



Metodología Científica II, 2014

Diagnóstico de Fibrosis Quística: actualización del tema.

Tutora: Prof. Agda. Karina Machado

Balbuena Carmen

Charón Natali, [redacted]

Ferreira Martin

Irigoyen Juan

Clínica Pediátrica "A". Facultad de Medicina. UdelaR.

Índice de Contenido

Resumen.....	3
Fundamentación de la propuesta.....	4
Introducción: Marco teórico.....	5
Historia.....	5
Epidemiología.....	5
Etiología.....	6
Fisiopatología.....	7
Diagnóstico.....	8
Tratamiento.....	9
Pronóstico.....	10
Situación en el Uruguay.....	11
Objetivo general y específicos.....	12
Metodología.....	13
Resultados.....	14
Detección de tripsina inmunoreactiva (TIR).....	14
Técnica de determinación.....	14
Interpretación de los resultados: consideraciones especiales.....	15
Determinación de la proteína asociada a pancreatitis (PAP).....	16
Test de Sudor.....	16
Interpretación de los resultados.....	18
Determinación de la diferencia de potencial nasal (DPN).....	19
Limitaciones de la prueba.....	20
Diagnóstico genético.....	20
Indicaciones para realizar el estudio genético.....	21
Algoritmos diagnósticos.....	22
Estrategias de cribado.....	22
Diagnóstico a partir de sospecha clínica.....	23
El diagnóstico en Uruguay a partir del cribado neonatal.....	23
Conclusiones y perspectivas.....	25
Anexos.....	27
Anexo 1.....	27
Anexo 2.....	28
Bibliografía.....	29

Resumen

Introducción: La Fibrosis Quística (FQ) es una enfermedad autosómica recesiva que afecta preferentemente a la población de origen caucásico, causada por la mutación en un gen que codifica una proteína reguladora de la conductancia transmembrana: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR). Se presenta en su forma clásica y más habitual por enfermedad pulmonar obstructiva crónica, insuficiencia pancreática, elevación de cloro en sudor e infertilidad en varones por azoospermia obstructiva. Esta sintomatología suele manifestarse en los primeros meses de vida. Es de suma importancia el diagnóstico y tratamiento precoz de la patología para ofrecer un mejor pronóstico y calidad de vida a los pacientes que la padecen.

Objetivo: El presente trabajo pretende realizar una revisión y análisis crítico de la literatura existente sobre el diagnóstico de la FQ en niños, abarcando estrategias diagnósticas nacionales e internacionales.

Metodología: Se hicieron búsquedas bibliográficas en PubMed, Scielo, TESEO y en Portal Timbó, solicitando además material a la biblioteca del Sindicato Médico del Uruguay, Sociedad Uruguaya de Pediatría y Biblioteca de Facultad de Medicina.

Resultados: El diagnóstico de FQ se basa principalmente en la sospecha clínica, screening neonatal (determinación de la Tripsina Inmunoreactiva, TIR, en sangre), determinación de la Proteína Asociada a Pancreatitis (PAP), Test del Sudor, estudio genético y la Diferencia de Potencial Transnasal (DPN).

Conclusiones: El diagnóstico de FQ es muy similar en los distintos países, con diferencias en cuanto al orden cronológico de las distintas técnicas diagnósticas. En Uruguay, así como en otros países, se destaca la búsqueda de FQ en la pesquisa neonatal.

Palabras Claves:

Cystic Fibrosis, Diagnosis, Children.

Fundamentación de la propuesta

Dada la gravedad de las manifestaciones clínicas y el impacto sobre el estado nutricional, el crecimiento y desarrollo de los individuos afectados por FQ, es de suma importancia un diagnóstico temprano de la enfermedad, que posibilite la implementación inmediata de un tratamiento adecuado.

El diagnóstico precoz sumado a un tratamiento oportuno aumenta la expectativa de vida, así como mejora notablemente la calidad de vida del paciente, con disminución de la morbi-mortalidad.

Existen distintos métodos diagnósticos de acuerdo a las etapas de la vida, con diferentes implicancias pronósticas en cada una de ellas: diagnóstico prenatal (estudio genético de las vellosidades coriónicas), pesquisa neonatal (tripsina inmunoreactiva), etapa posterior a la neonatal (test del sudor, diagnóstico genético y molecular y otros estudios).

Sabiendo que existe amplia bibliografía al respecto, se justifica la realización de un análisis crítico del tema, haciendo especial hincapié en las propiedades estadísticas y metodológicas de los diferentes test diagnósticos.

Es así que se planteó la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuáles son los distintos métodos diagnósticos para la detección de la FQ, sus propiedades estadísticas y sus implicancias, aplicabilidad y utilidad en la clínica? Y respecto a este tema, ¿cuál es la realidad de Uruguay?

Introducción: Marco teórico

La FQ es un trastorno hereditario autosómico recesivo debido a disfunción de las glándulas exócrinas, manifestándose principalmente por obstrucción e infección de las vías respiratorias y problemas digestivos. Afecta principalmente a la población de origen caucásico, siendo la enfermedad autosómica recesiva que más frecuentemente afecta la vida de éstos. La patología es causada por una mutación en el gen que codifica para el canal de cloruro, una proteína llamada Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR).

Historia

La patología fue descrita por primera vez en 1938 por Dorothy Andersen, quien detalló su sintomatología, incluyendo la asociación con íleo meconial. En 1945, Andersen y Hodges concluyeron que la FQ se transmitía de manera autosómica recesiva. En 1952 Bodian describió la patogenia, indicando que las secreciones anormalmente espesas que taponaban los conductos excretores de las glándulas exocrinas, producían las lesiones características observadas en páncreas, pulmón, hígado y conductos deferentes, dadas por la dilatación quística, fibrosis y destrucción de las glándulas (1).

Posteriormente, en 1959, a través de la técnica de iontoforesis con pilocarpina diseñada por Gibson y Cook, la determinación cuantitativa de cloro y sodio en sudor se convirtió en el mejor método diagnóstico, siendo hasta la fecha una prueba de determinación que no ha sido superada. En 1983 el descubrimiento de Quinton marcó un cambio en la investigación al descubrir que el defecto específico de la FQ era una reabsorción defectuosa del cloro a nivel de las células epiteliales del epitelio glandular. Dos años más tarde el gen responsable fue detectado en el cromosoma 7 y finalmente en 1989, Riordan, Rommens y Kerem, comunicaron la identificación del gen (1).

Epidemiología

La incidencia de la enfermedad varía considerablemente según la región y la

etnia. En caucásicos oscila entre 1:900 recién nacidos vivos en Quebec y 1:5352 en Cataluña, 1:2000 en judíos mediterráneos, 1:3100 en asiáticos y 1:1700 en afroamericanos (1).

En la región se estima una incidencia de 1:6000 en Argentina y en Chile de 1:8000 a 1:10000 (2). En Brasil la incidencia es variable, con valores que van desde 1:2000 niños nacidos en los estados del sur y 1:7000 en los estados del oeste medio y del norte (3). Se estima que existe un portador cada 20-25 personas sanas en población blanca (1). En Uruguay no existe al momento datos oficiales de incidencia o prevalencia.

Entre los afectados, 95% padece enfermedad respiratoria, 85-90% insuficiencia pancreática, 95% de los varones sufren infertilidad debido a azoospermia secundaria a la ausencia congénita bilateral de los conductos deferentes. En el 10-20% la primera manifestación de la enfermedad es el íleo meconial (2).

Etiología

La enfermedad es causada por mutaciones en el gen que codifica la proteína transmembrana, CFTR. El mismo ocupa cerca de 190 kb a nivel genómico y está constituido por 27 exones y se encuentra en el brazo largo del cromosoma 7 (7q31.2). Su alelo normal produce un transcripto de ARN mensajero, que luego codifica una proteína de 1480 aminoácidos y un peso molecular de 168kDa (4). La proteína CFTR funciona como un canal de cloro, y se expresa en células epiteliales de tejidos exócrinos. El CFTR cumple otras funciones: conduce bicarbonato, contribuyendo a su secreción en varios tejidos, incluyendo la vía aérea, intestino y páncreas.

Actualmente se conocen más de 1900 mutaciones, de las cuales la más frecuente es la denominada $\Delta F508$, presente en el 70% de los alelos FQ a nivel mundial (4). Un grupo de tan sólo 20 mutaciones aparece con frecuencias individuales superiores al 1% y el resto son muy raras o características de un determinado grupo poblacional.

En lo funcional, las mutaciones se agrupan en cinco clases (I -V). Las clases I a III conducen a la pérdida completa de la función del canal; por afectación de

biosíntesis de la proteína, su maduración, o su función, respectivamente. Las mutaciones de clases IV y V producen proteínas que retienen cierta actividad residual (5).

Fisiopatología

El evento fisiopatológico fundamental es la presencia de secreciones anormalmente espesas y deshidratadas que provocan la obstrucción de los conductos del páncreas, glándulas salivares, epidídimo, intestino, bronquios, y bronquiolos. La formación de estas secreciones es el resultado final de un flujo alterado de iones cloruro e iones sodio y del agua que les acompaña (1).

En el aparato respiratorio estas secreciones viscosas producen un movimiento ciliar alterado, impidiendo que el barrido sea adecuado, resultando en obstrucción de bronquios y produciendo infecciones respiratorias. Los gérmenes asociados a la FQ son *Haemophilus influenza* y *Staphylococcus aureus* en los primeros años de vida. Posteriormente los pacientes presentan, frecuentemente colonización por *Pseudomona aeruginosa* (2). El hallazgo de este germen en los cultivos requiere, en forma absoluta, descartar FQ.

En el páncreas, el CFTR se expresa en la membrana apical de las células ductales proximales, donde los canales de Cl^- y $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ funcionan en paralelo. El HCO_3^- es liberado a la luz, produciendo una secreción alcalina que hidrata, solubiliza e inactiva las secreciones acinares. En la FQ este proceso se altera y las secreciones espesas obstruyen los conductos y conducen a la destrucción del órgano (1). La deficiencia pancreática conlleva a malabsorción de grasas y proteínas, que sumado a la deficiencia en la absorción de vitaminas liposolubles genera trastornos nutricionales, provocando alteraciones en el crecimiento.

En el aparato reproductor masculino la mutación produce agenesia congénita bilateral de los vasos deferentes (ACBVD) del testículo, ocasionando una azoospermia, con la consiguiente esterilidad masculina. Ésta puede ser una manifestación de la enfermedad, aun con prueba del sudor negativa (2).

Diagnóstico

El diagnóstico de FQ se basa en tres pilares:

1. Sospecha clínica de la enfermedad: fenotipo compatible, enfermedad en hermanos o primos hermanos, o cribado neonatal positivo.
2. Evidencia de disfunción del gen CFTR: aumento de cloro en test de sudor y potencial transepitelial nasal anormal.
3. Identificación de 2 mutaciones causantes de FQ en distintos cromosomas (2).

La enfermedad se caracteriza por trastornos en distintos sistemas.

En el aparato respiratorio las manifestaciones clínicas están caracterizadas por la triada de obstrucción bronquial, inflamación e infección. En los niños la sintomatología más frecuente es la tos seca y recurrente, tos productiva con secreciones desde mucosas a purulentas, taquipnea persistente, aumento leve del diámetro antero-posterior del tórax, retracciones intercostales y obstrucción bronquial. Los cuadros evolucionados pueden presentar broncorrea, hemoptisis e hipocratismo digital.

Pueden presentarse síntomas de sinusitis crónica (anosmia, cefaleas, rinorrea, mucocoele). Ante una obstrucción nasal persistente con pólipos nasales sin causa clara debe descartarse FQ.

Las manifestaciones en el aparato digestivo están dadas por:

- Íleo meconial: caracterizado por un cuadro de obstrucción Intestinal al nacimiento con distensión abdominal progresiva, vómitos biliosos y falta o retardo en la eliminación del meconio. Su presencia es altamente sugestiva de FQ, a pesar de que se pueden presentar con TIR normales y la obtención del sudor ser dificultosa. En el adulto se presenta como síndrome de obstrucción intestinal distal.
- Malabsorción intestinal: debido a insuficiencia pancreática exócrina, se manifiesta por deposiciones abundantes, fétidas, hipocoloreadas, brillantes, aceitosas.
- Prolapso rectal.

- Retraso del crecimiento.
- Ictericia colestática neonatal prolongada.
- Enfermedad hepática con elevación de las transaminasas. Puede verse litiasis vesicular y cirrosis en mayor frecuencia.
- Síndrome ascítico-edematoso (2).

Otras manifestaciones clínicas son: “sudor salado”, infertilidad, diabetes relacionada con FQ. Puede existir deshidratación hiponatémica y alcalosis hipoclorémica grave que puede presentarse como el debut de la enfermedad.

La pesquisa neonatal se realiza mediante la cuantificación de la medida de la tripsina inmunoreactiva (TIR) en sangre entera impregnada en papel de filtro.

La disfunción del CFTR se evidencia mediante la estimulación de las glándulas sudoríparas por iontoforesis con pilocarpina, recolección del sudor y cuantificación de la concentración de sodio y cloro en el mismo (test de sudor). Los valores normales son inferiores a 40 mmol/l. valores superiores a 60 mmol/l son compatibles con el diagnóstico y los de entre 40-60 mmol/l son considerados dudosos (6).

Para la identificación de mutaciones causantes de FQ existen kits comerciales que detectan las mutaciones más frecuentes de la población a la que pertenece el paciente. La detección de dos alelos mutados es diagnóstico de certeza, pero la no detección no lo excluye (4). Si el paciente presenta una clínica altamente sugestiva y el estudio de las mutaciones más frecuentes no arroja resultados definitivos se puede realizar la secuenciación del gen(4). La detección de las mutaciones no solo se utiliza para el diagnóstico, sino también para asesoramiento genético y detección de portadores.

Tratamiento

Se basa en un abordaje multidisciplinario, con un pediatra de cabecera y si es posible en un centro especializado en FQ.

Los objetivos del tratamiento son:

- Prevención y tratamiento de las enfermedades respiratorias.
- Prevención y tratamiento del déficit nutricional.

- Prevención y tratamiento de otras manifestaciones o complicaciones.
- Cuidado de la salud mental (2).

Para que se cumplan estos objetivos es necesario: realizar controles periódicos, reconocer y tratar precozmente las exacerbaciones, mantener una nutrición adecuada, poseer hábitos de salud saludables, etc.

Sabiendo que las afectaciones en el aparato respiratorio y las alteraciones nutricionales son las que en mayor medida influyen en la calidad de vida y el pronóstico, se describirán las directivas terapéuticas en dichas esferas.

El tratamiento de la afectación del aparato respiratorio se basa en:

- Medidas de prevención como vacunas y evitar el tabaquismo
- Terapia inhalatoria (broncodilatadores, mucolíticos, antibióticos).
- Kinesiología respiratoria diaria.
- Actividad física y deporte.
- Antiinflamatorios.
- Antibióticos en las exacerbaciones pulmonares (según bacteriología).
- Tratamiento de las complicaciones (insuficiencia respiratoria, hemoptisis, neumotórax).
- Adherencia aceptable (2)

El tratamiento nutricional está basado en:

- Adecuada valoración del estado nutricional.
- Recomendaciones nutricionales adaptadas a los requerimientos.
- Valoración de la malabsorción.
- Uso de enzimas pancreáticas (2).

Dependiendo del compromiso de los distintos sistemas en cada paciente el tratamiento será individualizado.

Pronóstico

Desde que se conoce la enfermedad ha habido un cambio sustancial en el pronóstico de los pacientes con FQ; esto gracias al diagnóstico precoz, conocimiento de los mecanismos de la enfermedad, tratamiento adecuado y

formación de equipos multidisciplinarios. Hoy en día la media de edad de sobrevida es cercana a los 40 años (3).

Situación en el Uruguay

La FQ se introdujo a la pesquisa neonatal (PNN) desde junio de 2010 a partir de la inquietud de la Asociación Honoraria de Padres de Hijos con FQ, volviéndose obligatoria para todos los recién nacidos a partir del decreto 677/2009 del MSP (7, 8). Desde esta fecha se han confirmado 23 casos de FQ. Con una prevalencia de 1:8100 personas (9).

El Banco de Previsión Social (BPS) - Instituto de la Seguridad Social es el encargado de realizar el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con FQ de todo el Uruguay tanto del sector público como del sector privado, en sus distintas dependencias. Destacándose la importancia del Ministerio de Salud Pública (MSP), el cual decreta las afecciones que deben buscarse de forma obligatoria en la pesquisa neonatal, la Comisión Honoraria para la Lucha Antituberculosa y Enfermedades Prevalentes (CHLAEP) que es la encargada de supervisar que se le haya realizado a todos los neonatos y citar a aquellos que lo requieran, y la Administración Nacional de Correo (ANC) que transporta las muestras (8). El Laboratorio de Pesquisa Neonatal del BPS se encarga de recibir y procesar las muestras de sangre procedentes de todo el país, analizando alrededor de 170 a 250 muestras/día para TIR y 80 para proteína asociada a pancreatitis (PAP) al mes, en lo que se refiere a la FQ.(9).

El test de sudor y los distintos estudios genéticos se realizan en el Sanatorio Canzani y en Facultad de Química respectivamente.

Una vez establecido el diagnóstico, es el Departamento de Especialidades Médico Quirúrgicas (DEMEQUI) la institución de Uruguay que brinda atención altamente especializada en casos de afecciones connatales, el encargado del tratamiento y seguimiento de los niños afectados.

Objetivo general y específicos

Objetivo general:

Realizar una revisión y análisis crítico de la literatura sobre los test diagnósticos para fibrosis quística.

Objetivos específicos:

1. Revisión y análisis crítico de los distintos test diagnósticos, en forma individual, considerando sus propiedades estadísticas.
2. Revisión y análisis crítico de las estrategias y algoritmos publicados para el diagnóstico de la fibrosis quística.
3. Analizar la disponibilidad de los distintos test diagnósticos en Uruguay.

Metodología

Se realizó una revisión de la literatura existente sobre el tema, analizando posteriormente de manera crítica la misma. La búsqueda bibliográfica fue realizada en los buscadores Pubmed, Scielo, TESEO y en el Portal Timbó.

Se solicitó bibliografía a la biblioteca del Sindicato Médico Uruguayo, a la Sociedad Uruguaya de Pediatría, a la biblioteca de Facultad de Medicina, y al Centro de Pesquisa neonatal del Banco de Previsión Social.

Se realizó una búsqueda para cada uno de los test diagnósticos que se abordaron en el trabajo, por separado, y otra búsqueda para las distintas estrategias y algoritmos diagnósticos existentes. Se utilizaron criterios distintos para cada una de estas búsquedas. De los artículos identificados por los buscadores se analizó el resumen y se seleccionaron los de interés.

A continuación se describen los distintos criterios de búsqueda para cada tema:

Los filtros utilizados en todos los casos fueron:

Article types: "review", "clinical trial", "meta-analysis"

Text availability: "free full text"

Publication dates: "10 years"

Las palabras claves utilizadas fueron:

- Test del Sudor: ("Sweat test" OR "sweat testing" OR "sweat chloride") AND "cystic fibrosis"
- Diagnóstico genético: ("Genome" OR "Genetic") AND "Diagnosis" AND "Cystic Fibrosis"
- TIR: ("Immunoreactive Trypsinogen" OR "TIR" OR "IRT") AND "Cystic Fibrosis"
- DPN: ("Nasal Potential Difference") AND "Cystic Fibrosis"
- Screening neonatal: ("Neonatal screening") AND "Cystic Fibrosis"

Resultados

Detección de tripsina inmunoreactiva (TIR)

La TIR forma parte del screening neonatal de FQ, que junto a otras enfermedades neonatales es parte de programas de detección de defectos congénitos en varios países (10). De esta manera pueden ser detectadas precozmente y así actuar sobre los factores modificables que pueden cambiar notablemente el curso natural de las enfermedades.

En 1979 se demostró que los valores de tripsina inmunoreactiva (TIR) estaban elevados en muestras de sangre obtenidas de cordón en recién nacidos afectados de FQ. A partir de este descubrimiento la determinación de TIR en una gota de sangre seca se utilizó como método definitivo por ser simple, fiable y de alta sensibilidad (1). En 1983 la fundación estadounidense para la FQ recomendó la determinación de TIR utilizando una muestra de sangre de talón como método de cribado, Este método se utiliza en Uruguay actualmente.

La tripsina se sintetiza y secreta desde las células acinares del páncreas exócrino como un precursor o proenzima, llamado tripsinógeno.

Las concentraciones elevadas de tripsina en sangre se producen como consecuencia del reflujo de dicha enzima desde los conductos pancreáticos hacia la circulación, en los casos de obstrucción parcial o completa de los canales pancreáticos.

Técnica de determinación

La determinación de tripsina se realiza mediante el análisis de sangre seca entera impregnada en papel de filtro durante la primera semana de vida. Existen distintas técnicas para la cuantificación de la tripsina: radioinmunoensayo (RIA), inmunofluorescencia a tiempo retardado (DELFA) o enzimoimmunoensayo (ELISA) . Los valores de normalidad varían según la técnica utilizada (6).

La técnica de ELISA consiste en extracción de un disco de la mancha de

sangre recolectada previamente en papel de filtro; el cual se coloca en el pocillo con anticuerpo junto con una disolución buffer de elución. Después de la incubación durante toda la noche, la solución buffer de elución y la mancha de sangre se aspiran, se lava el pocillo y se agrega el anticuerpo con la enzima marcada, incubándose una segunda vez. La reacción enzimática finaliza rápidamente con la solución de parada, y se lee la absorbancia para cada pocillo en 450 nm. Los resultados se determinan como concentración de TIR en ng/mL (11).

La técnica de DELFIA consiste en un inmunoensayo sándwich de dos sitios que utiliza dos anticuerpos monoclonales de ratón purificados para la captura y detección de TIR. Muestras de sangre seca se eluyen en placas de microtitulación recubiertas en IgG anticuerpo monoclonal anti-TIR. Posteriormente, se añade un segundo anticuerpo anti-TIR IgG conjugado con europio. Después de incubación, se adiciona un reactivo intensificador que produce una reacción de fluorescencia; esta señal es proporcional a la concentración de TIR presente en la muestra (12). Para esta técnica se considera concentraciones menores de 70 ng/ml como normales, pero varían dependiendo del laboratorio que realice la prueba.

Interpretación de los resultados: consideraciones especiales

En recién nacidos con edad gestacional inferior a 28 semanas, bajo peso al nacer (<2.500 gr), y raza negra o asiática, se elevan al doble los valores de normalidad de TIR (6).

Los portadores de un solo alelo mutado pueden mostrar valores de TIR más elevados que la población general (6).

Del mismo modo existen diferentes entidades que pueden cursar con hipertripsinemia no relacionada con FQ, y que pueden originar falsos positivos del estudio: muestras recogidas muy precozmente, hipertripsinemia transitoria del recién nacido, sufrimiento fetal, stress perinatal, puntuación baja de test de Apgar, distress respiratorio, hipoglucemia, infecciones congénitas, trisomía 13 y 18, diabetes insípida nefrogénica, insuficiencia renal, atresia intestinal,

alteraciones hepáticas, raza negra (6).

Los niveles de la TIR también pueden tener falsos negativos, como es el caso de recién nacidos afectados por Ileo meconial (probabilidad superior al 30% de resultados falsos negativos (2)), estenosis yeyunal o ileal, que pueden tener niveles normales de TIR.

Determinación de la proteína asociada a pancreatitis (PAP)

La proteína asociada a pancreatitis (PAP) es sintetizada en el páncreas únicamente ante daño o estrés de este órgano(1). En la FQ el páncreas ya se encuentra afectado en la vida intrauterina por lo cual la PAP se comienza a sintetizar desde ese momento (1). Se ha demostrado que la concentración de PAP se encuentra elevada en los neonatos con FQ (1).

El mucoPAP kit es un test de ELISA “sandwich” optimizado para testear la PAP en gotas de sangre entera seca en papel de filtro (13). Este test puede formar parte de la pesquisa neonatal, complementando la detección de la TIR. Esta prueba es relevante en nuestro país, como se desarrollará más adelante.

Test de Sudor

La cuantificación del cloruro en sudor es un pilar fundamental para el diagnóstico de FQ. Desde que se estandarizó el método de Gibson-Cooke en 1959, continua siendo la prueba de laboratorio más importante para confirmar el diagnóstico (6).

Consiste en la administración trasdérmica de pilocarpina por iontoforesis para estimular la secreción de las glándulas sudoríparas, seguido por la recolección del sudor en gasa, papel de filtro (Gibson y Cooke) o en una bobina de MICRODUCT (disco cónico cóncavo invertido con un agujero central conectado a un tubo espiral de plástico (14)), y la posterior cuantificación y análisis del cloruro.

Para que el diagnóstico sea preciso es necesario una adecuada implementación de la prueba. Debe ser realizada en centros acreditados y especializados en el diagnóstico de FQ y que adhieren a las recomendaciones

de la Cystic Fibrosis Foundation (CFF) (15).

Procedimiento convencional de Gibson y Cooke.

1. No requiere preparación especial antes o durante la prueba.
2. Se elige la cara interna del antebrazo, previa higiene con agua desionizada y gasa.
3. En el área se colocan dos almohadillas de gasa, una con nitrato de pilocarpina y la otra con ácido sulfúrico, ambas con un electrodo, que se conectan al polo positivo y negativo respectivamente.
4. Se comienza la iontoforesis aumentando la corriente desde 0 a 4 mA; se recomienda reducir la intensidad si existen molestias en el paciente.
5. Se realiza el pasaje de corriente durante 4 a 5 minutos y luego se reduce la intensidad lentamente a 0; luego lavar la zona estimulada por la pilocarpina con agua desionizada y secar.
6. Se recoge la muestra en papel de gasa o de filtro. Cubrir con banda de polietileno y sujetar con cinta adhesiva para evitar la evaporación.
7. Dejar transcurrir 30 minutos, retirar con pinzas y pesar (2).

La CFF destaca aspectos importantes a tener en cuenta para la realización del test de sudor:

1. Se recomienda que en los neonatos asintomáticos con un test de screening positivo la prueba se realice a partir de las dos semanas de edad y con un peso mínimo de 2000 g.
2. En RN sintomáticos (ej: ileo meconial) el test se puede realizar a partir de las 48 horas del nacimiento; aunque existen más probabilidades de resultados no concluyentes.
3. Los factores que influyen en el volumen de sudor incluyen edad, sexo, peso, raza, condición de la piel y sistema de recolección utilizado.
4. Un volumen suficiente se define como al menos 75 mg de sudor obtenidos mediante el método de Gibson y Cooke o al menos 15 uL por el método de Macroduct.
5. El cloruro es el único ión que se debe tener en cuenta a la hora de realizar el diagnóstico.

6. El método analítico debe ser capaz de detectar con precisión extremo inferior del rango normal de cloruro en el sudor (10 mmol/L).
7. No se debe tener en cuenta la conductividad del sudor, ni la osmolaridad en el momento de hacer el diagnóstico.
8. Se sugiere realizar la prueba de forma bilateral. No se debe sumar muestras insuficientes ni ambas tomas deben ser considerada como dos pruebas distintas.
9. Es importante que el laboratorio que realice la prueba haga la recolección y el análisis el mismo día.
10. Los resultados y su interpretación deben ser reportados lo antes posible(16).

Interpretación de los resultados

Clásicamente los valores de cloro se consideran normales cuando son menores de 40 mmol/L, intermedios cuando su valor se encuentra entre 40-59 mmol/L y compatible con la enfermedad si son mayores a 60 mmol/L (2). Estos valores han sido aplicados a todos los pacientes sin distinción de edad.

En la actualidad la CFF recomienda valores de referencia distintos para menores de seis meses; en los cuales un valor menor de 29 mmol/L descarta la enfermedad, de 30 a 59 mmol/L se considera intermedio y más de 60 mmol/L confirma FQ (14).

Si bien este test es el gold standard para el diagnóstico, y posee muchas ventajas, las pruebas falsas negativas pueden deberse a: errores del laboratorio (17) (recogida de sudor insuficiente, errores en la calibración del equipamiento), por personal no experimentado o en pacientes con FQ que tengan edema y deshidratación (17) y en ciertas patologías (fucosidosis, hipotiroidismo no tratado, eczema, diabetes insípida nefrogénica, etc (2)).

Además, para su adecuada realización se requieren centros especializados, equipamiento avanzado y personal entrenado; muchas veces esto es inviable para países en desarrollo. Otro inconveniente del test es la dificultad que supone para muchos niños la recolección del sudor y el tiempo que consume

este procedimiento (15).

Los resultados del test de de sudor deben ser evaluados a la luz del cuadro clínico y la edad del paciente y no como único elemento diagnóstico (2)

Determinación de la diferencia de potencial nasal (DPN)

El epitelio respiratorio ciliado regula la composición de fluidos periepiteliales mediante el transporte activo de iones sodio y cloro. Este transporte iónico genera una diferencia de potencial transepitelial que puede medirse in vivo, depende de la concentración de los diferentes iones y es negativa respecto a la submucosa. La submucosa de todo el epitelio respiratorio es isoeléctrica, al igual que el tejido celular subcutáneo. Por eso es posible tomar como valor de referencia (para establecer una diferencia de potencial transepitelial) cualquier tejido subcutáneo en zonas del cuerpo humano de fácil acceso; como la cara externa del brazo del paciente.

Las anomalías del transporte iónico en el epitelio respiratorio de pacientes con FQ se asocian con un patrón de DPN que es diferente del de individuos normales. Ésta es la razón fundamental para el uso del mismo como ayuda diagnóstica. Específicamente tres rasgos distinguen a la FQ:

1. Mayor valor absoluto de diferencia de potencial, lo cual refleja un transporte de sodio aumentado a través de una membrana celular relativamente impermeable al cloro. Un valor absoluto de DPN basal ostensiblemente elevado es patognomónico de FQ.
2. Mayor reducción de la diferencia de potencial después de perfusión nasal con un inhibidor del canal de sodio (amilorida), lo cual refleja la inhibición del transporte acelerado de sodio típico de los pacientes con FQ
3. Cambio mínimo o ausencia de cambio en el DPN en respuesta a la perfusión de la superficie epitelial nasal con una solución libre de cloro en conjunción con un beta-agonista (isoproterenol o fenoterol), lo cual refleja la falta de secreción de cloro mediada por la CFTR.

A través de los simpaticomiméticos que producen la activación de la adenilciclase y de del AMPc se consigue una estimulación de cloro en los

individuos sanos, pero no en los pacientes con FQ (18).

Limitaciones de la prueba

A pesar de ser un método reproducible, de bajo costo, poco invasivo y que cuantifica de manera directa las alteraciones fisiopatológicas, posee importantes limitaciones que dificultan su aplicación sistemática.

La prueba no es fiable en caso de inflamación o infección nasal, algunos tratamientos como la aerosolterapia con suero hipertónico, antibioticoterapia inhalada, repetidas polipectomías, cicatrices nasales, pacientes con sonda nasogástrica que pueda erosionar el epitelio nasal (18).

La técnica puede ser dificultosa en caso de que el paciente posea pólipos nasales y en menores de 5 años por su edad, porque requieren ligera sedación y un catéter de menor calibre.

A pesar de lo antedicho, la principal desventaja es la falta de estandarización de la técnica, que implica que los valores de referencia dependan de cada laboratorio que realiza el estudio (2). Este debe realizar un número suficiente de estudios a fin de disponer de valores de referencia y asegurar un adecuado rigor de la técnica. La cifra oscilaría entre 300 y 400 determinaciones (18).

En la mayoría de los casos el diagnóstico de FQ es sencillo con los tests diagnósticos citados, hay un espectro diagnóstico de síntomas y signos que alientan a mejorar las pruebas de diagnóstico disponibles y desarrollar mejores métodos para establecer el diagnóstico positivo (19). Por lo antedicho, su indicación se reserva para casos atípicos, siendo su uso más reconocido en la investigación de la enfermedad.

Diagnóstico genético

Como ya se ha indicado anteriormente, la FQ es la enfermedad genética autosómica recesiva, por lo que la confirmación de la alteración genética es un pilar diagnóstico importante. Se han identificado más de 1800 mutaciones relacionadas con la enfermedad, de las cuales la más frecuente es la $\Delta F508$. Dicha mutación provoca la pérdida de una fenilalanina en el primer pliegue

ligador de nucleótidos del CFTR.

La frecuencia de las mutaciones varía de acuerdo a la poblaciones. La $\Delta F508$ se encuentra en un 70% o más de los cromosomas de pacientes con Fibrosis Quística en las poblaciones de Europa septentrional; en Europa meridional esta frecuencia es menor. Existe un grupo de mutaciones que se asocian con una determinada etnia y que tienen una frecuencia de que va de 1 a 7%. El resto de las mutaciones tiene una frecuencia menor al 1% (20).

Actualmente existen kits comerciales que permiten detectar, mediante técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la presencia del conjunto de mutaciones más frecuentes en la población mundial, y pueden ser utilizadas como parte de los protocolos diagnósticos (4). Dichos kits deben tener la capacidad de detectar al menos un 80% de los alelos mutantes en la población a la que pertenece el paciente (4). Los kits comerciales disponibles en el mercado, desarrollados para poblaciones de Europa y Estados Unidos, detectan entre 12 y 31 mutaciones. Estos sistemas, en su mayoría, incluyen las mutaciones más frecuentes de nuestra población y permiten alcanzar adecuados niveles de sensibilidad (75-80%) (1).

En caso de ser necesario se puede realizar la secuenciación completa del gen CFTR, la cual permite detectar mutaciones o arreglos nuevos o complejos. Este método cuenta con una sensibilidad aproximada al 100% (20).

Indicaciones para realizar el estudio genético

- Confirmación del diagnóstico en casos dudosos
- Diagnóstico en recién nacidos con patología sugestiva.
- Diagnóstico presintomático en recién nacidos y lactantes con sospecha de FQ por antecedentes familiares o pesquisa neonatal positiva.
- Definición genotípica de pacientes con FQ confirmada y detección de portadores asintomáticos en la familia, para adecuado asesoramiento genético.
- Diagnóstico de formas con presentación atípica.
- Diagnóstico prenatal en biopsia de vellosidades coriónicas o amniocentesis.
- Diagnóstico preimplantatorio

El conocimiento del genotipo es también de utilidad para la predicción de ciertas características fenotípicas como la función pancreática (correlación genotipo - fenotipo), caracterización de pacientes para el diseño e implementación de futuras estrategias terapéuticas y para realizar asesoramiento genético (2).

Algoritmos diagnósticos

Habiendo descrito anteriormente los distintos test utilizados para el diagnóstico de FQ, en esta sección se analizará como éstos se integran para realizar un diagnóstico eficiente y precoz. Existen dos puntos de partida para realizar el diagnóstico: en los pacientes que presentan una prueba de TIR anormal y aquellos en los que se sospecha por una clínica presuntiva.

Estrategias de cribado

Para que una enfermedad sea incluida dentro de los programas de cribado debe tener las siguientes características: que la enfermedad tenga una incidencia importante, que el método de cribado sea sencillo, práctico y con una alta sensibilidad, que tenga una adecuada relación costo-beneficio y que el tratamiento precoz cambie satisfactoriamente el curso de la enfermedad.

El esquema general para el diagnóstico neonatal de la enfermedad comienza con un valor de TIR alterado. A partir de éste se plantean dos opciones: realizar una segunda TIR (TIR-TIR) o aplicar un estudio del ADN (TIR-ADN).

Si en esta segunda instancia el resultado continua alterado, se aplicará un Test de Sudor. Si la concentración de cloruro es mayor/igual a 60 mMol/l, se confirma FQ. Si se encuentra entre 30 y 59 mMol/l es posible la FQ; e necesita confirmar el diagnóstico con otros test (test de sudor, DPN, ADN). Si el resultado es menor/igual a 29 mMol/l es improbable el diagnóstico de FQ.

Como paso siguiente se realizará un estudio del ADN para los siguientes casos: pacientes en los que se utilizó en primera instancia TIR-TIR y la prueba de sudor fue positiva; pacientes en los que se utilizó TIR-TIR en primera instancia y la prueba de sudor fue intermedia; pacientes en los que se utilizó en

primera instancia TIR-ADN (con 0 o 1 mutación del CFTR) y presentaron resultado intermedio en el test de sudor.

Cuando se llega al diagnóstico definitivo se comienza inmediatamente con la evaluación clínica del paciente, el tratamiento oportuno y asesoramiento familiar (es importante la realización de test de sudor en hermanos aunque estos no tengan síntomas e independientemente de la edad) (16). (Anexo 1)

Diagnóstico a partir de sospecha clínica

Cuando el diagnóstico no se realiza mediante el cribado neonatal, es la clínica que presenta el paciente el punto de partida para el diagnóstico. Se considera fenotipo compatible con FQ las siguientes características clínicas:

- Enfermedad sinopulmonar crónica.
- Anormalidades gastrointestinales o nutricionales.
- Síndrome de pérdida de sal.
- Azoospermia.
- Hermano o hermana con FQ (2).

En pacientes que presenten una o más de estas características se realizará test de sudor; de acuerdo al resultado se seguirán los mismos pasos que en el algoritmo anterior.

El diagnóstico en Uruguay a partir del cribado neonatal

En nuestro país, el algoritmo de cribado neonatal de FQ se basa en la estrategia TIR-TIR a la que se le adiciona la medición de otro marcador, la PAP.

El uso de esta última se justifica debido a:

- La TIR es muy sensible pero poco específica, por lo que se obtiene un alto porcentaje de falsos positivos.
- El procesamiento conjunto de ambos marcadores aumenta el valor predictivo positivo, disminuyendo el número de pacientes recitados.
- La TIR no puede ser utilizada después de los 30 días de vida del niño a diferencia de la PAP que sí puede ser utilizada luego de este período(7).

El algoritmo TIR-PAP se comenzó a usar entre abril-noviembre de 2011. Al

comenzar la pesquisa se debió calcular los puntos de corte para TIR en las muestras de 2-14 y de 15-30 días de vida. De la PAP se estudió la estabilidad de la muestra en papel de filtro y los valores en pacientes conocidos con FQ(7). El algoritmo comienza con la realización de una prueba de TIR a partir de una muestra de sangre obtenida de talón a todos los recién nacidos del país. Utilizando reactivos de la empresa BIORAD.

Si el resultado de esta prueba es positivo (mayor a 43 ug/l), se realiza una primera PAP a partir de la misma muestra de sangre. Inmediatamente se solicita una nueva muestra de sangre para una segunda TIR y PAP, teniendo en cuenta que si el paciente tiene más de treinta días sólo se realizará PAP.

Los pacientes en los que es improbable la FQ y no se requieren otros estudios son: casos con primera TIR negativa; casos en los que la segunda TIR sea negativa; casos en los que la segunda PAP es negativa, siempre y cuando la segunda TIR sea negativa.

Los pacientes en los que se deberán realizar tests confirmatorios para FQ son aquellos que, teniendo una primera TIR elevada: presentan una segunda prueba de TIR elevada, tienen una segunda PAP elevada, o presentan valores en ascenso entre la primera y la segunda PAP (9).

En éstos el primer estudio confirmatorio a realizar es el test de sudor. Si el resultado es positivo se confirma la patología, de lo contrario se descarta. En los resultados intermedios o en los negativos pero con alta sospecha clínica se plantea el análisis genético para el diagnóstico. Antes de tomar una decisión con respecto al resultado de este test, éste se realizará al menos dos veces.

En el algoritmo diagnóstico de Uruguay no se considera el DPN, ya que no hay disponibilidad de este en el país (9). (Anexo 2)

Conclusiones y perspectivas

Es importante destacar que en Uruguay a partir de 2010 el screening de FQ fue incluido en el programa de cribado neonatal y se realiza a todos los niños recién nacidos en el país (8). No en todos los países sucede esto y es relevante mencionarlo (10).

Del análisis de las estrategias diagnosticas en Uruguay se destaca la determinación de la PAP en los algoritmos diagnósticos, la cual no se nombra como primera estrategia en algoritmos internacionales. Este hecho llama la atención debido a que en la bibliografía se señala que la sensibilidad de la estrategia TIR-PAP es comparable a la estrategia TIR-ADN, pero se necesitan más estudios para evaluar la posibilidad de implementar la PAP en los programas de cribado en combinación con la TIR (1).

En Uruguay la bibliografía sobre el tema es acotada, por lo que es necesario desarrollar investigaciones futuras que profundicen en temas relacionados con la epidemiología, incidencia, mutaciones genéticas prevalentes, distintos tratamientos y efectividad de éstos, y sobrevida en nuestro país.

El objetivo general y los objetivos específicos del presente trabajo fueron cumplidos:

- a) Se realizó una revisión y análisis crítico de los distintos test diagnósticos.
- b) Se realizó una revisión y análisis crítico de las estrategias y algoritmos publicados para el diagnóstico de FQ.
- c) Se analizó la disponibilidad de test y las estrategias de diagnósticos en Uruguay.

Cabe destacar que el primer objetivo no se logró en su totalidad, ya que no se pudo acceder a datos exactos en cuanto a las propiedades estadísticas de los test, contando solamente con datos generales (no numéricos).

La búsqueda bibliográfica realizada fue completa y de calidad. A pesar de ello no se pudo acceder a artículos que no contaban con acceso libre a texto completo, que quizás contaran con datos estadísticos más exactos.

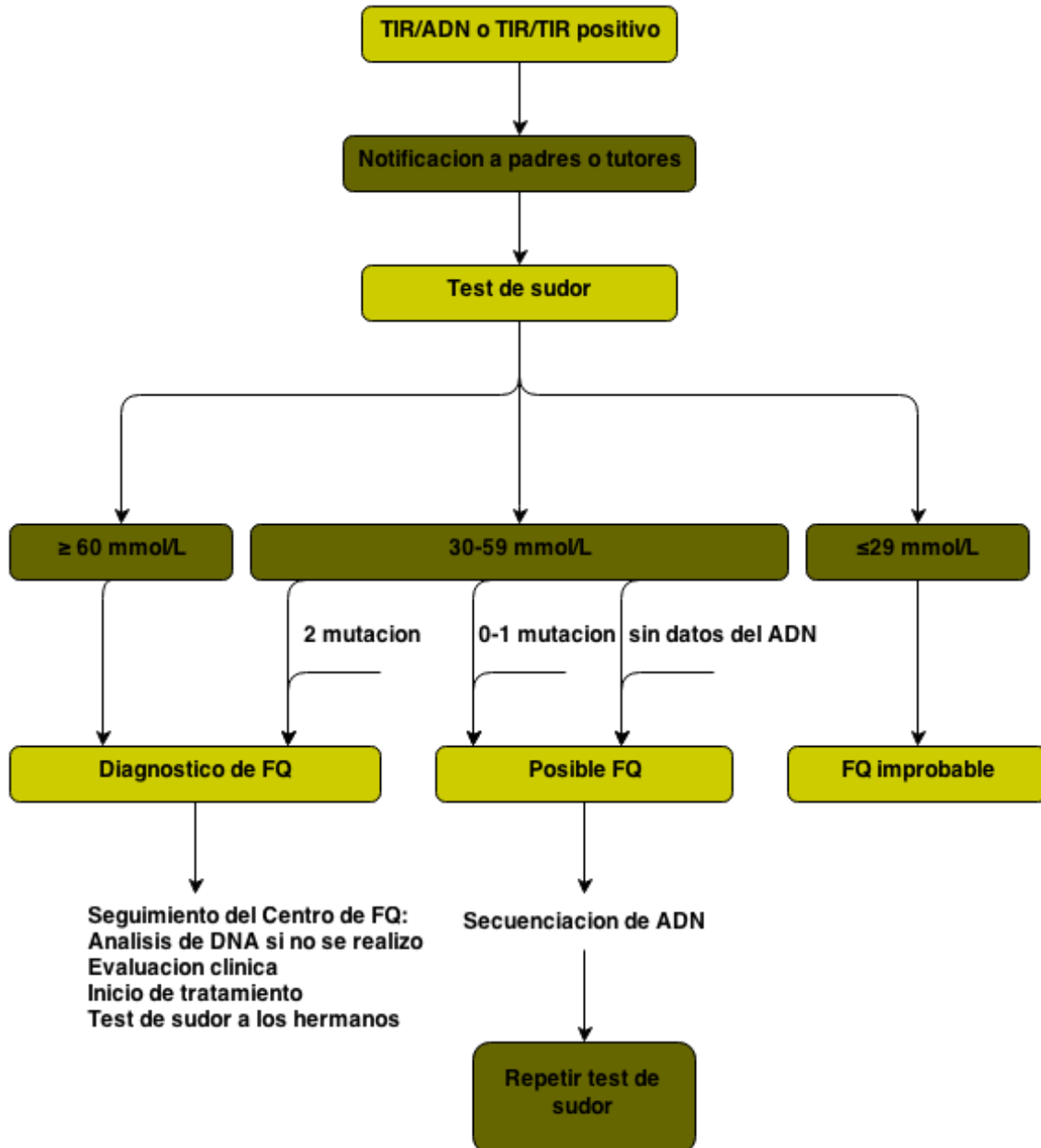
Otro aspecto a destacar es acerca del diagnostico prenatal. Dicho diagnostico

no se consideró en este trabajo por falta de bibliografía sobre el tema, que es relativamente nuevo, controvertido, y no se realiza en Uruguay.

Consideramos que esta experiencia nos permitió profundizar sobre un tema que no es abordado en su totalidad en la carrera y que tiene una frecuencia relevante en la población. Además es el primer trabajo de investigación que realizamos, y creemos que nos aportó herramientas importantes para el desarrollo de nuestra profesión; ya que pusimos en práctica los conocimientos adquiridos en los distintos cursos de metodología científica en cuanto a la realización de búsquedas bibliográficas. Además a partir de este trabajo leímos una variedad de artículos científicos, revisiones, tratados y ensayos clínicos sobre el tema, lo que nos permitió poner en práctica habilidades de análisis crítico de la bibliografía.

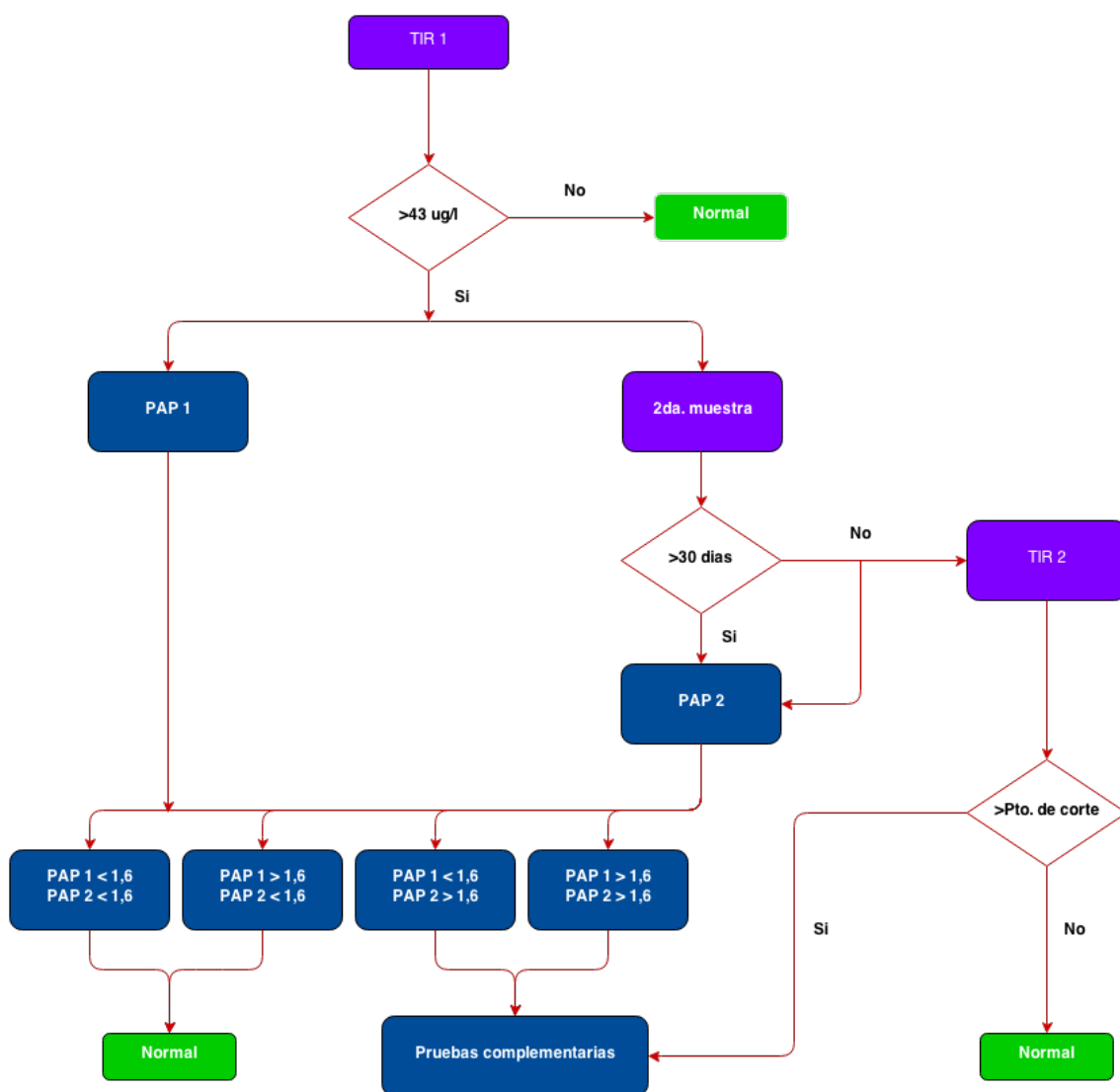
Anexos

Anexo 1



Algoritmo diagnostico. Traducción. (2)

Anexo 2



Algoritmo diagnostico utilizado en Uruguay. (3)

Bibliografía

1. Salcedo Posadas A. Tratado de fibrosis quística. Madrid: Justim; 2012.
2. Castaños C, Rentería F. Consenso Nacional de Fibrosis Quística. Arch Argent Pediatría. 2008;106(5):suplemento.
3. De Abreu e Silva. FA. Grupo de estudio de Fibrosis Quística en Brasil. Grupo Brasileiro de Estudos de Fibrose Cística. 2007 Enero;
4. Pizzo L. Desarrollo de herramientas para mejorar el diagnóstico molecular y asesoramiento genético de Fibrosis Quística en Uruguay [Tesis de Maestría]. [Montevideo]: Facultad de Ciencias, UdelaR; 2013.
5. Zielenski J. Genotype and Phenotype in Cystic Fibrosis. Respiration. 2000;67(2):117–33.
6. Oliva C, et al., fyh. Cribado Neonatal de Fibrosis Quística en la Comunidad Autonoma de Canarias 2009-2012. Canar Pediátrica. 2013 May;37(2):64–72.
7. Machado ME. Pesquisa Neonatal de Fibrosis Quísitica en Uruguay. Rev Asoc Quím Farm Urug. 2013 May;65:22–7.
8. Queiruga G, Queijo C, Lemes A, Machado M, Garlo P. Sistema Nacional de Pesquisa Neonatal en Uruguay. Mem Inst Investig Cienc Salud. 2011 Diciembre;9(2):72–7.
9. Machado ME. Visita al Laboratorio de Pesquisa Neonatal, BPS. 2014.
10. Vázquez Cordero C. Beneficios clínicos del diagnóstico precoz de la fibrosis quística mediante el cribado neonatal. Soc Vasco-Navar Pediatría. 2011;43(1):15–8.
11. IBL international. Immunoreactive Trypsin neonatal Screening ELISA. 2012.
12. Weber R, Pavan M, Souza AC de, Castro SM de. An evaluation of IRT neonatal analytical performance in AutoDELFIA®. J Bras Patol E Med Lab. 2013 Dec;49(6):388–90.
13. DYNABIO S. MucoPAP. PAP assay Kit for Cystic Fibrosis newborn screening. 2013.
14. Barrio Gómez de Agüero MI, García Hernández G, Gartner S. Protocolo de diagnóstico y seguimiento de los pacientes con fibrosis quística. An

Pediatría Asoc Esp Pediatría. 2009;71(3):250–64.

15. Laguna TA, Lin N, Wang Q, Holme B, McNamara J, Regelman WE. Comparison of Quantitative Sweat Chloride Methods after Positive Newborn Screen for Cystic Fibrosis. *Pediatr Pulmonol* [Internet]. 2012 Aug [cited 2014 Sep 2];47(8). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3856863/>
16. Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, Cutting GR, et al. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr*. 2008 Aug;153(2):S4–S14.
17. Ortigosa L. Fibrosis quística. Aspectos diagnósticos. *Colomb Médica*. 2007 Mar;38(1):suplemento 1.
18. Domingo-Ribas C, Bosque-García M. Prueba de la diferencia de potencial nasal para el diagnóstico de la fibrosis quística. *Arch Bronconeumol*. 2006 Jan;42(1):33–8.
19. Valiulis A, Skurvydienė I, Misevičienė V, Kasnauskienė J, Vaidelienė L, Utkus A. Relevance of nasal potential difference in diagnosis of cystic fibrosis among children. *Med Kaunas Lith*. 2013;49(4):185–90.
20. Vaglio A, Pizzo L, Quadrelli A, Gueçaimburú R, Pagano S, Quadrelli R. Limitaciones de los estudios de genética molecular en el proceso diagnóstico de fibrosis quística. *Rev Médica Urug*. 2011;27(3):129–37.