

Biomédica
Instituto Nacional de Salud(Colombia)
biomedica@ins.gov.co
ISSN (Versión impresa): 0120-4157
COLOMBIA

2000

Neivis Marrero / Amarilys Frometa / Remigio Coto / Layda Villegas
MEDICIÓN DE TSH, T4 Y PHE EN MUESTRAS DE SANGRE DEL CORDÓN
UMBILICAL EN PAPEL DE FILTRO: IMPACTO EN EL TAMIZAJE NEONATAL
Biomédica, marzo, año/vol. 20, número 001
Instituto Nacional de Salud(Colombia)
Bogotá, Colombia
pp. 33-41

Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal

Universidad Autónoma del Estado de México

<http://redalyc.uaemex.mx>



ARTÍCULO ORIGINAL

Medición de TSH, T4 y Phe en muestras de sangre del cordón umbilical en papel de filtro: impacto en el tamizaje neonatal

Neivis Marrero ¹, Amariyls Frómata ¹, Remigio Coto ², Layda Villegas ²

¹ Laboratorio de Tamizaje Neonatal, Centro de Inmunoensayos, La Habana, Cuba

² Laboratorio SUMA, Hospital Docente Materno-Infantil 10 de octubre, La Habana, Cuba

Resumen

En este momento existe consenso en que el hipotiroidismo congénito y la fenilcetonuria constituyen modelos teóricos y prácticos ideales en el tamizaje neonatal. La tendencia actual en el mundo es la salida temprana de las maternidades debido a razones socioeconómicas, lo cual guía, sin duda, a la implementación de estos programas en sangre del cordón umbilical. Se evaluaron los niveles de T4 total, TSH y Phe en muestras de sangre del cordón umbilical de 458 recién nacidos, colectadas en papel de filtro S&S 2992, utilizando ultramicroensayos fluorescentes. La distribución de frecuencias para las concentraciones de TSH mostró un valor medio de 1,7 mIU/l; el 98% de las muestras tuvieron concentraciones en el rango de 0-10 mIU/l, el 1,7% entre 10-20 mIU/l y una muestra con valor mayor de 20 mIU/l; para T4 el valor medio de concentración fue de 177,2 nmol/l; el 90,2% tuvo valores entre 116-370 nmol/l, el 9,6% entre 60-116 nmol/l y una muestra con un valor menor de 60 nmol/l. Para Phe, el valor promedio fue de 4,6 μ mol/l (0,7mg/dl), el 80,3% entre 0-60 μ mol/l (0-1 mg/dl), el 19,2% entre 60-120 μ mol/l (1-2 mg/dl) y 2 muestras con valor mayor de 120 μ mol/l (2 mg/dl). Los resultados obtenidos demuestran que es factible el empleo de muestras en sangre del cordón para el diagnóstico precoz de hipotiroidismo congénito, no así en el caso de la Phe donde los niveles detectados fueron muy bajos por lo que no garantiza total efectividad en el diagnóstico de fenilcetonuria.

Palabras clave: hipotiroidismo congénito, fenilcetonuria (PKU), tamizaje neonatal, fenilalanina (Phe), hormona estimulante de la tiroides (TSH), tiroxina (T4).

Measurements of TSH, T4 and Phe in samples of umbilical cord blood on filter paper: impact on neonatal screening

Abstract

There is a consensus on considering congenital hypothyroidism and phenylketonuria as theoretical and practical models in neonatal screening. The tendency toward early discharge in some maternity hospitals due to socioeconomic reasons led us to implement screening programs in umbilical cord blood samples. Titres of total T4, TSH and Phe in cord blood on S&S 2992 filter paper from 458 neonates were performed using fluorescent ultramicroassays. Frequency distribution for TSH concentrations showed a mean of 1.7 mIU/l; 98% of the samples had concentrations within the 0-10 mIU/l range, 1.7 % within 10-20 mIU/l and one sample with a value higher than 20 mIU/l. The mean value was 177.2 nmol/l for T4, 90.2% within 116-370 nmol/l, 9.6 % within 60-116 nmol/l and one sample with a value lower than 60 nmol/l. For Phe, the mean concentration was 4.6 μ mol/l (0.7 mg/dl), 80.3 % within the range 0-60 μ mol/l (0-1 mg/dl), 19.2 % within 60-120 μ mol/l (1-2 mg/dl) and two samples with a value higher than 120 μ mol/l (2 mg/dl). Results showed

that the use of cord blood samples in early diagnosis of congenital hypothyroidism is convenient. However, cord blood Phe levels were lower. Thus, they do not guarantee total effectiveness in the detection of phenylketonuria.

Key words: congenital hypothyroidism, phenylketonuria (PKU), neonatal screening, phenylalanine (Phe), thyroid stimulating hormone (TSH), thyroxine (T4).

El tamizaje clásico en una población de recién nacidos se lleva a cabo para enfermedades clínicamente no detectables y que sean tratables antes de que los efectos sean irreversibles. Los errores congénitos han constituido la mayor causa de patología neonatal, aunque han disminuido notablemente por los avances en las conductas obstétricas prenatales y perinatales.

Los programas de detección temprana de enfermedades metabólicas en recién nacidos constituyen un acto de medicina preventiva en el marco de la salud pública, para la identificación precoz de enfermedades que pueden conducir potencialmente a problemas de graves consecuencias para la salud y la sociedad. Ellos exploran los riesgos individuales de una población dada y una vez encontrados, se requiere de exámenes confirmatorios individuales y del diagnóstico.

Los programas de tamizaje neonatal comenzaron en EUA en 1961, con la determinación de Phe en sangre seca sobre papel de filtro con la prueba de inhibición bacteriana de Guthrie, para la detección de fenilcetonuria (1). Una década después, en 1972, se inició en Quebec un programa para la detección de hipotiroidismo congénito (2), seguido por el de Pittsburgh en 1973 (3).

En este momento, existe consenso en que estas enfermedades constituyen modelos teóricos y prácticos ideales en el tamizaje neonatal para enfermedades metabólicas hereditarias; han sido los programas de tamizaje más extendidos en el mundo, contando hoy con una experiencia de casi tres décadas de funcionamiento.

La fenilcetonuria es un desorden congénito del metabolismo de la Phe, con una frecuencia de 1:16.000 recién nacidos (4), producida por la disminución o deficiencia de la actividad del complejo enzimático hidroxilasa de fenilalanina, lo que provoca la acumulación de Phe en sangre y orina que, a su vez, induce un grave retardo mental (5). Por esta razón, es imprescindible la detección temprana y la aplicación de una dieta deficiente de Phe, con cantidad suficiente de este aminoácido para garantizar el desarrollo normal del niño (6).

El hipotiroidismo congénito es uno de los desórdenes endocrinos más frecuentes en la infancia (7). Esta enfermedad es causada por la ausencia anatómica o funcional de la glándula tiroides y constituye la causa más frecuente de retraso mental evitable, con una frecuencia aproximada de 1:4.000 recién nacidos (8,9); sólo el diagnóstico precoz y una terapia sustitutiva con L-tiroxina en los primeros momentos de la vida pueden prevenir las consecuencias adversas en el desarrollo psicomotor (10-14).

Uno de los problemas a los que se enfrentan las autoridades de salud al ejecutar los programas de tamizaje neonatal es lograr una alta cobertura, para lo cual es necesario tener en cuenta las estructuras de salud de cada país, el porcentaje de partos que ocurre en centros hospitalarios, y la sensibilización y educación de los padres.

En Latinoamérica, algunos países como Chile, Costa Rica, Puerto Rico, Uruguay y Cuba cuentan con un programa nacional con cobertura cercana al 100 % de los recién nacidos. En Brasil y Argentina, el diagnóstico neonatal se realiza en algunas provincias con excelente cobertura y con la posibilidad de ampliarla (15).

Los porcentajes de cobertura son variables: Cuba, 98%; Chile, 96,5%; Uruguay, 99%; Costa Rica,

Correspondencia: Nelvis Marrero, Calle 134 y Avenida 25, Apartado postal 6653, Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba

Recibido: 30/08/99; aceptado: 11/02/00

91%; Brasil, 60%; Argentina, 44,5%, y México, 38,6 % (16).

La toma de muestra de sangre del talón del recién nacido en papel de filtro entre el segundo y el séptimo día de nacido, se ha extendido en la mayoría de estos programas de tamizaje neonatal. Sin embargo, hay países como Cuba y Uruguay, donde se ha establecido el uso de muestras del cordón umbilical como una estrategia válida para lograr un óptimo desarrollo de sus programas (17,18).

La tendencia actual en el mundo es la salida temprana de las maternidades, lo cual conlleva, sin duda, a la implementación de programas de tamizaje en sangre del cordón con el objetivo de aumentar el porcentaje de cobertura de dichos programas (19,20).

Este trabajo pretende analizar los niveles de T4 total, TSH y Phe en sangre del cordón umbilical y valorar la factibilidad de su uso como marcadores para el diagnóstico temprano de hipotiroidismo congénito y fenilcetonuria, respectivamente.

Materiales y métodos

Muestras de sangre

Las muestras usadas en este estudio se obtuvieron de sangre del cordón umbilical, para lo cual se depositaron 40 μ l (2 gotas) de EDTA al 4% en un tubo de ensayo, se despinzó suavemente el extremo del cordón umbilical próximo a la placenta y se dejó drenar espontáneamente la sangre en el tubo; se recolectaron 2 ml de sangre y se homogenizó suavemente. Se dispensaron 100 μ l de sangre (con pipeta automática de volumen fijo o gotero desechable, tarado para este volumen), en cada uno de los 4 círculos impresos en las tarjetas de papel de filtro Schleicher y Schuell 2992 y se colocaron en posición horizontal sobre un soporte diseñado al efecto; se dejaron secar durante 3 horas a temperatura ambiente y, luego, se guardaron en sobres de papel y se conservaron a -20 °C hasta su análisis.

Métodos

Para realizar las mediciones de T4 total, TSH y Phe se emplearon los estuches de reactivos

UMELISA TSH Neonatal, UMELISA T4 Neonatal y el UMTEST PKU, respectivamente, producidos por el Centro de Inmunoensayo (21-24).

Los calibradores y controles empleados se prepararon a partir de sangre total humana ajustada a un valor de hematocrito de 55% y dispensados sobre papel de filtro Schleicher y Schuell 2992. Se emplearon discos de 5 mm de diámetro de los calibradores, controles y muestras.

El UMELISA TSH Neonatal es un ensayo inmunoenzimático heterogéneo tipo sandwich, en el cual se utilizan tiras de ultramicroelisa (10 μ l por pocillo) como fase sólida, revestidas previamente con anticuerpos anticadena β de la TSH. Las muestras se eluyen con 70 μ l de conjugado anti α TSH/fosfatasa alcalina en solución tampón tris-carnero; luego, se depositan en las tiras de reacción y, finalmente, se añade el sustrato fluorogénico (4-metil-umbeliferil-fosfato). La curva estándar se validó contra el patrón 80 558 de la OMS y abarca un rango útil de 10-200 mUI/l, con un límite de detección de 2 mUI/l. La evaluación analítica mostró una precisión intra e interensayo de 6,2 y 7,4%, respectivamente. El porcentaje de recuperación obtenido al añadir la hormona fue de 98 a 105% y no se evidenciaron interferencias significativas con otras hormonas hipofisarias.

El UMELISA T4 Neonatal es un ensayo heterogéneo inmunoenzimático competitivo, en el cual se utilizan tiras de ultramicroelisa (10 μ l por pocillo) como fase sólida, revestidas previamente con anticuerpos anti-T4. Las muestras se eluyen con 70 μ l de conjugado T4/fosfatasa alcalina en solución tampón barbiturato-ANS; luego, se depositan en las tiras de reacción y, finalmente, se añade el sustrato fluorogénico (4-metil-umbeliferil-fosfato). La curva estándar se preparó por método gravimétrico y abarca un rango útil de 25-400 nmol/l, con un límite de detección de 11 nmol/l. La evaluación analítica mostró una precisión intra e interensayo de 6,9 y 9,1%, respectivamente. La recuperación analítica obtenida fue mayor de 95% y no se evidenciaron interferencias significativas con otras sustancias estructuralmente relacionadas.

El UMTEST PKU es una ultramicroprueba fluorescente basada en el método de McCaman y

Robins. En esta prueba, la Phe presente en la muestra se eluye con 70 μ l de etanol a 70% y, luego, reacciona con la ninhidrina en condiciones óptimas de pH y temperatura, formando un complejo poco fluorescente. Con la adición de iones cobre, se produce la amplificación de la fluorescencia, aumentando su intensidad por la previa adición de L-leucil-L-alanina a la mezcla de reacción. La curva estándar se preparó por método gravimétrico y abarca un rango útil de 180-2880 μ mol/l, con un límite de detección de 50 μ mol/l. La evaluación analítica mostró una precisión intra e interensayo de 3,8 y 5,2%, respectivamente. El porcentaje de recuperación obtenido fue de 94 a 115%.

La medición de la señal de fluorescencia se realizó en todos los casos, empleando el lector fluorímetro-fotómetro PR-521 y los resultados se calcularon automáticamente empleando el Strips reader software, versión 7.0 para Windows, un programa diseñado para el cálculo de la concentración e interpretación de los resultados. Otros equipos y accesorios empleados fueron el lavador automático MAS 301 y el perforador P-51.

Resultados y discusión

De junio a septiembre de 1998, se analizaron 458 muestras de niños nacidos en el Hospital Docente Materno-Infantil 10 de Octubre en la Ciudad de La Habana.

En la figura 1 se muestra una distribución de frecuencias de los niveles de concentración de TSH en sangre del cordón umbilical en papel de filtro.

La media obtenida fue de 1,7 mUI de TSH/l de sangre total (EEM \pm 0,3 mUI/l). En el cuadro 1 se resume el comportamiento de los valores de TSH en la población estudiada de recién nacidos. El 98 y 99% de los recién nacidos tenían concentraciones de TSH inferiores a 8,6 y 10,3 mUI/l, respectivamente.

En la figura 2 aparece la distribución de valores de T4. La media de concentración obtenida fue de 177,2 nmol de T4/l de suero (EEM \pm 0,02 nmol/l).

El comportamiento de los valores de T4 en la población de recién nacidos estudiada se muestra en el cuadro 2.

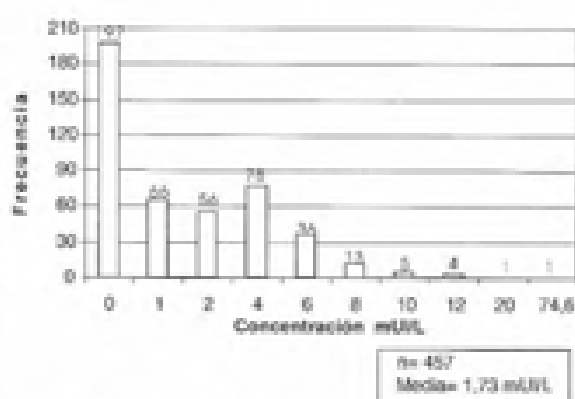


Figura 1. Distribución de frecuencias de TSH en muestras de sangre de cordón umbilical en papel de filtro.

Cuadro 1. Concentraciones de TSH para el total de muestras evaluadas.

Concentración (mUI/l)	0-10	10-20	>20
Número de muestras	446	8	1
Porcentaje (%)	98	1,7	0,2

El décimo percentil de la distribución correspondió a 116,4 nmol/l.

Como resultado de este estudio, encontramos un niño cuya muestra al momento del análisis tenía valores de TSH y T4 de 74,6 mUI/l y 40,1 nmol/l, respectivamente, el cual se confirmó luego como hipotiroides.

En la figura 3 se muestra la distribución de valores de Phe en muestras de sangre del cordón. La media fue de 41,6 μ mol de Phe/l de sangre total (EEM \pm 0,05 μ mol/l).

Las concentraciones de Phe en los de recién nacidos estudiados se presentan en el cuadro 3.

El 98 y 99% de la población estudiada tuvo valores inferiores a 81,4 y 84,8 μ mol/l, respectivamente.

Los resultados anteriores sugieren que es factible el empleo de muestras en sangre del cordón para el tamizaje de hipotiroidismo congénito. Es importante tener presente 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,

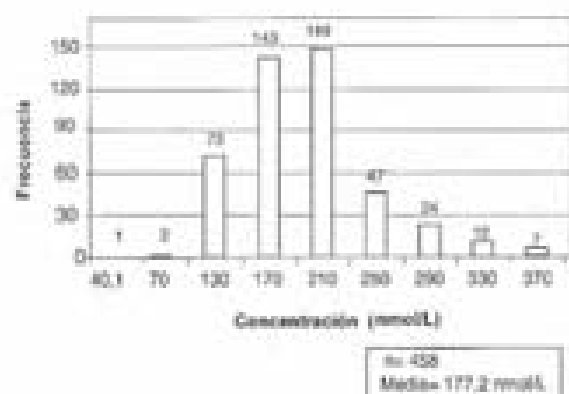


Figura 2. Distribución de frecuencias de T4 en muestras de sangre de cordón umbilical en papel de filtro.

Cuadro 2. Concentraciones de T4 para el total de muestras evaluadas.

Concentración (nmol/l)	<60	60-116	116-370
Número de muestras	1	44	413
Porcentaje (%)	0,2	9,6	90,2

decrece rápidamente durante las primeras 24 horas de vida y más lentamente en los próximos 2 o 3 días; y las concentraciones de T4 libre y total en suero tienen un valor máximo a las 24 o 36 horas después del parto y, luego, decrece lentamente durante las siguientes 2 o 3 semanas de vida (25,26).

Los valores de estas hormonas en sangre del cordón no se comportan igual que en la sangre de talón e, incluso, en talón se modifican con la edad.

Los niveles de TSH y T4 de niños normales son más altos en sangre del cordón que en sangre tomada en los primeros días de vida. Por esta razón, es necesario establecer el nivel de corte adecuado para hacer un diagnóstico correcto y disminuir el número de casos reportados.

Al emplear un nivel de corte para TSH de 15 mUI/L, el índice de reportados fue de 1%; sin embargo, cuando se recalculó el nivel de corte para muestras de sangre del cordón, el percentil 97,5 de la distribución correspondió a 21,6 mUI/L y con este nuevo valor, se bajó el porcentaje de falsos positivos a 0,5% sin encontrar ningún falso

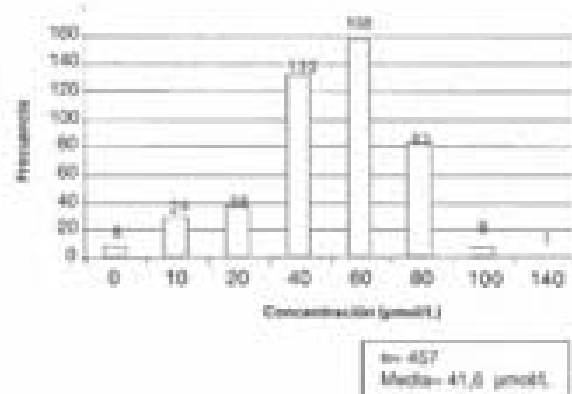


Figura 3. Distribución de frecuencias de Phe en muestras de sangre de cordón umbilical en papel de filtro.

Cuadro 3. Concentraciones de Phe para el total de muestras evaluadas.

Concentración (µmol/l)	0-60	60-120	>120
Número de muestras	367	88	2
Porcentaje (%)	80,3	19,2	0,4

negativo (19). Se ha descrito que hay una tendencia a la disminución progresiva de los percentiles 98 y 99 para los valores de TSH en las muestras de sangre de talón tomadas a las 48 horas de 8,7 y 9,7 mUI/L, respectivamente, y aquellas tomadas hasta los 14 días de 7,2 y 8,2 mUI/L, respectivamente (27). Mientras que Larsson y colaboradores reportaron una media para T4 de 142 nmol/l de plasma (EEM \pm 1,7 nmol/l), en una distribución de 19.289 muestras de sangre de talón de recién nacidos tomadas al quinto día de vida (28).

Así, podemos encontrar países como Chile, Costa Rica y Argentina que emplean un nivel de corte para TSH de 20 mUI/L para muestras de sangre de talón entre el segundo y séptimo día de vida (29-31); en otros casos, como México, emplean 15 mUI/L para sangre de talón y 30 mUI/L para sangre del cordón umbilical (32,33); Cuba, 30 mUI/L para muestras de suero del cordón umbilical (17); España, 10 mUI/L para talón (34); EUA, 30 mUI/L para muestras tomadas antes de las 24 horas de vida y 25 mUI/L para aquellas tomadas a las 24 horas o más (35), y Japón, 8 mUI/L para muestras de sangre de talón (36).

Esta gran diversidad demuestra que, teniendo en cuenta los diferentes factores genéticos y ambientales que actúan sobre poblaciones de diferentes localizaciones geográficas, se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

Para establecer un programa de tamizaje en sangre del cordón umbilical, es necesario tomar en cuenta la influencia de factores perinatales relacionados con el momento del parto y que pueden modificar las concentraciones de TSH y de las hormonas tiroideas en sangre del cordón (37); además, considerar el hecho de que el uso de antisépticos yodados también pueden interferir en los resultados cuando la permeabilidad de la

Según los resultados obtenidos en nuestro estudio, los niveles de Phe en sangre del cordón son muy bajos y se corre el riesgo de que algunos niños que tienen deficiencia de la actividad del complejo enzimático hidroxilasa de fenilalanina, no tengan niveles elevados de fenilalanina en sangre en las primeras horas siguientes al nacimiento. De acuerdo con lo informado para muestras de sangre de talón, los valores elevados están por encima de $240 \mu\text{mol/l}$ (4 mg/dl) y, sin embargo, nosotros obtuvimos solo dos valores mayores de $120 \mu\text{mol/l}$ (2 mg/dl), pero muy cercanos a este valor. Esto indica que la concentración detectable de Phe en sangre del cordón es muy baja. A pesar de que en este estudio no detectamos ningún falso negativo,