
INTERÉS CLÍNICO

El UMEELISA 17OH Progesterona NEONATAL ha sido concebido para el pesquiasaje de la Hiperplasia Suprarrenal Congénita (HSC) en recién nacidos. La HSC es una enfermedad heredable autosómica recesiva provocada en el 90 % de los casos por la deficiencia de la enzima 21-hidroxilasa (1). Esta enzima cataliza el penúltimo paso en la síntesis de cortisol; la conversión de 17α -hidroxiprogesterona (17OHP) a 11-desoxicortisol. El déficit de cortisol condiciona un aumento en la secreción de corticotropina (ACTH) por la hipofísis, lo que provoca la acumulación de los precursores del cortisol y la hiperplasia de las glándulas suprarrenales (2).

Este trastorno, con una frecuencia aproximada a nivel mundial de 1:15 000 recién nacidos, puede conllevar a una crisis adrenal con peligro para la vida y constituye la causa más frecuente de ambigüedad genital (1,3). Entre los síntomas clínicos más frecuentes se encuentran una maduración esquelética acelerada, virilización en niñas y un desarrollo prematuro de las características sexuales secundarias en niños (4).

El desarrollo de HSC puede evitarse sólo si el tratamiento sustitutivo comienza en los primeros momentos de la vida, por lo cual el diagnóstico precoz constituye la clave para el tratamiento exitoso de la enfermedad (5).

En la década de los 70 se introdujo el análisis de los niveles de 17OHP en plasma por el principio competitivo para el diagnóstico de HSC. Hoy en día se ha generalizado el uso de estos métodos en la pesquisa neonatal de la enfermedad empleando muestras de sangre seca colectadas sobre papel de filtro (6,7).

FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El UMEELISA 17OH Progesterona NEONATAL es un ensayo inmunoenzimático competitivo para la cuantificación de 17α -hidroxiprogesterona (17OHP) en muestras de sangre seca sobre papel de filtro, donde el antígeno natural y el antígeno marcado con una enzima compiten por una cantidad limitada de sitios de unión a los anticuerpos. El ensayo utiliza como fase sólida, placas de ultramicroELISA revestidas previamente con anticuerpos policlonales anti-17OHP, lo cual garantiza la especificidad del ensayo.

Las muestras, los calibradores y el control en manchas de sangre seca sobre papel de filtro, se eluyen con una solución que contiene el conjugado 17OHP/Fosfatasa Alcalina (F.A.). Este eluato se deposita en los pocillos de las tiras para permitir la formación del complejo anticuerpo-17OHP-enzima. La realización de un lavado posterior elimina los componentes no fijados. Al añadir el sustrato fluorigénico (4-Metilumbeliferil fosfato) en los pocillos de las tiras, éste resultará hidrolizado por la enzima del conjugado y la intensidad de la fluorescencia emitida será inversamente proporcional a la concentración de 17OHP presente en la muestra.

El UMELISA 17OH Progesterona NEONATAL es un ensayo diseñado para el pesquisaje de la Hiperplasia Suprarrenal Congénita (HSC) en muestras de sangre seca sobre papel de filtro de recién nacidos. Debe ser utilizado con el Sistema Ultramicroanalítico (**SUMA**), adecuado para efectuar la prueba en óptimas condiciones y garantizando el empleo del equipamiento necesario.

CONTENIDO DEL ESTUCHE Y PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO

Código UM 2035 (288 pruebas)

Contenido:

Placa recubierta de 12 tiras x 8 pocillos	3
Tarjeta con Calibradores y Control en sangre seca	2 x 3 curvas
R1: Solución Tampón	1 x 25 mL
R2: Tampón Conjugado	2 x 15 mL
R3: Conjugado	1 x 0,8 mL
R4: Sustrato	1 x 2 mL
R5: Tampón Sustrato	1 x 18 mL

El lote de las tarjetas y las placas recubiertas se muestra en el borde de su envase primario, el cual está compuesto por cinco dígitos, los cuatro primero representan la fecha de vencimiento y el quinto representa un indicador numérico interno del proceso de producción.

Los calibradores y el control han sido preparados con sangre humana con un valor de hematocrito del 55 %.

Todos los reactivos contienen azida sódica como agente preservante.

Los calibradores y el control son negativos a las pruebas de detección de anti-VIH 1+2, HBsAg, anti-VHC y Sifilis, no obstante, deben ser manipulados como materiales potencialmente infecciosos.

Preparación de las soluciones de trabajo:

R1: Para 4 tiras de reacción diluir 2 mL de solución R1 hasta un volumen de 50 mL con H₂O destilada. Mezcle suavemente para evitar la formación de espuma.

R3: Diluir 1:41 con solución de trabajo R2. Cantidad necesaria para 4 tiras de reacción: 3 mL (0,075 mL de R3 + 3 mL de R2).

R4: Diluya 1:10 con R5. Cantidad necesaria para 4 tiras de reacción: 2 mL (0,2 mL de R4 + 1,8 mL de R5). Prepare inmediatamente antes de usar.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

- Todos los reactivos deben mantenerse entre 2 y 8 °C. En estas condiciones, serán estables en el envase original hasta la fecha de vencimiento.
- Las Tarjetas con Calibradores y Control en sangre seca y las Placas recubiertas de 12 tiras x 8 pocillos, una vez utilizadas, son estables durante dos meses, almacenadas tanto a -20 °C, como de 2 a 8 °C, si se mantienen las mismas condiciones de almacenamiento y se evita la contaminación durante la ejecución del ensayo, deben permanecer además en la bolsa suministrada, protegida con el desecante y herméticamente cerrada.
- En el caso de los componentes R2: Tampón Conjugado y R3: Conjugado; una vez utilizados, son estables durante dos meses, almacenados sin mezclar, de 2 a 8 °C y durante 15 días si se almacenan mezclados a la misma temperatura.
- Después de utilizar parte del contenido del resto de los reactivos, los mismos serán estables durante dos meses si se mantienen las mismas condiciones de almacenamiento y se evita la contaminación durante la ejecución de la prueba.

MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

- Agua destilada.
- Hipoclorito de sodio.
- Pipeta multicanal con puntas desechables para 10 µL.
- Pipetas de precisión entre 10 y 1000 µL.
- Probetas graduadas entre 10 y 250 mL.
- Papel absorbente.
- Placas o tubos para realizar la elución.

PRECAUCIONES

- Antes de comenzar a trabajar, verifique que todos los reactivos estén completamente homogéneos y a una temperatura entre 20 y 25 °C
- Manipule los calibradores, el control y las muestras como potencialmente infecciosos. Utilice guantes desechables. Los materiales utilizados deben colocarse en soluciones desinfectantes (Hipoclorito de sodio al 5 %) o esterilizarse en autoclave.
- Considere a los equipos y accesorios que se han puesto en contacto directo con las muestras y reactivos como contaminados. Realice los procedimientos de limpieza indicados en los manuales de usuario correspondientes.
- Las muestras de sangre seca deben ser colectadas sobre papel de filtro el cual haya sido homologado por el Centro de InmunoEnsayo, para ser aplicado en tamizajes neonatales, utilizando el Sistema Ultramicroanalítico (SUMA), y no deben permanecer a

una temperatura entre 20 y 25 °C por más de una semana. Almacenadas entre 2 y 8 °C son estables durante cuatro meses (8).

-Las tiras de reacción deben estar a la temperatura del laboratorio antes de retirarles la cubierta protectora, para evitar que se condense humedad en su superficie.

-Verifique que las tiras de reacción estén niveladas en el soporte.

-Utilice puntas limpias o nuevas para el trabajo con las soluciones y las muestras.

-Garantice el adecuado control de la humedad en todos los pasos de la prueba. Las muestras y reactivos una vez aplicados, deben mantenerse en las cámaras húmedas para evitar su evaporación ya que esto puede alterar los resultados.

-Verifique periódicamente la exactitud y precisión de las pipetas.

-Cumpla las normas de manipulación de los equipos utilizados y verifique previamente su adecuado funcionamiento, tenga especial cuidado en las operaciones de pipeteo y lavado.

-Evite posibles contaminaciones con materiales fluorescentes.

-Evite la exposición a la luz de los frascos que contienen el Sustrato y el Tampón conjugado.

-El juego de reactivos no debe emplearse después de la fecha de vencimiento.

-Los reactivos del UMELISA 17OH Progesterona NEONATAL de lotes diferentes no se deben intercambiar.

PROCEDIMIENTO TÉCNICO

1.-Preparación de los calibradores, el control y las muestras.

Corte con un perforador para papel un disco de 3 mm de diámetro de la mancha de sangre. Deposítelo en un recipiente apropiado y añádale 70 µL de solución de trabajo R3. Incube durante 30 minutos a una temperatura entre 20 y 25 °C en cámara húmeda. Homogeneice adecuadamente.

2.- Adición de los calibradores, el control y las muestras a las tiras de reacción.

Transfiera 10 µL de los calibradores, el control y las muestras a las tiras de reacción. Se seguirá el siguiente esquema de distribución:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	E	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75
B	A	E	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76
C	B	F	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77
D	B	F	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78
E	C	CB	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79
F	C	CB	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80
G	D	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81
H	D	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82

Estas son las concentraciones aproximadas que deben tener los calibradores del ensayo, en cada lote se determinan las concentraciones de los mismos.

Calibrador A: 0 nmol de 17OHP/L de sangre total

Calibrador B: 5 - 15 nmol de 17OHP/L de sangre total

Calibrador C: 20 - 40 nmol de 17OHP/L de sangre total

Calibrador D: 50 - 80 nmol de 17OHP/L de sangre total

Calibrador E: 100 - 160 nmol de 17OHP/L de sangre total

Calibrador F: 190 - 320 nmol de 17OHP/L de sangre total

Control CB: Control del ensayo.

Se recomienda evaluar las muestras por duplicado. Si utiliza el programa UMELISA 17OH Progesterona NEONATAL para la interpretación automática de los resultados, debe colocar en las posiciones 1 y 2 la primera muestra, en las posiciones 3 y 4 la segunda y así sucesivamente.

3.- Incubación de los calibradores, el control y las muestras.

Incuba las tiras de reacción 2 horas a una temperatura entre 20 y 25 °C en cámara húmeda.

4.- Lavado.

Utilice un lavador de la tecnología SUMA. Lave las tiras de reacción seis veces. Verifique el llenado total del pocillo con la solución de trabajo R1. La solución debe permanecer como mínimo 30 segundos en los pocillos en cada lavado. Después de la última aspiración seque las tiras sobre papel absorbente.

5.- Adición del Sustrato.

Coloque 10 μL de Sustrato convenientemente diluido en cada pocillo de las tiras de reacción.

6.- Incubación del Sustrato.

Incube en cámara húmeda a una temperatura entre 20 y 25 $^{\circ}\text{C}$. En estas condiciones se requiere una incubación de 30 minutos para alcanzar una señal fluorescente de 120 a 150 unidades para el Calibrador A, sin embargo, debido a las variaciones de temperatura puede resultar conveniente que cada laboratorio ajuste el tiempo de incubación para lograr estos niveles de fluorescencia.

7.- Lectura.

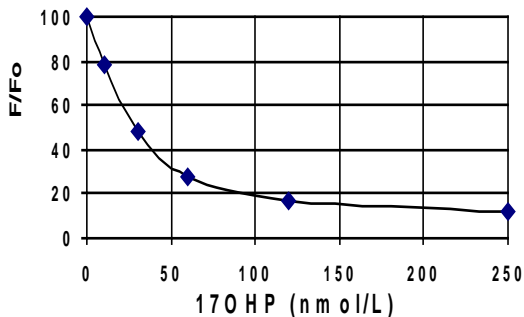
Realice la lectura de la intensidad de la fluorescencia emitida en cada determinación utilizando un lector de la serie SUMA.

PROCEDIMIENTO DE CÁLCULO

Se determina el cociente (Porcentaje de Fluorescencia con respecto al Calibrador A) entre la fluorescencia promedio (F) de los calibradores, el control y las muestras y la fluorescencia promedio del calibrador A (F_0), el resultado se expresa en porcentaje. En el caso del calibrador A: F/F_0 (%) = 100.

Los valores calculados de las muestras se interpolan en un gráfico de F/F_0 (%) contra la concentración de 17OHP correspondiente a la Curva de Calibración, obteniéndose los valores de concentración en nmol/L de sangre y ng/mL de suero.

Curva de Calibración



-La validación, interpretación e impresión de los resultados son realizadas automáticamente por el programa UMELISA 17OH Progesterona NEONATAL. Si no dispone de lo mismo, la interpretación de los resultados se realiza comparando los valores de concentración de 17OHP calculada con el valor de referencia.

CONTROL DE LA CALIDAD

I. La curva de calibración debe cumplir las siguientes condiciones:

La media de los dos valores de fluorescencia para cada calibrador (A - F) debe proporcionar una disminución en unidades de fluorescencia proporcional a su concentración, siguiendo un patrón similar al ejemplificado, los valores discordantes son eliminados automáticamente por el programa.

II. El valor de concentración calculada para el control debe encontrarse en el intervalo establecido para el ensayo.

III. Rechaza los resultados de una muestra si los resultados de la misma son discordantes.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

En un estudio, realizado en 6 157 muestras de sangre seca sobre papel de filtro de recién nacidos cubanos; colectadas como promedio entre el 5to y el 7mo día de vida, se determinó la concentración de 17OHP, empleando el estuche de reactivos UMELISA 17OH Progesterona NEONATAL. Se determinaron la media, la mediana y diferentes percentiles de la distribución y se evaluó la influencia del peso al nacer (PN) y la edad gestacional (EG) sobre los niveles de la 17OHP.

	Edad gestacional (semanas)			Peso al nacer (gramos)		
	< 35	35 - 36,9	> 37	< 1500	1500 – 2499	> 2500
n	242	338	5577	61	529	5567
Media	71,1	50,5	38,2	78,6	52,0	38,7
Mediana	57,4	46,6	36,5	61,5	45,1	36,8
Percentil 98	165	136	84	169	141	86
Percentil 99	190	148	99	207	151	103
Percentil 99,5	247	160	115	233	185	120

Los valores medios de concentración y los percentiles calculados en este estudio pueden utilizarse como una referencia para el establecimiento de los niveles de corte.

La práctica internacional recomienda que cada laboratorio o programa, teniendo en cuenta los diferentes factores genéticos, geográficos y ambientales que actúan sobre las poblaciones, establezca sus propios valores de referencia.

El ajuste de los niveles de corte teniendo en consideración la EG, el PN y/o la edad de toma de la muestra, podría evitar un número elevado de resultados falsos positivos y garantizar una mayor eficiencia del programa de pesquisa.

Se ha determinado para la población de neonatos cubanos, el establecimiento de tres niveles de corte, en función del peso al nacer y/o la edad gestacional (y se ha definido el peso al nacer como el indicador primario en el cálculo del nivel de corte):

	Nivel de corte (nmol/L)
PN \geq 2500 gramos y/o EG \geq 37 semanas	70
PN entre 1501-2499 gramos y/o EG entre 35,1-36,9 semanas	120
PN \leq 1500 gramos y/o EG \leq 35 semanas	240

Factor de conversión:
nmol/L de sangre = 0,73 ng/mL de suero

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DEL ENSAYO

1. PRECISIÓN.

Se evaluaron tres muestras de concentraciones conocidas de 17OHP en el ensayo (intraensayo) y el mismo fue repetido durante varios días (interensayo).

Precisión del UMELISA 17OH Progesterona NEONATAL

Concentración de las muestras (nmol/L)	Intraensayo (n= 24)		Interensayo (n= 10)	
	DE	CV (%)	DE	CV (%)
28,0	2,1	7,6	2,4	8,4
56,3	4,4	7,8	5,4	9,6
133,0	12,4	9,3	15,8	11,9

DE: Desviación Estándar

CV: Coeficiente de Variación

2. EXACTITUD.

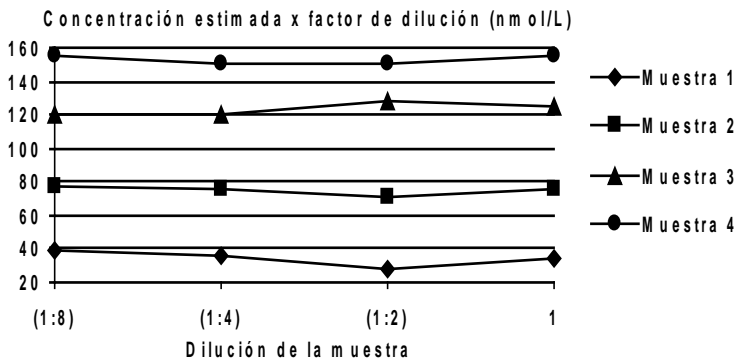
El porcentaje de recuperación obtenido, al añadir diferentes cantidades de 17OHP a tres muestras de sangre de concentración conocida, antes de ser depositadas sobre el papel de filtro fue de $97,7 \% \pm 7,5 \%$.

Recuperación del UME LISA 17OH Progesterona NEONATAL

Muestras	Valor Esperado (nmol/L)	Valor Obtenido (nmol/L)	Recuperación (%)
1	30	27,5	91,7
2	60	57,1	95,2
3	120	127,3	106,1

Se realizaron diluciones seriadas a cuatro muestras de sangre con niveles altos de 17OHP antes de ser depositadas sobre el papel de filtro. Las concentraciones calculadas después de la corrección con el factor de dilución fueron de $\pm 4,2 \%$ de la concentración original en las muestras puras.

Paralelismo del UME LISA 17OH Progesterona NEONATAL



3. DETECTABILIDAD.

La concentración mínima detectable fue de 2,2 nmol/L. Se definió como la menor cantidad de 17OHP presente en una muestra que puede ser detectada con una probabilidad del 95 % y fue calculada como LB + 3 Des.

Donde:

LB: percentilo 95 de los valores del calibrador cero.

DEs: Media de las desviaciones estándar de muestras de bajas concentraciones de 17OHP estudiadas (1,5 - 5 nmol/L).

4. ESPECIFICIDAD.

Se evaluó la reactividad cruzada (RC) con otros compuestos relacionados estructuralmente con la 17OHP.

Compuestos	RC (%)
17OH Pregnenolona	2,6
Progesterona	2,1
Sustancias de Reichstein	0,8
17OH Progesterona-17-acetato	< 0,1
17OH Progesterona hexanoato	< 0,1
Prednisona	< 0,1
5-pregnenolona	< 0,1
5-Pregnenolona-sulfato	< 0,1
Dehidroisoandrosterona-3-sulfato	< 0,1
Pregnenolona sulfato	< 0,1
Cortisona	< 0,1
Dehidroisoandrosterona	< 0,1
Estrona	< 0,1
Corticosterona	< 0,1
β -estradiol	< 0,1
Estriol	< 0,1
Prednisolona	< 0,1
Danazol	< 0,1
Colesterol	< 0,1
Aldosterona	< 0,1
Hidrocortisona	< 0,1
17 α -estradiol	< 0,1

Como puede observarse, los niveles de reactividad cruzada obtenidos son menores que el valor aceptado para este ensayo, de acuerdo con el tipo de compuesto a determinar (10 %).

BIBLIOGRAFIA

- 1.- White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocrine Reviews* 2000; 21 (3): 245-291
- 2.- Cutler GB, Jr Laue L. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *N Engl J Med* 1990; 323: 1806-1813.
- 3.- Miller WL. Congenital adrenal hyperplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1991; 20: 721-749.
- 4.- New MI. Genetic disorders of adrenal hormone synthesis. *Horm Res* 1992; 37: 22-33.
- 5.- Levine LS, Pang S. Prenatal diagnosis and treatment of congenital adrenal hyperplasia. *Freund Publishing House Ltd* 1994; 3: 193- 200.
- 6.- Pang. S, Wallace M, Hofman L, et. al. Worldwide experience in newborn screening for congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Pediatrics* 1988; 81: 866-874.
- 7.-Thilén A, Nordenström A, Hagenfeldt L, Von Döbeln U, Guthenberg C, Larsson A. Benefits of Neonatal Screening for congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency) in Sweden. *Pediatrics* 1998; 101 (4): 1-5.
- 8.- Elves, L.H., Loeber, J.G., The need for standardized bloodspot TSH-calibrators in congenital hypothyroidism screening. *Early Human Development* 45: 179-190, 1996.
- 9.-CLSI. Protocols for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline. *CLSI document EP17-A*. 940 West Valley Road, Suite 1400, 326 Wayne, PA 19087-1898: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2004.

Edición No. 2

Septiembre 2010

UMELISA 17 OH Progesterona NEONATAL

Código UM 2035

Centro de InmunoEnsayo. Calle 134 y Ave. 25. Apdo. Postal 6653, La Habana, CUBA. Teléfono: 7208-2929, Fax (537) 72086514.