Implementación de algoritmo diagnostico para detectar neonatos con Fibrosis Quistica en el Hospital Dr. Guillermo Rawson de San Juan

9 min.

La fibrosis quísitca (FQ) es una enfermedad crónica y hereditaria que representa un grave problema para la salud. Es una enfermedad degenerativa que afecta principalmente a los pulmones y al sistema digestivo. A continuación le presentamos un trabajo realizado en el Hospital Dr. Guillermo Rawson de la provincia de San Juan, Argentina, en el cual implementan un algoritmo diagnóstico para FQ empleando las diferentes técnicas disponibles en el hospital público.

Bonetto Elisa (1),
Morrone Andrea (2),
Plana Melina A. (3),
Berenguer Ofelia (4),
Alaniz Angel (5)

1. Lic. en Bioquímica
2. Bioquímica. Especialista en Endocrinología.
3. Lic. en Bioquímica.
4. Lic. en Bioquímica.
5. Bioquímico.

Laboratorio Central. Sector de Pesquisa Neonatal. Biología Molecular. Hospital Descentralizado Dr. Guillermo Rawson. Gral. José María Paz, San Juan, Argentina.

Correspondencia

E-mail: pesquisaneonatalsanjuan@gmail.com

Introducción

En nuestra provincia la pesquisa neonatal de Fibrosis Quística (FQ) se realiza desde marzo del 2010, con el método de tripsina inmunoreactiva (IRT).

El laboratorio de Biología Molecular (BM) funciona desde el año 2000 en el Hospital Dr. Guillermo Rawson (HDGR) donde se investigó 10 mutaciones para FQ, cubriendo el 76% de los enfermos según la frecuencia en la población argentina. A partir del año 2014, se implementó la búsqueda de 36 mutaciones cubriendo así más del 80% de las mutaciones existentes para la enfermedad.

El otro método disponible en el laboratorio, considerado de elección para confirmar sospecha clínica de FQ, es el Test del Sudor (TS), implementado en el sector público a partir de agosto del 2015.

Dada la posibilidad de contar con numerosas herramientas para confirmar el diagnóstico de FQ, se propone implementar un algoritmo diagnóstico utilizando diferentes estrategias de combinación de metodologías.

Objetivos

Establecer un algoritmo diagnóstico para FQ empleando las técnicas disponibles en el hospital público.

Armar diferentes vías de algoritmo diagnóstico según la edad el paciente.

Materiales y métodos

Se analizaron 45.052 muestras de sangre seca de neonatos (obtenida entre las 48 horas y 5 días de vida) desde marzo del 2010 a diciembre de 2015. Se utilizó para medir IRT el método InmunoChem Neonatal Trypsina-MW Elisa, Laboratorio Bacon, para papel de filtro. Los casos positivos fueron recitados antes de los 30 días y se les realizó una segunda determinación de IRT. Aquellos que fueron mayor al valor de corte en la segunda muestra, se les realizó Biología molecular o Test del sudor según la edad del paciente.

El TS se realizó por el método Gold Standard de Gibson y Cooke. La Estimulación del sudor se hizo por iontoforesis con pilocarpina (QPIT). El Análisis cuantitativo de la concentración de cloruros se obtuvo por titulación de Cl^- con técnica Schales y Schales.

Hasta el año 2014 se investigaba la presencia de 5 mutaciones que afectan los exones 10, 11 y 21 del gen responsable de la fibrosis quística (CFTR) y un sitio de splicing mediante una reacción en cadena de la polimerasa alelo específica (AS-PCR) que permite la detección de los alelos mutados y normales:

- F 508 (deleción 3 pb. en el exón 10)
- G542X y G551D (mutaciones puntuales en el exón 11)
- N1303K (mutación puntual en el exón 21)
- 1717 – 1G – A (sitio de splicing)

Además se estudiaron 5 mutaciones que afectan a los exones 3, 7, 20 y al

intrón 19 del gen CFTR mediante la amplificación con primers específicos y posterior digestión con enzimas de restricción:

- W1282X y S1255X (mutaciones puntuales en el exón 20)
- R334W (mutación puntual del exón 7)
- 3849+10Kb (mutación puntual en el intrón 19)
- G85E (mutación puntual del exón 3)

A partir del año 2014 se incorporó la determinación de 36 mutaciones por el test de INNO LIPA CFTR19 – INNO LIPA CFTR17 + Tn Update.

Resultados

De las muestras de sangre seca de RN analizadas, 145 fueron elevadas para IRT (mayor a 130 ng/ml), de las cuales 129 fueron negativas en la segunda determinación de TIR.

A los 16 RN positivos para la segunda determinación de IRT, se les realizó BM, y se encontraron mutaciones en 5 pacientes. Los 11 pacientes no confirmados, 10 presentaron valores de TIR cercanos al punto de corte, concluyendo que fueron falsos positivos para la técnica empleada. Solo un paciente arrojó un valor de TIR mayor a 750 ng/ml y no se observó ninguna mutación (Figura 1).

Figura 1

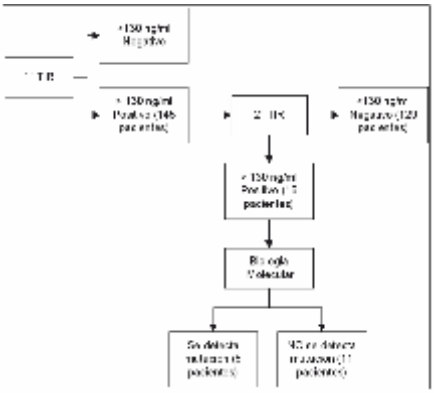
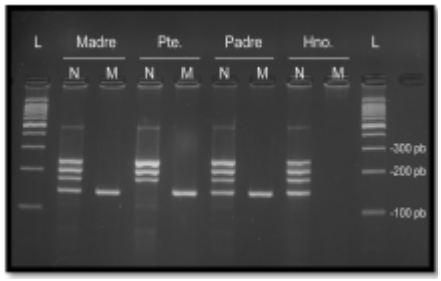


Figura 2. Mutación ΔF 508: Banda de 139 pb.



De los 5 pacientes con FQ, 2 fueron homocigotas para ΔF508 (Figura 2) y G542X (Figura 3); 3 fueron heterocigotas (G542X/W1282X, ΔF508/G85E y ΔF508/W1282X). (Figura 4 y 5).

Debido a la implementación reciente del TS, solo en un paciente de 1 mes de vida, se realizó el TS no pudiendo concluirlo debido a que el peso del sudor no alcanzó los 75 miligramos.

NUEVO

GEMATEC
equipamiento para medicina

Radiometer Analizador de Inmunoensayo
AQT90 FLEX

- Parámetros medidos: Troponina T, Troponina I, CKMB (masa), Mioglobina. NT-proBNP. PCR. BhCG y Dímero-D.
- Carga contínua de muestras, tiempo promedio de resultado 10 minutos.
- Aspiración de muestra a partir de tubo cerrado (sangre entera, plasma o suero)

QUÍMICA CLÍNICA | INMUMOLOGÍA | MEDIO INTERNO | HEMATOLOGÍA

REPRESENTANTE EN ARGENTINA RADIOMETER mindray

Int. Avalos 3651 | (1605) | Munro
Buenos Aires, República Argentina
Tel./Fax: (54 11) 4512 5666
ventas@gematec.com.ar
www.gematec.com.ar

Figura 3. Mutación G542X.Paciente Homocigota

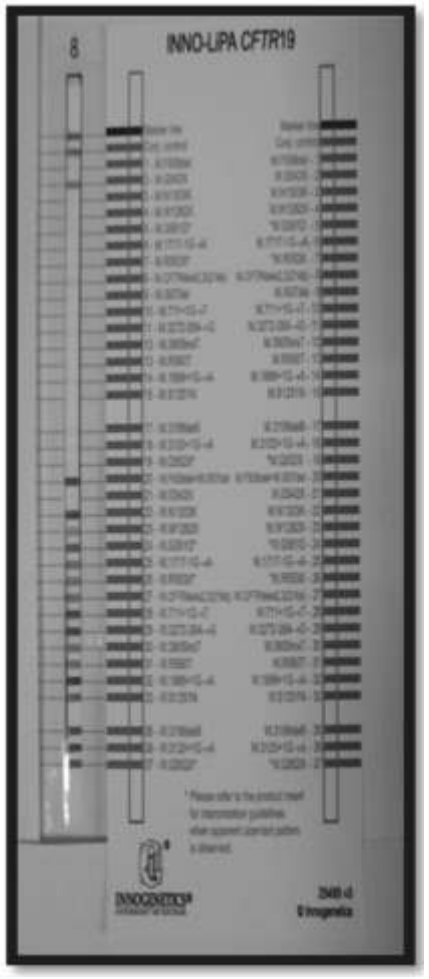
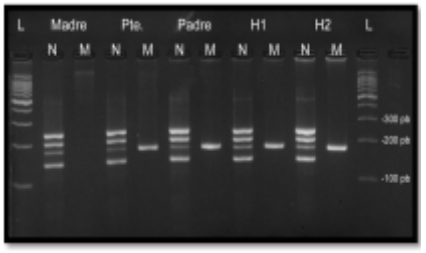


Figura 4. Mutación W1282X: digestión con Mnl 1.Alelo Normal: Bandas de 183, 182 y 106 pb. Alelo Mutado: Bandas de 183 y 288 pb

Figura 5. Mutación G542X: Banda de 174 pb



Discusión y conclusiones

La estrategia implementada en el HDGR para FQ dependerá de la edad del paciente, ya que en pacientes mayores de 30 días la segunda determinación de IRT da falsos negativos y los pacientes menores de 3 meses, el TS carece de sentido por la baja tasa de sudoración a esa edad y el mayor número de falsos negativos (FN). Por ello se concluyó utilizar las siguientes estrategias:

Aquellos pacientes con IRT positiva con menos de 30 días se les realizarán una segunda IRT (estrategia IRT/IRT).

Aquellos pacientes con IRT positiva con más de 30 días se les realizará BM (estrategia IRT/BM).

Para los pacientes con dos IRT positivas y mayores de 3 meses de vida se realizará el TS seguido de BM para los casos con TS positivo (estrategia IRT/IRT – TS – BM).

Para los pacientes con dos IRT positiva y menores de 3 meses, se realizará BM (estrategia IRT/IRT- BM). Si sólo se encuentra 1 mutación, se realiza el test del sudor. (Figura 6).

La derivación directa de estos pacientes al laboratorio de BM reduciría la edad al diagnóstico y los FN en el TS en este rango etario.

Las diferentes estrategias propuestas como algoritmo diagnóstico de FQ, facilitarán el diagnóstico precoz y el manejo adecuado según la edad del paciente; permitiendo llegar a un diagnóstico seguro y colaborando así con la implementación de estrategias terapéuticas tempranas en nuestra población hospitalaria con FQ.

Figura 6

Referencias Bibliográficas

1. Comités Nacionales de Neumonología, Nutrición, Gastroenterología e Infectología. Consenso Nacional de Fibrosis Quística. Arch Argent Pediatr. 2008; 106(5):01-52.
2. Luis Ortigosa. Fibrosis quística. Aspectos diagnósticos. Colombia Médica. 2007; 38 (1): 41-4.
3. Aliño Pellicer S. F., Antelo Landeira M. C., y otros. Libro blanco de atención a la fibrosis quística. Valencia: Federación Española contra la Fibrosis Quistica; 2002.
4. Donaldson S., Boucher R. Fisiopatología de la fibrosis quística. Ann Nestlé [Esp] 2006; 64:101-109.
5. Comité de Neumonología. Guía de diagnóstico y tratamiento de pacientes con Fibrosis Quística. Actualización. Arch Argent Pediatr. 2014; 112 (3):291-292.
6. Salcedo Posadas A., Gartner S., Girón Moreno R.M., García Novo M.D. Tratado de Fibrosis Quística. España: Editorial Justim S.L.; 2012.
7. Julian Zielenki, Richard Rozmahel, Dominique Bozon, Bat-Sheva Kerem, Zbyszko Grzelaczak, John R. Riordan, Johanna Rommens y Lap-Chee Tsui. Genomic DNA sequence of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Gene. Canada: Genomics. 1991; 10: 214-228.
8. Paolo Fortina, Rebecca Conant, Gregory Monokian, Giulia Dotti, Teresa Parrella, Wendy Hitchcock, Jeffrey Kant, Thomas Seanlin, Eric Rappaport, Elias Schwartz y Saul Surrey. Non-radiactive detection of the most common mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene by multiplex allele-specific polymerase chain reaction. Philadelphia: USA. Human Genetics. 1992; 90: 375-378.
9. Richard M. Ferie, Martin J. Schwarz, Nancy H. Robertson, Sally Vaudin, Maurice Super, Geraldine Malone y Stephen Little. Development, Multiplexing, and Application of ARMS Tests for Common Mutations in the CFTR Gene. Inglaterra. Am J. Hm. Genet. 1992; 51: 251-262.

Diestro
MEDICAL DEVICE TECHNOLOGY

Lanzamiento en
Argentina y Latinoamérica

Familia DIESTRO versión 4

La más amplia gama de **Analizadores de Electrolitos**

- Desde equipos semiautomáticos para pocas muestras diarias, hasta automáticos de alta gama y prestación para una gran carga de trabajo.
- **Diseñados y producidos en Argentina comercializados en todo el mundo.**

SEMIAUTOMÁTICOS

V4 Semi Básico

Ideal para laboratorios pequeños con baja cantidad de muestras diarias. No consume mientras no se usa!

V4 Semi Plus

Ideal para laboratorios pequeños con baja cantidad de muestras. Con impresora y conectividad. No consume mientras no se usa!

AUTOMÁTICOS

V4 Auto Básico

Para laboratorios medianos y modernos, con auto stand by para reducir consumo, impresora y conectividad.

V4 Auto Plus

Es el instrumento para laboratorios grandes, que necesita gestionar sus muestras en forma autónoma y segura, con toda la conectividad necesaria.

Na^+ K^+ Cl^- Ca^{++} Li^+

CE