



Pontificia Universidad
JAVERIANA
Bogotá

ANALISIS DE TRIPSINA INMUNOREACTIVA EN SANGRE DE CORDON
UMBILICAL EN UNA MUESTRA DE RECIEN NACIDOS DE BOGOTA

PRESENTADO POR:

PAOLA ANDREA RAMIREZ LOPEZ

TRABAJO DE GRADO
PRESENTADO COMO REQUISITO PARA OPTAR EL TITULO DE
BACTERIOLÓGA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BACTERIOLOGIA
BOGOTA, D.C.

ANALISIS DE TRIPSINA INMUNOREACTIVA EN SANGRE DE CORDON
UMBILICAL EN UNA MUESTRA DE RECIEN NACIDOS DE BOGOTA

PRESENTADO POR:

PAOLA ANDREA RAMIREZ LOPEZ

DIRECTORAS

DORA FONSECA.Biol. MSc
HEIDI MATEUS.M.D.MSc

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BASICAS
UNIDAD DE GENETICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD EL ROSARIO

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BACTERIOLOGIA
BOGOTA, D.C.

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23, resolución N° 13 de 1946:

La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica.

TABLA DE CONTENIDO

	PAG
1. INTRODUCCIÓN	7
2. MARCO TEORICO	10
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	16
4. OBJETIVOS	17
5. METODOLGIA	18
5.1 POBLACIÓN EN ESTUDIO Y MUESTRA	18
5.2 PROCEDIMIENTO	18
5.2.1 RECOLECCION DE LAS MUESTRAS	19
5.2.2 DETERMINACION DE TRIPSINA	19
5.2.2.1 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	19
5.3. MANEJO DE DATOS	20
5.4 ANALISIS DE DATOS	20
5.4.1ANALISIS DE CURVAS DE CALIBRACIÓN	21
5.4.2 ANALISIS DE CONTROLES ALTOS Y BAJOS	22
5.4.3 DETERMINACION DE LA CURVA DE NORMALIDAD	23
5.4.4DETERMINACION DEL PUNTO DE CORTE	22
5.4.5 ANALISIS ESTADISTICO	22
6. RESULTADOS	24
7. DISCUSION	27
8. CONCLUSIONES	31
9. RECOMENDACIONES	32
10. BIBLIOGRAFIA	33

RESUMEN

El Tripsinógeno es el precursor de una de las enzimas pancreáticas más importantes que representa el 20% de las proteínas totales del jugo pancreático. El Tripsinógeno es producido en el páncreas y es secretado en el duodeno donde se convierte en su forma activa, la tripsina inmunoreactiva (IRT), por medio de la enterocinasa que se encuentra en el intestino, (Floch, 2006,). En condiciones normales este debe ser el ciclo del Tripsinógeno, sin embargo, una escasa cantidad de este se puede autoactivar lentamente a tripsina en el páncreas, siendo esta la razón por la cual se encuentran concentraciones altas de (IRT) en sangre. En la actualidad se conocen tres tipos de tripsinógeno que se clasifican de acuerdo su movilidad en la electroforesis como tripsinógeno catiónico también llamado proteasa de serina 1 (PRSSI), tripsinógeno aniónico (PRSS2) y mesotripsinógeno (PRSS3); el tripsinógeno catiónico se autoactiva con mayor facilidad y es más resistente a la autólisis, (Lizarazu, 2008,).

La autoactivación de tripsina en el páncreas puede ser producida por múltiples factores, que hacen que se presente un desequilibrio en esta enzima, entre los factores de mayor importancia se encuentran las mutaciones que afectan el gen regulador de la conductancia transmembranal de la Fibrosis Quística (CFTR), que actúa como canal de cloro, y esta establecido que muchas mutaciones en este gen causan la Fibrosis Quística (FQ), (Weiss, 2005,).

La Fibrosis Quística es la enfermedad autosómica recesiva mas frecuente en población caucásica con una frecuencia de 1:2500. La detección temprana de esta enfermedad mediante Tamizaje Genético Neonatal, permite identificar presintómicamente a los afectados con el fin de establecer medidas que mejoren su calidad de vida. El primer paso en el establecimiento de este tipo de programas es determinar el biomarcador adecuado y los valores de referencia que permitan hacer la prueba altamente sensible y específica.

Objetivo principal: Evaluar mediante un método de ELISA directa el valor de Tripsina Inmunoreactiva en 8.482 muestras de sangre de cordón umbilical tomadas de recién nacidos de la ciudad de Bogotá, y establecer el punto de referencia normal en este tipo de muestras, con el fin de proponer el uso de este biomarcador en la implementación de un programa de Tamizaje Genético Neonatal para Fibrosis Quística.

Materiales y métodos: El tipo de estudio propuesto es observacional, descriptivo; donde se determino el valor de IRT en 8.482 muestras de sangre de cordón umbilical de recién nacidos sanos entre abril y septiembre del 2009, atendidos en el Hospital Universitario Mayor-MEDERI ; Red Hospitalaria de la Secretaria Distrital de Salud y remitidos a la Fundación Arthur Stanley Gillow. La determinación de IRT se realizo mediante la técnica de ELISA directa y el valor de referencia o punto de corte se estableció en el percentil 99. A través de los programas estadísticos Epidat y SSP V1 se evaluó la relación del valor de IRT con las variables demográficas edad de la madre y peso al nacimiento. A través de programas de regresión lineal se estableció el cumplimiento de la Ley de Beer para las curvas de calibración generadas con los calibradores proporcionados por el Kit ELISA BIOCLONE IRT.

Resultados: Se estableció como punto de corte 60 ug/L, por medio de intervalos de confianza de agrupando los datos de 3 en 3 ug/L y determinando el percentil 99. En cuanto a las variables demográficas evaluadas de peso al nacimiento y edad de la madre se encontraron valores de OR de 1,3 y 3,1 (para edades superiores a 30 años), pero sin valores de P estadísticamente significativos. Se estableció la pérdida de linealidad de la curva de calibración, cuando el valor de absorbancia del calibrador de 331 ug/L era considerado.

1. INTRODUCCIÓN

La Fibrosis Quística (FQ) es una enfermedad autosómica recesiva, donde se ve afectado el gen regulador de la conductancia transmembranal de la Fibrosis Quística (CFTR). Su incidencia es de 1 en cada 500 a 2500 recién nacidos con una distribución igual por sexo, sin embargo, la frecuencia de afectados varía según la localización geográfica y el grupo étnico, encontrándose en algunas poblaciones frecuencias muy altas, como sucede con la población de Alberta en Canadá, donde la incidencia es de 1 afectado por cada 313 personas. En Latinoamérica, la incidencia de la enfermedad está entre 1 en 8000 para la población de México y 1 en 3862 para Cuba; en Colombia no hay datos reales de la incidencia pero mediante análisis indirectos de portadores de la mutación p.F508del la prevalencia podría estar en alrededor de 1:5000 (comunicación personal, Mateus y Fonseca 2009,).

El gen CFTR actúa como canal de cloro y se localiza en la membrana apical de las células de epitelios y glándulas (Daza, 1997,). Los pacientes afectados presentan una relativa impermeabilidad de la membrana apical hacia el cloro, como consecuencia de la falta de apertura del canal y un aumento de la reabsorción de sodio y agua que solamente ocurre en el epitelio respiratorio. Estos fenómenos condicionan una considerable viscosidad del moco el cual es un ambiente apto para varios microorganismos patógenos, (Liñán, 2005,). Este aumento de viscosidad produce una obstrucción de la mucosa de las glándulas exocrinas lo cual conduce al taponamiento de los conductos de los diferentes órganos siendo esto el principal contribuyente a la alta morbilidad y mortalidad en pacientes con FQ (Steven, 2005,). La FQ se presenta como una enfermedad pulmonar o gastrointestinal recurrente de aparición temprana, el cuadro clínico usualmente se acompaña de electrolitos en sudor mayor de 60 mM. La primera causa de muerte es la afección pulmonar en cerca del 90% de los pacientes (Garred, 1999). El cuadro clínico incluye tos crónica, infiltrados pulmonares, hiperactividad bronquial y rinorrea acuosa. En el periodo neonatal pueden presentar obstrucción intestinal debida a íleo meconial (Knowles, 2002).

En el caso del páncreas al estar afectado el canal (CFTR) se altera la formación de líquido pancreático, produciendo un líquido viscoso ocasionando así la formación de tapones proteicos que favorecen la activación enzimática que ocasionan el daño

pancreático (Lizarazu, 2008,). La deficiencia en la función exocrina del páncreas está presente en el 85 a 95% de los pacientes. En condiciones normales el tripsinógeno producido en el páncreas pasa por los conductos pancreáticos y va al duodeno donde es activado para la formación de tripsina. En la Fibrosis Quística el defecto en el canal (CFTR) además de producir una obstrucción conduce a un desequilibrio en las proteasas y en sus inhibidores produciendo así una autodigestión intrapancreática del tripsinógeno, (H witt, 2003,). Al no presentarse la activación del tripsinógeno en el intestino, este alcanza niveles altos en sangre en los recién nacidos con FQ, (Rodrigues, 2008,).

La elevación de tripsina inmunoreactiva en los afectados, ha permitido que su determinación sea usada en programas de Tamizaje Genético Neonatal, el cual consiste en la aplicación de procedimientos de selección a poblaciones de individuos “aparentemente sanos” con objeto de identificar, a aquellos que pueden estar enfermos o que presentan un riesgo incrementado de padecer una enfermedad porque presentan factores de predisposición (Kristidis, 1992,).

Estos programas de Tamizaje, al identificar presintómicamente al afectado, permiten instaurar protocolos médicos que logren mejorar la calidad de pronóstico de vida de los pacientes.

En Colombia no existen programas de Tamizaje Genético Neonatal para FQ, a pesar de ser ésta una enfermedad que cumple con los criterios establecidos para la inclusión en dichos programas, como son: ser frecuente, ser fácilmente diagnosticable (alta sensibilidad y especificidad), existir pruebas confirmatorias, tener un adecuado costo-beneficio y ser tratable (OMS). De esta manera es importante empezar a generar el conocimiento de los biomarcadores que, como la tripsina inmunoreactiva permitirían identificar recién nacidos potencialmente afectados con la enfermedad. Por estas razones en este estudio se propone realizar por primera vez en el país el establecimiento de los valores de referencia para Tripsina Inmunoreactiva en muestras de sangre obtenidas a partir de cordón umbilical en una muestra de recién nacidos de la ciudad de Bogotá. Este conocimiento permitirá establecer parte de un protocolo que identifique tempranamente afectados con FQ, e implementar programas masivos en Colombia que lograrán ofrecer diagnóstico y tratamiento oportuno para esta entidad.

El tamaño de la muestra fue determinado teniendo en cuenta el valor de incidencia descrito indirectamente a través de los estudios de portadores hecho previamente por nuestro grupo de investigación de Fibrosis Quística de la Unidad de Genética de la Universidad del Rosario que es de 1:5025, Este dato, teniendo en cuenta una población total de referencia de 10.000 recién nacidos, estimado a partir del numero de neonatos que se proyectan atender en los hospitales mencionados, en un lapso de 5 meses. Se acepto una confiabilidad de 99%, y un mínimo error estándar relativo clase C.

Las muestras fueron tomadas a partir de sangre de cordón umbilical y colectadas sobre papel de filtro SYS903 según las recomendaciones del National Committee of Standard of Laboratory (NCCLS, 1994). La sangre se dejo secar a temperatura ambiente por 4 horas, en posición horizontal, y fueron guardadas en refrigeración en cada una de las instituciones participantes hasta su remisión a las instalaciones del laboratorio de Biología Molecular y Celular de la Universidad del Rosario, en donde se realizó la determinación inmunoenzimática de la Tripsina Inmunoreactiva.

El análisis cuantitativo de la IRT se realizo teniendo en cuenta los siguientes pasos: Determinación inmunoenzimática de la IRT, la cual se realizo utilizando el Kit Neonatal IRT ELISA de Bioclone. Esta técnica es una ELISA DIRECTA tipo sándwich. , donde la medición de la tripsina se realiza en una muestra de 3 mm de diámetro, obtenida directamente de sangre seca de cordón umbilical tomada sobre papel de filtro S & S903.

Al terminar con el procesamiento de las muestras se realizo la lectura a punto final de los datos en un lector de ELISA a 450nm, los datos obtenidos fueron analizados teniendo en cuenta la ley de Beer-Lambert, este análisis se obtuvo realizando una grafica de tipo lineal.

Análisis de las curvas de calibración, teniendo como referencia los valores de los calibradores suministrados por el kit, con este análisis se evaluó el coeficiente de correlación el cual dio cercano a 1.

Determinación de intervalos de confianza de 3 en 3 ug/L para la elaboración de la curva de normalidad del biomarcador para establecer el punto de referencia.

2. MARCO TEORICO

FIBROSIS QUÍSTICA

La fibrosis Quística (FQ) es una enfermedad autosómica recesiva causada por mutaciones en el gen de la conductancia transmembranal de la Fibrosis Quística (CFTR), el cual está localizado en el brazo largo del cromosoma 7, (Maíz, 2001,). Su incidencia es de 1 en cada 500 a 2500 recién nacidos con una distribución igual por sexo, sin embargo, la frecuencia de afectados varía según la localización geográfica y el grupo étnico, encontrándose en algunas poblaciones frecuencias muy altas, como sucede con la población de Alberta en Canadá, donde la incidencia es de 1 afectado por cada 313 personas. (Comunicación personal, Mateus y Fonseca 2009,). A causa de este defecto los pacientes presentan una variedad de síntomas pero la clínica más característica va ligada a un aumento de la viscosidad de las secreciones lo cual lleva a mecanismos frecuentes de inflamación, infecciones recurrentes por microorganismos ya reportados en la literatura, (Liñan,2005,). Además es caracterizada por un transporte anormal de electrolitos, que conduce a una enfermedad crónica obstructiva de los pulmones, insuficiencia pancreática exocrina y aumento de la cantidad de electrolitos en el sudor.

GENETICA DE LA ENFERMEDAD

En 1.989 Lap-Chee Tsui y colaboradores aíslan el gen defectuoso identificando la producción de la proteína del gen regulador transmembranal de la fibrosis Quística, (CFTR) (Pérez, 2005,). El gen CFTR tiene un tamaño de 250 kilobases, comprende 27 exones y codifica para una proteína de 1,480 aminoácidos, que se localiza en la membrana apical de las células epiteliales normales. Existen cinco clases de mutaciones descritas que ocasionan una producción deficiente de la proteína u en otros casos ausencia de esta, hasta el momento más de 1300 mutaciones han sido reportadas. La mutación p.F508del es la mutación más común, y está presente en aproximadamente el 70 % de los alelos del CFTR y en el 90 % de los pacientes con Fibrosis Quística. Esta mutación presenta una delección de tres pares de bases y lleva a la pérdida de un aminoácido, fenilalanina, en la posición 508 (exón 10), (Steven, 2005,). Los estudios en Colombia indican una frecuencia que oscila entre 39% y 48% con una marcada variación según los departamentos, desde 25% en Bolívar, hasta 66% en Santander, (Mateus y Fonseca, 2007,).

MUTACIONES DE CLASE I: Resulta de un defecto de inestabilidad del RNA mensajero (mRNA) o de una proteína anormal, la cual es rápidamente degradada, por ende no hay producción de la proteína, (Vega, 2004). La mutación G542X es la que mas causa este defecto, aunque su frecuencia es de 1 a 2 % en la población mundial, (Collazo, 2008). Esta clase de mutación produce un cuadro clínico caracterizado por: insuficiencia pancreática exocrina y enfermedad pulmonar crónica, (Lao, 2003).

MUTACIONES DE CLASE II: Resulta de una falla en el proceso de síntesis de la proteína o del transporte de la misma a través de la membrana apical de la célula, (Vega, 2004). Lo cual da como consecuencia una proteína defectuosa que no va a presentar su función normal, (Ortigosa, 2007). Una de las mutaciones específicas que provoca este defecto es la mutación p.F508del que es responsable del 60% de los enfermos FQ en el mundo. La frecuencia de esta mutación en la población mundial es de 66 %. Sus características clínicas son: insuficiencia pancreática severa y síntomas respiratorios con un patrón clínico severo que conduce a la muerte precoz, (Collazo, 2008).

MUTACIONES DE CLASE III: Resulta de una proteína correctamente localizada pero defectuosa en la regulación de la actividad del canal de cloro, (Ortigosa, 2007). Una de las mutaciones específicas para este defecto es la G551D, la cual es poco frecuente alrededor del mundo, (Lao, 2003). Esta mutación puede o no cursar con insuficiencia pancreática, (Collazo, 2008).

MUTACIONES DE CLASE IV: En estas mutaciones la proteína esta correctamente localizada y regulada, pero tiene un defecto en la conductancia del cloro (Vega, 2004). La mutación que más ocasiona este defecto es la mutación R334W. Esta mutación provoca un cambio de arginina por triptófano en el codón 334 del gen CFTR, ocurre en el primer dominio transmembranal, (Collazo, 2008).

MUTACIONES DE CLASE V: Resulta en una reducida síntesis de CFTR, con una clara tendencia a presentar una enfermedad leve, con test de sudor en valores

límites y con una secreción intestinal residual de cloro, (Vega, 2004), su expresión clínica es muy variable y por lo general es de curso más leve, (Ortigosa, 2007).

MANIFESTACIONES CLINICAS

La FQ afecta el aparato respiratorio, gastrointestinal, glándulas sudoríparas y aparato reproductor. Las manifestaciones clínicas son variables de acuerdo a la edad del diagnóstico, (Daza, 1997,)

COMPROMISO PULMONAR

La infección pulmonar es una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad en el paciente con (FQ). La evolución en el tiempo, su calidad de vida y sus expectativas de supervivencia son proporcionales al número anual de exacerbaciones y a la carga de microorganismos en las secreciones respiratorias, (Cantón, 2002,). Por lo general las infecciones virales pueden predisponer a la colonización y sobre-infección bacteriana, o están implicados en las exacerbaciones pulmonares. La mayoría de los pacientes son infectados especialmente por *Staphylococcus aureus* y/o *Haemophilus*, pero posterior a esta infección el 80% de los pacientes presentan cultivos positivos para *Pseudomona aeruginosa*. (Castilla, 2008).

COMPROMISO HEPATICO

Histológicamente, la enfermedad hepática relacionada con la fibrosis Quística se caracteriza por fibrosis biliar focal, enfermedad hepática clínicamente significativa que desarrolla en el 2% -5% de los pacientes, (H.Witt, 2003,).

ILEON MECONIAL

Entre el 10 y 27% de los pacientes con fibrosis quística presentan esta patología en el periodo neonatal, el defecto genético y la alteración de los productos de secreción exocrina característica de fibrosis quística son las bases patogénicas de esta entidad, (Renteria, 2001,).

COMPROMISO PANCREATICO

El daño pancreático se caracteriza por la pérdida generalizada de células acinares, la enfermedad pancreática varía según la pérdida de la función exocrina y la función endocrina del páncreas, cerca del 90% de los pacientes con fibrosis quística presenta insuficiencia pancreática exocrina, En condiciones normales, la mayoría de las enzimas pancreáticas son secretadas en forma inactiva para ser activadas en la luz duodenal, sin embargo, una escasa cantidad del tripsinógeno se puede autoactivar lentamente a tripsina en el páncreas a causa del taponamiento de los conductos pancreáticos con el moco viscoso que impide que el tripsinógeno viaje hasta al duodeno a activarse, (Lizarazu,2008,).

DIABETES

La alteración de la tolerancia a la glucosa y la diabetes se deben a una progresiva fibrosis pancreática y al reemplazo del tejido normal por tejido graso, que lleva a una disminución de las células β y a una disminución de la secreción de insulina responsable de la intolerancia a la glucosa y la dependencia de la insulina,(Liñan,2005,).

ASPECTOS DIAGNÓSTICOS

Para realizar un diagnostico de la enfermedad, se tienen como pruebas específicas diagnosticas el ionograma y la identificación de las diferentes mutaciones ya establecidas para esta enfermedad, pero además se pueden realizar pruebas específicas para cada sistema, dependiendo las diferentes manifestaciones. Estas pruebas son la medición del potencial nasal, radiografías de tórax entre otras, pero estas pruebas no son indicativas para la enfermedad, (Anabel, 2006). Algunas características clínicas de esta enfermedad son (Oller, 2008):

- Enfermedad sinusal y pulmonar crónica, infección o colonización persistente de vías aéreas.
- Alteraciones gastrointestinales y nutricionales: íleo meconial, insuficiencia pancreática exócrina.
- Síndrome de pérdida de sal.
- Antecedentes familiares.

IONOGRAMA (DETERMINACION DE ELECTROLITOS EN SUDOR)

La prueba diagnostica que consta de tres etapas: estimular la sudoración, recoger el sudor y por último, determinar la concentración de electrolitos, (Ortigosa, 2007,).

El resultado de la prueba se considera:

- Positivo valores >60 mEq/l de Cl-
- Negativo valores <50 mEq/l de Cl-
- Dudoso valores entre 50 y 60 mEq/l de Cl-

Para efectuar esta técnica se precisa de personal experto y habituado a practicarla, (Maíz, 2001,).

MEDICION DE TRIPSINA

El tripsinógeno es un precursor de enzimas pancreáticas, su concentración esta en niveles altos en sangre en recién nacidos con fibrosis quísticas incluso cuando la insuficiencia del páncreas no es total, (Rodrigues, 2008,). En algunos países como Europa, Uruguay y España el Tripsinógeno inmunoreactivo (IRT) se cuantifica en las muestras de sangre de talón tomadas en papel filtro que se usan para el resto de las determinaciones incluidas en el programa de Tamizaje Neonatal como lo son hipotiroidismo congénito y fenilalanina. Realizan esta prueba con el fin de iniciar el protocolo de Tamizaje para FQ, por lo general esta prueba se realiza por inmunoensayos (ELISA directo) Esta enzima es medida con anticuerpos monoclonales, lo que lleva a un aumento de la sensibilidad. (Belnaves, 1995,)

El punto de corte de referencia se toma teniendo en cuenta los análisis realizados por cada laboratorio, esta prueba sola no da como diagnostico fibrosis quística siempre se debe confirmar con pruebas moleculares especificas para la búsqueda de las diferentes mutaciones, (Comité neumología, 2006).

PRUEBAS MOLECULARES

Estas pruebas realizan la búsqueda directa de las más de 1.300 mutaciones del gen CFTR o el análisis de su segregación por métodos indirectos utilizando marcadores moleculares ligados al gen. Esto en cada país se realiza teniendo en cuenta la distribución y la frecuencia de las mutaciones de cada origen étnico.

Dentro de los métodos mas utilizados para el análisis de las mutaciones en CFTR se encuentran: la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), hibridación específica para la detección de mutaciones mas frecuentes (ASO), análisis de

polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP) y heteroduplex combinados con secuenciación para mutaciones desconocidas, (Orozco, 2006).

TAMIZAJE NEONATAL

Los programas de Tamizaje neonatal son actividades de prevención en salud pública, su eficacia depende no sólo de disponer de un espécimen adecuado para su realización y de un laboratorio que aplique métodos fiables, sino que deben garantizar la cobertura universal y la adecuada coordinación con el resto de los recursos asistenciales, para ofrecer el diagnóstico y tratamiento eficaces a los individuos detectados. La experiencia detallada de la investigación neonatal de FQ se ha informado para 20 programas de todo el mundo. En total más de 5 millones de neonatos fueron investigados con una tasa de falsos positivos baja (0,5 por 1.000), una tasa aceptable de verdaderos positivos descubiertos (90%), y un valor predictivo positivo favorable de 33%, (Comité de neumología, 2006)

Diversos protocolos de detección se basan en la prueba de IRT prueba preliminar como una herramienta de Tamizaje para la FQ seguida por análisis moleculares. Algunos protocolos son:

- **IRT / IRT**

El protocolo aprobado inicialmente para los programas de detección fue el de dos etapas IRT. Cuando el primer IRT es alto, es necesario establecer una segunda muestra de sangre para la nueva medición IRT, si la segunda prueba también es alta, el test del sudor se realiza para el diagnóstico definitivo, (Rodrigues 2008).

- **IRT / DNA**

Se realiza medición de IRT y posterior a esto se identifica la mutación mas frecuente que es la p.F508del, (Rodrigues, 2008).

- **IRT / DNA / IRT**

Este protocolo realiza una primera medición de IRT y luego identifica la mutación p.F508del y posterior a esto se realiza una segunda medición de IRT si el niño tiene un alelo mutante, (Rodrigues, 2008).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN:

El grupo de Investigación de “Estudios Moleculares en pacientes colombianos con Fibrosis Quística y otras formas de mucoviscidosis” ha desarrollado varios trabajos que han identificado a la FQ como una enfermedad con alta incidencia en el país, sin embargo dado que este dato no se ha evaluado directamente en recién nacidos a modo de Tamizaje Genético Neonatal, es necesario establecer protocolos que permitan cumplir este objetivo.

Surge entonces la pregunta de investigación: ¿Cual es la incidencia de FQ en una muestra de neonatos de la ciudad de Bogota?, y para resolverla es necesario implementar trabajos como el presente que identifique el valor de referencia que podrá ser utilizado en la evaluación de Tripsina Inmunoreactiva en muestras de sangre de cordón umbilical.

El punto de corte de este biomarcador es clave para el establecimiento de protocolos que permitan identificar de manera masiva a los afectados por esta enfermedad. Se ha elegido la Tripsina Inmunoreactiva por ser un metabolito fácilmente identificable mediante metodologías convencionales como ELISA directa y que presenta valores elevados en los pacientes con FQ.

Ni en Colombia ni en el mundo se tiene establecido este valor en muestras de sangre de cordón, ya que usualmente los programas de Tamizaje se realizan en muestras obtenidas de talón entre las 48 y 72 horas de vida, sin embargo según la resolución 412/2000, la ley colombiana estipulo como obligatorio la medición de TSH para identificar Hipotiroidismo Congénito en muestras de cordón, por lo que se hace necesario usar esta misma muestra para la medición de Tripsina Inmunoreactiva, facilitando así la inclusión de enfermedades genéticas importantes en este tipo de programas.

El presente trabajo busca entonces ser el pilar pionero que permita dar parte del conocimiento clave en la instauración del protocolo para la implementación de un programa de Tamizaje Genético Neonatal para Fibrosis Quística, ya que determinara mediante el análisis de 8.482 recién nacidos el punto de referencia para tripsina inmunoreactiva, en sangre de cordón umbilical.

4. OBJETIVOS

GENERAL

* Evaluar mediante un método de ELISA directa el valor de Tripsina Inmunoreactiva en 8.482 muestras de sangre de cordón umbilical tomadas de recién nacidos de la ciudad de Bogotá, y establecer el punto de referencia normal en este tipo de muestras, con el fin de proponer el uso de este biomarcador en la implementación de un programa de Tamizaje Genético Neonatal para Fibrosis Quística.

ESPECIFICOS

- Evaluar los coeficientes de correlación aplicados al análisis de curvas de calibración que midan absorbancia vs concentración en la determinación inmuno enzimática de tripsina inmunoreactiva.
- Utilizando el Kit comercial Bioclone, evaluar Tripsina inmunoreactiva en muestras obtenidas de sangre de cordón umbilical y establecer intervalos de confianza, que permitan determinar el punto de referencia del metabolito.
- Analizar mediante gráfica de área bajo la curva el comportamiento de los datos de tripsina inmunoreactiva evaluados en sangre de cordón umbilical.
- Relacionar el valor de tripsina inmunoreactiva con las variables demográficas de edad de la madre, peso al nacer y edad gestacional al nacimiento.
- Analizar la importancia del uso de Tripsina Inmunoreactiva como biomarcador aplicable a un programa de Tamizaje Genético Neonatal para Fibrosis Quística.

5. METODOLOGIA

5.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO Y MUESTRA

Para la Realización de este estudio, se analizaron 8.482 muestras de recién nacidos sanos, entre abril y septiembre del 2009, atendidos en el Hospital Universitario Mayor-MEDERI; Red Hospitalaria de la Secretaria Distrital de Salud y remitidos a la Fundación Arthur Stanley Gillow. El tamaño de la muestra fue determinado teniendo en cuenta el valor de incidencia descrito indirectamente a través de los estudios de portadores hecho previamente por el grupo de investigación de la Universidad del Rosario que es de 1:5025, teniendo en cuenta una población total de referencia de 10.000 recién nacidos, estimado a partir del numero de neonatos que se proyectan atender en los hospitales mencionados, en un lapso de 5 meses. Se acepto una confiabilidad de 99%, y un mínimo error estándar relativo. Las muestras se obtuvieron mediante consentimiento informado por escrito de los padres y fueron manejados mediante una codificación numérica, para asegurar la confidencialidad de los resultados.

5.2 PROCEDIMIENTO

5.2.1 Recolección de las muestras

Las muestras fueron tomadas a partir de sangre de cordón umbilical y colectadas sobre papel de filtro SYS903 según las recomendaciones del National Committee of Standards of Laboratory (NCCLS, 1994). La sangre se puso a secar a temperatura ambiente por 4 horas, en posición horizontal, luego fueron guardadas en refrigeración en cada una de las instituciones participantes hasta su remisión a las instalaciones del laboratorio de Biología Molecular y Celular de la Universidad del Rosario, en donde se realizó la determinación inmunoenzimática de la Tripsina Inmunoreactiva.

5.2.2 Determinación del valor de Tripsina Inmunoreactiva mediante el Kit Neonatal IRT ELISA de Bioclone:

Las muestras se procesaron, teniendo en cuenta las especificaciones del KIT Neonatal IRT ELISA de la casa Comercial Bioclone.

Para el análisis del biomarcador tripsina inmunoreactiva se realiza una ELISA directa donde las paredes de los pocillos de cada placa están recubiertos con anticuerpos específicos para la tripsina (antígeno), después de presentarse esa

unión covalente entre anticuerpo y el biomarcador se realiza un lavado que quitara cualquier material no unido, se añade estreptavidina peroxidasa que forma enlaces múltiples con el anticuerpo biotilnado. Después se realiza otra etapa de lavado y se adiciona la solución de sustrato que reacciona con la peroxidasa unida produciendo color en proporción directa con la cantidad de antígeno, por ultimo se para la reacción utilizando solución stop.

MATERIALES SUMINISTRADOS POR EL KIT

- Reactivo anticuerpo: (Solución que contiene albúmina de suero bovino)
- Reactivo amplificador: (Estreptavidina y thiomersal)
- Solución de sustrato: (Tretamethylbenzidine y peroxido de hidrogeno)
- Solución estabilizadora stop:(Acido clorhidrico)
- Pocillos recubiertos anticuerpos específicos para IRT
- Solución de lavado: (Thiomersal)
- Calibradores (0, 13.2, 30.8, 67.8, 161 y 331 ug/L)
- Control alto (93.9 – 141 ug/L)
- Control bajo (40.1 – 60.2 ug/L)
-

5.2.2.1 Procesamiento de las muestras

1. Cada placa contiene 96 pozos, dispuestos en tiras de 8. En cada pozo se deposita una muestra de 3 mm de diámetro, obtenida directamente de la sangre seca tomada sobre el papel de filtro S & S903. (en la primera tira de cada dos placas se colocaron los calibradores)
2. Se pipetea 100 μ L del reactivo anticuerpo
3. Se cubren los pocillos y se incuban por 10 minutos en un agitador de placa a 25°C.
4. Se incuban las placas a 25°C por 24 horas
5. Al día siguiente, se ponen en agitación 10 minutos.
6. Se retiran los discos y se realiza la etapa de lavado por 5 veces, la solución de lavado contiene thiomersal, 0.09% w/V. Para esta etapa es necesario preparar la solución de lavado haciendo una dilución 1 en 15.
7. Pipetear 100 μ L de reactivo amplificador

8. cubrir los pocillos e incubar con agitación por 10 minutos
9. Se repite la etapa de lavado
10. Se seca correctamente en papel absorbente la placa
11. Pipetear 100 μ L de sustrato y se incuba por 10 minutos.
12. Pipetear 50 μ L de solución stop
13. Se realiza la lectura punto a punto a 450nm en el lector de ELISA.

5.3 MANEJO DE DATOS:

Para el manejo de los datos se creó una base de datos utilizando el programa de Microsoft Excel, en la cual se consignaron los datos, registrados en la tarjeta que contiene el papel de filtro S&S diseñada para tal fin. Se tuvieron en cuenta las siguientes variables:

- * Institución de nacimiento del menor
- * Ciudad y Departamento de nacimiento
- * Número de Historia Clínica
- * Régimen De Salud: Contributivo o Subsidiado, nombre de la EPS.
- * Datos de la madre: Nombre, Edad, Identificación, Dirección y teléfono
- * Datos del Recién Nacido: fecha de nacimiento, sexo, peso, talla, complicaciones, transfusión y fecha nacimiento.

Los datos obtenidos de la medición de la tripsina fueron puestos en la base de datos teniendo en cuenta el número de registro.

5.4 ANALISIS DE DATOS

Semanalmente se realizaron análisis de los datos obtenidos por el lector de ELISA, el cual determinó la concentración de la tripsina teniendo en cuenta la absorbancia, realizando una gráfica de tipo lineal. Estos datos deben cumplir la ley de Beer-Lambert, esta ley explica que hay una relación exponencial entre la transmisión de luz a través de una sustancia y la concentración de la sustancia, así como también entre la transmisión y la longitud del cuerpo que la luz atraviesa. Este análisis semanal permitió la elaboración de la curva de normalidad, el análisis de las curvas de calibración y la determinación del punto de corte.

5.4.1 ANALISIS DE CURVAS DE CALIBRACIÓN

Las curvas de calibración son independientes en cada montaje, (cada dos placas) para el control de los datos obtenidos de las muestras analizadas. Teniendo las bases de datos actualizadas, para cada curva de calibración se realizó una regresión lineal, mediante el análisis de absorbancias y concentraciones obtenidas para los calibradores suministrados en el kit. Los datos fueron introducidos en Excel y se analizaron en funciones- de regresión lineal. Donde se considera adecuado, un valor de coeficiente de correlación cercano a 1. Con los datos obtenidos para cada curva de calibración se emitió la conclusión respecto a la linealidad obtenida para los calibradores utilizados. (ANEXO1).

5.4.2 ANALISIS DE CONTROLES ALTOS Y BAJOS

En cada montaje se corrieron los controles altos y bajos suministrados por el Kit. El control bajo aceptaba un rango de medición entre 40.1 y 60.2 ug/L, para el control alto estos valores correspondían a 93.9-141 ug/L. Se controló que estos datos estuviesen dentro de estos valores, lo cual determinaba absoluta confiabilidad de la medida de los pacientes analizados en cada corrido. En el Anexo 2 se presentan los datos de media y desviación estándar encontrada para algunos de los datos evaluados. Al verificar que los valores de los controles analizados se encontraban en el rango esperado, se asumía que las curvas de calibración eran óptimas para el análisis.

5.4.3 DETERMINACIÓN DE LA CURVA DE NORMALIDAD DE LOS DATOS ANALIZADOS.

Semanalmente se elaboraron las gráficas de todos los resultados para ir evaluando el comportamiento de los valores de Tripsina Inmunoreactiva evaluada en sangre de cordón. Para este fin los datos obtenidos fueron filtrados y ordenados ascendentemente y posteriormente se establecieron intervalos de confianza, agrupando los datos de concentración en valores de 3 en 3, los intervalos generados fueron: valores menores de 3 ug/L, de 3.1 a 6; de 6.1 a 9 y así sucesivamente. El número de muestras para cada intervalo de confianza fue graficado, esta grafica permitió establecer si el biomarcador se comportó con distribución normal o no.

5.4.4 DETERMINACIÓN DEL PUNTO DE CORTE PARA EL VALOR DE TRIPSINA INMUNOREACTIVA

El punto de corte se determinó, tomando como normal los datos situados en el percentil 99 del total de resultados de las concentraciones de tripsina inmunoreactiva realizadas en sangre de cordón umbilical. El dato de punto es expresado en ug/L.

5.4.5 ANALISIS ESTADISTICO

Las variables analizadas frente a las concentraciones de la IRT fueron la edad de madre y el peso del neonato, teniendo en cuenta este estudio como de tipo transversal se realizaron tablas de contingencia relacionando el peso del recién nacido tomando como referencia el peso normal al nacer entre 2500 g y 3500 g (Rivera,2001) y la edad de la madre con los niveles de tripsina, para la realización de la tabla de contingencia de las edades de las madres se tomaron intervalos de 10 en 10 (21-25, 26-30 etc) para luego calcular el OR (odds ratio) con el fin de determinar si hay o no relación entre estas. Para realizar estos análisis estadísticos se utilizaron los Epidat 3.1 y SPSS 7.5v.

6. RESULTADOS

6.1 DESCRIPCION DE LA POBLACION DE ESTUDIO

Al analizar 8.482 muestras en sangre de cordón umbilical en una muestra de recién nacidos se encontró (tabla 1)

VARIABLE	DATOS	PROMEDIO
PESO DEL RECIEN NACIDO (g)	800 a 3.350 g	2.800.3 g
EDAD DE LAS MADRES (Años)	10-46 Años	23.25 años

TABLA 1. Variables demográficas

6.2 ANALISIS DE CONTROLES ALTOS Y BAJOS

CONTROL BAJO	VALOR ug/L
MEDIA	50,3125
DS 1	6,12447566
DS 2	12,2489513

TABLA 2. Análisis estadístico de los controles bajos

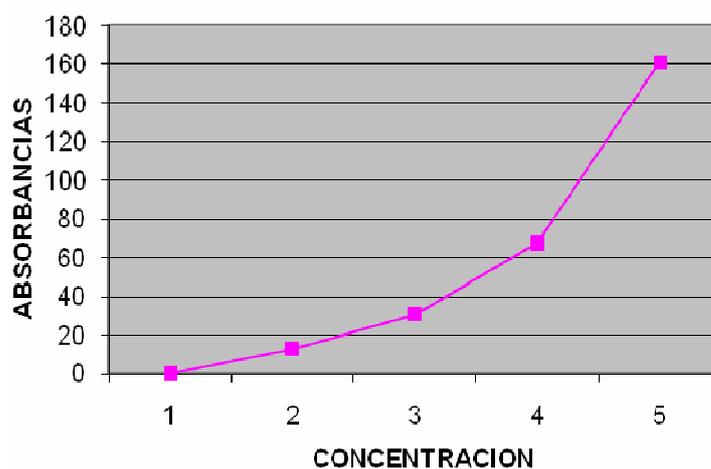
CONTROL ALTO	VALOR ug/L
MEDIA	120,160417
DS 1	16,5405722
DS 2	33,0811443

TABLA 3. Análisis estadístico de los controles altos

6.2 ANALISIS DE CURVAS DE CALIBRACION

Los datos obtenidos por el lector de ELISA, resultado de la concentración de tripsina analizada de cada muestra con respecto a la absorbancia, fueron representados en una grafica de tipo lineal, así como el cálculo del coeficiente de correlación, pendiente e intercepto (Tabla 4).

CURVA DE CALIBRACION



CURVA	CTE CORRELACION	INTERCEPTO	PENDIENTE
1	0.980589715	0.269035903	0.269035903
2	0.980386712	0.25801906	0.261712355
3	0.990439251	0.203058161	0.016061984
4	0.984203060	0.300973568	0.015176438
5	0.988746393	0.271122948	0.015448626
6	0.993768370	0.148927067	0.014609108
7	0.981685323	0.276910537	0.014481112
8	0.988642527	0.271125946	0.015418123
9	0.988562326	0.238801047	0.013460391
10	0.987926032	0.231608492	0.011095885
11	0.997597759	0.122537305	0.015818598
12	0.995468061	0.118129756	0.013857592
13	0.989526238	0.264564512	0.014652410
14	0.996444932	0.108644233	0.014581301
15	0.985230091	0.233722693	0.014752150
16	0.980663458	0.271285069	0.011820288
17	0.989326221	0.253423121	0.013645691
18	0.983102151	0.300863657	0.014516563
19	0.987425032	0.232517382	0.011192775
20	0.990228224	0.132214716	0.015715492

Tabla No.4 curvas de calibracion

En todas las curvas de calibracion se obvio el dato de absorbancia del calibrador de 331 ug/L dado que cunaod este dato se incorporaba los coeficientes de correacion de las curvas bajaban de 0.98 o 0.99 a 0.95, lo que indicaba una perdida de linealidad.

6.3 GRAFICA DE NORMALIDAD

La formación de intervalos de confianza de 3 en 3 de los datos de concentración obtenidos del análisis de tripsina inmunoreactiva, permitieron la elaboración de la grafica de normalidad para este biomarcador. (Figura 1)

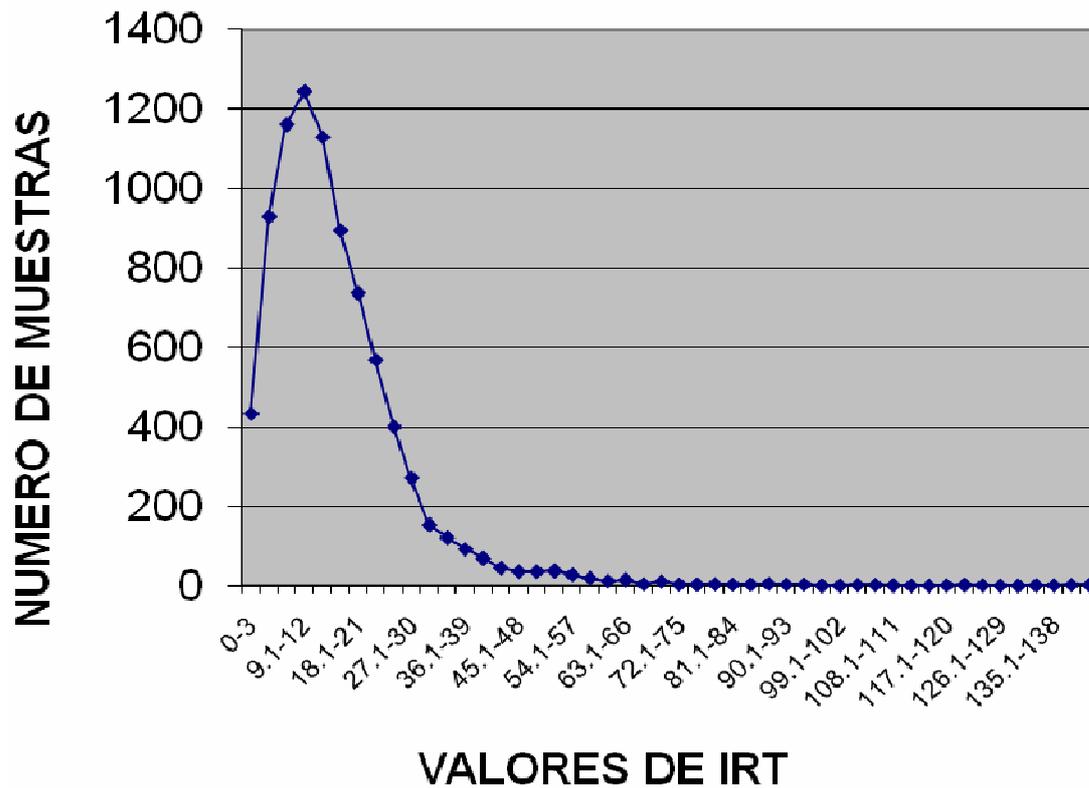


Figura 1: Distribución del valor de tripsina inmunoreactiva en muestra de sangre de cordón.

6.4 PUNTO DE CORTE DE LA TRIPSINA

Al tomar como normal los datos situados en el percentil 99 del total de determinaciones de Tripsina inmunoreactiva se identifico 60 ug/L como punto de corte o referencia.

6.5 EVALUACION DE LA ASOCIACION ENTRE LAS VARIABLES DEMOGRAFICAS

Variable	OR	Intervalos de confianza	Chi cuadrado	p
BAJO PESO	1,305	0,386 - 4,410	0,185	0,667
EDAD DE LA MADRE (años)				
10-19	1,000			
20-29	2,247	0,5124 – 9,8609	1,11	0,2903
30-39	3,141	0,6553 – 15,0619		
≥40	0,000			

Tabla 5. Análisis de variables demográficas.

7. DISCUSIÓN

La Fibrosis Quística es un trastorno multisistémico de evolución crónica progresiva que se hereda en forma autosómica recesiva, es categorizada como una de las enfermedades genéticas que tienen una alta tasa de mortalidad, principalmente debido a la sobreinfección pulmonar, por esta razón surge la necesidad de crear programas de Tamizaje Neonatal que permitan identificar de manera presintomática a los afectados con el fin de ofrecer orientación médica y terapéutica que logre mejorar la calidad de vida del paciente y disminuir la mortalidad. Actualmente algunos países han implementado dichos programas utilizando una de las diversas estrategias propuestas como son: IRT-IRT; IRT-DNA o IRT-DNA-IRT y generalmente las muestras evaluadas son obtenidas de sangre de talón entre las primeras 72 horas de vida. En este estudio decidimos realizar el análisis de IRT en sangre de cordón umbilical, teniendo en cuenta que para la medición de TSH para Hipotiroidismo congénito en el país se utiliza esta muestra, por lo que se hace necesario que para IRT se utilice la misma, facilitando así la inclusión de enfermedades genéticas importantes como lo son la Fibrosis Quística en los programas de Tamizaje. También es de gran importancia realizar estos análisis utilizando sangre de cordón umbilical para los estudios de Tamizajes Genéticos, por que se ha identificado múltiples factores que no facilitan la toma de la muestra en talón a los 2 o 3 días del nacimiento, como lo son familias de recién nacidos que viven en zonas de difícil acceso, egresos tempranos de la maternidad y desconocimiento de los padres acerca de la prueba, (Frometa, 2001).

En Colombia no hay programas de Tamizaje Neonatal para esta enfermedad, ni se tiene conocimiento acerca del comportamiento de la IRT, el cual es el biomarcador de elección para los Tamizajes ya establecidos en otros países. La IRT es utilizada en el Tamizaje por que esta enzima se ve alterada cuando hay un daño en la función exocrina del páncreas, a causa del defecto del gen CFTR, afección que se puede presentar en el 85 al 95% de los pacientes. Este metabolito puede ser fácilmente evaluado a través de ensayos como el propuesto en esta investigación, mediante análisis inmunoenzimáticos; este hecho es de gran importancia ya que uno de los criterios de elección para que un metabolito sea usado como marcador en Tamizaje es que la metodología de elección sea fácil, asequible y eficaz.

El valor del punto de corte de la IRT en muestras de sangre de cordón umbilical fue (60 ug/L) este dato permitirá, cuando se establezca un programa de Tamizaje Neonatal para FQ en Colombia encontrar a los posibles afectados con el fin de realizar seguimiento a estos pacientes y lograr descartar o detectar la enfermedad. El establecimiento de un adecuado punto de corte es determinante en la evaluación posterior de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo para el programa de Tamizaje en que se vaya a utilizar el biomarcador analizado. Generalmente los mejores resultados se logran si se toman como normales los valores que se encuentran entre los percentiles 98 y 99. Si tenemos en cuenta el comportamiento de la IRT en pacientes afectados con FQ, un punto de corte con un valor mas bajo que el determinado en el presente estudio, llevara a la aparición de muchos falsos positivos, es decir infantes que sin tener la enfermedad, tienen valores de IRT positivos. Por otro lado y de manera inversa un punto de corte muy alto, corre el riesgo de no identificar verdaderos afectados, llevando a la aparición de falsos negativos. La sensibilidad estará determinada por la correcta identificación a través de la medida de IRT de todos los enfermos en el grupo de recién nacidos evaluados, y esta será alta si la tasa de falsos negativos es baja. La especificidad, se relaciona con la posibilidad que ofrece el biomarcador de identificar los verdaderos positivos y su valor será mayor entre menor numero de falsos positivos se presenten.

Al identificar pacientes con niveles mayores al punto de corte es importante tener en cuenta que no siempre significa que este tenga la enfermedad, los niveles de IRT se pueden encontrar elevados por diversos factores como lo son la obstrucción intestinal, la diabetes mellitus e insuficiencias pancreáticas entre otros lo cual llevaría a la generación de falsos positivos(Massie,2005). De la misma manera es posible encontrar valores de IRT normales o disminuidos en pacientes afectados dependiendo el compromiso pancreático, cuando este es demasiado alto hasta el punto de ocasionar necrosis total y disminuyendo así por completo la IRT (Sontag, 2006). También puede ser el caso de pacientes que no presentan compromiso pancreático que corresponden al 1% (Rodrigues, 2008). Por esto es necesario que posterior a esta medición se realicen las demás pruebas complementarias entre las que se encuentra como prueba diagnóstica la medición de electrolitos en sudor y pruebas moleculares.

A nivel mundial este es el primer reporte que establece el punto de corte de IRT en sangre de cordón umbilical, en otros países este esta establecido pero en sangre de talón en donde el valor normal oscila entre 50 y 70ug/L. Este punto de corte puede variar dependiendo el percentil que cada grupo de investigación tenga en cuenta en el momento del análisis, quienes usan como normales los valores de percentil mas bajo, tendrán los valores de IRT mas altos, mientras que los percentiles mayores muestran el patrón contrario, las implicaciones de este hecho con respecto a sensibilidad y especificidad ya se discutieron en le párrafo anterior (López, 1.998).

Al realizar la determinación de IRT mediante técnicas inmunoenzimaticas es importante el análisis de las curvas de calibración con el fin de verificar que la lectura de las absorbancias de las muestras sean confiables, y así se determine el valor de concentración exacto de cada una de ellas. Esta confiabilidad se sustenta en el cumplimiento de la ley de Lambert-Beer que establece una directa dependencia entre las variables de concentración VS absorbancia. Si dicha relación se cumple se evidenciaran para las curvas de calibración los coeficientes de correlación cercanos a 1 (Chang, 2002). En el presente estudio se observo que las curvas de calibración perdían su linealidad, cuando era incluido el valor de absorbancia correspondiente al calibrador de concentración de 331.0 ug/L proporcionado por el Kit, lo cual se presenta cuando se pierde la relación lineal entre el valor de absorbancia y la concentración del calibrador. En este caso, logramos documentar una desviación de la ley de Lambert Beer negativa, ya que se observo que el valor de absorbancia de este calibrador era menor que el esperado, y presentaba valores casi iguales a los obtenidos para el calibrador de concentración de 161 ug/L (anexo1). Las desviaciones de la ley de Beer en concentraciones elevadas, se explican ya que la distancia promedio entre los iones o moléculas de las especies absorbentes disminuyen tanto que determina que cada partícula afecta la distribución de carga y por lo tanto de absorción de las partículas vecinas. Este efecto lleva a que la energía transmitida sea muy pequeña, generando un error en la lectura que es llamado error fotométrico (Baeza, 2.006). Esta desviación de la Ley de Beer puede generar si no es detectada, errores en las lecturas de las muestras, razón por la cual este calibrador no fue tenido en cuenta

en ninguna de las mediciones de IRT realizadas en las muestras de sangre de los recién nacidos. La solución a la desviación detectada es simplemente diluir el calibrador a concentraciones que estén en el intervalo de lectura adecuado, sin embargo este hecho no fue realizado en esta investigación ya que se manejaban calibradores que no estaban en solución sino dispuestos como manchas secas sobre papel filtro SyS 903. El análisis de los valores obtenidos para los controles altos y bajos suministrados en el Kit evaluado, indican que estos se mantuvieron en el rango esperado, y la mayoría de los datos se situaron en la tendencia central de 40.1-60.2 ug/L (bajo) y 93.9-141.0 ug/L (alto). La tendencia de los controles es una medida que evalúa el comportamiento de los datos bajo la curva de calibración usada para el día del análisis y refuerza la confiabilidad y aceptabilidad de los valores desconocidos de las muestras, obviamente con el análisis conjunto de los coeficientes de correlación anteriormente discutidos.

En cuanto a las variables sociodemográficas analizadas se determino que el bajo peso al nacer (<2500g) incrementa 1,3 veces la probabilidad de encontrar elevada la IRT, sin embargo este incremento no es estadísticamente significativo ($p=0,667$), por lo que no podemos concluir que estas variables estén asociadas. Aún así, es importante resaltar que reportes de literatura previos hechos sobre resultados masivos de programas de Tamizaje Neonatal han indicado que una de las causas de falsos positivos, es el bajo peso al nacer. Este hecho puede ser debido a la posible relación existente entre esta variable y la insuficiencia pancreática, que explicaría por que la IRT se eleva (Kloosterboer, et al 2009). Estudios recientes demuestran que también existe una relación entre el bajo peso al nacer y la diabetes, al estar afectadas las células beta del páncreas hay un desequilibrio en las enzimas pancreáticas lo que posiblemente causaría elevación de la IRT (Apolinar, 2008)

La relación de valor de IRT y edad de la madre indico OR de 2,2 y 3,1 para rangos de 20-29 años y 30-39 años respectivamente. Sin embargo el valores de P (0,293) no es estadísticamente significativo, por lo que no podemos establecer verdadera asociación de las variables.

8. CONCLUSIONES

- Al analizar las 8.482 muestras de sangre de cordón umbilical mediante el método de ELISA directa se determinó como punto de corte para la IRT 60ug/L.
- Como resultado del análisis de las curvas de calibración se encontró que los coeficientes de correlación son cercanos a 1, lo que indica que hay una dependencia directa entre las variables, teniendo en cuenta la exclusión del calibrador número 6 correspondiente a la concentración (331.0 ug/L), que no permite que se cumpla la ley de Lambert-Beer.
- El punto de corte determinado en el presente estudio permitió establecer el valor normal de la IRT en muestras de sangre de cordón umbilical, el cual se podrá usar en el futuro en programas de Tamizaje Neonatal para FQ en el país para así poder tomar decisiones de continuar con otras pruebas complementarias para identificar o descartar la Fibrosis Quística. Ejemplo de Tamizaje neonatal en España para Fibrosis Quística.
- En la gráfica de normalidad se observa claramente que la IRT se distribuye entre los intervalos menores, y que en promedio 1.250 muestras presentan niveles de IRT entre el intervalo 12.1-15 ug/L siendo este el punto más alto de la curva.
- Los resultados al analizar la edad de la madre y el peso del recién nacido frente a la concentración de la IRT demuestran valores de OR por encima de 1, pero dado que la diferencia no es significativa ($P > 0.05$), no se puede concluir relación entre las variables.

9. RECOMENDACIONES: Este estudio al determinar el valor de referencia de la tripsina inmunoreactiva por primera vez en el país permitirá en un futuro establecer un protocolo de Tamizaje Neonatal de Fibrosis Quística en Colombia con el fin de brindar tratamiento oportuno a la enfermedad y mejorar la calidad de vida del paciente a las pocas horas del nacimiento.

10. BIBLIOGRAFIA

Apolinar L. Neurobiología del bajo peso al nacer y su asociación con la diabetes tipo 2. Perinatol Reprod Hum, 2.008, (22): 155-164.

Baeza A. Precisión en espectrofotometría UNAM, 2.006, (1): 1-13.

Belnaves M. The impact of newborn screening on cystic fbrosis testing in Vctoria,Australia, Rev VCGS, 1995;(32):537-542.

Chang R. Química Analítica. México D.F: Editorial MC Graw-Hill. 2002.

Cantón. R. Patógenos multirresistentes en la fibrosis quística. Madrid Arch Bronconeumol 2002; (8):376-85.

Castilla G. Epidemiología de Infecciones Respiratorias en pacientes con Fibrosis Quística. Rev. Perú Pediátrica. 2008;(2): 82-89.

Comités de neumología y gastroenterología Montevideo. Protocolo de atención para pacientes portadores de fibrosis quística.2006.

Collazo T. Fibrosis Quística: Mutaciones más frecuentes en la población mundial. Centro nacional de Genética médica 2008; (4):S475-S484.

Daza W. ¿Qué es una clínica de Fibrosis Quística? Revista Colombiana de pediatría. 1997. (1-6).

Floch M. Netter.Gastroenterología; Edición Elsevier. 2006,211-215.

Frometa A. Influencia de algunos factores asociados con el embarazo en la concentración de TSH en cordón umbilical. Biomedica, 2.001, (21):242-247

Garred P, Pressler T, Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis. J. Clin. Invest.; 1999, (104): 431-437.

H witt . Chronic pancreatitis and cystic fibrosis. Gut, 2003;52(Suppl II).

Kloosterboer R. Quality improvement in newborn screening for cystic Fibrosis by process failure mode effects analysis. Journal of Human Genetics, 2.009 (8), S9-S9

Knowles M, Durie P. What is cystic fibrosis?. (2002) N Engl J Med; 347 (6): (439-42).

Kristidis P, Buzon D, Corey M. Genetic determination of exocrine pancreatic function in cystic fibrosis. Am J Hum Genet.; 1992 (50): 1178-1184

Lao O. Spatial patterns of cystic fibrosis mutation spectra in European populations. European Journal of Human Genetics 2003 (11), 385–394

Liñan S. Fibrosis Quística. Epidemiología, genética y fisiopatología de la enfermedad. Unidad de Neumología Pediátrica y Fibrosis Quística. Hospital materno infantil Vall Hebron. 132-140.

Lizarazu J. Fisiopatología de la pancreatitis crónica. Rev. Col Gastroenterología.2008. (23) no.3.

López G. Curvas ROC. Unidad de epidemiología clínica y bioestadística España. 1.998. (4), 229-235.

Máiz L. Normativa del diagnóstico y el tratamiento de la afección respiratoria en la fibrosis quística. Arch Bronconeumol 2001; (37): 316-324.

Massie J. Markedly elevated neonatal immunoreactive trypsinogen levels in the absence of cystic fibrosis gene mutations is not an indication for further testing. Rev Journal of medicine, 2005 (91);222-225;

Mateus H, M.D., Fonseca D, M.SC. Frecuencia de la mutación F508del en estudiantes de la Facultad de Medicina de la Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia. Rev. Colombia medica. 2007. (38) N° 4.

NCCLS. Recommendation making filter paper simples. 1.994.

Oller A. Fibrosis quística: diagnostico molecular en 93 pacientes argentinos y detección familiar de portadores. Arch Argent Pediatr, 2.008. (4): 310-319.

Orozco L. Fibrosis Quística: la frontera del conocimiento molecular y sus aplicaciones clínicas. RIC, 2.006, (58): 139-152

Ortigosa L. M.D. Fibrosis quística. Aspectos diagnósticos. Rev. Colombia medica 2007.Vol. 38 N° 1 (Supl 1).

Pérez J Aspectos históricos de la Fibrosis Quística. Unidad de FQ.H. Regional Málaga .1995

Renteria F. Ileon meconial como manifestacion inicial de Fibrosis Quística, Arch.pediatría2001; 99(6).

Rodrigues R. Cystic fibrosis and neonatal screening. Rio de Janeiro, 2008.

Sontag M. Genetic and physiologic correlates of longitudinal immunoreactive trypsinogen decline in infants with cystic fibrosis identified through newborn screening. *J Pediatr*, 2006, (7):650-657.

Steven M. Rowe, M:D, Stacey Millar. Mechanisms of disease Cystic Fibrosis. *Rev. Journal of medicine*.2005. 353.2229.

Vega L. CFTR: 15 años después del descubrimiento de un gen. Universidad Católica de Chile, *Rev. Med Hered* 2004, (3)15.

Weiss F. Complete cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene sequencing in patients with idiopathic chronic pancreatitis and controls. *Rev. Gut* 2005; (54):1456–1460.