses, cuando se comparan con niños que requieren de cuidados especiales al no ser detectados por el programa (OMS. 1991; Pollit RJ, 1997).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Antígenos

1- . Subunidad β-TSH comercial (SCRIPPS, San Diego) con más del 95% de pureza

2- . Tripsina-1 comercial (SCRIPPS, San Diego) con más del 95% de pureza.

3- . Tripsinógeno purificado por inmunoafinidad con más del 90% de pureza (Centro de Inmunoensayo, Habana).

3.2. Inmunización y generación de los hibridomas.

Se inmunizaron ratones BALB/c con 50µg de antigeno según el esquema, diluidos con solución fosfato salino 0,15mol/L, pH 7.3 (SFS) mezclado con igual volumen de adyuvante completo de Freund (Sigma) por vía subcutánea. Se repitió esta dosis a los 21, 42 y 63 días con adyuvante incompleto por vía intraperitoneal y siete días después se extrajo la sangre del seno retroorbital para analizar los títulos de los anticuerpos específicos.

Los procedimientos generales seguidos para la obtención de los hibridomas se desarrollaron según lo descrito por Kohler y Milstein (1975) con algunas modificaciones (Acosta cols., 2000a). Los esplenocitos de los ratones con mayor título fueron fusionados con la línea de mieloma murino no secretor P3-X63.Ag8-653 usando polietilen glicol (PM 1500 Sigma). Las células se cultivaron durante diez días en placas de 96 pozos (Greiner) con medio selectivo DULBECCO F12 (Gibco) que contenía hipoxantina-aminopterina-timina (HAT, Sigma), pasado este tiempo se comenzó a retirar la aminopterina del medio. La presencia de anticuerpos específicos en los sobrenadantes de cultivo se evaluó cuando se observaba un crecimiento celular que cubría aproximadamente 2/3 partes del pozo cultivado.

3.2.1. Pesquisaje y clonaje de los hibridomas.

La selección de los cultivos secretores de anticuerpos específicos a la p-TSH, Tripsina-1 y Tripsinógeno se realizó mediante UMELISA.

Para el pesquisaje de los cultivos secretores de la primera fusión (inmunógeno P-TSH) se recubrieron las placas UMELISA (Greiner), con una concentración proteica de l µg/mL en solución reguladora Na_2CO_3, 2.93g de NaHC03 y 0.2g NaN3, para 1 litro de agua destilada, pH 9.6, durante toda la noche (TN, 16-18 horas) a 4°C.

En el caso del pesquisaje de los cultivos secretores de la segunda y tercera fusión (inmunógenos Tripsina-1 y Tripsinógeno) se recubrieron las placas con Tripsina-1 comercial a una concentración proteica de 4 μg/mL en SFS, pH 7.2, durante 4 horas a temperatura ambiente (TA, 20-25°C). Concluido el tiempo de incubación del recubrimiento se realizó el lavado de las placas sensibilizadas con SFS, pH 7.2, Tween 20, al 0.05%. Seguidamente las placas se preservaron con solución de bloqueo (SFS, pH 7.2, Tween 20, al 0.05%, suero de albúmina bovina (SAB) al 1% y sacarosa 2%) durante 1 h a TA. Se aspiró la solución de bloqueo y se secaron las placas a 37°C durante 2 horas. Las placas se sellaron herméticamente, empleando la termoconformadora Compaker 5, en una cubierta de cloruro de polivinilo y papel de aluminio, adicionándole silica gel como desecante. Las placas selladas son conservadas entre 2-8°C hasta su uso.

El procedimiento de montaje de la prueba fue el siguiente:

Se aplicaron 10 μL los sobrenadantes de cultivo puros o diluidos 1:2 con Tris-HCl 0.05 mol/L, pH 7.8 y se incubaron por 2 horas a 37°C en cámara húmeda A continuación las placas se lavaron 4 veces empleando el lavador automático MAS 301 (Centro de Inmunoensayo (CIE), Habana, Cuba) y se incubaron por 1 h a 37°C con l0 μL con una solución de conjugado (anticuerpos de carnero anti-IgG de ratón unido con fosfatasa alcalina, CIE, Habana). Las placas se lavaron nuevamente y se añadieron 10 μL por pozo del sustrato 4 metil-umbeliferil.fosfato 5mmol/L, en solución reguladora dietalonamina 0.92mol/L, $MgCL_2$ 0.72mmol/L, NaN_3 7mmol/L, pH 9.8. La fluorescencia producto de la reacción se midió al cabo de los 30 minutos de incubación a TA empleando el lector Fluorímetro-Fotómetro PR-501 (CIE, Habana). Los pocilios con una fluorescencia 3 veces superior al control negativo (sabrenadante de mielona no secretor X63) se consideraron positivos. Como control positivo se empleó en el caso del pesquisaje de los anticuerpos específicos a la β-TSH un AcM comercial (ICN, Biochemical, Finlandia) a una concentración de 0.5 μg/ml, mientras que en el pesquisaje de los anticuerpos específicos a la Tripsina o Tripsinógeno se utilizó un AcM comercial de la firma Bioclon (Autralia) a una concentración de 0.5μg/mL.

De cada fusión se seleccionaron los híbridos positivos y se clonaron al menos dos veces por dilución limitante (Campbell, 1991a, 1991b).

3.3. Determinación de la clase, subclase y tipo de inmunoglobulina de cada AcM.

La clase, subclase de inmunoglobulina se determinó a partir de los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas, por inmunodifición doble en gel de agar (Ouchterlony y Nilsson, 1973) con empleo de sueros clasificadores anti-lg de ratón comercial (Sigma). Para este ensayo los sobrenadantes se concentraron 20 veces para el ensayo. Adicionalmente se empleó el estuche de anti-subclases (Calbiochem) con algunas modificaciones para ser empleadas las placas de UMELISA y la tecnología SUMA. La modificación consistió en el empleo de anticuerpos de carnero anti-lg de conejo conjugados a fosfatasa alcalina (en lugar del conjugado ofertado en el estuche) para ser utilizado en la lectura el fotómetro-Fluorímetro PR 501.

3.4. Producción de líquido ascítico y purificación de los AcM

Para la producción de líquido ascítico, a partir del cual purificar los AcMs, se emplearon ratones BALB/c (CIE, Habana) tratados diez días antes con adyuvante incompleto de Freund (Sigma). Se utilizaron 20 animales por grupo y se inocularon con 0.5 ó $1{,}5x10^6$ células por animal. El líquido ascítico se obtuvo por punción abdominal, este se sometió a centrifugación para eliminar residuos de fibrina, y se conservó a -20°C hasta su empleo. La purificación de los AcMs a partir de líquido ascítico, se realizó mediante cromatografía de afinidad en columna de Sepharosa-Proteína A CL 4B (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Se empleó una solución de glicina 1.5mol/L, pH 8.9 en el paso de adsorción. Los líquidos asciticos se diluyeron 1:2 con esta misma solución. La elución de cada subclase de anticuerpo se realizó con ácido cítrico 0. lmol/L a pH 6 para IgGl y pH 5 para lgG2a. Se estimó la concentración de AcM por mL de líquido ascítico a partir del recobrado obtenido en la purificación. La concentración del AcM purificado se determinó por la medición de la densidad óptica a 280nm y la especificidad se confirmó mediante la técnica de UMELISA descrita en el acápite 3.2.1 pero empleando como antígenos para el recubrimiento de las placas moléculas relacionadas estructuralmente como se describe en el siguiente acápite.

3.5. Ensayos de UMELISA para la determinación de la especificidad de los AcM obtenidos.

Para la realización del UMELISA indirecto las placas de poliestireno de alta captación de % posiciones con capacidad máxima de **30µL** producidas (Firma Greiner, Alemania) fueron recubiertas de forma pasiva con los Ag de interés.

Para la evaluación de la especificidad se emplearon las hormonas FSH, LH (Sigma) y hCG (Laboratorio de Purificación de Proteínas, Centro de Inmunoensayo). El procedimiento de recubrimiento y montaje del ensayo se describió en el acápite 3.2.1.

Para la evaluación de la especificidad de los AcMs anti Tripsina se emplearon proteínas estructural mente relacionadas: α_1-antitripsina-Tripsina, α-quimotripsinógeno A tipo II (bovino), α-quimotripsinógeno tipo I-S (bovino), α-quimotripsinógeno tipo VII (bovino), fosfolipasa A_2 (bovina), quimotripsina (humana), tripsina tipo IX (porcina), tripsina tipo XI1 (bovina), tripsinógeno (bovino) todas ofertadas por la firma Sigma. El procedimiento de recubrimiento y montaje de ios ensayos se describió en el acápite 3.2.1.

3.6. Conjugación de anticuerpos policlonales anti cadena a TSH con la fosfatasa alcalina.

Los anticuerpos policlonales obtenidos en carnero anti cadena a-TSH (Producidos en el Vivario, Centro de Inmunoensayo) se unieron covalentemente a la enzima fosfatasa alcalina mediante el procedimiento de conjugación con glutaraldehído en un paso (Avrameas, 1969a).

3.7. Conjugación de la Tripsina a biotina.

La tripsina-biotina fue preparada según el método descrito por Bayer y Wilchek, 1996. El procedimiento de biotinilación fue optimizado por el Laboratorio de Purificaciones del Centro de Inmunoensayo, empleando una relación molar de 80 µg de biotina por cada mg de Tripsina en SFS, 0.15moI/L, pH 7.2.

3.8. Preparación del conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina.

El conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina fue preparado según el método del glutaraldehído en un paso (Avrameas, 1969a). Para la conjugación se siguió el procedimiento optimizado en el Laboratorio de Pesquisaje Neonatal del Centro de

Inmunoensayo, empleando una relación molar de 4 mg de fosfatasa alcalina por cada mg de estreptavidina.

Se prepara una dilución intermedia de 1:4700 del conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina con SFS, 0.15mol/L, pH 7.2.

3.9. Reconocimiento de los antígenos en solución por los diferentes AcM.

Tomando en consideración que se pretendía seleccionar AcM útiles para el diseño de técnicas inmunoenzimáticas de tipo "sandwich", se evaluó la capacidad de los AcMs de reconocer los antígenos en solución.

3.9.1. Reconocimiento de la Tripsina en solución.

La capacidad de capturar al antígeno por los diferentes AcM anti-Tripsina se determinó recubriendo las placas de poliestireno (Greiner) con los AcM por separado en solución reguladora Tris-HCl 0.05mol/L, pH 8.0, a una concentración fija de 5µg/mL, y se bloquearon con solución de preservo (acápite 3.2.1). A continuación se añadieron a cada pozo 10µL, de antígeno biotinilado (Tripsina - biotina) a concentraciones que oscilaron entre 250 y 0.5ng/mL en SFS-SAB 1% y se incubó durante TN a TA. Luego de varios lavados, se aplicó 10 µL del conjugado estreptavidina/Fosfatasa alcalina ha una dilución 1:100 000 y después de un nuevo lavado, la técnica se desarrolló acorde a lo descrito en al acápite 3.2.1. Para la evaluación se estimó el valor de R^2, y el análisis de varianza para la dócima de la pendiente y la falta de ajuste (Serret y Rosales, 1997; Statgraphics© plus for Windows TM, 1998).

3.9.2. Reconocimiento de la TSH en solución.

La capacidad de capturar al antígeno por los diferentes AcMs anti P-TSH se determinó recubriendo las placas de poliestireno (Greiner) con los AcM por separado y una mezcla relación 1:1 de los AcM 2C1-G10 y 4A2-A8, en solución reguladora Tris-HCl 0.05mol/L, pH 8.0, a una concentración fija de 5µg/mL, y se bloquearon con solución de bloqueo (acápite 3.2.1). A continuación se añadieron a cada pozo 10 µL de TSH a concentraciones que oscilaron entre 200 y 10mUI/L en Tris HCL 0.05mol/L, pH 7.8, y se incubó 2 horas a 37°C. Luego de varios lavados, se aplicó 10 µL de una solución de anticuerpos de carnero anti a-TSH conjugados a fosfatasa alcalina a una dilución 1:15000. Después de lavar varias

veces, la técnica se desarrolló acorde a lo descrito en al acápite 3.2.1. Para la evaluación se estimó el valor de R^2, y el análisis de varianza para la dócima de la pendiente y la falta de ajuste (Serret y cols, 1997; Statgraphics® plus for Windows TM, 1998).

3.9.3. Determinación del reconocimiento de epítopos.

Para la determinación del reconocimiento de epítopos seguimos diferentes estrategias:

a) Ensayo de competencia (inhibición), se emplearon placas de UMELISA recubiertas con 5fig/mL del AcM 1 en solución reguladora Tris-HCl 0.05mol/L, pH 8.0. Como control se empleo el antigeno (Calibrador TSH 200mUI/L) en solución reguladora SFS 0.15mol/L, pH 7.2 y un conjugado policlonal anti α-TSH a una dilución 1:15000 (Laboratorio de Pesquisaje Neonatal, Centro de Inmunoensayo, Cuba). La solución de antígeno fue preincubada en solución con el segundo AcM (AcM 2, 10µg/mL) durante 1 h a 37°C y se aplica a la placa de reacción recubierta con el AcM 1. La incubación se realizó durante 2 horas a 37°C en cámara húmeda. Se calculó el porcentaje de inhibición de unión (I) del AcM2 preincubado con el antígeno, I=100-(Flu.¡xl00/$Flu._{max}$) donde $Flu._{i}$ = fluorescencia de la mezcla de AcM y antígeno, $Flu._{max}^{=}$ fluorescencia del AcM en ausencia del AcM 2. Se consideraron positivos porcentajes de inhibición de la unión del AcM 2 mayores del 50%.

b) Ensayo de competencia (inhibición), empleando placas de UMELISA recubiertas con el AcM l(5µg/mL) en solución reguladora Tris-HCl 0.05 mol/L pH 8.0. Como control se empleó 125ng/mL de Tripsina-biotina en solución reguladora SFS 0.15mol/L, pH 7.2. Adicionalmente se utilizó en esta prueba el AcM comercial de la firma Bioclon (Australia). La solución de antígeno es preincubada en solución con el segundo AcM (10µg/mL AcM 2) durante 1 h a 37°C y se aplica a la placa de reacción recubierta con el AcM 1. La incubación se realizó durante TN a TA en cámara húmeda. El procedimiento del cálculo del porcentaje de inhibición se realizó según lo descrito anteriormente.

c) Técnica de Dot Blot. La estructura lineal o conformacional de los epítopos identificados por los diferentes AcM, anti-Tripsina se evaluó mediante la técnica de Dot Blot. Se prepararon dos soluciones de Tripsina, a una concentración final de 5µg/mL, como sigue: Solución 1- Solución reguladora salina fosfato (SFS) 0.15mol/L, pH 7.2 (Antígeno sin desnaturalizar).

Solución 2 - Solución reguladora salina fosfato (SFS) con β-mercaptoetanol calentada por 5 minutos a 100 °C (Antígeno desnaturalizado).

Se aplicaron al vacío 100 µL de estas soluciones sobre una membrana de nitrocelulosa. Como antígeno no relacionado se empleo SAB a la concentración y variantes ya descritas para el Antígeno.

La nitrocelulosa se incubó 30 minutos a TA con una solución de preservo (SFS-ASB al 1%, sacarosa 2%). Luego se añadieron por separado cada uno de los AcMs a 5µg/mL en SFS, incubando la membrana durante 30 minutos TA. El siguiente paso consistió en lavar la nitrocelulosa con SFS-T 5 veces, seguido por la adición de un conjugado anticuerpos de carnero anti-lgG de ratón/fosfatasa alcalina (Laboratorio de Purificaciones, CIE), diluido 1:4000 en SFS, pH 7.2 y se incubó 30 minutos a TA. Se repitió el lavado y se añadió el sustrato de depósito de la fosfatasa alcalina (BCIP/NBT de la Sigma) 10 minutos, al cabo de lo cual se detuvo la reacción lavando con agua destilada.

3.10. Preparación de los AcM anti-Tripsina 3H9 y 2G6 biotinilados.

Los anticuerpos biotinilados fueron preparados según el método descrito por Bayer y Wilchek, (Bayer y Wilchek, 1996). El procedimiento de biotinilación fue optimizado por el Laboratorio de Hepatitis del Centro de Inmunoensayo, empleando una relación molar de 80 µg de biotina por cada mg de AcM anti-Tripsina 2G6 o 3H9 en solución reguladora SFS 0.15mol/L, pH 7.2.

3.10.1. Determinación del reconocimiento de la Tripsina por los AcM 2G6-Biotina y 3H9-Biotina.

Se emplearon placas recubiertas con 4µg/mL de Tripsina comercial a según lo descrito en el acápite 3.2.1. Se aplicaron 10 µL del AcM 2G6-biotina o 3H9-biotina convenientemente diluido (desde 1 fig/mL hasta 0.05 µg/mL. Luego de la incubación (lh a TA) y varios lavados se aplicó el conjugado estreptavidina/fosfatasa alcalina 1:100 000. Una vez concluido un nuevo ciclo de lavados se siguió el ensayo según lo descrito en el acápite

3.2.1. Para la evaluación se estimó el valor de R^2, y el análisis de varianza para la dócima de la pendiente y la falta de ajuste (Serret y Rosales, 1997; Statgraphics® plus for Windows TM, 1998).

3.11. Determinación de la constante de afinidad.

La determinación de la constante de afinidad (Kaf) se realizó mediante una modificación del método descrito por Beattly y cols.,(1987) para ser empleado el sistema SUMA

El recubrimiento de las placas de UMELISA se realizó empleando las soluciones reguladoras establecidas en el acápite 3.2.1 utilizando diluciones seriadas de β-TSH desde 1µg/mL hasta 0.125µg/mL o Tripsina desde 4µg/mL hasta 0,5µg/mL. Posterior a la incubación del recubrimiento se realizó el lavado de las placas ajustado a un ciclo de lavado con la solución reguladora SFS 0,01mol/L; pH 7,2. Las diluciones seriadas de los AcMs (solos o acoplados a biotina en el caso de los AcM anti Tripsina) en evaluación se realizaron con la solución reguladora SFS 0.01mol/L, 30 minutos, antes de ser aplicada en la placa de reacción, cubriendo un rango desde 2 hasta 0.00175fig/mL. Las placas fueron incubadas durante lh a 37°C en cámara húmeda. Posterior a la incubación se realizaron 4 ciclos de lavado para eliminar los componentes no fijados. Se empleó al conjugado de los anticuerpos de carnero anti-IgG de ratón /Fosfatasa Alcalina (0.5µg/mL). La incubación del conjugado se realizó durante lh a 37°C en cámara húmeda, el lavado de las placas así como las siguientes etapas del montaje se realizó según lo descrito en el acápite 3.2.1.

El ensayo se realizó durante tres días consecutivos empleando tres réplicas y se determinó la Kaf según la formulación realizada por Beattly. La media de los valores de fluorescencia obtenidos se representó en un eje de coordenadas en fúnción del logaritmo de la concentración de anticuerpo para obtener una serie de curvas sigmoides.

La determinación de la Kaf se realizó a partir de la concentración de anticuerpo correspondiente al 50% de fluorescencia y se relacionó cada una de las curvas con la obtenida a la mayor concentración de antígeno. Para el cálculo se empleó la siguiente fórmula:

$$Kaf = (n-l)/2(n[Ab']t-[Ab]t)$$

donde: $n = [Ag]t/[Ag']t$

[Ab]t = Concentración total de anticuerpo que corresponde al 50% de fluorescencia en la curva con la mayor concentración de antígeno de recubrimiento.

[Ab']t = Concentración total de anticuerpo que corresponde al 50% de fluorescencia en la curva que se compara.

3.12. Determinación del punto isoeléctrico.

La determinación del punto isoeléctrico (p I.) se realizó empleando el procedimiento descrito en el manual de usuario del PHAST SYSTEM (Suecia).

3.13. Estudio de los AcIVfs como inniunoligando.

3.13.1. Selección del AclM con características adecuadas para inmunopurificar Tripsina a partir de páncreas mediante un sistema UMELISA.

El procedimiento de montaje fue el siguiente: A las placas recubiertas con los AcMs se añadió la Tripsina conjugada a biotina a una concentración de 125ng/mL en SFS-SAB 0.1%, y se incubó durante TN a TA. Seguidamente se probó la elución del antígeno biotinilado añadiendo 10 µL/pozo de glicina, 0.2mol/L pH 2.8, durante 1 h a 37°C, o SFS, pH 7.4. Luego se continuó el desarrollo de la técnica según lo reportado en el acápite 3.2.1. En este ensayo, la condición de elución mínima es aquella cuando se emplea en la elución SFS pH 7.4 (control negativo), por lo que la fluorescencia obtenida será máxima. En consecuencia, los resultados del experimento se expresaron para cada AcM como:

CCE = 100 - (Flu luego de eluir con glicina 0.2 mol/L /Flu luego de eluir con SFS) x 100 CCE.

Capacidad de Captura y Elución del AcM en cuestión, expresado en %.

Flu: Fluorescencia.

3.13.2. Empleo de AcM para la Purificación de Tripsina por Inmunoafinidad.

El AcM 3H9 purificado a partir de líquido ascítico se acopló a la Sepharosa CL 4B activada con bromuro de cianógeno, a 20mg de AcM por mg de gel seco, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Pharmacia Biotech AG, Suecia).

Se determinó el porcentaje de unión del AcM a la matriz mediante un ensayo UMELISA para la cuantificación de la IgG de ratón descrito en el siguiente acápite.

El material de partida a purificar fue tejido pancreático, se utilizó polvo de acetona (que contenía tripsina a menos de un 5% de pureza). La solución de acoplamiento fue SFS, pH

7.2. en presencia de un inhibidor de proteasas (PMSF) 174mg/L. El material a purificar se aplicó a la columna a 0.32mL/minutos Se realizó el lavado con NaCl 0.01 mol/L. Para la elución empleó glicina 0.2mol/L, pH 2.8, a un flujo de 0.5mL/minutos. El eluato se dializó inmediatamente en solución reguladora SFS 0.1 mol/L pH 7.0, PMSF 174mg/L. Todo el

proceso se controló mediante un medidor de absorción UV situado en línea y un registrador. La concentración se determinó mediante la técnica de Lowry y cols., (1951) donde se emplea SAB como curva patrón.

El porcentaje de pureza se calculó mediante una electroforesis en gel SDS-poliacrilamina 12,5%, según el procedimiento empleado en el laboratorio de Purificación de Proteínas, Centro de Inmunoensayo.

3.13.3. Selección del AcM con características adecuadas para inniunopurificar TSH a partir de Hipófisis mediante un sistema UMELISA.

Los AcMs con características adecuadas para inmunopurificar TSH a partir de hipófisis se seleccionaron mediante un sistema UMELISA en el cual las placas (Greiner) se recubrieron de manera independiente con 15 µL/pozo de una solución de 10 µg de cada AcM por mL de Tris-HCl 0,05 M, pH 8.0, durante toda la noche a 4°c. Luego de bloquear con PBS-BSA 1 % sacarosa 5 % durante 1 hora a TA, se añadió a las placas las hormonas glicoproteicas aplicando el estándar F el cual presenta una concentración de 48 mUI/L (4,8 ng/mL).

La incubación de la TSH del estándar se realizó durante 2 horas. Seguidamente se probó la elución del antígeno añadiendo 10 µL/pozo de Glicina, 0.2M pH 2.8, durante 1 hora a 37°C, NaCl 1M glucosa 10 mM o de PBS pH 7.4 y luego de una incubación de 1 hora para TSH se realizó el lavado con Tris HCL pH 7.4. Seguidamente se añadió el conjugado policlonal anti subunidad a para TSH en a las placas recubiertas con los AcM anti p-TSH 2C1-G10, 4 A2-A8, 10G8-F4. Seguido de un nuevo lavado se continuó el desarrollo de la técnica con la adición del sustrato específico de la fosfatasa alcalina.

En estos ensayos, la condición de elución mínima es aquella que se produce en PBS pH 7.4 (control negativo), por lo que la fluorescencia obtenida será máxima. En consecuencia, los resultados del experimento se expresaron para cada AcM como:

CCE = 100 - (Flu luego de eluir con Glicina 0.2 M /Flu luego de eluir con PBS) x 100 donde CCE es la Capacidad de Captura y Elución del AcM en cuestión, expresado en %. Flu es la fluorescencia.

3.13.4. Empleo de AcM para la Purificación de TSH por Inmunoafinidad.

El AcM 10G8-F4 purificado a partir de líquido ascítico se acopló a la Sepharosa CL 4B activada con bromuro de cianógeno, a 20mg de AcM por mg de gel seco, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Pharmacia Biotech AG, Suecia).

Se determinó el porcentaje de unión del AcM a la matriz mediante un ensayo UMELISA para la cuantificación de la IgG de ratón descrito en el siguiente acápite.

El material de partida a purificar fue tejido de hipófisis, se utilizó polvo de acetona (que contenía TSH a menos de un 5% de pureza). La solución de acoplamiento fue SFS, pH 7.2. El material a purificar se aplicó a la columna a 0.32mL/minutos Se realizó el lavado con NaCl 0.01 mol/L. Para la elución empleó glicina 0.2mol/L, pH 2.8, a un flujo de 0.5mL/minutos El eluato se dializó inmediatamente en solución reguladora SFS 0.1 mol/L pH 7.0, PMSF 174mg/L. Todo el proceso se controló mediante un medidor de absorción UV situado en línea y un registrador. La concentración se determinó mediante la técnica de Lowry y cols., (1951) donde se emplea SAB como curva patrón.

El porcentaje de pureza se calculó mediante una electroforesis en gel SDS-poliacrilamina 12,5%, según el procedimiento empleado en el laboratorio de Purificación de Proteínas, Centro de Inmunoensayo.

3.13.5. UMELISA para la cuantifícación de la IgG de ratón.

Se determinó el porcentaje de unión del AcM a la matriz mediante un ensayo UMELISA donde las placas de poliestireno se recubrieron con anticuerpos policlonales IgG de carnero anti IgG de ratón, y el conjugado empleado fúe la misma preparación de recubrimiento, pero conjugada con fosfatasa alcalina. Como referencia se empleó una preparación de IgG de ratón de concentración conocida y más del >98% de pureza. La sensibilidad de este sistema UMELISA es de lng/mL. El procedimiento del ensayo se realizó según lo descrito en el acápite 3.2.1.

3.14. Obtención de anticuerpos policlonales en conejo empleando la Tripsina purificada.

El procedimiento empleado para la obtención del antisuero de conejo específico para la Tripsina humana se resume en la figura 2:

Figura 2. Procedimiento para Ia obtención del antisuero específico a la Tripsina humana

La Tripsina empleada como inmunógeno presentó una pureza mayor del 95%, determinada por SDS-PAGE.

Los conejos seleccionados para la obtención de los inmunosueros fueron machos de la raza Nueva Zelanda con un peso promedio entre 35-55 kg. La vía de administración de los inmunógenos fue intradérmica, cerca de los sacos ganglionares y las inoculaciones se realizaron en ocho puntos. Los inmunógenos se prepararon mezclando 1 mL de la solución de Tripsina a una concentración de 127|ig/mL con lmL. Las inmunizaciones se realizaron con una frecuencia semanal, la primera dosis con adyuvante completo de Freund y las tres restantes con adyuvante incompleto de Freund, posteriormente se mantuvo una dosis mensual con adyuvante incompleto.

Las extracciones se realizaron a partir de la vena de la oreja. El volumen de cada extracción fue de 40 mL de sangre total. Los elementos celulares se separaron del plasma. El plasma se desfibrinó con trombina.

3.14.1. Purificación de los anticuerpos policlonales anti Tripsina humana

Los anticuerpos policlonales anti Tripsina se purificaron a partir del antisuero anti Tripsina mediante cromatografía de intercambio iónico.

Preparación de la muestra.

El suero de conejo anti Tripsina humana se diluyo 1:2 con H_20 destilada.

Se adicionó $(NH_4)_2S0_4$ saturada gota a gota bajo agitación luego de lo cual se mantuvo la agitación por 30 min. seguidamente se dejo en reposo por 1 hora.

Transcurrido el reposo se centrifugó a 10.000 rpm. por 15 min. y se desecho el sobrenadante. El *pellet* fue reconstituido con 1:2 $(NH_4)_2SO_4$

Seguidamente se centrifugó en las mismas condiciones y se resuspendió el *pellet* con SSF 1:2. Luego se dializó durante 48 horas en SSF.

La muestra se aplicó directamente en la columna previamente equilibrada con solución reguladora salina fosfato 0.15 mol/L pH 7.3. La columna se lavó con NaCl 1 mol/L, glucosa 0.01 mol/L para eliminar las proteínas adsorbidas inespecíficamente. La fracción de la IgG anti-Tripsina humana se eluyó con la solución reguladora Glicina 0.2 mol/L pH 2.8.

El pico recogido se dializó a 4°C frente a la solución reguladora salina fosfato 0.15 mol/L pH 7.3 en una bolsa de diálisis (nivel de corte: 12000 Da-14000 Da) con cinco cambios de 1L cada cinco horas. Los anticuerpos dializados se centrifugaron durante 10 minutos a 22°C a 16000 g para eliminar los agregados.

La estimación de la concentración de la IgG de conejo anti Tripsina humana se realizó por lectura directa de la absorbancia a 280 nm en una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso de luz y se calculó según la siguiente fórmula:

$$C_{IgG} = \frac{10 \times D.O_{280}}{\varepsilon \times 1} \times f_d$$

donde:

C_{IgG}: Concentración de IgG (mg/mL)

$D.O_{280}$: Lectura de densidad óptica de la muestra a 280 nm en una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso de luz.

Ɛ. Coeficiente de extinción porcentual de la IgG de conejo (14.7 cm mL/g), dado para una solución de IgG al 1 %, 1 cm de paso de luz y una longitud de onda de 280 nm.

I: Paso de luz en cm (1 cm).

f_d: Factor de dilución.

La pureza se evaluó por inmunoelectroforesis frente a suero de carnero a proteínas totales de conejo

3.15. Análisis de los costos de producción.

Se estimaron los costos de obtención y producción de los AcM, y se realizó la comparación de haberse mantenido la producción de los anticuerpos policlonales anti β-TSH ó la

necesidad de importar AcM para la producción de los estuches de UMELISA TSH (suero) y UMELISA TSH Neonatal.

Los datos de los precios en el mercado de los AcMs fueron tomados de la base de Datos www.Abcam.com.

3.16. Impacto del UMELISA TSH.

A partir de los datos del Ministerio de salud Publica el número de partos y recién nacidos vivos asi como el número de hipotiroideos diagnosticados desde el comienzo del programa. Pariendo de los costos de tratamiento en instituciones hospitalarias especializadas se estimó el ahorro.

Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas
Dirección B M.N
CNICM INFOMED

4. RESULTADOS

4.1. Resultados de las fusiones y pesquisaje de los hibridomas.

Con el objetivo de obtener hibridomas secretores de AcM anti β- TSH y anti-Tripsina se inmunizaron cinco ratones por esquema. El suero de los animales se analizó por UMELISA indirecto y se seleccionaron los ratones con mayor título de anticuerpo específico para la fusión. En la tabla 3 se recogen los porcentajes de eficiencia (pozos con hibridomas viables), número de hibridomas secretores de anticuerpos y número de estos que no presentaron reactividad cruzada con varias moléculas estructural mente relacionadas.

Tabla 4. *Eficiencia y No. de hibridomas secretores de anticuerpos de anticuerpos específicos*

Fusión	Eficiencia (%)	No. Hibridomas secretores de anticuerpos	No. de Hibridomas específicos
I-TSH	87	6	5
II-T risina-1	68	5	1
III- Tripsinógeno	63	3	1

De los seis AcMs obtenidos del primer esquema de inmunización, empleando como inmunógeno β-TSH comercial, cinco mostraron una especificidad de enlace con la TSH completa y la subunidad β-TSH. En el caso del AcM 7C10-C9, reconoce con igual intensidad de unidades de fluorescencia todas las hormonas evaluadas (Tabla 5).

Tabla 5. *Especificidad de los AcM obtenidos contra la β-TSH.*

	Hormonas de reactividad cruzada				
AcM	**HTSH**	**P-TSH**	**hLH**	**hFSH**	**hCG**
4 A2-A8	+		-	-	-
2C1-G10	+	+	-	-	-
10G8-F4	+	+	-	-	-
7C10-C9	+	+	+		+
9D1I-D1	+	+	-	-	-
7D7-F4	+	+	-	-	-

En el esquema realizado empleando la Tripsina comercial de los cuatro AcM obtenidos, solo el 3H9 mostró especificidad por la Tripsina tanto en su forma libre como cuando esta se encuentra unida al inhibidor ai-antitripsina. En el caso de la fusión del de los ratones que emplearon como inmunógeno Tripsinógeno purificado por inmunoafinidad, de los tres hibridomas obtenidos solo el 2G6 mostró especificidad por la Tripsina tanto en su forma libre como cuando esta se encuentra unida al inhibidor ai-antitripsina (Tabla 6).

Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas
Dirección B M.N
CNICM INFOMED

Tabla 6. *Especificidad de los AcM obtenidos contra la Tripsina humana.*

Proteínas	8HH	5E10	8D10	2G8	2A9	3H9 2G6
Tripsina Humana	+	+	+		+	-l- +
Tripsina Humana + al-Anti-tripsina	+	+	+	+	+	+ +
a-quimotripsinógeno A tipo II (bovino)	-	+	-	-	-	-
a-quimotripsinógeno tipo I-S (bovino)	-	+	-	-	-	-
a-quimotripsinógeno tipo VII (bovino)	-	+	-	-	-	-
fosfolipasa A_2 (bovina)	-	+	-	-	-	-
quimotripsina (humana)	+	+	+	+	+	-
tripsina tipo IX (porcina)	-	+	-	-	-	-
tripsina tipo XII (bovina)	-	+	-	-	-	-
tripsinógeno (bovino)	-	+	-	-	-	-
ai-antitripsina (humana)	-	-	-	-	-	-
a_2-macroglobulina (humana)						
inmunoglobulina G (humana)						

Los cultivos celulares de los hibridomas específicos se clonaron al menos dos veces por dilución limitante hasta obtener hibridomas estables secretores de AcMs. Los clones de los hibridomas y sus respectivos anticuerpos se denominaron según aparece en la tabla 7.

Tabla 7. Denominación de los hibridomas secretores de anticuerpos específicos

Fusión	Clones
I-TSH	4A2-A8, 2C1-G10, 10G8-F4, 9D11-C9, 7D7-F4
11-T ripsina-1	3H9
111- Tripsinógeno	2G6

4.1.1. Producción de fluido ascítico y purificación de los AcM.

Los hibridomas se inocularon en la cavidad peritoneal de los ratones BALB/c previamente iritado con adyuvante incompleto de Freud's para obtener fluido ascítico rico en AcMs. En la Tabla 8 se recogen los porcentajes de prendimiento y el volumen promedio de líquido ascítico por animal inoculado.

Tabla 8. Porcentaje de prendimiento y volumen promedio de líquido ascítico por animal inoculado.

Fusión	% de prendimiento	mL por ratón
I-TSH/4 A2-A8	86.4	5
I-TSH/2C1-G10	93.6	7
1-TSH/10G8-F4	91	4.8
I-TSH/9D11-C9	86	5
I-TSH/7D7-F4	84	6.5
II-Tripsina/3H9	95.4	6
III-Tripsinógeno 2G6	92.6	5

La fracción de IgG proveniente de líquido ascítico se purificó hasta más de un 95% de pureza por cromatografía de afinidad en Sepharosa Proteína A CL 4B La concentración de los AcM osciló entre 0,5 y 3mg/mL y el rendimiento en todos los casos fue superior a lmg de AcM por mL de líquido ascítico.

4.2. Caracterización de los AcIVIs obtenidos.

El sobrenadante del cultivo de estos hibridomas se concentró 20 veces y se evaluó por inmunodifusión radial. Se determinó que los AcMs específicos a la B-TSH pertenecen al isotipo IgGl y los AcMs específicos a la Tripsina son de isotipo lgG2a. Este resultado se confirmó empleando un estuche antisubclase comercial (Calbiochern).

4.3. Reconocimiento de los antígenos en solución.

Tomando en consideración que se buscaba seleccionar AcMs útiles para el diseño de ensayos inmunoenzimáticos de tipo "sandwich", así como AcM útiles para la purificación por inmunoafinidad de estas proteínas, se evaluó la capacidad de reconocer los antígenos (b-TSH y Tripsina) en solución. Para los AcM anti B-TSH se determinó que al encontrarse unidos al soporte sólido, estos mantenían el reconocimiento de la TSH presente en la curva estándar (48 UI/mL). Los resultados de esta evaluación se muestran en la figura 1.

Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas
Dirección B M.N
CNICM INFOMED

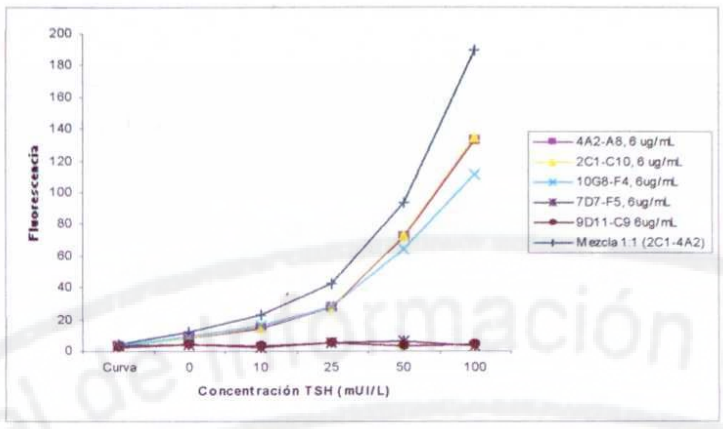


***Figura 1**. Reconocimiento de TSH en solución por los AcM. Cada AcM 2C1-G10, 4 A2-A8, 10G6-F4, 9D11-C9 y 71)7-T5, unidos al soporte sólido a 5 ug/mLy ¡a mezcla 2C1-G10y 4 A2-A8 a una relación 1:1.*

Se pudo constatar que los AcM 2C1-G10, 4A2-A8 y 10G8-F4 unido a las placas de poliestireno mantienen el reconocimiento por la TSH en solución mientras que los AcM 9D11-C9 y 7D7-F5, no reconocen la TSH en solución.

Al realizar el análisis de las pendientes obtenidas, así como el mejor ajuste de la fluorescencia de cada punto de las curvas estándar relacionándola con los valores de concentración se obtuvieron los siguientes resultados empleando el programa STATGRAPHY

Tabla 9. *Análisis del reconocimiento de la TSH en solución por los diferentes AcM anti p-ISH.*

Curva TSH (mUI/L)	**Ac.policlonal**	**AcM 4A2-A8**	**AcM 2C1-G10**	**AcM 10G8-F4**	**Mezcla (1:1) 4A2-2C1**
0	3	3.15	3	3.3	3.75
10	10.9	8	10.3	8.7	12.2
25	21.55	15.15	14.8	13.6	22.7
50	37.8	27	23.1	21.1	42.3
100	81.75	68.15	50.5	52.6	92.9
200	147.65	130.5	107.6	100.4	189.15
R^2	1	1	1	0.995	1
Dócima para la falta de ajuste	Fcalc=28.78**	Fcalc=27.96**	Fcalc=19.03**	Fcalc=90.23**	Fcalc=2.91

****Para la dócima de la pendiente la $F_{tab(1,2)}$=4.96. **Para la dócima de la falta de ajuste $F_{tab(2.4)}$=4.53.α<0.05).***
En rojo la condición donde se obtuvo una adecuando ajuste de las curvas.

De estos resultados se concluyo que el mejor ajuste de la curva estándar con una excelente pendiente y valor de $R^{2=}$1, es la mezcla de los AcM anti β-TSH, 2C1-G10 y 4A2-A8.

En el caso de los AcM anti-Tripsina se evaluó el reconocimiento por la tripsina-biotina una vez que estos se encontraban unidos a las placas de poliestireno (Figura 2).

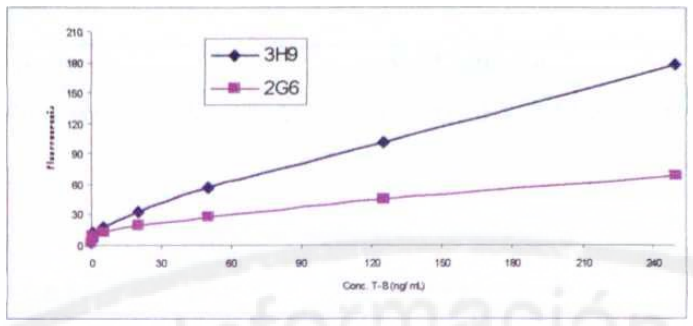


***Figura** 2. Reconocimiento de Tripsina en solución por los AcM. Cada AcM 3H9y 2G6, unidos al soporte sólido a una concentración de 5 µg, mL.*

Se pudo evidenciar que el AcM 3H9 presenta un reconocimiento mayor por la tripsina que el AcM 2G6 cuando este se encuentra fijado a la fase sólida. Al realizar el análisis para la dócima de la pendiente y ajuste de la curva estándar se obtuvo que el AcM anti-Tripsina 3H9 presento un valor de R^2=l con una excelente pendiente y buen ajuste. Siendo significativa para $\alpha<0.05$ el comportamiento del recubrimiento con el AcM 2G6. con relación al ANO VA para la falta de ajuste.

4.4. Determinación del reconocimiento de epítopos.

Para conocer si los AcMs seleccionados reconocían el mismo epitopo o epítopos relacionados espacialmente, se realizaron experimentos de competencia. Estos experimentos indicaron que los AcM anti J3-TSH reconocen 2 epítopos e la subunidad (3- TSH como se observa en la tabla 10. Los AcMs anti B-TSH 10G8-F4 y 4A2-A8 reconocen el mismo epitopo, mientras que el AcM 2C1-G10 reconoce un epitopo diferente. El ensayo de inhibición donde las placas se recubrieron con los AcM 9D11-D1 y 7D7-F4 no se obtuvo señal de fluorescencia.

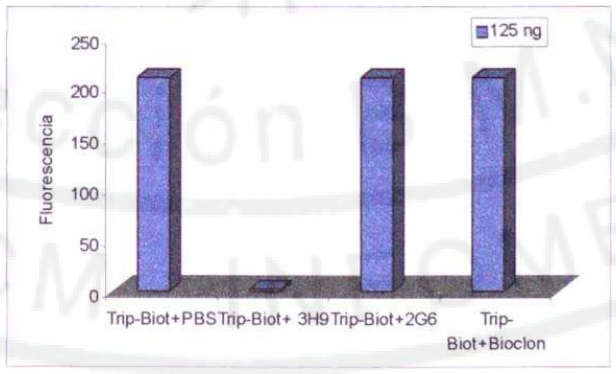
Tabla 10. Ensayo de competencia entre los diferentes AcM

AcM recubrimiento	AcM solución 4 A2-A8	2C1-G10	10G8-F4	7D7-F4	9D11-D1
4 A2-A8	88.2	27.3	82.9	33	40
2C1-G10	10	82	5	5	5
10G8-F4	17.6	60	85	80	69

Se expresan los porcentajes de inhibición en cada caso. Porcentaje de inhibición se calculó según la siguiente fórmula: 100-(Flu_λ x100 Flu_{max}). Donde Flu_λ= fluorescencia de la mezcla de Anticuerpo-Antígeno, Flu_{max} fluorescencia del antígeno. En rojo los porcentajes de inhibición superiores al 60 %.

El ensayo de competencia entre los AcM anti-Tripsina por la Tripsina-biotina se observa en las figuras 3 a y b cuando las placas se encuentran recubiertas con el AcM 3H9 o AcM 2G6 y empleando como control un AcM comercial especifico a la Tripsina de la firma Bioclon, Australia

A



B

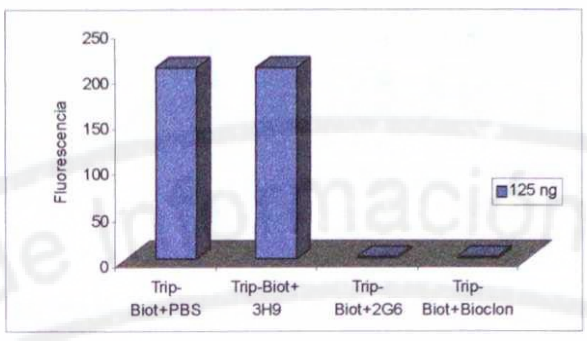


Figura 3. A: Ensayo de competencia entre el AcM 3H9 (5fµg/mL) unido a la fase sólida y el AcM 2G6 desplazante (10µgmL). Como control se empleó un AcM anti Tripsina comercial.. B: Ensayo de competencia entre el AcM 2G6 unido a la fase sólida y el AcM 3H9 desplazante. Como control del ensayo se utilizó un AcM anti Tripsina comercial. La tripsina-biotina se utilizó a una concentración de 125 ng/mL y se preincubó con el AcM desplazante durante I h a 37°C. Luego la mezcla (AcM desplazante-Tripsina-Biotina, se aplicó en la placa con el ler AcM y se detectó la tripsina unida a la placa vía ler AcM.

Este ensayo de competencia demostró que los AcM 3H9 y 2G6 reconocen diferentes epítopos de la Tripsina. Este resultado fue corroborado con la prueba de Dot Blot (Figura 4). El AcM 3H9 reconoce tanto la Tripsina en condiciones nativas como después de la reducción con p-mercaptoetanol. El AcM 2G6 solo mantiene el patrón de reconocimiento cuando la Tripsina se encuentra en condiciones nativas.

B

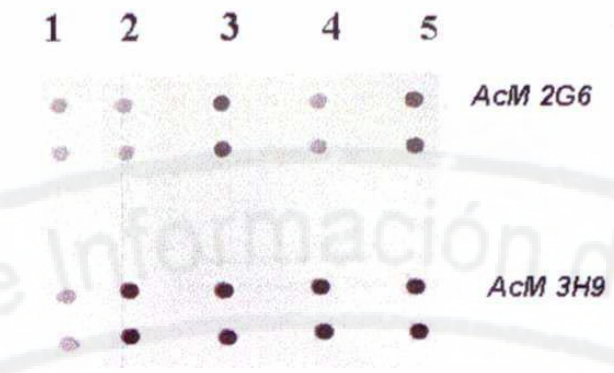


Figura 4. *Dot Blot donde 1 es SAB (Control negativo), 2 es Tripsina-1 comercial reducida, 3 es Tripsina-1 comercial nativa, 4 es Tripsina purificada reducida y 5 es Tripsina purificada nativa.*

4.5. Reconocimiento de la Tripsina por los AcM 2G6 y 3H9 biotinilados.

Además de demostrar que los AcMs mantienen el reconocimiento cuando estos se encuentran unidos a las placas de poliestireno, para poder ser utilizado como anticuerpo marcado, resulta imprescindible demostrar que una vez biotinilado los AcM 2G6 y 3H9 mantiene el reconocimiento por la Tripsina.

La figura 5, evidencia que se mantuvo el reconocimiento por la Tripsina unida a las placas de poliestireno por el AcM 2G6-biotina y 3H9-biotina. Al realizar el análisis del comportamiento de la curva de calibración se obtuvo un valor de R^2 =1 con una excelente pendiente y ajuste al realizar el ANOVA para la dócima de la falta de ajuste con una α <0.05.

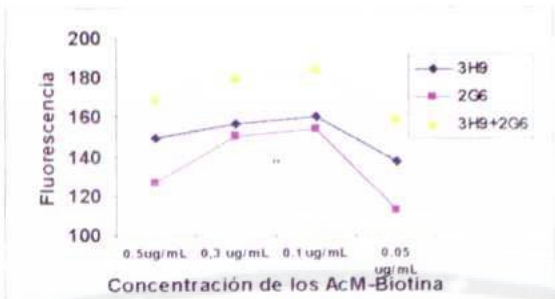


Figura ***5. Reconocimiento de Ios AcMs 2G6-biotina y 3H9-biotina así como la mezcla de estos por la tripsina unida a las placas de poliestireno recubiertas con el anticuerpo policlonal a 6 µg-mL (Punto 1241 ng mL de la curva estándar). Se evaluaron diferentes concentraciones del AcM 2G6-Biotina que oscilaron desde O.O5µg mL hasta 1 µg mL. Como control negativo se empleó un AcM biotinilado no relacionado perteneciente a la misma subclase.***

4.1. Determinación de la constante de afinidad.

La constante de afinidad (Kaf) de los AcM especifícos a la TSH o la Tripsina se determino como se explico anteriormente utilizando un UMELISA indirecto Los valores de Kaf obtenidos se encontraban en el rango 10 -10^{10} L/moles. En las tablas 11 y 12. se muestran los resultados de la Kaf promedio obtenida en cada uno de los tres ensayos consecutivos correspondientes a cada AcM.

Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas
Dirección B M V
CNICM INFOMED

AcM	Kaf.
4 A2-A8	$6.72+3.26 \times 10^{9;}$ L/M
2C1-G10	$1\ 79\pm 0.91 \times 10^{10}$ L/M
I0G8-F4	$1\ 70\pm 0.13 \times 10^{8}$ L/M
7C10-C9	$1.99\pm 0.76 \times 10^{8}$ L/M
7D7-F4	$2.80\pm 0.41 \times 10^{7}$L/M
9D11 -DI	$1{,}66\pm 0.32 \times 10^{7}$ L/M
4 A2-A8 y 2C1-GI0	$1.95\pm 0.76 \times 10^{11}$ L/M

Kaf: Constante de afinidad

Tabla 12. ***Valores de constante de afinidad de los AcMs anti Tripsina.***

AcM	Kaf.
3H9	$1{,}790 \pm 0.24 \times 10^{9}$ L/M
2G6	$2.065 \pm 0.71 \times 10^{9}$ L/M

Kaf: Constante de afinidad

4.7. Determinación del punto isoleléctrico.

La determinación del punto isoeléctrico realizada a los AcMs 4A2-A8 y el 2C1-G10 (anti β-TSH) y los AcMs 3H9 y 2G6 (anti-Tripsina) se recoge en la tabla 13 y 14. Este método demostró que los AcMs presentan cuatro bandas de clonalidad que se mueven en un rango de pH característico.

***Tabla** 13. Rangos de pH obtenidos en la focalización isoeléctrica de los AcM 4 A2-AS y 2CI-GI0 anti B- TSH.*

AcM	**pl.**
4 A2-A8	6.25-6.55
2C1-G10	6.52-6.7

p.I: Punto isoeléctrico

***Tabla** 14. Rangos de pH obtenidos en la focalización isoeléctrica de los AcM 2G6 y 3H9 anti Tripsina.*

AcM	**pl.**
2G6	6.2-65
3H9	5.7-6.2

p. I: Punto isoeléctrico

4.8. Estudio de los AcMs como inmunoligando.

4.8.1. Selección del AcM con características adecuadas para inmunopurificar TSH a partir de Hipófisis mediante un sistema UMELISA. Purificación por Inmunoafinidad.

El ensayo para la determinación de la capacidad de captura y elución de la TSH por los anticuerpos monoclonales mostró que en el caso del 2C1-G10 fue capaz de capturar y eluir el 27 % de la TSH, el 4A2-A8 en estas mismas condición de eluyo el 35 % de la TSH capturada y con el AcM 10G8-F4 eluyó el 91 % de la TSH.

Al realizar este mismo ensayo empleando en el recubrimiento la mezcla de los AcM 2C1- G10 y 4A2-A8 se obtuvo que estos fueron capaces de capturar y luego eluir el 17,8 % de la TSH.

Dada las características del AcM 10G8-F4 el cual presenta una constante de afinidad moderada y que reconoce un determinante conserva en la molécula en condiciones nativas.

así como el rendimiento obtenido durante el proceso de purificación (dato no mostrado), decidimos emplearlo en la purificación de la TSH por inmunoafinidad El porcentaje de unión del AcM 10G8-F4 a la matriz cromatográfica fue superior al 98%. El cromatograma obtenido en la purificación de TSH se muestra en la figura 6.

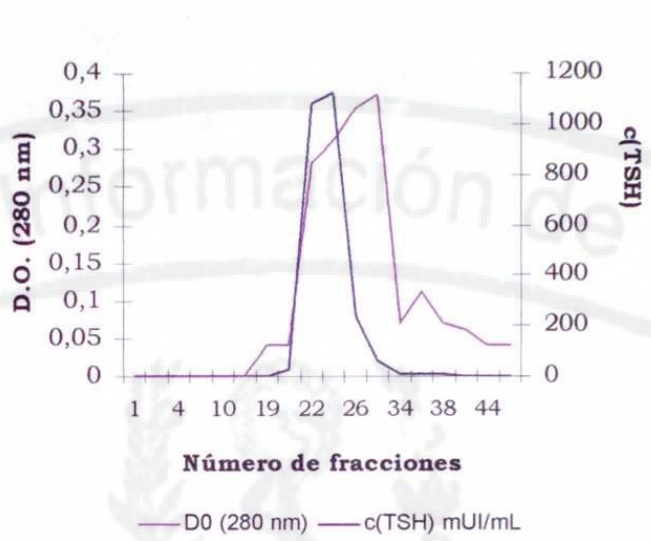
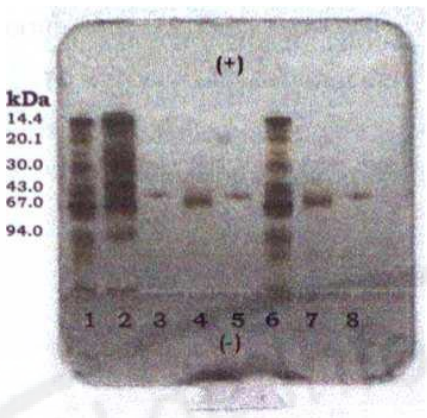


Figura *6. Perfil cromatográfico típico de Ia obtención de la TSH por cromatografía de inmunoafinidad en Sepharose 4B-AcM anti βTSH. <u>Condiciones de corrida:</u> Muestra: extracto de hipófisis, Solución de equilibrio: SFS, 0.15 M, pH 7.2, Solución de elución: Glicina 0.2 mol/L, pH 2.8, Flujo: 30 mL min, Detección: Δ280nm.*

En el eluato de la purificación se recupera la TSH con más del 90% de pureza, corroborada mediante una electroforesis de proteínas en gel de SDS-poliacrilamida al 12.5% (Figura 7), el recobrado es cercano al 40% y no se detectan anticuerpos de ratón por desprendimiento de la matriz cromatográfica.



Leyenda:

Posiciones 1 y 6: Proteínas patrones de bajo peso molecular.

Posición 2: Extracto de hipófisis.

Posiciones 3, 5 y 8: TSH humana comercial.

Posiciones 4 y 7: TSH humana purificada.

***Figura** 7. Elecíroforesis en ge/ de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) de la muestra de TSH purificada (Tinción con plata).*

Los resultados del empleo de estos AcM en la estandarización del UMELISA TSH Neonatal y UMELISA TSH Suero se recogen en el anexo 1

4.8.2. Selección del AcM con características adecuadas para inmunopurificar Tripsina a partir de páncreas mediante un sistema UMELISA. Purificación por inmunoafinidad.

La selección de uno de los AcMs obtenidos contra la tripsina como inmunoligando, se basó en el rendimiento de AcM por volumen de líquido ascitico, además se evaluó la capacidad de captura y elución de la Tripsina empleando para la elución del antigeno glicina 0.2mol/L, pH 2.8, y como control se empleó SFS 0.15mol/L, pH 7.2. Se observo que el AcM 3H9 fue capaz de capturar y eluir el 79,3% del antigeno biotinilado, mientras que el AcM 2G6 en estas mismas condiciones permitió la elución del 81,6% del antigeno biotinilado.

Dada las características del AcM 3H9 que reconoce un determinante que se conserva en la molécula tanto en condiciones nativas, como después de la reducción, asi como el mayor rendimiento obtenido durante el proceso de purificación (dato no mostrado), decidimos emplearlo en la purificación de la tripsina por inmunoafinidad.

El porcentaje de unión del AcM 3H9 a la matriz cromatográfica fue superior al 98%. El cromatograma obtenido en la purificación de Tripsina se muestra en la figura 8

En el eluato de la purificación se recupera la tripsina con más del 90% de pureza, corroborada mediante una electroforesis de proteínas en gel de SDS-poliacrilamida al 12.5% (Figura 9, 10), el recobrado es cercano al 40% y no se detectan anticuerpos de ratón por desprendimiento de la matriz cromatográfica.

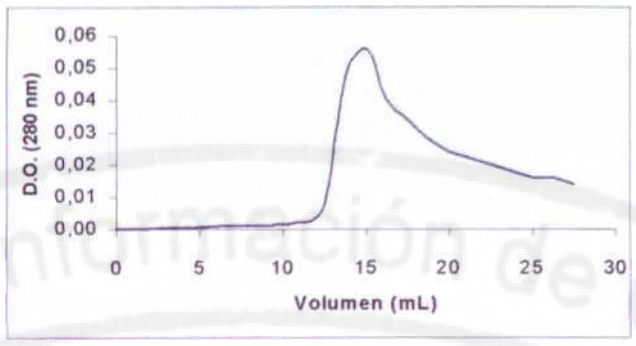


Figura. *8. Cromatografía de afinidad empleando como fuente extracto de páncreas. Condiciones de corrida: Muestra: extracto pancreático, Solución de equilibrio: SFS, 0.15 M, pH 7.2, Solución de elución: Glicina 0.2 mol/L, pH 2.8, Flujo: 30 mL min, Detección: A 280nm.*

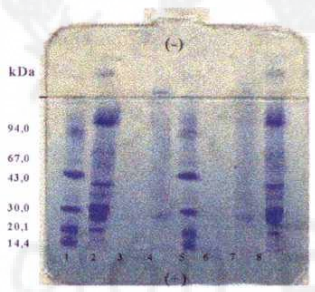


Figura 9. *Electroforesis en gel de poliacrilamida en el PhastGel Gradiente 8-25 de la purificación de la tripsina por inmunoafinidad. Leyenda: Posiciones 1 y 5: Proteínas patrones de bajo peso molecular, posiciones 2 y 8: Muestra de polvo de acetona pancreático, Posiciones 4 y 7: Tripsina humana purificada (Tinción phast-GEL™BlueR).*

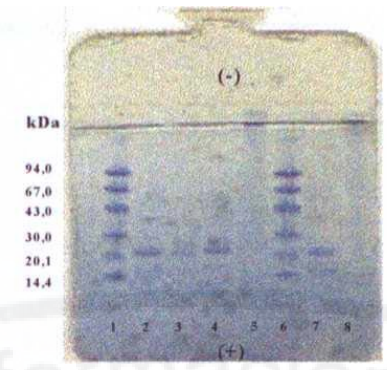


***Figura 10**. Electroforesis en gel de poliacrilamida en PhastGel Gradiente 8 25 en presencia de SDS y β-mercaptoetanol (SDS PAGE), de la purificación de la tripsina por inmunoafinidad. Leyenda: Posiciones 1 y 6: Proteínas de bajo peso molecular, Posiciones 2 y 7: Tripsina humana purificada, Posición 3: Tripsina bovina comercial, Posición 4: Tripsinógeno bovino comercial. (Tinción phastGEL™BlueR).*

Se detectó en el SDS PAGE una banda que correspondía a 24 kD que coincide con lo descrito previamente para esta proteína (Paju y cols, 2000). En la fracción purificada (posiciones 2 y 7), se evidenció una banda de menos de 20 kD, lo que se correspondió con un producto de la degradación del Tripsinógeno en el extracto de pancreas al detectarse en la muestra inicial (Paju y cols, 2000).

4.9. Obtención de anticuerpos policlonales en conejo empleando la Tripsina purificada.

4.9.1. Evaluación del titulo de los Conejos

En la tabla 14 y figura 11 se recogen los resultados de los títulos de anticuerpo especifico obtenidos en los dos conejos inmunizados. El nivel de corte se calcula como 3 veces el control negativo.

Tabla 14. Títulos de AC específicos concluido en el esquema básico de inmunización de los *conejos.*

Dilución	Q8	Q7
Control Negativo	2.54	2.87
128000,00	20.00	12.00
64000,00	38,00	21,00
32000,00	70,00	32,00
16000,00	130,00	59,00
8000,00	200,00	128,00
4000,00	200,00	200,00
2000,00	200,00	200,00
1000,00	200,00	200,00

Subrayado la última dilución de! suero de conejo anti Tripsina positiva en la titulación.

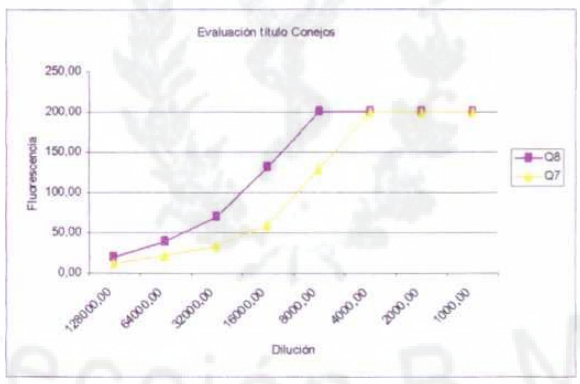


Figura 11. *Curvas de anticuerpos específicos.*

En la evaluación de la reactividad cruzada de los antisueros de conejo anti Tripsina se observó reconocimiento por la tripsina porcina en ambos animales y el antisuero correspondiente al conejo Q8 se observó además, reconocimiento por el quimiotripsinógeno bovino. No se encontró reactividad cruzada contra la quimiotripsina humana. El nivel de corte empleado es tres veces el control negativo (Tabla 15).

***Tabla** 15. Fluorescencia obtenida en la evaluación de la reactividad cruzada de los an ti sue ros de conejo anti Tripsina humana.*

Antígeno	**Q8**	**Q7**
a2 Macroglobulin (human)	1,62	2,2
o^iAntitrypsin (human)	6,5	5,4
Chymotrypsin (human)	15,7	6.5
a-Chyniotrypsinogcn A (Bovine) Type **II**	38	1,5
a-Chymotrypsinogen A (Bovino) Type **I-S**	1,5	1,6
a-Chymotrypsinogcn A (Bovine) Type **VII**	10	1.5
Trypsinogen (bovino)	8,5	23
Trypsin Type **IX** (Porcine)	52	111
Trypsin Type **XIII**	2,6	15
Phospholipase A2 (Bovine)	1,4	1,52
Trypsin humman	210	210
Control negativo	11,8	12.8

Subrayado el resultado positivo del suero de conejo anti en la prueba de reactividad cruzada.

Resultados de una evaluación preliminar de un ensayo empleando placas recubiertas con los AcM separados y en mezcla y utilizando los sueros de conejos a una dilución 1:1000 y el conjugado anti IgG de conejo 1:10000 se observan en la tabla 16 y figura 12.

***Tabla** 16. Análisis de las diferentes variantes de recubrimiento para el UMELISA TIR Neonatal empleando los anticuerpos monoclonales a 5 ug/mL independientes o mezcla de estos a una relación 1:1.*

Calibradores	**Q8-3H9**	**Q7-3H9**	Q8-**3H9+2G8**	**Q7-3H9+2G8**	**Q8-2G6**	**Q7-2G6**
A	4,47	5,62	9,20	9,10	4.57	4.64
B	21,10	19,20	35,07	33,65	19.10	19.90
C	43,85	37,42	65,79	68,59	39.02	40.94
D	73,40	69,44	102,05	105,78	61,32	67,19
E	104,51	103,58	118,47	120,93	91,92	96.78
F	147,29	143,25	155,19	158,14	124.90	**138.87**
R2	0,94	0,95	0,85	0,83	0.94	0.95
Dócima para la falta de ajuste	Fcale=5,32	Fealc=6,26	Fcalc=2,037	Fcalc=l,78	**Fcalc=7,26**	**Fcalc=7.()l**

Valor de Fpara el ANOVA ajuste F tabulada =4.53

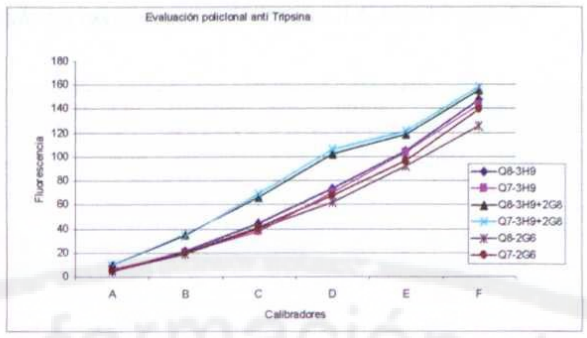


Figura 12. *Curvas obtenidas empleando el anticuerpo policlonal como conjugado, placas re cubiertas con los AcM independientes y mezclas de estos a una relación 1:1.*

Se pudo constatar un efecto cooperador de la mezcla de anticuerpos recubiertos con relación a los anticuerpos recubiertos de forma independiente. Este resultado coincide con lo observado para TSH al emplear mezclas de anticuerpos monoclonales en el recubrimiento.

Resultados de la evaluación preliminar de un ensayo empleando placas recubiertas los anticuerpos pliclonales y empleando para la elución de la muestra los AcM separados y en mezcla y utilizando el conjugado Estreptavidina/ fosfatasa alcalina 1:5000 (la tabla 17 y figura 13).

Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas
Dirección B M.N
CNICM INFOMED

Curva TIR (ng/mL)	Q8 5ug/mL + 2G6-3H9 biot.	Q8 10ug/mL + 2G6-3H9 biot.	Q8 15ug/mL +2G6-3H9 biot.	Q8 5ug/mL + 2G6, biot.	Q8 10ug/mL + 2G6 biot.	Q8 15ug/mL + 2G6 biot.
A	**1,95**	1,74	1,83	1.64	1,62	1,90
B	25,76	29,56	28,80	20,39	22,70	24,93
C	56,27	61,63	57,56	44.23	41,44	55,51
D	77,87	82,42	81,64	57.45	60,81	63,64
E	84,37	119,38	119,80	74,94	99,19	90,52
F	**119,15**	136,79	138,76	106,67	114,40	116,74
R2	0,81	0,83	0,85	0,89	0,88	0,86
Dócinia para la falta de ajuste	Fcalc=2,79	Fcalc=2,03	Fcalc=2.21	Fcalc-6.11	Fcalc=4,02	Fcalc=3,78

Valor de la F tabulada para el A NOVA para la falta de ajuste F tabulada =4.5. En rojo las curvas con una comportamiento adecuando con relación al ajuste.

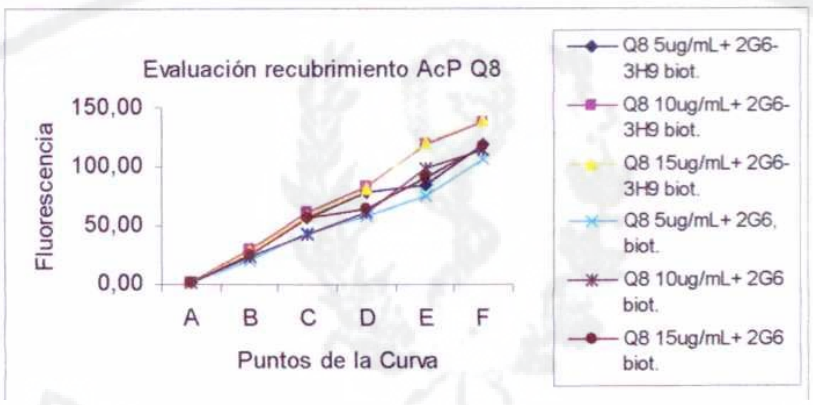


Figura 13. *Curvas obtenidas empleando el anticuerpo policlonal fijado a la fase sólida a una concentración de 4 ug/mL, los AcM se emplearon biot i ni lados en una relación 1:1, el conjuado Estreptavidina fosfatusa alcalina se utilizó a una dilución 1:10000.*

Se observó que en la variante donde la elución de la Tripsina de los ponches se realizo con la mezcla de los anticuerpos monoclonales se obtuvieron curvas con ajuste y buena relación lineal.

De los resultados obtenidos podemos predecir un buen comportamiento de los anticuerpos policlonales tanto como Ac de recubrimiento como Ac marcados con biotina.

Queda por evaluar el comportamiento de estos ensayos empleando muestras de pacientes y neonatos normales.

Los resultados preliminares de la evaluación de AcM y policlonales para ser empleados en la estandarización del UMELISA TIR Neonatal se recogen en el anexo 2.

4.10. Resultados del programa Cubano para la detección de Hipotiroidismo congénito.

Los resultados globales del programa cubano se expresan en la tabla 18. Se han estudiado 2 186152 recién nacidos y se han diagnosticado 658 HC en las primeras horas de vida, para una frecuencia global de 1:3322. También se muestra que a pesar de que hay 172 niños pendientes de reevaluación por no haber alcanzado los 3 años de edad, se han detectado un total de 284 (47,09%) niños como HC permanentes y 203 (33.66%) transitorios, para una frecuencia de 1:7 698 y 1:10 769, respectivamente.

***Tabla** 18. Resultados Globales del Programa Cubano para el diagnóstico del Hipotiroidismo Congénito.*

Años	RN Estudiados	Cobertura	Frecuencia	Detectados	Posit. Cordón	Posit. Talón	Falsos Positivos	Especificidad	V.P. Positivo
1986/1996	1377278	83,0	3074	422	25308	449	24860	98,2	1,80
1997	144737	95,1	2857	51	1553	42	1511	99,0	2,70
1998	143000	97,5	3772	39	1893	37	1854	98,8	1,95
1999	146910	98,0	4804	30	1385	30	1355	99,1	2,10
2000	138577	98,0	3043	43	449	43	406	99,7	9,60
2001	137103	99,1	3428	40	765	40	725	99,5	5,20
2002	139482	99,1	5365	26	665	28	639	99,5	3.90
TOTAL	2227087		3763	658	32018	669	31350	98,6	2,10

Los resultados obtenidos a partir del año 1999 son empleando los AcM en el UMELISA TSH obtenidos en este trabajo.

Los resultados de la cobertura desde el comienzo del programa se recogen en la Tabla 19.

Tabla 19. Cobertura del programa desde los inicios del Programa Nacional de prevención del Hipotiroidismo Congénito.

ANOS	RN Estudiados	Cobertura
1986/96	1377278	83
1997	144737	95
1998	143000	97
1999	146910	98
2000	138577	99
2001	137103	99
2002	139482	99
TOTAL	2186152	93

RN: Recién nacidos.

En el caso de la eficacia del programa desde el año 2000 se cuenta con un tiempo promedio de 19 días en la terminación del proceso e inicio de la terapéutica, aunque hay provincias que están en solo 7 días. Los resultados de la especificidad de la prueba asi como el valor predictivo positivo se muestran en las Figura 14 y 15.

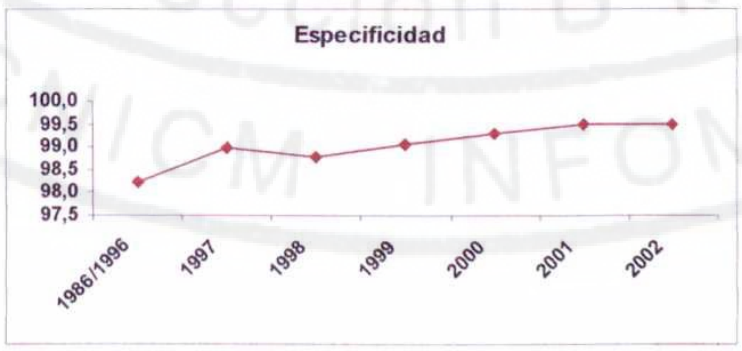


Figura 14. Especificidad del UMELISA TSH en el Programa Nacional.

Figura 15. Valor predictivo positivo obtenido desde la implantación del Programa Nacional de detección precoz del Hipotiroidismo Congénito.

4.11.- Resultados de la Utilización del UMELISA TSH Neonatal en Programas de Pesquisa Neonatal en Brasil y México

4.11.1.- Resultados del programa en Minas Gerais, Brasil (Test do pezinho)

Se han estudiado en el período de 1993-2002 más de 2 millones recién nacidos de los cuales se han detectado 426 niños hipotiroideos para una frecuencia de la enfermedad de 1:4 480 recién nacidos, similar a la reportada a nivel mundial (Committee on Genetics, 1996). La cobertura total del programa en el estado se ha ido incrementando de 44.4% en el año 1993; 60.2% en el 1995; 70% en el 1996 hasta llegar al 90% desde el año 1999. La estrategia adoptada ha permitido la identificación e inicio del tratamiento de los casos con Hipotiroidismo Congénito primario con una edad promedio de 35,4 días. Hasta el momento no se ha reportado ningún caso como falso negativo.

4.11.2. Resultados del programa del IMSS en México.

Se han estudiado en el período comprendido de 1997-2002 un total de 598 724 recién nacidos de los cuales se han detectado 180 niños para una frecuencia total de la enfermedad de 1:3322 y en regiones como Yucatán la incidencia es de 1: 1200 similar a la prevalencia encontrada en grupos hispanos que viven en los EUA (Therrell y cols, 1982). El programa tiene una cobertura actual de un 60% de los nacimientos. Otros investigadores mexicanos (Vela y cols, 1999) reportan una incidencia de HC de 1:2458 en 1 140 364 recién nacidos estudiados en el período comprendido entre 1989 y 1997, ellos observaron determinadas

regiones con alta incidencia de la enfermedad que se correspondían con zonas de deficiencia de yodo.

4.12. Análisis de los costos de producción de los AcMs anti β- TSH.

No estaría completo este trabajo si no se realizara un análisis de la influencia en los costos de producción del UMELISA TSH Suero y Neonatal desde la sustitución de los anticuerpos policlonales por los AcM.

En la tabla 20 se recogen los gastos incurrido durante la obtención y caracterización de los AcM anti β-TSH en la etapa de investigación.

***Tabla** 20. Desglose de los gastos incurridos durante la obtención de los AcM anti β-TSH.*

Concepto	**Costos**
Salarios	
Materias Primas	20 000 USD
Otros	

En la tabla 21 se observa el costo de producción de los AcM para la realización de la producción de los estuches UMELISA TSH (suero) y UMELISA TSH Neonatal

***Tabla** 21. Costo de producción de ¡os AcM anti β-TSH (Enero 1999-Julio2003).*

No de determinaciones producidas	**mg. de AcM producidos**	**Costo de producción (S)**
82 770 176	2497	4155.92

De haber sino necesario la producción de anticuerpos policlonales para realizar la producción de las 82 770 176 determinaciones se hubiera invertido 11504.26 $. Esto es sin tener en cuenta el costo de mantenimiento de los carneros (especie animal empleada para la

producción de los anticuerpos policlonales) y el procedimiento de purificación de los anticuerpos policlonales lo cual incrementaria en cerca de un 25% el costo de producción En la tabla 22 se analizan los gastos por concepto de compra de AcM de no disponerse de los AcM anti P-TSH para garantizar la producción en el período Enero 1999-Julio3003.

***Tabla** 22. Precio en el mercado de AcM para la producción en el período Enero 1999- Julio 2003.*

mg. de AcM necesarios	**Precio en el mercado ($)**
2497	1 050 000

En la tabla 23 se reflejan los ingresos producidos de las ventad de los estuches UMELISA TSH (suero) y UMELISA TSH Neonatal.

***Tabla** 23. Ingresos por concepto de ventas de los estuches UMELISA TSH Suero y UMELISA TSH Neonatal.*

Empleo	**Ingresos**
Programa Nacional	1 millón de MN
Exportaciones	3.8 millones de USD

4.13. Impacto del programa de Hipotiroidismo Congénito

En el caso particular del HC varios estudios se han pronunciado con relación a este tema. En E.U.A. y Canadá hay consenso de que el beneficio mayor de estos programas es el aporte humano que se brinda a la familia que hubiera tenido que sufrir esta penosa situación, sin embargo, hay varios factores de orden financiero donde se encuentran los costos y la utilidad de la inversión, teniendo en cuenta los gastos que ocasionaría el enfermo de no haberse diagnosticado previamente.

En Cuba dada sus características de tener una atención médica socializada y un bloque científico-productivo de procedimientos de avanzada para el apoyo a los servicios de salud, como el Centro de Inmunoensayo, el análisis se basa fundamentalmente en dos aspectos diferenciados: El ahorro a la economía del país por la importación de la infraestructura, reactivos, asistencia técnica, asesoramiento, etc. que se hace necesaria con el uso de tecnología de punta para los pesquisajes masivos que detectan y confirman los recién nacidos con HC y el ahorro por el gasto en que se hubiera incurrido en la atención médica especializada y la educación diferenciada de estos niños, de por vida.

Para el análisis económico se tuvo en cuenta el costo de la atención de un niño hipotiroideo no diagnosticado y el número de niños diagnosticados desde el comienzo del Programa Nacional de prevención del Hipotiroidismo Congénito, obteniéndose el siguiente resultado.

Costos en la atención de un niño hipotiroideo no diagnosticado: $ 27 900

Cantidad de hipotiroideos detectados 658. Costo total: $ 18 358 200

Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas
Dirección B M.N
CNICM INFOMED

5. DISCUSIÓN

Desde la década del 80 del pasado siglo se han venido desarrollando en nuestro Centro trabajos relacionados con el desarrollo de ensayos inmunoenzimáticos para el establecimiento de programas de pesquisaje masivo. Entre ellos se destacan los trabajos relativos a la estandarización de un ensayo inmunoenzimático de principio “sandwich” para la detección del antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B (HBsAg), el UMELISA HBsAg PLUS, empleado anticuerpos policlonales y monoclonales donde los problemas de especificidad y sensibilidad se resolvieron con la introducción de AcM específicos y de alta afinidad generados con este fin (Acosta y cols., 2000a). A partir de los resultados obtenidos con el UMELISA HBsAg PLUS a través de la sustitución de los anticuerpos policlonales por AcM se logró un ensayo con parámetros de sensibilidad y especificidad acorde a los ensayos disponibles en el mercado.

Partiendo de estos resultados nos planteamos la posibilidad de sustituir los anticuerpos policlonales anti β-TSH utilizados en el recubrimiento de las placas para el UMELISA TSH por AcM y además lograr la purificación de la TSH imprescindible en el proceso productivo de los AcM y del estuche diagnóstico.

El desarrollo de técnicas de UMELISA para el diagnóstico neonatal comenzaron en nuestro Centro en 1986 a partir del diseño de un inmunoensayo enzimático de tipo ‘'sandwich" soportado en el Sistema Ultra Micro Analítico (SUMA) el que constituyó la base analítica que permitió el desarrollo del Programa Nacional de Detección Precoz de HC, basado en la medición de TSH en muestras de suero de cordón en neonatos (Fernández y cols., 2002, Carlos, 1998).

En este ensayo, como planteamos anteriormente, se empleaban para el recubrimiento de las placas de UMELISA anticuerpos policlonales obtenidos a partir de la inmunización de carneros con la subunidad β-TSH comercial. Las dificultades inherentes al proceso productivo de los antisueros de carnero, así como la necesidad de la compra en divisas de un antígeno con precios muy elevados para mantener esta producción fue una de las motivaciones para el desarrollo de este trabajo.

Adicional mente al uso expuesto anteriormente nos propusimos la obtención de AcM específicos, que permitan la purificación por inmunoafinidad de la TSH humana con la

finalidad de su empleo en el recubrimiento de las placas de UMELISA indirecto para la titulación de los sobrenadantes de los hibridomas, así como la certificación de los líquidos ascíticos específicos a la TSH.

De la misma manera determinamos realizar la purificación de la Tripsina humana dada la necesidad de disponer en el país de un ensayo para el diagnóstico neonatal de la FQ, para lo cual resultaba indispensable la obtención de AcM anti Tripsina para el diseño de un ensayo inmunoenzimático de tipo "sandwich" para la determinación cuantitativa de la tripsina inmunoreactiva (TIR), marcador bioquímico que en niveles elevados en el neonato correlaciona con la presencia de la enfermedad (Crossly y cols, 1979). Adicionalmente y siguiendo la misma metodología descrita anteriormente, evaluamos la capacidad de los AcM anti-Tripsina obtenidos para la realización de la purificación por inmunoafinidad con la finalidad de su empleo en el recubrimiento de las placas de UMELISA indirecto para la titulación de los sobrenadantes de los hibridomas, así como la certificación de los líquidos ascíticos específicos a la Tripsina.

5.1. Obtención y caracterización de los AcM anti β-TSH y anti-Tripsina.

Las características intrínsecas de los AcM y del proceso mediante el cual se generaron les confirieron una serie de ventajas potenciales para su uso en el diseño de ensayos inmunoenzimáticos. Primero, la posibilidad de seleccionarlos con una alta especificidad por un epítopo particular de la molécula hace que al ser empleados para en el recubrimiento de la fase sólida garantice una elevada especificidad en el ensayo donde se utilicen (Gavilondo, 1995).

Otra característica importante es la afinidad de los AcM, la que se obtuvo mediante una selección bien dirigida AcM con u valor de constante de afinidad entre 10^6-10^{12}L/moles. Los AcM con una constante de afinidad alta (10^9-10^{12}L/moles) son ideales para su aplicación en el diseño de ensayos inmunoenzimáticos, ya que permiten el incremento de la detectabilidad (Acosta y cols, 2000a; Baluja y cols, 2002). A estos dos aspectos se unen las otras muchas ventajas de los AcM relativas a su reproducibilidad de lote a lote, la inagotabilidad real de su fuente, la ausencia de reactividades cruzadas, elemento que los hace muy atractivos el diseño de ensayos de UMELISA y además pueden ser empleados

para la purificación de antígenos que se utilizan en la preparación de los antígenos necesaria en los ensayos de tamizaje (Gavilondo, 1995).

La selección de los anticuerpos con especificidad y afinidad definida se llevó a cabo durante la pesquisa de los hibridomas. Es por ello que el desarrollo de un sistema adecuado para la identificación y la selección de los hibridomas secretores de AcM específicos, fue uno de los aspectos principales a tener en cuenta. El sistema de pesquisaje estuvo en correspondencia con la utilización final a que fueron destinados los AcM. Esto incluye desde el fundamento del método hasta las condiciones generales del ensayo. Otro elemento importante fue la superficie que se empleo en el sistema de selección del AcM. Se conoce que algunas superficies pueden alterar groseramente el pH óptimo debido a efectos de carga locales y algunos AcM tienen dependencia considerable del pH, de modo tal que cambios ligeros en una unidad de pH podrían determinar la selección entre el AcM positivo y el negativo (Gavilondo, 1995).

En anteriores trabajos realizados por nuestro grupo se han aplicado dos sistemas de tamizaje diferentes en cuanto a la forma de presentación del antígeno. En uno el antígeno se superficie del virus de la Hepatitis B (HBsAg) se presentó en solución a los anticuerpos que se encontraban fijados sobre las placas de UMELISA, mientras que el otro sistema se presentó el HBsAg fijado a las placas de UMELISA. De la aplicación del primer método se seleccionaron AcM que reconocían eficientemente el HBsAg en solución, mientras que el segundo se reconocía el HBsAg tanto en solución como fijado a las placas (Acosta y cols., 2000a). Ambos métodos fueron útiles para seleccionar AcM que reconocían al HBsAg en solución luego de encontrarse los AcM tanto fijados a las placas como AcMs biotinilados, resultado corroborado en los ensayos utilizados para la selección de los hibridomas secretores de AcM específicos a la p-TSH y Tripsina.

Partiendo de la experiencia acumulada para la obtención de AcM no solo para el HBsAg sino también para la gonadotropina corionica humana (hCG), determinamos emplear el principio indirecto presentando los antígenos unidos a las placas de UMELISA ya que los sistemas de selección sobre fase sólida facilitan en muchos casos el tamizaje cuando se evalúa un número grande de hibridomas (Acosta y cols, 2000; Baluja y cols, 2000a; Baluja y cols, 2002).

5.1.1. Selección y caracterización de los AcM anti β-TSH y anti-Tripsina.

Con el propósito de la obtención de AcM útiles para el diseño de técnicas de UMELISA de tipo "sandwich" se empleó primeramente un sistema UMELISA donde el antígeno (β-TSH ó Tripsina-1) se presentó inmovilizado a las placas de UMELISA, con el fin de disminuir el número de sobrenadantes a evaluar.

De la primera fusión (β -TSH) se seleccionaron finalmente dos AcM 2C1-G10 (IgGl) y 4A2-A8 (IgGl) teniendo en cuenta los valores de fluorescencia obtenidos, los valores de la constante de afinidad y la especificidad por el antígeno demostrada frente a moléculas estructural mente relacionadas (LH, FSH y hCG).

De la segunda y tercera fusiones se seleccionaron los AcM anti-Tripsina 3H9 (IgG2a) y 2G6 (IgG2a). La especificidad por la Tripsina se demostró en ensayos frente a moléculas estructuralmente relacionadas.

A partir de la caracterización parcial de los AcM anti P-TSH y anti-Tripsina se estudió la factibilidad del empleo de estos en el recubrimiento de la fase sólida, sustituyendo los anticuerpos policlonales utilizados en el recubrimiento en el UMELISA TSH y como AcM para el recubrimiento y conjugados a biotina para el diseño del UMELISA TIR.

Se tuvo en consideración que las señales de fluorescencia obtenidas para los diferentes puntos de la curva estándar presenten un coeficiente R" > 0.98 con un ANO VA para la dócima de la pendiente y ANO VA para la dócima para el ajuste adecuadas (a<0.05).

Las placas recubiertas con los AcM anti β -TSH de forma independiente, aunque presentaron un valor R^2> 0.98 fueron altamente significativas para el ANOYA de la pendiente y las curvas no presentaron una adecuado ajuste, problema que se soluciono al realizar la evaluación de la mezcla de los AcM 2C1-G10 y 4 A2-A8. Con el empleo de la mezcla de AcMs 2C1-G10 y 4A2-A8 contra la p-TSH observamos que se logró un aumento considerable de la pendiente de la curva en la zona de cuantificación de los valores normales (menor a l0mUI/L) y un aumento en la sensibilidad del UMELISA de manera general (Frómeta, 2001). Este fenómeno se explica por la unión simultánea de los AcM a la cadena β de la TSH a través de diferentes sitios de reconocimiento, lo cual demuestra el efecto bonificador al utilizar mezclas de AcM. Estos resultados coinciden con los reportados por Zenke y colaboradores donde se logró incrementar sustancialmente la sensibilidad de un ELISA tipo "sandwich" al utilizar una combinación de tres AcM en el

recubrimiento que reconocen tres epítopos diferentes (Zenke y cols, 1991). Es por eso que en la actualidad el desarrollo de nuevos inmunoensayos principalmente de tipo “sandwich” utilizan mezclas de AcM para evitar las desventajas que ocasionan los antisueros policlonales con relación a la reproducibilidad del título, su afinidad, especificidad y de esta forma ganar n el reconocimiento de nuevos epítopos en la molécula del antígeno (Steward y cols., 1985).

En el caso de la evaluación de los AcM anti Tripsina, el empleó del AcM 3H9 demostró una valor de R^2> 0.98 con una adecuada pendiente y ajuste. En el caso del AcM 2G6 aunque el valor de R^2> 0.98, el análisis del ANOVA para la pendiente y falta de ajuste fueron altamente significativos (a<0.05), los que nos permitió predecir un adecuado comportamiento del ensayo en toda la zona de cuantificación de la curva estándar.

5.2. Evaluación de los AcM como ¡nniunoligándos.

El desarrollo de métodos rápidos y con posibilidad de llevar a una escala productiva de purificación de la TSH y la Tripsina humanas es un elemento crucial en la producción del estuche diagnóstico UMELISA TSH Neonatal y Suero y el UMELISA TIR, así como en el diseño del ensayo para la evaluación de la actividad de los sobrenadantes de los hibridomas productores de anticuerpos específicos a la TSH y los líquidos ascíticos obtenidos a partir de la inoculación de los hibridomas en los ratones BALB/c.

En este trabajo se diseñaron ensayos de UMELISA que posibilitaron realizar una selección de los AcM con potencialidades para su empleo en la purificación por inmunoafinidad de la TSH y Tripsina humanas. Además fue posible determinar la solución reguladora con utilidad en el proceso de elución de estas proteínas garantizando que este proceso ocurra en condiciones menos drásticas que permita que estas proteínas conserven su condición nativa indispensable para su posterior empleo en los calibradores y controles de las técnicas, así como antígeno empleado en el recubrimiento de los UMELISA indirectos para el control de los hibridomas secretores de anticuerpos específicos a la TSH y Tripsina durante el proceso de producción de los AcM.

El proceso de adsorción de un antígeno a los anticuerpos inmovilizados en la matriz y su posterior elución se produjo de forma relativamente simple. Esta interacción, como es bien conocida es de tipo no covalente. En principio, la solución seleccionada en el paso de

adsorción minimizó las interacciones no específicas y maximizó las específicas que se producen entre el ligando y el antígeno (Chase, 1984).

En las etapas de equilibrio de la matriz cromatográfica y adsorción del antigeno se llevaron a cabo en soluciones reguladoras de fosfato o Tris, en las concentraciones entre 0.002-0.2 moles/L a un pH fisiológico empleando inhibidores de proteasas para evitar la degradación de la proteína por la acción de las proteasas (Chase, 1984).

A diferencia de lo que ocurre con la adsorción, la elución del antígeno de una columna de inmunoafinidad suele ser más compleja, para lograr esto se empleamos soluciones que disminuyen la afinidad del anticuerpo por el antígeno hasta alcanzar la denominada constante de elución, K_e lo que promueve la disociación del complejo (Yarmush y Colton, 1985).

5.2.1. Purificación de TSH por inmunoafinidad.

Se evaluó la capacidad de los AcM anti TSH de purificar la TSH por inmunoafinidad empleando como fuente hipófisis de cadáveres humanos a través del empleo de métodos de elución rápidos y sencillos.

Para la purificación de la TSH se seleccionó la solución reguladora SFS, pH 7.2, para las etapas de equilibrio de la matriz cromatográfica y adsorción del antigeno. Bajo esta condición se obtuvo unas uniones eficientes de los antígenos a los AcM inmovilizados en la matriz.

En principio, el desarrollo de estrategias de elución fue básicamente empírico. Se evaluaron diversos procedimientos efectivos de ruptura de ciertos tipos de interacciones, más o menos moderados a partir del diseño un UMELISA como sistema que permite estudiar las diferentes condiciones. Con el empleo del UMELISA y el inmunoadsorbente se obtuvo la misma respuesta, a pesar de ciertas diferencias, lo que demuestran la utilizad del UMELISA en la evaluación inicial de la solución de elución (Pepper, 1990).

Se evidenció que la glicina 0.2mol/L, pH 2.8 es efectivo en la elución, ya que tiene la capacidad de romper los puentes de hidrógeno y debilitar las interacciones hidrofóbicas (Coding, 1986). La TSH obtenida mantuvo su condición nativa resultado corroborado al compararla con la TSH comercial en un ensayo de seguimiento de la actividad específica a la TSH de los sobrenadantes y líquidos ascíticos de hibridomas específicos a TSH.

5.2.2. Purificación de Tripsinógeno por inmunoafinidad.

Se evaluó la capacidad de los AcM anti Tripsina de purificar por la Tripsina por inmunoafinidad de empleando como fuente tejido pancreático a través del empleo de métodos de elución rápidos y sencillos.

En este trabajo se seleccionó la solución reguladora SFS, pH 7.2, PMSF 174 mg/L para las etapas de equilibrio de la matriz cromatográfica y adsorción del antígeno. Bajo esta condición se obtuvo una unión eficiente de los antígenos a los AcM inmovilizado en la matriz.

En principio, el desarrollo de estrategias de elución fue básicamente empírico. Se evaluaron diversos procedimientos efectivos de ruptura de ciertos tipos de interacciones, más o menos moderados a partir del diseño un UMELISA como sistema que permite estudiar las diferentes condiciones. Con el empleo del UMELISA y el inmunoadsorbente se obtuvo la misma respuesta, a pesar de ciertas diferencias, lo que demuestran la utilizad del UMELISA en la evaluación inicial de la solución de elución (Pepper, 1990).

Se evidenció que la glicina 0.2mol/L, pH 2.8 es efectivo en la elución, ya que tiene la capacidad de romper los puentes de hidrógeno y debilitar las interacciones hidrofóbicas (Goding, 1986).

La presencia de degradaciones de la propia molécula de Tripsinógeno en purificaciones realzadas ha sido analizada en diferentes trabajos (Paju y col. 2000). La degradación antes señalada no debe interferir en el empleo de estos antígenos inmovilizados en la placas de UMELISA para el seguimiento de la actividad específica de los AcM lo cual fue corroborado durante la comparación del comportamiento con los antigenos comerciales y los antígenos purificados.

5.3. Aplicación de la Tripsina purificada por inmunoafinidad en la obtención de anticuerpos policlonales.

La estrategia seguida en el esquema de inmunización de conejos para la obtención de anticuerpos policlonales anti-Tripsina humana permitió disponer de anticuerpos útiles en el recubrimiento de la fase sólida (Placas de UMELISA) para su empleo en el ensayo IJMELISA TIR Neonatal. El empleo de anticuerpos policlonales anti-Tripsina unidas a la fase sólida o como anticuerpos marcados han sido empleados por muchos ensayos comerciales como el ensayo comercial utilizado como referencia en la evaluación de

nuestro ensayo (ICN Biochemical. IRT ELISA). Esta combinación de policlonals y monoclonales nos permiten garantizar una elevada sensibilidad analítica y clínica al evaluar muestras de pacientes fibroquísiticos procedentes de diferentes países.

5.4. Aplicación de los AcM obtenidos en el desarrollo técnicas de UMELISA.

Las técnicas de UMELISA ocupan un lugar especial para el diagnóstico médico en nuestro país y tienen una vigencia actual bien definida, con características peculiares que han hecho posible su extensión y han permitido la consolidación del pesquisaje masivo para el diagnóstico de enfermedades Heredo-Metabólicas (Fernández, y cols., 2002).

Para desarrollar los ensayos UMELISA para la determinación cuantitativa de TSH y Tripsina en muestras de sangre seca colectada en papel de filtro y ó suero de cordón umbilical, es importante establecer normas de estandarización y validación, a partir de la elaboración de las curvas estándar, determinación de las condiciones óptimas de trabajo y el cálculo de los diferentes parámetros de validación, procedimientos que fueron realizados en el Laboratorio de Pesquisaje Neonatal del Centro de Inmunoensayo (Anexo 1 y 2) resultado que analizaremos a continuación.

Se logró durante el proceso de recubrimiento y después de ajustada la concentración óptima de los AcM, el bloqueo de los espacios libres por moléculas inertes, con el objetivo de evitar que puedan ser ocupados por biomoléculas no específicas o el conjugado, lo que aumenta el valor de fondo incidiendo negativamente en la detectabilidad del ensayo (Harlow, y Lane, 1998; Lovborg, 1984; Ochoa y cols., 2000; Voller, y cols., 1979; Esser, 1988; Tijssen, 1993; Steinitz, 2000).

El empleo de la mezcla de AcMs contra la p-TSH permitió como describimos anteriormente un aumento considerable de la pendiente de la curva en la zona de cuantificación de los valores normales y un aumento en la sensibilidad del UMELISA de manera general.

Es importante señalar que las condiciones seleccionadas para el recubrimiento de las placas en ambas técnicas (UMELISA TSH y UMELISA TIR), es la más práctica desde el punto de vista operacional para el escalado productivo, ya que el proceso de recubrimiento ocurre durante un período de incubación nocturno, sin generar ningún inconveniente para los

operarios y de esa manera se dispone de un intervalo de tiempo mayor para el montaje del ensayo.

En general las técnicas estandarizadas presentaron valores cercanos al 10% para la precisión intraensayo. En la precisión interensayo predominaron los CV menores del 10% lo que denota una excelente precisión, coincidiendo con los resultados encontrados por otros investigadores (Broughton y cols., 1986; International Organization for Standardization. 1994; Serret y Rosales, 1997; Chaloner-Larsson y cols., 1997; Ochoa y cols., 1999). Debe tenerse en cuenta que la precisión está limitada por errores accidentales que no pueden evitarse completamente y dependen de varios factores que sólo hasta cierto limite pueden ser controlados, tales como los errores instrumentales e individuales, de ahí que los métodos automatizados, al ser eliminados por principio algunos de estos factores, tengan desviaciones por azar menores que los métodos manuales (Broughton y cols., 1986; Ochoa y cols., 1999; Kroll, 1993).

La exactitud encontrada en las técnicas fue buena, lo que nos permite afirmar que los valores de concentración reportados corresponden con la concentración real del analito presente en las muestras evaluadas, indicador de que no existen errores sistemáticos (Broughton y cols., 1986; Ochoa y cols., 1999; Kroll, 1993). Además, los ensayos mostraron una buena exactitud, parámetro que está íntimamente relacionado con una buena linealidad (Broughton y cols., 1986; Ochoa y cols., 1999; Serret y Rosales, 1997; Chaloner- Larsson y cols., 1997; International Organization for Standardization. 1994).

El límite de detección fue adecuado para los propósitos de cada ensayo. Este resultado se alcanzó gracias a curvas de excelente sensibilidad y por tanto de altas pendientes, y un bajo valor de fondo que permite una buena discriminación entre muestras normales y elevadas. La optimización del procedimiento de sensibilización de la fase sólida es responsable en gran medida de estos resultados.

Los resultados de la comparación de muestras de sangre seca sobre papel de filtro entre placas recubieitas con AcM y placas con anticuerpos policlonales mostraron una buena correlación (r = 0,9947) y la ecuación de regresión obtenida fue y = 1,0116 x + (-0,1609), permitiendo predecir un adecuando comportamiento del ensayo en el programa de detección de Hipotiroidismo Congénito, resultado corroborado al realizar la correlación con un estuche comercial.

En el estudio de distribución como se observó que el comportamiento de la concentración de TSH en sangre del cordón no es igual que en sangre de talón ya que en las primeras horas de vida ocurren cambios drásticos en el metabolismo de las hormonas tiroideas, la concentración de TSH en suero tiene un valor máximo a los 30 minutos después del nacimiento, decrece rápidamente durante las primeras 24 hs de vida y más lentamente en los próximos 2 ó 3 días (Kaplan, 1993). Es por esta razón que el nivel de corte difiere según el origen de la muestra permitiendo hacer un diagnóstico correcto y disminuir el número de casos a recitar para consulta médica (Marrero, 2001).

Partiendo de los resultados obtenidos de estudio de distribución de frecuencia de las concentraciones de TSH en neonatos resultó posible la determinación del nivel de corte el cual generalmente varía entre los diferentes programas de pesquisa. Esta gran diversidad se debe a los diferentes factores genéticos y ambientales que actúan sobre poblaciones de diferentes zonas geográficas, como es la deficiencia de yodo así como el empleo de antisépticos yodados en el recién nacido. En países como Chile, Costa Rica y .Argentina utilizan como punto de corte 20mUI/L para muestras de sangre colectadas en talón entre el 2^{do} y 7^{mo} día de vida (Cuello y cols., 1999, Casco y cols., 1999, Barteik y cols., 1999) en México se emplea 15mUI/L para sangre de talón y 30mUI/L para sangre del cordón umbilical (Lemus y cols., 1999); Cuba, 30mUI/L para muestras de suero del cordón umbilical (Carvajal F, y cols., 1999); España, 10mUI/L para sangre del talón (Garriga y cols., 1999); EUA, 30mUI/L para muestras tomadas antes de las 24 hs de vida y 25mUI/L para aquellas tomadas a las 24 hs o más (Sardovia y cols., 1999) y Japón, 8mUI/L para muestras de sangre del talón (Takahaschi y cols., 1999).

Los niveles de TIR en muestras de sangre seca sobre papel de filtro de recién nacidos encontrados fueron similares a los reportados en la literatura para otras poblaciones (Bowling y Brown, 1987), según aparece en el documento instructivo del ensayo comercial DELFIA Neonatal IRT. Con el nivel de corte seleccionado solo el 1% de las muestras presenta un valor de concentración elevado. Este resultado concuerda con los valores aceptados para este tipo de ensayo (Levy y Albers, 2000).

Según los datos informados por el programa nacional de detección y control de la Fibrosis Quistica, han sido detectados 258 niños como fibroquísiticos. El diagnóstico realizado en nuestro país se basa en los hallazgos clínicos y nexos epidemiológicos y la única prueba

disponible es el test de sudor y la detección de las mutaciones más frecuentes por PCR, pero esta técnica solo se utiliza para la confirmación de los casos.

La edad promedio del diagnóstico es 19 meses, lo que sin lugar a duda no permite realizar un seguimiento y la aplicación de una terapia profiláctica y de sostén sustitutiva que garantice la prevención de los trastornos asociados a la mal nutrición y la deficiencia de enzimas pancreáticas, además, la causa fundamental de los ingresos pueden ser controladas. Dada la infraestructura creada en nuestro pais, pensamos que de establecerse el Programa de Pesquisaje Neonatal para la FQ, los niveles de cobertura pueden ser cercanos al 99%.

5.5. Aplicación de las técnicas de UMELISA en el Programa Nacional de Salud.

Cuba fue el segundo pais, después de Canadá, en organizar un programa de detección del Hipotiroidismo Congénito de alcance nacional. El número tan elevado de partos institucionalizados ha permitido alcanzar y mantener la cobertura por encima de 99% durante los últimos años. Estos resultados se han alcanzado gracias a la concepción del programa y a los soportes del mismo desde el punto de vista analítico, clínico y organizativo. La eficiencia del programa no está solamente en la cobertura elevada del pesquisaje, existen otros factores, como son, la dinámica de la recitación en los niños que tienen la TSH elevada en el cordón, y mucho más importante, el tiempo mínimo del diagnóstico y de la aplicación de la terapéutica sustitutiva de la hormona en el tiempo más breve. Desde el año 2000 se cuenta con un tiempo promedio de 19 días en la terminación del proceso e inicio de la terapéutica, aunque hay provincias que están en solo 7 días.

La especificidad en un 95,5% y mantenida por encima del 99% desde el año 1999, en el que se introdujeron los anticuerpos monoclonales descritos en este trabajo, demuestra la elevada especificad alcanzada, la estabilidad del proceso productivo del estuche y una alta precisión en el trabajo de la Red de Laboratorios. El alcance del Valor Predictivo Positivo a cifras por encima del 3% habla a favor de una disminución de los falsos positivos obtenidos en el pesquisaje. La frecuencia de la enfermedad se ha mantenido estable desde el inicio del programa.

Los resultados globales del programa han permitido detectar a más de 658 hipotiroideos, con una frecuencia global de 1:3289. Este resultado coincide con la incidencia a escala mundial reportada en el pesquisaje de 24 000 000 de niños, detectándose anualmente entre 6000 y 8000 casos, para una frecuencia aproximada de 1:3 429 (Iorcansky y cols., 1999).

5.6. Análisis de los costos de producción de los AcMs anti p-TSH.

No estaria completo este trabajo si no se realizara un análisis de la influencia en los costos de producción del UMELISA TSH suero y Neonatal desde la sustitución de los anticuerpos policlonales por los AcM Si bien el gasto inicial necesario durante la etapa de la obtención de los AcM anti β-TSH, es elevada, los resultados en cuanto a costos obtenidos durante la producción son inferiores en comparación a los costos de producción de los anticuerpos policlonales.

De haber sino necesario la producción de anticuerpos policlonales para realizar la producción de las 82 770 176 (periodo Enero 1999- Julio 2003) determinaciones, se hubiera invertido 11504.26 $. Esto es sin tener en cuenta el costo de mantenimiento de los carneros (especie animal empleado para la producción de los anticuerpos policlonales) y el procedimiento de purificación de los anticuerpos policlonales lo cual incrementaría en cerca de un 25% el costo de producción.

La producción de anticuerpos policlonales requiere de la realización de inmunizaciones periódicas con antígeno de elevada pureza, el que se oferta en el mercado con un precio de 1500 USD el mg. Para mantener (Enero 1999- Julio2003) la inmunización de los animales se hubiera requerido una inversión por concepto de compra de antígeno de cerca de 8000 USD. que junto con las dificultades conocidas de importar hacia nuestro pais para este tipo de material biológico, hacen dependiente la producción del estuche diagnóstico de una materia prima no siempre segura Otras de las ventajas de los AcM esta relacionada con su reproducibilidad de lote a lote, la inagotabilidad real de su fuente, la ausencia de reactividades cruzadas, elemento que los hacen muy atractivos el diseño de ensayos de UMELISA

A partir de los ingresos generados por las ventas de los estuches UMELISA TSH se logró recuperar la inversión inicial, durante la etapa de obtención, en el primer año.

Otro aspecto importante es que los ingresos en divisa han permitido soportar los costos de todos los Programas Nacionales que emplean nuestra tecnología:

- Programa Materno Infantil
- Programa de Certificación de la Sangre
- Programa de Vigilancia Epidemiológica

5.6. Análisis de los costos de producción de los AcMs anti p-TSH.

5.7. Análisis del impacto del programa de HC en Cuba

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido que antes de ejercer cualquier análisis con el objetivo de implementar un programa de pesquisaje para mejorar la salud de la población, es necesario siempre tener en cuenta que la enfermedad estudiada pueda ser detectada precozmente, basándose el cálculo de los costos y los beneficios. Estos costos deben incluir: estuches de reactivos para el pesquisaje, la confirmación y tratamiento, los que tienen que ser balanceados con la asistencia médica (OMS, 1991).

En Cuba dada sus características de tener una atención médica socializada y un bloque científico-productivo de procedimientos de avanzada para el apoyo a los servicios de salud, como el Centro de Inmunoensayo, el análisis se basa fundamentalmente en dos aspectos diferenciados: El ahorro a la economía del país por la importación de la infraestructura, reactivos, asistencia técnica, asesoramiento, etc. que se hace necesaria con el uso de tecnología de punta para los pesquisajes masivos que detectan y confirman los recién nacidos con HC y el ahorro por el gasto en que se hubiera incurrido en la atención médica especializada y la educación diferenciada de estos niños, de por vida.

Para la elección de un estudio poblacional deben analizarse dos aspectos esenciales en la toma de decisión, la frecuencia de la enfermedad y las probabilidades de solución temprana, es decir, la eficiencia del propósito estará en la medida en que se haga más precoz el diagnóstico y se aplique más tempranamente la fórmula que no permita el desarrollo de la enfermedad.

Más de 18 millones de USD / MN se ahorraron teniendo en cuenta que para los resultados analizados en este trabajo solamente se han tenido en cuenta los gastos días por niños, atendidos de modo diferenciado solo en los HC permanentes e impedir la importación de 4 638 154 determinaciones, en este análisis no se incluyen otros gastos de laboratorios, como lectores, material gastable, asistencia técnica, etc.

En resumen los resultados obtenidos en este trabajo permiten a nuestro país disponer de dos ensayos que en primer lugar garantizarán el pesquisaje neonatal de dos enfermedades, que en el caso del HC el diagnóstico temprano posibilitará el establecimiento de una terapia que permitirá el desarrollo normal de los recién nacidos y para la FQ, permitirá apoyar el diagnóstico y contribuir en el mejoramiento de la calidad de vida de los niños fibroquísticos, además estos estuches son un renglón exportable con un alto valor agregado.

que contribuirá con el diagnóstico de estas enfermedades en los países de la región latinoamericana principales clientes de la tecnología SUMA.

Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas
Dirección B M.N
CNICM INFOMED

6. CONCLUSIONES

- Los anticuerpos monoclonales obtenidos contra la subunidad β -TSH (4A2-A8 y 2C1-G10) y contra la Tripsina humana (3H9, 2G6) presentaron las características inmunoquímicas adecuadas para se empleados en el diseño de ensayos UMELSA
- Se logró la purificación de la Tripsina humana por cromatografía de inmunoafinidad utilizando el AcM anti Tripsina 3H9, a través de un procedimiento rápido y sencillo.
- Se logró la purificación de la TSH por cromatografía de inmunoafinidad utilizando el AcM anti TSH 10G8-F4, a través de un procedimiento rápido y sencillo.
- Los resultados obtenidos en el Programa Nacional para la Prevención del HC demostraron un incremento de la especificidad de la técnica desde la sustitución de los anticuerpos policlonales por los AcMs anti β-TSH descritos en este trabajo.

Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas
Dirección B M.N
CNICM INFOMED

7. RECOMENDACIONES

- Continuar el trabajo de obtención y caracterización de AcMs contra la Tripsina para incrementar el número de determinantes antigénicos detectados en la molécula.

- Evaluar los niveles de TIR en muestras de niños en el periodo neonatal y en individuos con diagnóstico clínico de la enfermedad.

- Realizar un estudio en la población de riesgo infantil, que nos permita determinar los niveles de TIR y apoyar el diagnóstico de la FQ.

Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas
Dirección B M.N
CNICM INFOMED

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu F, Dodge **J,** editors. Guidelines for the Diagnosis and Management of CF. 1996. Sponsored by World Health Organization, Human Genetics Programme and International Cystic Fibrosis Association

Acosta C, Baluja Bl, Amores **I,** Brito A, Valdivia **I,** Delhanty A, Ventura **J,** Soto V. Monoclonal Antibodies Against Hepatitis B S Antigen: Production, Characterization, and Use for Diagnosis. Hybridoma 2000a; 19(3):259-262.

Acosta C, Baluja **I,** Amores **I,** Brito A, Delahanty A, Ventura **J,** Miguez **J,** Hernández M, Gómez 1, Montes de Oca M. Evaluación de la antigenicidad e inmunigenicidad de péptidos sintéticos de tres proteínas de la cápside del virus de la hepatitis A. Revista CENIC (Ciencias Bilógicas), 2000b; 31(2): 105-107.

Ahlboni BE, Yaqoob M, Larsson et al: Genetic and linkage analysis of familial congenital hypothyroidism: exclusion of linkage to the TSH receptor gene. Hum Genet 1997; (99): 186.

Alliende RA, Curotto LB. Bases moleculares y cromosómicas de las enfermedades genéticas. En: Colombo CM, Cornejo EV, Raimann BE, editoras. Errores innatos en el metabolismo del niño, la ed. Santiago de Chile: editorial Universitaria; 1999 p. 25-43.

American Academy of Pediatrics. Newborn Screening for Congenital Hypothyroidism: Recommended Guidelines. Pediatrics 1993; 91 (6) 1203-1209.

Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, Souza DW, Paul S, Mulligan RC, cols., Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. Science 1991a; 253:202-205

ANN ARBOR, Ml. Journal of the American Medical Association 287:13, 1662-1670, 2002.

Armas H, González CM, González NL, Milena A, Doménech E. Screening neonatal de la fibrosis quistica mediante tripsina inmunoreactiva sérica. An Esp Pediatr 1994; 41:261- 6

Audrézet MP, Costes B, Ghanem N, Fanen P, Verlingue C, Morin JF, y cols., Screening for cystic fibrosis in dried blood spots of newborns. Molecular and Cellular Probes 1993;7:497-502.

Avrameas S, Ternynck T. The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoadsorbents. Immunochemistry 1969; 6: 53-66

Avrameas S. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. Immunochemistry 1969a; 6: 43-52

Bakhai A, Sheridan DJ, Coutelle CC. Bronchial artery delivery of viral vectors for gene delivery in cystic fibrosis;superior to airway delivery? BMC Pulm Med 2002 Apr 3; 2(1)2

Baluja I, Brito A, Acosta C, Amores I, Soto V, Luberta A. Obtención y producción de un anticuerpo monoclonal especifico a la gonadotropina coriónica humana y su aplicación en el ultramicroELISA. Rev CENIC 2000, 31:3, 169-172.

Baluja I, Brito A, Acosta C, Zulueta O, Melchor A, Amores I, Martinez L, Hernandes M. Monoclonal antibidy to (3 free hCG. Hybridoma and hybridomics, 2002; 21(5): 381- 385.

Barteik ME, Bonafé M, Conta AG, Santa María B, Tabares S, Moreno Barral **J.** Pesquisa neonatal para hipotiroidismo congénito y fenilcetonuria realizado por la universidad, en la provincia de Córdoba-Argentina. En: Cornejo V, Raimann E, Colombo M, editoras. Libro de resúmenes II congreso latinoamericano de errores innatos del metabolismo y pesquisa neonatal. 1999; 24-27 de octubre Santiago de Chile. Caupolican servicios gráficos, 1999:41-42.

Bayer EA, Skutelsky E Wilchek M. The avidin-biotin complex in affinity cytochemistry Methods Enzymol 1979; 62: 308-315

Bayer EA, Wilchek M. The avidin-biotin system. En: Christipoulos TK, Diamandis EP, editores. Immunoassay, 1ª ed San Diego-New York-Boston-London-Sidney-Tokyo-Toronto: Academic Press 1996.

Bealtly JD, Beattly BG,y Ulahos WG Measurement of monoclonal antibody afTinity by non-competitive enzyme immunoassay. J Immuno Methods 1987; 100:173-179.

Benkirane MM, Bon D, Costagliola S. Monoclonal antibody mapping of the antigenic surface of human thyrotropin and its subunits. Endocrinology 1987; 121(3), 1171-1177.

Bickel H, Gerrard J, Hickmans EM. Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria. Lancet 1953;2:812.

Birnkrant DJ, Stern RC. Sweat testing in the 90s. Am J Asthma Allergy Pediatr 1991;4:194-8.

Birnkrant DJ, Stern RC. Sweat testing in the 90s. Am J Asthma Allergy Pediatr 1991;4:194-8.

Blyte SA, Farrel PM Advances in the diagnosis and management of cystic fibrosis. Clin Chem 1984;17:277-83

Boeber E, Yasemen E, Walter W, Tunnessen J. Transient Primary Hypothyroidism. Arch Pediatr Adolesc Med 1996; 105:1099-1100.

Borgstrom A, Ohlsson, K , Radioimmunological de-termination and characterization of cathodal trypsin-like immunoreactivity in normal human plasma. Scand J Clin Lab Invest 1976: 36: 809-14.

Borrebaeck C. Antibodies in diagnostics-from immunoassay to protein chips. Immunology Today 2000; 21(8): 379-382

Boucher RC. Drug therapy in the 1990s: what can we expect for cystic fibrosis[9] Drugs 1992;43:431-9.

Bowling FG, Brown ARD. Newborn screening for CF using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) technique. Clinica Chimica Actal987; 171:257-262.

Boyle MP, Farukhi Z, Nosky ML. Strategies for improving transition to adult cystic fibrosis care, based on patient and parent views. Pediatr Pulmonol 2001;32:428-36

Brinson GM, Noone PG, Mauro MA, Knowles MR, Yankaska JR, Sandhu JS, y cols., Bronchial artery embolization for the treatment of hemoptysis in patients with cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 1998;157:1951-8

Bronfenbrenner J A useful modification of the preparation of therapeutic sera. J Proc Soc Exp Biol and Med 1930, 27: 734-735

Bronsveld I, Bijman J, Mekus F, Ballmann M, Veeze HJ, Tümmler B Clinical presentation of exclusive cystic fibrosis lung disease Thx 1999; 54:278-81

Broughton PMG, Bergonzi C, Lindstedt G, Loeber IG, Malan PG, Mathieu M, Pozet S Guidelines for a user laboratory to evaluate and select a kit for its own use. Part I. Quantitative tests. Vol 3, No. 3. London: European Committee for Clinical Laboratory Standards; 1986.

Buck FF, Bier, **M.** and Nord, F.F., Some properties of human trypsin. Arch Biochem Biophys 1962; 98: 528-530

Buckland RM. Strong signals from streptavidin-biotin. Nature 1986; 320: 557-558.

Buist NR, Tuerck J.M. The practicioner's role in newborn screening. Pediatric Clinics of North America 1992; 39 (2): 199-211

Burnstoek G Overview: purinergic mechanisms. Ann NY Sci 1990;603:1-18

Bush A, Wallis C. Time to think again: Cystic fibrosis is not an «all or none» disease. Pediatr Pulmonol 2000;30:139-44

Callen A, Diener-West M, Zeitlin PL, Rubenstein RC. A simplified cyclic adenosine monophosphate-mediated sweat rate test for quantitative measure of cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) function. J Pediatr 2000;137:849-55.

Camargo E. Neonatal Hypothyroidism Screening with Inmunochemiluminometric Assay of Thyrotropin. Clin. Chem. 1991; 37:1796

Campbell A. Assay Techniques. En: Campbell, AM (ed.) Monoclonal antibodies anf imunosensor tecnology. Elsevier Science Publishers, Amsterdan. 199la:51-l 15.

Campbell A. Cell culture requeriments for hybridomas.. En: Campbell, AM (ed.) Monoclonal antibodies anf imunosensor tecnology. Elsevier Science Publishers, Amsterdan. 1991b: 163-187.

Campbell A. General propieties and applications of monoclonal antibodies. En: Campbell, AM (ed.) Monoclonal antibodies anf imunosensor tecnology. Elsevier Science Publishers, Amsterdan. 1991c: 1-49.

Campbell A. Selection and cloning. En: Campbell, AM (ed.) Monoclonal antibodies anf imunosensor tecnology. Elsevier Science Publishers, Amsterdan. 1991a:225-237.

Campbell GT, Bhatnagar A S. Simultaneous visualization by light microscopy of tw'o pituitary hormones in a single tissue section using a combination of indirect immunohistochemical methods J Histochem Cytochem 1976; 24: 448-452.

Carlos N. Sistema integral de diagnóstico para aplicaciones múltiples de Inmunoensayos. (Tesis de Maestría), 1SPJAE, Ciudad Habana, Cuba 1998.

Carlsson J, Drevin H Axen R Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. N-Succinimidyl 3-(2-pyridy!dithio)propionate, a new heterobifunctional reagent. Biochem **J** 1978; 173: 723-737.

Carvajal F, Alvarez MA, Robaina R, Frómeta A, Fernández Yero **JL,** Guell **R** Cuba: programa nacional de diagnóstico precoz de hipotiroidismo congénito 1988-99. En: Cornejo V, Raimann E, Colombo M, editoras. Libro de resúmenes II congreso latinoamericano de errores innatos del metabolismo y pesquisa neonatal. 1999; 24-27 de octubre Santiago de Chile. Caupolican servicios gráficos, 1999:61-62.

Carvajal F, Fernández Yero JL, Bencomo F, Robaina R, Alvarez MA. Programa de diagnóstico precoz del hipotiroidismo congénito. Experiencia cubana. Libro de resúmenes III congreso latinoamericano de errores innatos del metabolismo y pesquisa neonatal 2001; 21-24 de octubre Cartagena-Colombia. Pontificia Universidad Javeriana 2001 p. 70.

Casco T, Trejos R, Artavia E, Saborio M, Abarca G, Sánchez A, y col. Programa nacional de tamizaje neonatal en Costa Rica. En: Cornejo V, Raimann E, Colombo M, editoras. Libro de resúmenes II congreso latinoamericano de errores innatos del metabolismo y pesquisa neonatal. 1999; 24-27 de octubre Santiago de Chile. Caupolican servicios gráficos, 1999:59.

Castiñeiras DE, Colon C, Alonso-Fernández JR. Six-year evaluation of a seven minute determination of TSH and T4 for confirmation of Congenital Hypothyroidism. 8th International Neonatal Screening Symposium and Inaugural meeting of the International Society for Neonatal Screening. 11-15 november. 1991.

Catt K, Tregear GW Solid-phase radioimmunoassay in antibody coated tubes. Science 1967; 158 1570.

Chaloner-Larsson G, Anderson R, Egan A. A WHO guide to good analytical assays. Geneva: WHO; 1997 p.65-95.

Chase HA, Affinity separation utilizing immobilised monoclonal antibodies-a new tool for the biochemical engineer. Chem Eng Sci; 1984; 39: 1099-1125.

Chiem N, Harrison **D.** Monoclonal antibody binding affinity determined by microchip- based capillary electrophoresis. Electrophoresis, 1998; 19: 3040-4.

Chillón M, Casals T, Mercier B, Bassas L, Lissens W, Silber S, y cols., Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital bilateral absence of the vas deferens. N Engl J Med 1995;332:1475-1480

Chow C\V, Landau LI. Bronchial mocous glands in the newborn with CF. Eur J Pediatr 1982;139:240-3

Chun-Po L, Chen W, Kang-Wen W. Povidone-iodine in umbilical cord care interferes with neonatal screening for hypothyroidism. Eur Journal Pediatr 1994; 153. 756-758.

Committee on Genetics. American Academy of Pediatrics. Pediatrics 1996, 98 (3): 467- 472.

Coons A **H.** The development of immunohistochemistry. Ann N Y Acad Sci 1971; 177: 5- 9.

Corbeta C, Seia M, Bassotti A, Ambrosioni A, Giunta A, Padoan R Screening for CF in newborn infants: result of a pilot programme based on two tier protocol (IRT/DNA/IRT) in the italian population. J Med Screen 2002;9:60-63

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

Crystal RG, Me. Elvaney NG, Rosenfeld MA. Administration of an adenovirus containing the human CFTR cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis. Nat Genet 1994;8:42-51.

Cuello X, Pérez P, Vivanco X, Lobo G, Pérez A, Bruggendieck B. Evaluación de 7 años de programa de detección precoz de hipotiroidismo congénito (HC). En: Cornejo V, Raimann E, Colombo M, editoras. Libro de resúmenes II congreso latinoamericano de errores innatos del metabolismo y pesquisa neonatal. 1999; 24-27 de octubre Santiago de Chile. Caupolican servicios gráficos, 1999:54-55.

Davis FM, Rao PN. Monoclonal Antibodies in the diagnosis and treatment of cancer. Novel approaches to cancer chemotherapy. Academic Press, 1984: 23-92

Davis P, Drumm M, Konstan M. Cystic fibrosis. AM J Respir Crit Care Med 1996;154:1229-56.

De Felice M, Ovitt C, Biffali E, Rodríguez-Mallon A, Arra C, Di Lauro R A mouse model for hereditary thyroid dysgenesis and cleft palate. Nat Genet 1998, 19: 395-398

De Zeglier F, Pernasetti F, Vanhole C, Devlieger H, Van den Berghe G, Martial JA. The prenatal role of thyroid hormone evidenced by fetomaternal Pit-1 deficiency. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 1995; 80:3127-3130

Delange F, Bourdoux P Transient Primary Hypothyroidism in the newborn. In Dussault JH, Walker P (eds) Marcel Dekker, New York 1983. p. 275-301

Delange F, Dal hem A, Bourdoux P. Increased risk of primary hypothyroidism in preterm infants. Journal of Pediatrics 1984; 105:462-469.

Denning CR, Huang NH, Cuasay LR, Shwachman H, Tocci P, Warwick WJ, y col. Cooperative study comparing three methods of performing sweat tests to diagnose cystic fibrosis. Pediatrics 1980;66:752-757.

Devos H, Rodel C, Gagne N, Laframboise R, Van Vliet G. A search for the possible molecular mechanism of thyroid dysgenesis: sex ratios and associated malformations. J Clin Endocrinol Metab 1999; 84 (7): 2502-2506.

DeVriendt K, VanHole C, Matthijs G et al: Deletion of thyroid transcription factor-**1** gene in an infant with neonatal thyroid dysfunction and respiratory failure. N Engl J Med 1998; 338:1317.

Di Santi'Agnese PA, Darling RC, Perera Ga, Shea A. Abnormal composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas: clinical significance and relationship to the disease. Pediatrics 1953; 12: 549:63.

Dork T, Wulbrand U, Richter T. Cystic fibrosis with three mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. Hum Genet 1991;87:441-6

Drumni ML, Pope HA, Cliff WH. Correction of the cystic fibrosis defect “in vitro" by retrovirus-mediated gene transfer. Cell 1990; 62:1227-33. (Erratum, Cell 1993;74:215)

Dussault JA The impact of sistematic screening for congenital hypothyroidism. In: Farriaux JP, Dhondt JL, editors. New' horizons in neonatal screening. Procedings of the 9th internacional neonatal screening symposium, and the 2nd meeting of the internacional society for neonatal screening 1993; September 13-17 Lille. Lille CEDEX; 1993 p. 123-124

Dussault JH: Screening for congenital hypothyroidism. Clin Obstetr Gynecol 1997; 40:117.

Eagle H, Smith **D** E Vickers **P J.** The effect of combination with diazo compounds on the immunological reactivity of antibodies. **J** Exp Med 1936; 63 : 617-643

Elton EW, Geddes **DM.** Gene therapy for cystic fibrosis: a clinical perspective. Gene Ther 1995;2:88-95.

Englebienne P. Use of colloidal gold surface plasmon resonance peak shift to infer affinity constants from the interactions between protein antigens and antibodies specific for single or multiple epitopes. Analyst, 1998; 123: 1599-603.

Engvall E, Perlmann P. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry 1971 ;8:871.

Erp R, Gribnau T,, Sommeren A. and Bloemers H. Affinity of monoclonal antibodies. Interpretation of the positive cooperative nature of anti-hCG / hCG interactions. Journal of Immunological Methods, 140, 235, 1991Esser P. Principles in adsorption to polystyrene. Nunc Bulletin 1988; 11(6): 1-5

Fabbro D, Pellizari L, Mercuri F, Tell G, Damante G. PAX-8 protein levels regulate thyroglobulin gene expresión. Journal of Molecular Endocrinology 1998, 21 (3):347- 354

Farrel PM, Mischler EH. Newborn Screening for cystic fibrosis. Arch Pediatr 1992;39:35- 70

Fayol V, Ville G. Evaluation of automated enzyme immunoassays for several markers for hepatitis A and B using the Abbott IMx Ó analyser. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1991

Fazekas de St G, Scheidegger D. Production of monoclonal antibodies strategy and tactics. Journal of Immunological Methods. 1980; 35: 1-21.

Fernandez JL, Bencomo F, Robaina R. El aporte del SUMA a la Salud Publica Cubana. Premio Nacional de Salud. Ciudad de la Habana, Cuba, 2002.

Fernández JL, García C. Ajustes del método de inmunodifución radial simple y preparación de un suero de referencia. Revista CENIC.C.Biol. 1976.

Fernández JL, Solis **RL,** García FA. Screening technology development. The Cuban Experience. In: Wilcken B, Webster D (eds). Neonatal Screening in the nineties. Proceeding of the 8th Internacional Neonatal Screening Symposium, Leura, New South Wales, Australia, 12th- 15th November, 1991, and the Arthur Veale Memorial Meeting, Auckland, New Zealand, 5th-9th November, 1991: 38.

Fiel S Cystic Fibrosis. Clin Chest Med 1998; 19:3

Figarella C, Clemente F, Guy O. On zymogens of human pancreatic juice. FEBS Lett, 1969;.3: 351-353

Fisher DA, Dussault JH, Foley TR Screening for congenital hypothyroidism: results of screening one million North American infants. J.Pediatr 1979; 94:700-5.

Fisher DA. Neonatal thyroid disease in the offspring of women with autoimmune thyroid disease. Thyroid Today 1986; 9(4): 1.

Fisher DA. Screening for Congenital Hypothyroidims. Trends Endocrinol Metab 1991; 2:129-133.

Florholmen J, Jorde R, Olsen, R.L. Kolmannskog, S. and Burhol, **P.G.,** Radioimmunoassay of cationic trypsin-like immunoreactivity in man. Scand J Gastroenterol, 1984;. 19: 613-21

Flume PA, Anderson DL, Hardy KK, Gray S. Transition programs in cystic fibrosis centers: perceptions of pediatric and adult program directors. Pediatr Pulmonol 2001;31:443-50

Foley TP, Jr: Congenital hypothyroidism. In: Braverman LE, Utiger RD (eds). Werner's and Ingbar's The Thyroid, Lipincott-Raven, Philadelphia, 988, 1996.

Frómeta A. Desarrollo un ensayo UltramicroELlSA para medir la hormona estimulante de la tiroides humana (TSH) presente en sangre seca sobre papel de filtro en el diagnóstico de Hipotiroidismo Congénito Primario. (Tesis de Maestría), Facultad de Biología, Universidad de la Habana, 2000.

Fujimtira T, Ohta T, Kitagawa H, Fushida S, Nishimura GI, Yonemura Y, Elnemr A, Miwa K, Nakanuma Y. Trypsinogen expression and early detection for peritoneal dissemination in gastric cancer. J Surg Oncol, 1998; 69: 71-5.

Gagne N, Parma **J,** Deal C, Vassart G, Van Vliet G. Apparent congenital athyreosis contrasting with normal plasma thyroglobulin levels and associated with inactivating

mutations in the thyrotropin receptor gene: Are athyreosis and ectopic thyroid distinct entities? J Clin Endocrinol Metab 1998; 83: 1771-1775.

Gappa M, Ranganathan SC, Stock **J.** Lung infection testing in infants with CF: lessons from the past and the future directions. Pediatr Pulmonol 2001;32:228-45

Garret P, Pressler T, Madsen HO, Frederiksen B, Svejgaard A, Hoiby N, Schwartz M, Koch C. Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity wtth severity of lung disease and survival in cystic fibrosis. **J** Clin Invest 1999; 104:431-7.

Garriga MJ, Gil F, Luque **I,** Peran S. Criterios para establecer el nivel de corte de la TSH en el cribado del hipotiroidismo congénito. En: Cornejo V, Raimann E, Colombo M, editoras. Libro de resúmenes II congreso latinoamericano de errores innatos del metabolismo y pesquisa neonatal. 1999; 24-27 de octubre Santiago de Chile. Caupolican servicios gráficos, 1999:67-68.

Gavilondo JV, Anticuerpos Monoclonales, Elfos Scientiae Pub. 1995

Geokas MC, Largman C, Brodrick JW, Johnson JH. Determination of human pancreatic cationic trypsinogen in serum by radioimmunoassay. Am J Physiol, 1979;.236: E77-83

Glaser R. Affinity in solution of antigen-antibody complexes. Analytical Biochemistry, 213, 152-161, 1993.

Goding JW. Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2nd ed., Academic Press, London, 1986, Chapter 6.

Gregg RG, Simantel A, Farrell PM. Newborn screening for cystic fibrosis in Wisconsin: comparison of biochemical and molecular methods. Pediatrics 1997;99:819-24

Grossmann M; Weintraub BD, Szkudlinski MW: Novel insights into molecular mechanisms of human thyrotropin action: structural, physiological and therapeutic implications for the glycoprotein hormone family. Endocr Rev 1997; 18:476.

Gruters A, Krude H, Bierbermann H, Liesenkotter K, Schoneberg T, Gudermann T. Alterations of neonatal thyroid function. Acta Paediatrica 1999; 88(428): 17-22.

Guell R, Robaina R, Fernández Yero **JL,** Araujo **O,** Amat M. Screening for Neonatal Hypothyroidism: Ultramicro Analytic System (SUMA). 8th Internacional Congress Endocrinol 1988; (Abstract) 04-22045: 174.

Guerra D. Estudio genetico de la fibrosis quísitica [Tesis Doctoral] . Instituto Superior de Ciencias Médicas de la Habana. ICBP, “ Victoriode Giron". C. Habana Cuba, 1984.

Guesdon JL, Ternynck T Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. J Histochem Cytochem 1979; 27: 1131-1139

Guggino WB. Cystic fibrosis and the salt controversy. Cell 1999;96:607-10

Gunther K Dworak **O.** Remke S. Pfluger R Merkel S. Hohenberger **W** Reymond MA Prediction of distant nietastases after curative surgery for rectal cancer J. Surg. Res. 103(l):68-78, 2002.

Guthrie R, Suci A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. Pediatrics 1963; 32:338.

Guttornisen HK, Kasper DL. Bacterial Vaccines. En: Austen KF, BurakoffSJ, Rosen FS, Strom TB, editors. Therapeutic Immunology. 2nd ed. Massachusetts: Blackwell Science Inc; 2001. p. 401-12 :67-70

Guy O, Lombardo D, Bartelt DC, Amic J, Figarella C. Two human trypsinogens. Purification, molecular properties, and N-terminal sequences. Biochemistry, 1978; 17: 1669-75

Handelsman DJ, Conway AJ, Boylan LM, Turtle JR Young's syndrome: obstructive azoospermia and chronic sinopulmonary infections. N Engl J Med 1984; 310:3-9

Hannon H, Therrell B. Guidelines on the prevention and control of congenital hypothyroidism. Hereditary diseases program WHO/ HDP/ CON, HYPO/ GL/1990; 90(4): 199.

Harlow E, Lane D, editors. Immunoassays. En: Antibodies. A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1998. p.553-612.

Hasselbald V, Hedges LV. Meta-analysis of screening and diagnosis tests. Psychological Bulletin 1995;117:167-78

Hausler M, Franke E, Wendt G, Kentrup H, Dohmen H, Kusenbach G. Lung infections in cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol 1999;28(5):376-9

Hayashizaki Y, Miyai K, Kato K, Matsubara K: Molecular cloning of the human thyrotropin-b subunit gene. FEBS Lett 1985; 188:394 -400.

Henimila I, Dakubu S, Mukkala VM, Siitari H and Lovgren T. Europium as a label in time-resolved immunofluorometric assays. Anal. Biochem. 1984; 137: 335-343

Hernández J, Fajardo M, Blanco C, Machín M, Frómeta A, Marrero N. Pesquisaje de hipotiroidismo congénito en 124347 recién nacidos de la provincia Pinar del Río, Cuba en más de 11 años de programa. En: Cornejo V, Raimann E, Colombo M, editores. Libro de resúmenes. II congreso latinoamericano de errores innatos del metabolismo y pesquisa neonatal. 1999; 24-27 de octubre Santiago de Chile. Cauplican servicios gráficos; 1999 ,p. 62

Hershnian JM, Pekary AE, Smith VP, Hershman JD Evaluation of five high sensitivity american thyrotropin assays. Mayo Clin Proc 1988;63:1133-9.

Hsu SM, Cossman J Jaffe E S. A comparison of ABC, unlabeled antibody and conjugated immunohistochemical methods with monoclonal and polyclonal antibodies-- an examination of germinal center of tonsils. Am J Clin Pathol 1983; 80: 429-435

Hsu SIM, Raine L. The author's reply. Am J Clin Pathol 1982; 77: 775-776.

Hsu SM. Immunohistochemistry. Methods Enzymol 1990; 184: 357-363

Inoirtata H, Matsuura N, Tachinaba K, Kusuda S, Fukushi M, Umehashi H, cols., Guideline for Neonatal Mass screening for Congenital Hypothyroidism. Clin Pediatr Endocrinol 1999; 8 (1): 51-55.

International Organization for Standardization. ISO 5725-1:1994 International Standard. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 1: General principles and definitions. Geneva: The Organization; 1994.

International Organization for Standardization. ISO 5725-2:1994 International Standard. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method. Geneva: The Organization; 1994.

International Organization for Standardization. ISO 5725-3:1994. International Standard. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method. Geneva: The Organization; 1994.

lorcansky S. Hipotiroidismo Congénito en Latinoamérica. Cornejo V, Raimann E Colombo M, editores. Libro de resumen. 11 Congreso Latinoamericano de errores

innatos del metabolismo y Pesquisa Neonatal; 1999 24-27 Octubre. CAUPOLICAN Servicios Gráficos, 1999:62.

Irie M, Enomoto **K,** Naruse **H** Measurementof thyroid stimulating hormone in dried blood spot. Lancet 1975; 2:1233.

Ishikawa E, Imagawa M, Hashida S cols., Enzyme-labeling of antibodies and their fragments for enzyme immunoassay and immunohistochemical staining. J Immunoassay 1983; 4: 209-327

Itkonen O, Koivunen E, Hurme M, Alfthan H, Schroder T, Stenman U. Time-resolved immunofluorimetric assays for trypsinogen-1 and 2 in serum reveal prefrential elevation of trypsinogen-2 in pancreatitis. J Lab Clin Med 1990; 115: 712-8

Itkonen O , Stenman, U.-H , Osman, S., Koivunen, E, Halila, H. and Schroder, T., Serum samples from pancreatectomized patients contain trypsinogen immunoreac-tivity. J Lab Clin Med, 1996;. 128: 98-102

Johnson R B, Jr., Libby R M Nakamura R M. Comparison of glucose oxidase and peroxidase as labels for antibody in enzyme-linked immunosorbent assay. J Immunoassay 1980; 1: 27-37

Kaplan MM. Thyroid hormone theraphy. What, when, and how much. Postgraduate medicine 1993; 93: 249-262

Karem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewcz D, Cox TK, Chakravati A, cols., Identification of the cystic fibrosis: genetic analysis. Science 1989; 245: 1073-80

Khan TZ, Wagener JS, Bost T, Martinez J, Accurso FJ, Riches DWH Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 1995;151:1075-82

Knowles MR, Paradiso AM, Boucher RC. “In vivo” nasal potential difference: techniques and protocols for assessing efficacy of gene transfer in cystic fibrosis. Hum Gene Ther 1995;6:445-55.

Kohler G, C. Milstein. Continuous culture of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. Nature. 1975. 256: 495-7

Koivunen E, Huhtala ML, Stenman UH. Hu-man ovarian tumor-associated trypsin. Its purification and characterization from mucinous cyst fluid and identifi-cation as an activator of pro-urokinase. J Biol Chem, 1989; 264:14095-9.

Koivunen E, Itkonen O, Halila H, Stenman UH. Cyst fluid of ovarian cancer patients contains high concentrations of trypsinogen-2. Cancer Res, 1990; 50: 2375-8

Kroll MH, Emancipator K. A theoretical evaluation of linearity. Clin Chem 1993;39:405- 13

Kunitz, M. and Northrop, J.H. J Gen Physiol, 1936; 19: 991-1007.

La Franchi S. Congenital Hypothyroidism: Etiologies, Diagnosis and management. Thyroid 1999; 9 (7):735-740.

Labsystems Research Centre. Studies on Immobilization of Biological Materials. Enhanced Adsorption to Modified Polystyrene. Finland: Labsystems; 1998

Lai HC, Kosorok MR, Sondel SA. Growth status in children with CF based on the National CF Patient Registry data: evolution of various criteria used to identify malnutrition. N Engl J Med 1997;337:963-9.

Landeira CA. Dificultades en el diagnóstico de la FQ. Servicio de pediatría. Hospital Infantil La Paz. Madrid. Rev Patol Respir 2002; 5 Suppl 1:31-2

Lapthorn AJ, Harris DC, Littlejohn A, Lustbader JW, Canfield RE, Machin KJ, Morgan FJ, Isaacs NW Crystal structure of human chorionic gonadotropin. Nature 1994; 369:455-461

Larsen J, Campbell S, Faragher EB, Gótz M, Eichler **I,** Waldherr S, y cols., Cystic fibrosis screening in neonates measurement of immunoreactive tripsin and direct genotype analysis for AF508 mutation. Eur J Pediatr 1994;153:569-73

Lemonnier F, Laroche D, Brouard J, Lecointre C and Travert G. Congenital Hypothyroidism: Spontaneous of thyrotropin (TSH) and free thyroxine (FT4) during the first two weeks of life. In: In: Levy H.L, Hermos R.J and Grady G.F eds. Proceedings of the Third Meeting of the International Society for Neonatal Screening 1996; Oct. 20- 23 Boston, New England regional newborn screening program, 1996:234-237.

Lemus H, Loza D, Benitez MG, Escobedo J, Fernández **I,** Zarate A. Congenital hypothyroidism newborn screening in Mexico. Book of abstracts 4th meeting of the international society for neonatal screening. 1999; june 13-16 Stockholm. Stockholm convention bureau, 1999:90.

Levine MA, Jap TS, Hung W. Infantile hypothyroidism in two sibs: an unusual presentation of pseudohypoparathyroidism type la. Journal of Pediatrics 1995; 107: 919- 922.

Levy H, Albers S. Genetic screening of newborns. Annu Rev Genomics Hum Genet 2000; I: 199-77.

Libert F, Lefort A, Gerard C, Parmentier M Perret J, Ludgate M, Dumont JE, Vassart G Cloning, sequencing and expression of the human thyrotropin (TSH) receptor: evidence for the binding of autoantibodies. Biochem Biophys Res Commun 1989; 165:1250- 1255

Lovborg U. Guide to solid phase immunoassays. Roskilde, Denmark: Nunc; 1984

Lowry DH; Rosembrough HJ, Farr AL; y Randal RJ. Protein measurement with the folin phenol ragent. J Biol Chem. 1951; 193:265-269.

Lyczak J, Cannon C, Pier G. Lung infections associated with Cystic fibrosis. Clinical Microbiology Reviews 2002; 15(2): 194-222

Macchia EP, De Felice M and Di Lauro R. Molecular genetics of Congenital Hypothyroidism. Genetics & Development 1999; 9:289-294.

Maeolini R, y Masseyeff R. A sandwich meted for enzyme immunoassay. **I.** Application to rat alpha fetoprotein. J Immunol Methods 1975; 8: 223-234.

Magner JA Biosynthesis, cell biology, and bioactivity of thyroid-stimulating hormone: update 1994. In: Braverman LE, Refetoff S (eds) Endocrine Reviews Monographs. The Endocrine Society, Rockville, MD, 1994;3, p.55-60

Mak V, Zielenski J, Tsui LC. Proportion of cystic fibrosis gene mutations not detected by routine testing in men with obstructive azoospermia. JAMA 1999;281:2217-24

Marrack J Marrack J. Nature of antibodies. Nature 1934; 133: 292-293.

Marrero, N. Tamizaje de Hipotiroidismo Congénito, Fenilcetonuria, Galactosemia y deficiencia de Biotinidasa empleando la tecnología SUMA. (Tesis de maestría), Centro Nacional de Genética Médica, Centro de Inmunoensayo, C Habana, 2001.

Misrahi M, Loosfelt H, Atger M, Sar S, Guiochon-Mantel A, Milgrom E Cloning, sequencing and expression of human TSH receptor. Biochem Biophys Res Commun 1990; 166:394-403.

Monaga M UMELISA 170HP Suero: Ensayo para la determinación de 17 a- hidroxiprogesterona en muestras de suero humano [Tesis de Diploma], Ciudad Habana: Universidad de la Habana; 2002

Morton T, Myszka D, Chaiken **I.** Binding constants. Analytical Biochemistry 1995; 227: 176-185

Murray J. Screening for CF. Health Technology Assessment . Vol.3, N° 8. 1999.

Nagayania Y, Kaufman KD, Seto P, Rapoport B Molecular cloning, sequence and functional expression of he thyrotropin receptor. Biochem Biophys Res Commun 1989; 165:1184-1190

Nakane PK, Pierce GB. Enzyme labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. J Histochem Cytochem 1966; 14:929

Naruse H. The result of parallel assay of TSH and T4 in the same sample. In Naruse H, Irie M (Eds). "Neonatal Screening". Amsterdam. Excerpta Medica. 1983: 69.

National Committee for Clinical Laboratory Standards Evaluation of the linearity of quantitative analytical methods; Proposed Guideline. NCCLS document EP6-P6. Villanova, PA: The Committee; 1986.

Nieba L, Krebber A, Pluckthun A. Competition BIACORE for measuring true affinities: Large differences from values determined from binding kinetics. Analytical Biochemistry, 1996; 234: 155-165

Nixon GM, Armstrong DS, Carzino R, Carling JB, Olinsky A, Robertson CF, y cols., Early airway infection, inflammation and lung function in Cystic Fibrosis. Arch Dis Child 2002;87:306-311

None PG, Pue CA, Zhou Z. Lung disease associated with the CFTR gene. Am J Respir Crit Care Med 2000,162:1919-24.

Nousia-Arvanitakis S, Arvanitakis C, Desai N, Greenberger NJ. Diagnosis of exocrine pancreatic insufficiency in cystic fibrosis by the synthetic peptide N-benzoyl-L-tyrosyl- p-aminobenzoic acid. J Pediatr 1978;92:734-7

Novo C, Domingos A. and Karmali A. Purification and characterization of monoclonal antibodies against the free alpha-subunit of human chorionic gonadotrophin. Mol Biotechnol., 17, 119-28,2001

Ochoa R, Martínez JC, Ferriol X, Estrada E, García AM, Blanco R, cols., Guía para la estandarización de técnicas inmunoenzimáticas en ensayos de vacunas. VacciMonitor 2000;9(3): 13-8

Ochoa R, Martínez JC, Ferriol X, García AM, Estrada E, Blanco R, cols., Principios y procedimientos para la validación de inmunoensayos cuantitativos empleados para evaluar la inmunogenicidad de vacunas. VacciMonitor 1999;8(10):9-13.

Ochoa R A new format ELISA for the detection of HBsAg. Biotecnología Aplicada 1998;15:250-3

Odell WD, Wilber JF, Paul WE. Radioimmunoassay of thyrotrophin in human serum. J Clin Endocrinol Metab 1965;25:1179-88

Oellerich M Enzyme immunoassay: A review. J Clin Chem Clin Biochem 1984;22:895- 904.

Organización Mundial de la Salud. Guidelines on the prevention and Control of CH. Division of noncommunicable diseases and Health Technology. OMS 1991.

Ouchterlony O, y Nilsson LA. Immunodiffusion and immnoalectrophosesis. En: Weir, **D** M, (ed) Handbook of Experimental Immunology. Voll, 3 ed. Blackwell Scientific Publication, Oxford, England, 1973; pp 19.1.

Paju A, Bjartell A, Zhang WM, Nordling S, Borgström A, Hansson J, Stenman UH. Expression and characterization of trypsinogen produced in the human male genital tract. Am J Pathol 2000; 157: 2011-2021.

Parmentier M, Libert F, Maenhaut C, Lefort A, Gerard C, Perret J, Van Sande J, Dumont JE, Vassart G. Molecular cloning of the thyrotropin receptor. Science 1989; 246:1620- 1622

Pass KA. Early hospital dischargue: impact on newborn screening statement of the conference. In: Second Draft Standard for final review at the Twelfth National Neonatal Screening Symposium, Boston, Oct 21-24, 1996. Report of Joint Astphld and Com Committee on Neonatal Screening Standardization and Recommendations, Sept 30, 1996:18-22.

Peper, D. S. Production and characterization of solid phase immunoadsorbents. En: Laboratory Methods in Immunology. Vol II, pp205-228, 1990.

Perora GA, Di Sant'Agnese PA, Darling RC, Shea E. Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas: clinical significance and relationship to the disease. Pediatrics 1953;12:549-563

Peres O, Briard ML, Lemonnier F, Pasquet-Ferre C, Blondin C, Travert G, y cols., Neonatal CF screening: New Tends. Caen, Francia. Archives Francises de Pediatrie 1990;47:251-253

Pierce JG, Parsons TF Glycoprotein hormones: structure and function. Annu Rev Biochem 1981; 50:465-495

Plikaytis BD, Turner SH, Gheesling LL, Carlone GM. Comparisons of standard curve- fitting methods to quantitate Neisseria meningitidis group A polysaccharide antibody levels by enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol 1991; 29:1439-46.

Pohlenz J, Refetoff S. Mutations in the sodium iodide symporter (NIS) gene as a cause for iodide transport defects and CH. Biochimie 1999; 81(5):469-476.

Pohlenz J, Rosenthal IM, Weiss RE, Jhiang SM, Burant C, Refetoff S. Congenital Hypothyroidism due to mutations in the sodium/iodide symporter.Identification of a nonsense mutation producing a downstream cryptic 3'splice site. Journal Clinical Investigation 1998; 101:1028-1035.

Pollit RJ. Neonatal screening for inborn errors of metabolism: cost, yield and out come. Health Technology Assessment. 1997;(1):7:111-126

Porcellini A, Fenzi G, Avvedimento EV. Mutations of thyrotropin receptor gene. Journal Mol Med 1997; 75:567-575.

Posadas AS. Transición del niño al adulto en FQ Rev Patol Respir 2002; 5Suppll :20-l

Prados C, Maiz L, Antelo C, Baranda F, Blázquez J, Borro JM, y cols., Fibrosis quistica: consenso sobre el tratamiento del neumotorax y de la hemoptisis masiva y sobre las indicaciones de trasplante pulmonar. Arch Bronchoneumol 2000;36:411-6

Quinn FA, Scopp R, Lach A, Drake C, Mo M, Albright J, Trimpe K. A comparison of defferent matrices for evaluating functional sensivity, imprecision and dilutionm linearity of abbott ARCHITECT ®i2000 ® TSH assay. Clin. Chem. Lab. Med 2002; 40(7): 709-712.

Quinton PM, Bijman **J** Higher bioelectric potentials due to decreased chloride absorption in the sweat glands of patients with cystic fibrosis. N Engl J Med 1983;308:1185-9

Raimann BE, Cornejo EV. Una primera aproximación al diagnóstico y tratamiento de errores innatos del metabolismo. En: Colombo CM, Cornejo EV, Raimann BE, editoras. Errores innatos en el metabolismo del niño, la ed. Santiago de Chile: editorial Universitaria; 1999 p. 45-56.

Rainisio MG, Harms HK, Hodson ME, Navarro J, Strandvik J. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis. A European epidemiological study. Eur Respir J 2000;16:464-71

Ranganathan SC, Dezateux C, Bush A. Airway function in infant newly diagnosed with CF. Lancet 2001;358:1964-5.

Reiner L. On the chemical alteration of purified antibody-proteins. Science 1930; 72: 483- 484

Ricoux R, Chazaud B, Tresca JP, Pontet M. Quality control of coated antibodies: new, rapid determination of binding affinity. Clin Chem Lab Med, 2000; 38: 239-43.

Rinderknecht H. Renner IG, Abramson SB, Carmack C. Mesotrypsin: a new inhibitor- resistant protease from a zymogen in human pancreatic tissue and fluid. Gastroenterology, 1984; 86:681-92

Riordan JR. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Annu Rev Physiol 1993;55:609-30.

Rock MJ, Mischler EH, Farell PM, Bruns WT, Hassemer DJ, Laessig RH Immunoreactive trypsinogen screening for cystic fibrosis: characterization of infants with false-positive screening test Pediatr Pulmonol 1989; 6. 42-48

Rock MJ, Mischler EH, Farrel PM. Newborn screening for cystic fibrosis is complicated by age-related decline in immunoreactive tripsinogen levels. Pediatrics 1990;85:1001-7

Rodríguez L, Balmaseda A, Bravo J, Trujillo J, Martinez L, Ochoa R, cols., Validación de un ultramicroELISA de detección de anticuerpos contra el antígeno de superficie de la hepatitis B. Rev Cubana Med Trop 1996;48(1):45-9

Rosemstein BJ, Curting GR For the Cystic Fibrosis Consensus Panel. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. J Pediatr 1998;132:589-595

Rosenfeld M, Davis R, Fitzsimmons S, Pepe M, Ramsey B. Gender gap in CF mortality. Am J Epidemiol. 1997;145:794-803.

Rugg JA, Flaa CW, Dawson SR , Rigl CT, Leung KS, Evans SA. Automated quantification of thyrotropin by radial partion immunoassay. Clin. Chem. 1988, 34/1: 118-122

Salcedo A. Aspergilosis broncopulmonar alérgica. An Esp Pediatr 1999,133:16-21

Sardovia Iyer M, Hamilton B, Little Ch, Ayers L, Becker **W,** Lott **J.** Benefits of two-tier cut-off for TSH hypothyroidism assay. Book of abstracts 4th meeting of the international society for neonatal screening. 1999; june 13-16 Stockholm. Stockholm convention bureau, 1999:77.

Scatchard G ANN, N Y ACAD. SCI 1949; 51:660

Scheele G, Bartelt D, Bieger W. Characterization of human exocrine pancreatic proteins by two-dimensional isoelectric focusing/sodium dodecyl sulfate gel electro-phoresis. Gastroenterology, 1981; .80: 461-73

Schulz IJ. Micropuncture studies of the sweat formation in cystic fibrosis patients. **J.** Clin. Investig 1969; 48:1470-1477

Segal E, editor. Consenso de Fibrosis Quistica. Arch pediatr 1999; 97(3): 188

Seltzer VVK, Accurso F, Fall MZ, Vanriper AJ, Descartes M, Huang Y. Screening for CF: Feasibility of molecular genetic analysis of dried blood specimens. Colorado and Texas, USA. Biochemical Medicine and Metabolical Biology 1991;46:105-109.

Serra-Prat M. Cribaje neonatal de la fibrosis quistica. Barcelona: Agencia d Avaluado de Tecnología i Recerga Mediques. Servei Catala de la Salut. Departament de Sanitat i Seguretat Social. Generalitat de Catalunya. Enero 2000 (BRO1/2000).

Serret A, Rosales **I.** Validación de métodos analíticos. Segundo Taller Nacional de Validación. Ciudad de La Habana: Grupo Nacional de Validación; 1997

Skov M, Koch C, Reimert CM, Poulsen LK. Diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) in cystic fibrosis. Allergy 2000;55:50-8.

Slattery DIM, Waltz DA, Denham B, **O** mahony M, Greally P. Bronchoscopically administered recombinant human DNAse for lobar atelectasis in cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol 2001 ;31 (5):383-8

Sprague K, GraiTG, Tobias DJ Noninvasive ventilation in respiratory failure due to cystic fibrosis. South Med J 2000;93(10):954-61

Statgrapliies® plus for Windows TM [computer program] Version 3.1. Statistical Graphic Corp. USA; 1998.

Steinitz M, Baraz L. A rapid method for estimating the binding of ligands to ELISA microwells. Journal of Immunological Methods 2000;238:143-150

Steinkanip G, Ullrich G, Muller C, Fabel H, Von der Hardt H. Transition of adult patients with cystic fibrosis from paediatric to adult care. The patients' perspective before and after startup of an adult clinic. Eur J Med Res 2001;6:85-92

Stenman IIH, Koivunen E, Vuento M. Characterization of a tumor-associated serine protease. Biol Chem Hoppe Seyler, 1988; 369: Suppl, 9-14

Stern RC. The diagnosis of cystic fibrosis. N Engl J Med 1997; 336: 487-91

Steward MW, Lee AW The importance of antibody affinity in the perfomance of immunoassays for antibody. J Immunol; 1985 (78): 173-190.

Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC. CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. Science 1995;269:847-50

SufTin S C, Muck **K B,** Young J C, Lewin **K** Porter **D D** Improvement of the glucose oxidase immunoenzyme technic. Use of a tetrazolium whose formazan is stable without heavy metal chelation. Am J Clin Pathol 1979; 71: 492-496

Sunthornthepvarakul T, Gottschalk M, Hayashi Y, Refetoff S. Resistence to thyrotropin caused by mutations in the thyrotropin receptor gene. New Journal of England Medicine 1995; 332:155-160.

Suzuki N, Quesenberry MS, Wang **JK,** Lee **RT,** Kobayashi **K,** Lee YC. Efficient immobilization of proteins by modification of plate surface with polystyrene derivatives. Analytical Biochemistry 1997;247:412-6.

Takahaschi M, Kitamura T, Imamura H, Miura M, Morijiri Y. Pitfalls of neonatal screening for congenital hypothyroidism. En: Levy HL, Hermos RJ, Grady GF, editors. Proceedings of third meeting of the international society for neonatal screening. 1996; Oct 20-23; Boston. New England regional newborn screening program, 1996: 261-262.

Tijssen P. Non-immunologic molecular recognition systems used in immunoassays. En: Burdon RH, Van Knippernberg PH, editores. Practice and Theory of Enzyme Immunoassays I[a] ed. London-New York-Tokyo: Elsevier Amsterdam; 1993. p21 -24

Tijssen P. Practice and theory of enzyme immunoassay. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, vol, 15). Amsterdam: Elsevier Science Publishers
B V;1993.

Torresani TE, Qui-Qing, lllig **R** Thyrotropin enzymeinmunoassay in dried blood spots: a spectrophotometric method for neonatal thyroid screening. **J** Clin Chem Biochem. 1986b; 24:199-203

Torresani TE, Sherz **R** Thyroid screening of neonates without use of radioactivity: evaluation of time-resolved fluoroinmunoassay of thyrotropin. Clin Chem. 1986a; 32: 1013-1016,

Tuuminen T, Rakkolainen EM, Welin Y, Weber TH, Nylander P and Kapyaho Y, A rapid fluorometric enzyme immunoassay for the determination of neonatal TSH from blood spots.Clin Chem. 1991; 167-178.

Van Weenien BK, Schuurs AH. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. FEBS Lett 1971 ;15:232

Vazquez C. Diagnóstico de la Fibrosis Quistica. An Esp Pediatr 1999;50:431-438.

Vela M, Gamboa S, Loera-Luna A, Aguirre BE, Pérez-Palacio G, Velázquez A. Neonatal screening for CH in Mexico: experience, obstacles, and strategies. Journal of Medical Screening 1999;6:77-79.

Vlahakis NE, Aksamit **TR.** Diagnosis and treatment of allergic bronchopulmonary aspergillosis. Mayo Clin Proc 2001;76:930-8.

Volbracht T, Beyer P, Weber B, Helge H. TSH measurements from blood spots on filter paper by enzyme immunoassay (EIA) alternative to RIA as screening procedure for neonatal hypothyroidism.Advances in neonatal screening Amsterdam.Elsevier Science Publishers. 1987; 153-155.

Voller A, Bartlett A, Bidwell D, eds. Immunoassays for the 80s. Lancaster, U.K.: MTP Press Ltd 1981.

Voller A, Bartlett A, Bidwell DE. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. J Clin Pathol 1978;3 1:507

Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. The Elisa: a guide with abstracts of microplate application Guernsey:Dynatech Europe, Borough House; 1979.

Wang XJ, Moylan B, Leopold DA. Mutation in the gene responsible for cystic fibrosis and predisposition to chronic rhinosinusitis in the general population. JAMA 2000;284:1814-9.

Waters I)L, Dorney SFA, Gaskin KJ, Grauca MA, O'Halloran M, Wilken B. Pancreatic function in infants identified as cystic fibrosis in a neonatal screening program. N Engl J Med 1990; 332:303-308

Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. Cell 1993;73:1251-4

Wide L. Solid-phase antigen-antibody system. In Radioinmunoassay methods Kirkham, K. E. And Hunter, W. M., eds, pp 405-412, Churchill Livingstone 1971.

Wilfond BS, Farrel PM, Laxova A, Mischler E. Severe hemolytic anemia associated with vitamin E deficiency in infants with cystic fibrosis. Clin Pediatr 1994;33:2-7.

Wine JJ The genesis of cystic fibrosis lung disease. J Clin Invest 1999; 103:309-12

Wondisford FE, Radovick S, Moates JM, Usala SJ, Weintraub BD Isolation and characterization of the human thyrotropin b-subunit gene. Differences in gene stucture and promoter function from murine species. J Biol Chem 1988; 263:12538-12542

Wondisford FE, Usala SJ, DeCherney SG, Castren M, Radovick S, Gyves PW[r], Trempe JP, Kerfoot BP, Nikodem VM, Carter BJ, Weintraub BD Cloning of the human thyrotropin b-subunit gene and transient expression of biologically active human thyrotropin after gene transfection. Mol Endocrinol 1988; 2:32-39.

Woodhead JS, Weeks 1. Immunochemiluminometric assay based on acrinidium labels with a microtiter plate luminometer (Tech Brief). Clin. Chem. 1991; 37: 472

Wu H, Lustbader JW, Liu Y, Canfield RE, Hendrickson WA Structure of human chorionic gonadotropin at 2.6 Á resolution from MAD analysis of the selenomethionyl protein. Structure 1994;2:545-558

WWW.Abcain.coni.

Yarmush, M. L y Colton, C. K Affinity chromatograflhy,. En: Moo-Young, M (Ed) Comprehensive Biotechology. Pergamon Pess, pp:507-521, 1985

/aniiini M, Avvantagiato V, BifTali E, Arnone Ml, Sato K, Pischetola M, cols., The expression of TTF-2 is consistent with a dual role in thyroid differentiation Embriol J 1997; 16; 3185-3197.

Zenke G, Strittmatter U, Tees R, Andersen E, Fagg B, Kocher P, cols., A cocktail of three monoclonal antibodies significantly increases the sensitivity of an enzyme immunoassay for human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Journal of Immunoassay, 1991; 12 (2): 185-206.

Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas
Dirección B M.N
CNICM INFOMED

Anexo 1.

Resultados de la evaluación de los anticuerpos monoclonales para su empleo en el diseño de UMELISA TSH Suero y UMELISA TSH Neonatal

Pruebas para la optimización de los UMELISA TSH suero y UMELISA TSH Neonatal.

1. Determinación de la concentración óptima de recubrimiento de las placas para el UMELISA TSH (suero) y UMELISA TSH Neonatal.

Partiendo de los resultados obtenidos durante la caracterización de los AcM anti P-TSH. decidimos utilizar los AcM 2C1-G10 y 4A2-A8 para el recubrimiento de la fase sólida con el objetivo de sustituir los anticuerpos policlonales de camero anti P-TSH utilizados hasta el momento.

S realizó la evaluación de las diferentes relaciones de los AcM 2C1-G10 y 4A2-A8 (1:1; 2:1; 1:2) en el recubrimiento de las placas, tomando para el análisis los valores de fluorescencia de los diferentes puntos de concentración de la curva estándar (Tablas 1 y 2. Se utilizó como control la curva de calibración obtenida empleando como recubrimiento los anticuerpos policlonales anti p-TSH.

Tabla 1. Análisis de las diferentes variantes de recubrimiento UMELISA TSH Neonatal.

Curva TSH (mUI/L)	Control	Relación 1:1 (2C1-4A2)	Relación 2:1 (2C1-4A2)	Relación 1:2 (2C1-4A2)
0	5.9	3.05	3.8	3.5
10	10	13.7	14	13.8
25	15	26.05	23.1	22.2
50	20	43	35	37
100	65	95.2	85.4	85.7
200	131	172.9	175.2	179
R^2	0.983	1	0.994	0.997
Dócma para la falta de ajuste	Fcalc=90.54*	Fcalc=2.27	Fcalc=35.72*	Fcalc=4.23

**Significativo para a<0.05 *Para la dócima de la pendiente la* $F_{tab(1,2)}=4.96$. ***Para la dócima de la falta de ajuste* $Ftab_{(2,4)}=4.53$.

Tabla 2. Análisis de las diferentes variantes de recubrimiento para el UMELISA TSH (suero).

Curva TSH (mUI/L)	**Control**	Relación **1:1 (2C1-4A2)**	**Relación 2:1 (2C1-4A2)**	**Relación 1:2 (2C1-4A2)**
0	5.2	3.8	3.8	3.5
3	14.9	25.7	14.	13.8
6	30.8	49.3	23.1	231
12	49.1	77.6	35	35.3
24	106.4	140.3	85.4	62.9
48	129.9	180	175.2	93.85
R^2	0.94	0.999	0.95	0.995
Dócma del ajuste	Fcalc=69.74*0	Fcalc=1.55	Fcalc=583*	Fcalc=1.91

Significativo para a<0.05 *Para la dcsima de la pendiente la $F_{tab(1,2)}$= 4. 96. **Para la dócima de la falta de ajuste* *$F_{tab(2,4)}$=4.53.***

Se puede observar en la determinación de la concentración óptima del recubrimiento para el UMELISA TSH Neonatal así como para el UMELISA TSH (suero) que solamente las curvas obtenidas con las mezclas a una relación 1:1 y 1:2 de los AcM 2C1-G10 y 4 A2-A8, evidencian un valor de R^2 =1 o cercano a 1 con un excelente ajuste en las curvas estándar para una a<0.05. La variante seleccionada para el recubrimiento fue la relación 1:1 de la mezcla de los AcM y como concentración óptima para el UMELISA TSH (suero) quedó establecida 5µg/mL de cada AcM en la mezcla (dato no mostrado). En el caso de la concentración óptima de recubrimiento de la mezcla de AcM para el UMELISA TSH Neonatal, quedó establecido 10µg/mL (dato no mostrado).

2. Determinación de las condiciones óptimas (temperatura y tiempo) de incubación de la inmunoreacción del ensayo.

Para la determinación del tiempo y temperatura de incubación de la inmunoreacción comparamos dos variantes, tomando como control el procedimiento empleado en los ensayos que utilizan en el recubrimiento anticuerpos policlonales de camero anti β -TSH respecto al recubrimiento con la mezcla de AcMs anti β-TSH. En la tabla 3 y 4 se observa la comparación entre la variante 2 h TA y 2 h 37°C para el ensayo UMELISA TSH Neonatal y UMELISA TSH (suero).

Tabla 3. Análisis de las diferentes variantes de tiempo y temperatura en el UMELISA TSH Neonatal.

Curva TSH (mUI/L)	Control	2 hs TA	2 hs 37°C
0	5.9	1.7	1.45
10	10	9.6	8.52
25	15	27.9	24.34
50	20	53	45.1
100	65	83.4	77.7
200	131	145.4	129.66
R^2	0.983	0.9X7	0.978
Dócima para la falta de	Fcalc=5.43**	Fcalc=2.1	Fcalc=4.89**

**Significativo poro a< 0.05 *Para lo dócima de la pendiente lo $F_{tab(1,2)}$=4. 96. **Para la décima de la falta de ajuste $E_{tab(2.4)}$=4.53.*

Tabla 4. Análisis de las diferentes variantes de tiempo y temperatura en el UMELISA TSH Suero.

Curva TSH (mUI/L)	Control	2 hs TA	2 hs 37°C
0	5.2	6.33	4.6
3	14.9	15.4	17.26
6	30.8	33.6	33.5
12	49.1	44.6	50.7
24	106.4	75.1	84.9
48	129.9	133.7	150.3
R^2	0.94	0.991	0.993
Dócima para la falta de	Fcalc=6.34**	Fcalc=5.65**	Fcalc=2.43

**Significativo poro a<0.05 *Paro lo dócima de lo pendiente lo $F_{tab(1,2)}$= 4.96. **Poro la décimo de la falta de ajuste $F_{tab(2,4)}$ =4-5 3.*

La condición óptima para la inmunoreación en cl ensayo UMELISA TSH suero fue de 2 hs a 37°C mientras que para cl ensayo UMELISA TSH Neonatal la condición de inmunoreación óptima es de 2 hs a TA.

Determinación del tiempo óptimo de elución de las muestras**, **controles y curva de estándar en te ensayo UMELISA TSH Neonatal.

El valor de fluorescencia para el último punto de concentración de la curva de calibración durante la determinación del tiempo de elución en el UMELISA TSH Neonatal se muestran en las Figuras 1. No se evidencian diferencias significativas (α<().()5) durante el proceso de elución en cl intervalo de tiempo de 1-3 hs. por lo tanto la elución de las muestras, curva estándar y controles se estableció por 1 h. Esta condición es la más factible desde cl punto de vista analítico, ya que cl ensayo se ejecuta en un tiempo menor.

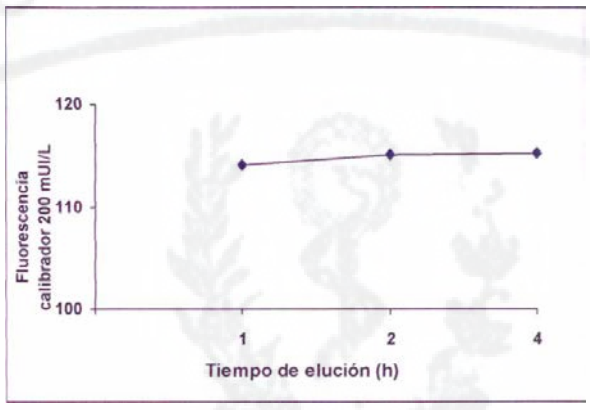


Figura 1. Evaluación del tiempo de elución de las muestras, curva de calibración y controles en el UMELISA TSH Neonatal.

4. Determinación de la dilución óptima de trabajo del conjugado Policlonal en carnero anti α-TSH /fosfatasa alcalina en el UMELISA TSH Neonatal.

En el caso de la titulación del conjugado anticuerpo policlonal en camero anti α-TSH la dilución óptima del conjugado fue 1:15000 para el ensayo UMELISA TSH Neonatal y 1:20000 para el UMELISA TSH (suero). Con esta dilución se obtiene una señal de fluorescencia adecuada, con una buena pendiente permitiendo la cuantificación exacta en todo el rango analítico de las curvas.

Validación del ensayo UMELISA TSH Neonatal.

1. ***Precisión***: Se logró una precisión intra e interensayo entre el 5 y 10% (Tabla 5).

Tabla 5. Estudio de precisión intraensayo e internesayo evaluando 10 y 20 replicas respectivamente.

TSH (mUI/L)	**Intraensayo (n = 10)**		**Interensayo (n = 30)**	
	DE	CV	DE	CV
9,78	0,99	10,12	0,96	9,76
24,07	0,82	3,40	0,99	4,10
100,18	5,23	5,22	5,79	5,77

n: Número de réplicas *DE: Desviación Estándar (mUI/L)* *CV: Coeficiente de Variación (%)*

Los coeficientes de variación promedio intra e interensayo obtenidos fueron de 6,24 y 6,54% respectivamente.

2. ***Exactitud.*** El recobrado del sistema para tres muestras diferentes se ubicó generalmente en el intervalo comprendido entre ± 10% del valor esperado, lo que denota una alta exactitud (Tabla 6).

Tabla 6. Exactitud del ensayo para la determinación de los niveles de TSH.

Valor obtenido de concentración de TSH (mUI/L)	**Valor esperado de concentración de TSH (mUI/L)**	**% de Recuperación**
12	11,55	96,25
50	50,4	100.8
100	98,95	98,95

3. ***Ensayo de paralelismo.*** Esta prueba demostró la independencia entre el valor de la concentración de cada muestra de la dilución de trabajo empleada, para el rango de medición evaluado (Figura 2). La pmeba presentó CV entre las diluciones menor al 10% y un R^2 >0.98.

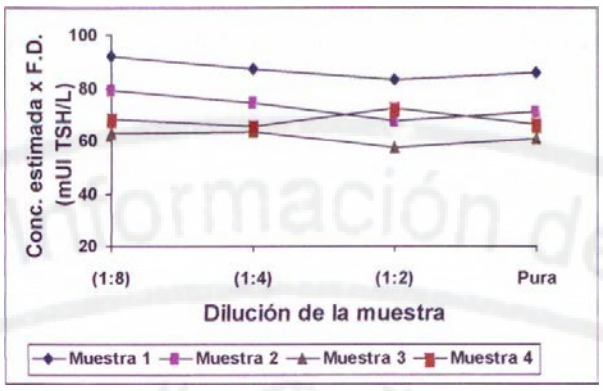


Figura 2. ***Prueba de paralelismo en el UMELISA TSH Neonatal FD: Factor de dilución de la muestra.***

4. *Límite de detección* La concentración mínima dctcctable que genera una respuesta consistentemente mayor que cl valor de fondo del ensayo fue de 1.3mUI/L.
5. *Prueba de reactividad cruzada:* Para cl análisis de la especificidad, se evaluó la reactividad cruzada con las hormonas LH. FSH y hCG. No se presentó reactividad cruzada con las hormonas estudiadas, por lo que el ensayo es altamente específico para la TSH (Tabla 7).

Tabla 7. ***Estudio de especificidad en el UMELISA TSH Neonatal.***

Proteínas	Concentración	Concentración aparente de TSH (mUI/mL)	RC
LH	1 µg/mL	< 1.3 mUI/L	no detectable
FSH	1 µg/m L	< 1,3 mUI/L	no detectable
hCG	1 µg/mL	< 1,3 mUl/L	no detectable

RC: *Reactividad Cruzada.*

6. ***Correlación del ensayo VME US A TSH policlonal contra UMELISA TSH Monoclonal:*** Los resultados de la regresión lineal se muestras a continuación (Figura 3,4).

MODEL MOD_1.

Dependent variable.. MAB **Miethod..** LINEAR

Listwise Deletion ot Missing Data

Multiple R	**.99471**
R Square	.98945
Adjusted R Square	.98944
Standard Error	1.78852

Analysis of Variance:

	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	1	366760 18	366760.18
Residuals	1223	3912.12	3.20

F = 114655 94849 Signif F= 0000

Figura 3. Constantes de la ecuación y Análisis de Varianza de la Regresión Lineal. (a — 0.05).

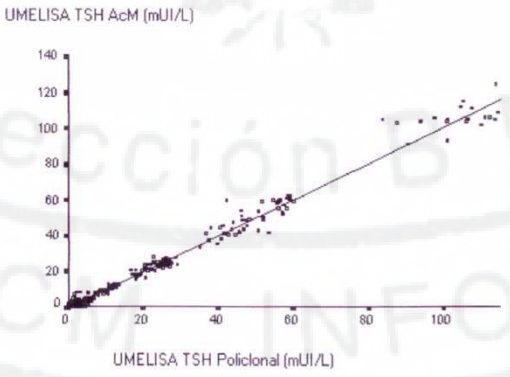


Figura 4. ***Correlación del UMEIJSA TSH Neonatal con placas recubiertas con la mezcla de los AcM respecto a! IJMEIJSA TSH con placas recubiertas con anticuerpos policlonales.***

El estudio de comparación de los valores de concentración de las muestras de sangre seca sobre papel de filtro corridas en placas sensibilizadas con AcM y placas con anticuerpos policlonales mostró una correlación (r = 0,9947) y la ecuación de regresión obtenida fue y = 1,0116 x + (-0,1609), donde el eje de las ordenadas se

presenta los valores de concentración de TSH (mUI/L) correspondiente a las placas rccubicrtas con la mezcla de AcM con una relación 1:1 y en cl eje de las abscisas a los valores de concentración de TSH (mUI/L) obtenidos con las placas rccubicrtas con anticuerpos policlonales de carnero anti p-TSH.

7. ***Correlación del ensayo UMELISA TSH Neonatal con un ensayo de la firma comercial Delfia hTSH Neonata!***: El estudio de correlación entre cl UMELISA TSH y cl ensayo comercial Dclfia hTSH Neonatal mostró un índice de correlación de r = 0.99 y la ecuación de regresión obtenida fue y = 0.97 x +1.49, donde cl eje de las ordenadas se presenta los valores de concentración de TSH (mUI/L) correspondiente al UMELISA TSH y en el eje de las abscisas a los valores de concentración de TSH (mUI/L) obtenidos por el ensayo comercial (Figura 5).

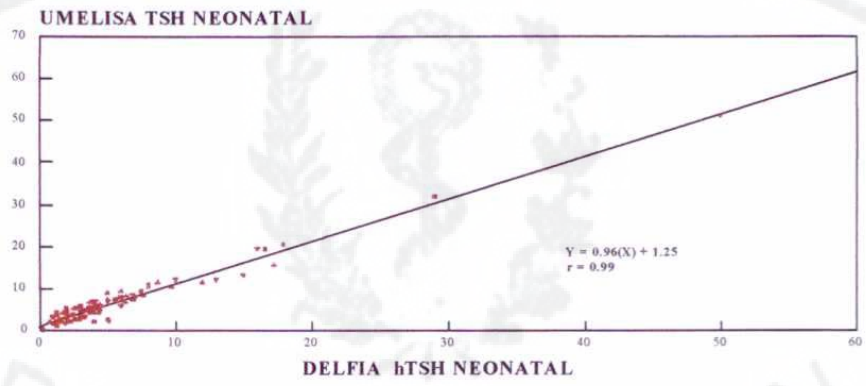


Figura 5. Correlación del UMELISA TSH Neonatal respecto al ensayo comercial de referencia Del fia hTSH Neonatal.

8. ***Determinación de los niveles de corte para las muestras de suero de cordón umbilical, sangre de cordón umbilical y sangre de talón:*** En las figuras 6, 7 y 8 se observa la distribución de frecuencia de los valores de concentración de TSH (mUl/L) en población de recién nacidos.

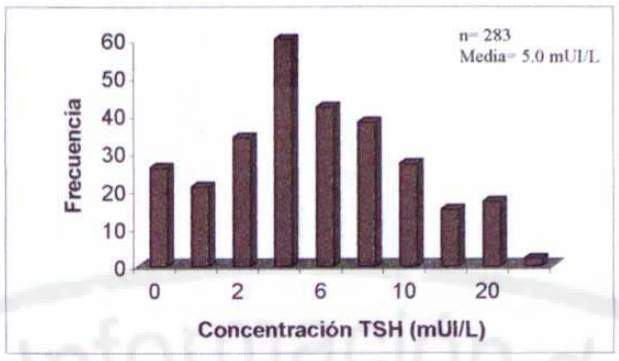


Figura 5. Distribución de la concentración de TSH en suero del cordón umbilical.

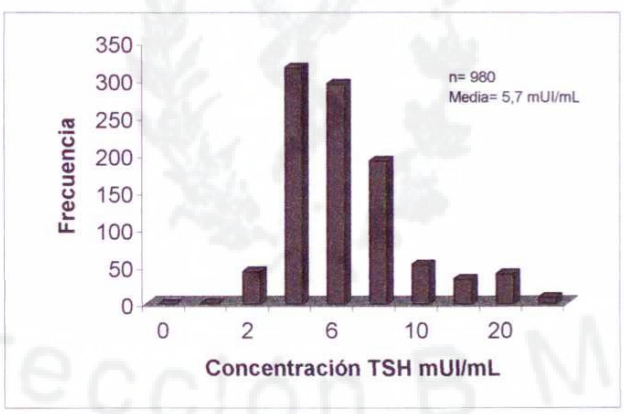


Figura 6 Distribución de la concentración de TSH en sangre del cordón umbilical.

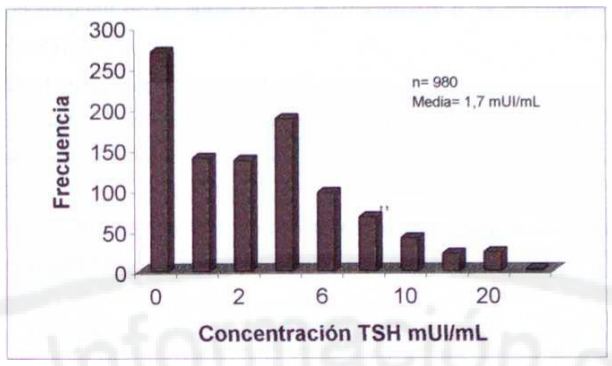


Figura 7. ***Distribución de Ia concentración de TSH de talón entre el 5to y 7mo día de nacido.***

Quedo establecido como nivel de corte el 98.5 percentil de la distribuciones que correspondió con un valor de concentración de 30mUI/L para suero de cordón umbilical. 25mUI/L para sangre de cordón umbilical y 15mUI/L para sangre de talón.

Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas
Dirección B M.N
CNICM INFOMED

Anexo 2

Resultados de la evaluación de los anticuerpos monoclonales para su empleo en el diseño del UMELISA TIR Neonatal

Pruebas para la optimización del UMELISA TIR Neonatal.

/. ***Determinación de la concentración óptima de recubrimiento para cl UMELISA TIR Neonatal.*** Partiendo de los resultados obtenidos durante la caracterización de los AcM anti Tripsina, decidimos utilizar en AcM 3H9 para el recubrimiento de la fase sólida.

En la tabla 1 se recogen los resultados de las curvas de calibración obtenidas para cada concentración de recubrimiento durante el proceso de titulación.

Tabla /. Análisis de las diferentes variantes de recubrimiento para el UMELISA TIR Neonatal empleando el Ac Policlonal anti-Tripsina humana.

Curva TIR (ng/mL)	2ug/mL	4ug/mL	6ug/mL	8ug/mL	lOug/mL
0	1.95	1.90	1.81	1.85	1.88
41.7	24.55	25.46	24.58	24.63	26.46
116.1	57.21	58.83	56.68	56.31	60.01
257.7	84.94	86.41	87.86	87.29	90.13
639.8	114.16	114.05	111.19	106.43	110.18
1240.9	132.69	132.84	134.78	129.80	132.70
R^2	0.992	0.991	0.986	0.987	0.98
Dócima para la falta de ajuste	Fcalc=5.03**	Fcalc=2.45	Fcalc=3.9	Fcalc=3.38	Fcalc=6.9**

Significativo para a<0.05 *Para la dósima de la pendiente la $F_{tab(1,2)}$= 4.96. **P°ra Ia dócima de la falta de ajuste $F_{tab(2,4)}$=4-53.

Las curvas con mejor ajuste se obtuvieron a las concentraciones de recubrimiento de 4 a 8 µg/mL. Teniendo en cuenta que en el desarrollo de este tipo de ensayo se requiere el exceso de anticuerpo en el recubrimiento para garantizar la reproducibilidad de los resultados decidimos tomar cono concentración óptima de recubrimiento 6 µg/mL.

2. Determinación de las condiciones óptimas (temperatura y tiempo) de incubación de los ensayos.

En la tabla 2 se recoge la comparación entre las variantes 2 h TA y 2 h 37°C, asi como 17 hs TA y 17 hs 37°C para el ensayo UMELISA TIR Neonatal.

Tabla 2. Análisis de las diferentes condiciones de tiempo y temperatura de incubación de la inmunoreacción del ensayo.

Curva TIR (ng/mL)	17 hs TA	17 hs 37°C	2 hs TA	2 hs 37°C
0	1.95	1.90	1 81	1.85
41.7	39.1	23.4	32.5	35.5
116.1	67.6	51.6	57.3	56.8
257.7	93.95	80	84.5	83.8
639.8	121.4	106	111.4	110.4
1240.9	140	119.04	126.3	118.6
R^2	1	0.993	0.994	0.987
Dócima para la falta de ajuste	Fcalc=0.63	Fcalc=6.98**	Fcalc=5.15**	Fcalc=55.94**

**Significativo para a<0.05 *Para la dósima de la pendiente la F* $_{tab(1,2)}$*~4.96. **Para la dócima de la falta de ajuste* $F_{tab(2,4)}$ *=4.53.*

La variante seleccionada para la inmunorreacción es 17 hs a TA. pues es donde se observó un buen ajuste de la pendiente con un valor de R^2 =1.

3. Determinación de Ia concentración óptima de trabajo de los AcMs biotinilados en el UMELISA TIR Neonatal.

De igual forma se determinó la concentración óptima de los AcMs 2G6-biotina y 3H9-biotina analizando el valore de R" v el análisis de la dócima de la pendiente y ajuste de la curva de calibración del ensayo. Los resultados se recogen en la tabla 3.

Tabla 3. Análisis de las diferentes concentraciones del AcM 2G6-Biotina para el UMELISA TIR Neonatal.

Curva TIR (ng/mL)	AcMs -Biotina 0.5 µg/mL	AcMs-Biotina 0.25 µg/mL	AcMs-Biotina 0.1 µg/mL
0	1.95	1.90	1.81
41.7	9.6	15.5	18.5
116.1	42.25	45.46	50.3
257.7	68.1	68.1	80.45
639.8	88.15	88.15	107.4
1240.9	115.8	124.25	138.6
R^2	0.994	0.988	0.993
Dócima para la falta de ajuste	Fcalc=T6.23**	Fcalc=54.98**	Fcalc=2.08

**Significativo para a<0.05 *Para la dócima de la pendiente la* $F_{tab(1,2)}$*= 4.96. **Para la dócima de la falta de ajuste* $F_{tab(2,4)}$ *=4.53.*

Fue seleccionada como concentración óptima la mezcla de los AcMs 2G6-Biotina y 3H9-Biotina 0.1 µg/mL. pues fue la única variante que presentó ajuste, con un valor de R^2>0.98.

4. Determinación dei tiempo óptimo de elución de las muestras, controles y curva de estándar en le ensayo.

En la tabla 4 se observan los resultados obtenidos al evaluar 30 y 60 minutos de elución de las muestras y calibradores del papel de filtro utilizando la mezcla de los AcMs-biotina.

Tabla 4 *Análisis de las diferentes variantes de tiempo para la elución de las muestras de sangre colectadas en papel de filtro para el UMELISA TIR Neonatal.*

Curva TIR (ng/mL)	Elución 30 minutos	Elución 60 minutos
0	1.95	1.90
41.7	27.95	31.0
116.1	60.88	59.1
257.7	90.15	86.1
639.8	109.61	113.3
1240.9	131.16	126.7
R:	0.99	0.99
Dócima para la falta de ajuste	Fcalc=3.24	Fcalc=2.28

Significativo para **α<0.05 *Para la dócima de lo pendiente lo **$F_{tab(1,2)}$=4.96.** **Para la dócima de la falta de ajuste **$F_{tab(2.4)}$=4.53.***

En las dos variantes evaluadas se observó ajuste v un valor de R superior a 0.99 por lo que decidimos utilizar como tiempo óptimo de elución 30 minutos

5. Determinación de la dilución óptima de trabajo del conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina en el UMELISA TIR Neonatal.

En la tabla 5 se muestran los valores de fluorescencia obtenidos para cada punto de la curva de calibración, al evaluar 3 diluciones de trabajo del conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina.

Curva TIR (ng/mL)	Est/FA 1:25	Est/FA 1:40	Est/FA 1:50
0	1.95	1.90	1.81
41.7	21.7	19.3	17.8
116.1	46.6	39.5	31.4
257.7	76.6	62.6	45.7
639.8	102.7	81.2	63
1240.9	130.3	94.4	73
R^2	0.99	0.988	0.987
Dócima para la falta de ajuste	Fcalc=3.24	Fcalc=6.8**	Fcalc=16.7**

*Significativo para $\alpha<0.05$ *Para la dócima de la pendiente la $F_{tab(1,2)}=4.96$. **Para la dócima de la falta de ajuste $F_{tab(2.4)}=4.53$.*

Se seleccionó como dilución óptima de trabajo 1:25 a partir de la predilución 1:4700.

Validación del ensayo UMELISA TIR Neonatal.

1. Precisión: Se obtuvo como regla una precisión intra e interensayo entre el 5 y 10% (Tabla 6).

Tabla 6. ***Estudio de precisión intraensayo e interne sayo en el UMELISA TRI Neonatal evaluando*** *24 y 9* ***replicas respectivamente.***

Muestras	Concentración de TIR (ng/mL)	n	DE	CV (%)
1	20,5	24	1,67	8.2
2	50,6	24	3,44	6.8
3	162.7	24	13,5	8.3

n: Número de réplicas. *DE: Desviación estándar.* *CV: Coeficiente de variación.*

B

Muestras	Concentración de TIR (ng/mL)	n	DE	CV (%)
1	20,5	9	1,7	8,3
2	50,6	9	4,25	8,4
3	162,7	9	13,9	8,6

n: Número de réplicas evaluadas DE: Desviación estándar CV: Coeficientes de variación

Los coeficientes de variación intra e Inter-ensayo fueron de 7,8 y 8,4%, respectivamente, por lo que la precisión del ensayo se considera aceptable

2. ***Exactitud***: El recobrado del sistema para tres muestras diferentes se ubicó generalmente en el intervalo comprendido entre ± 10% del valor esperado, lo que denota una alta exactitud (Tabla 7).

Tabla 7. Exactitud del ensayo para la determinación de los niveles de TIR.

Valor obtenido de concentración de TIR (ng/mL)	Valor esperado de concentración de TIR (ng/mL)	% de Recuperación
61,3	65	94,3
113,3	115	98.5
149,3	150	99,5
284,3	290	98,0
362,3	380	95,3

3. ***Ensayo de paralelismo***: En las muestras ensayadas esta prueba demostró la independencia entre el valor de la concentración de cada muestra de la dilución de trabajo empleada, para el rango de medición evaluado (Figura 1). La prueba mostró un CV inferior al 10% y un R2 >0.98.

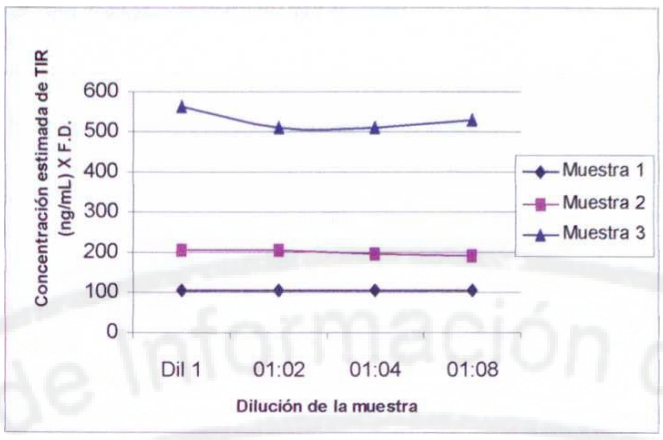


Figura ***1 Paralelismo en el UMELISA TIR Neonatal***

FD: Factor de dilución de la muestra.

4. *Limite de detección:* La concentración mínima detectable que genera una respuesta consistentemente mayor que cl valor de fondo del ensayo fue de 3.8ng/mL.
5. *Prueba de reactividad cruzada:* Para el análisis de la especificidad, se evaluó la reactividad cruzada con proteínas estructural mente relacionadas (Tabla 8).

Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas
Dirección B M.N
CNICM INFOMED

Tabla 8. Estudio de especificidad en el UMELISA TIR Neonatal.

Proteínas	Concentración	Concentración aparente de TIR (ng/mL)	RC
a-quimotripsinógeno A tipo **II** (bovino)	**1** µg/mL	< 3,8 ng/mL	no detectable
a-quimotripsinógeno tipo l-S (bovino)	1 µg/mL	< 3,8 ng/mL	no detectable
a-quimotripsinógeno tipo **VII** (bovino)	1 µg/mL	< 3,8 ng/mL	no detectable
fosfolipasa A_2 (bovina)	1 µg/mL	< 3,8 ng/mL	no detectable
quimotripsina (humana)	1 µg/mL	< 3,8 ng/mL	no detectable
tripsina tipo **IX** (porcina)	1 µg/mL	< 3,8 ng/mL	no detectable
tripsina tipo **XII** (bovina)	1 ng/mL	< 3,8 ng/mL	no detectable
tripsinógeno (bovino)	1 µg/mL	< 3,8 ng/mL	no detectable
α_1 rantitnpsina (humana)	2 mg/mL	< 3,8 ng/mL	no detectable
α_2-macroglobulina (humana)	5 mg/mL	< 3,8 ng/mL	no detectable
inmunoglobulina G (humana)	15 mg/mL	< 3,8 ng/mL	no detectable

RC: Reactividad Cruzada.

No se presentó reactividad cruzada con ninguna de las proteínas estudiadas, por lo que el ensayo es altamente específico para la Tripsina.

6. ***Correlación del ensayo UMELISA TIR Neonatal contra un ensayo Comercial (ICN Biochemical IRT Neonatal:*** Los resultados de la regresión lineal se muestras a continuación. Se obtuvo una ecuación de regresión: y = 0.96x +1,25 (r = 0.99) donde cl eje de las ordenadas representa los valores de concentración de TIR (ng/mL) de las muestras obtenidos por nuestro método y en el eje de la abscisas se representa los valores de concentración de TIR (ng/mL) correspondientes al estuche comercial empleado como referencia (ICN IRT Biochemicals) (Figura 2).

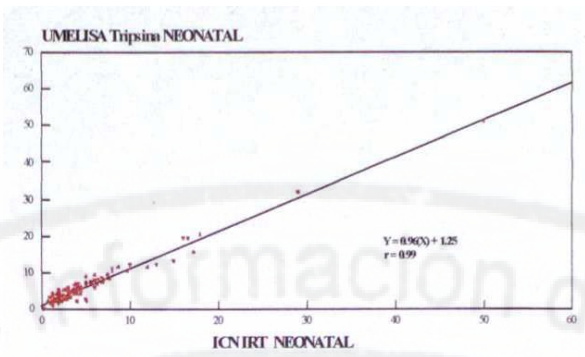


Figura 2. *Correlación del UMELISA TIR Neonatal con el estache de referencia ICN IRT Biochemicals*

7. ***Determinación de los niveles de corte para las muestras sangre de talón en el UMELISA TIR Neonatal:*** En la Figura 3 se muestran los valores de distribución de frecuencias obtenidas para la población analizada.

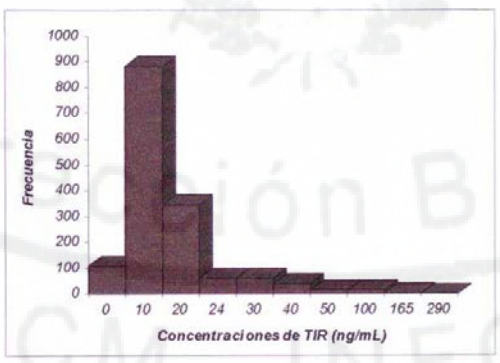


Figura 3. Distribución de frecuencias en 1553 muestras de sangre de talón de recién nacidos entre el 3er y 7mo día.

Se calculó el 99 pcrcentil de la distribución (nivel de corte de la población), obteniéndose un valor de 57 ng/mL.