

Ensayo ultramicroanalítico para la confirmación y seguimiento de la hiperplasia adrenal congénita en muestras de suero humano

del Río Fabre, Lesley¹
González Reyes, Ernesto Carlos²
Frómeta Suárez, Amarilys¹
Tejeda Gómez, Yileidis³
Puyada Pérez, Alain¹
Pérez Morás, Pedro Lucio¹

¹ Centro de Inmunoensayo/Laboratorio de Pesquisa Neonatal, La Habana, Cuba, lesley.delrio@cie.cu

² GK Pharmaceuticals CMO/Laboratorio R&D, Guayama, Puerto Rico, ernesto730@gmail.com

³ Docente académico/Universidad ETAC, Estado de México, México, juanaelastic@gmail.com

Resumen:

Introducción: El programa cubano de hiperplasia adrenal congénita (HAC) emplea, para la confirmación y seguimiento de los casos elevados en la pesquisa neonatal, el UMELISA 17OH Progesterona Suero, ensayo que cuantifica los niveles de 17 α -hidroxiprogesterona (17OHP) en muestras de suero.

Objetivo: Evaluar un anticuerpo monoclonal (AcM) anti-17OHP, obtenido en el Centro de Inmunoensayo, para la sustitución del actual anticuerpo policlonal (AcP) en la fase sólida del ensayo.

Materiales y Métodos: Se evaluaron las características funcionales del UMELISA 17OH Progesterona Suero con las nuevas condiciones de recubrimiento.

Resultados: El estudio de controles con diferentes concentraciones de 17OHP dio como resultado coeficientes de variación intra- e inter-ensayo inferiores al 6%. El ensayo de recuperación, al evaluar tres muestras, mostró un recobrado medio de 102.1 \pm 2.8%. Se obtuvo una baja correlación ($r=0,6646$) entre ambos ensayos al evaluar muestras de suero y el promedio de concentración de 17OHP, así como el porcentaje de elevados obtenidos con las nuevas condiciones de recubrimiento, son inferiores a los resultados alcanzados con la fase sólida sensibilizada con los AcP. Los límites de detección (1,4 ng/mL) y cuantificación (3,6 ng/mL) fueron similares a los reportados para el ensayo actual. Los porcentajes de reactividad cruzada con 23 hormonas fueron inferiores al 6%.

Conclusiones: El estudio de las características funcionales del UMELISA 17OH Progesterona Suero mostró que la sustitución del AcP en la fase sólida por el AcM no afecta la precisión y la exactitud del ensayo, además que permite contar con un diagnosticador más específico para la HAC.

Palabras clave: hiperplasia adrenal congénita, UMELISA 17OH Progesterona Suero, anticuerpo monoclonal anti-17OHP

I. INTRODUCCIÓN

La hiperplasia adrenal congénita (HAC) es un grupo de trastornos autosómicos recesivos, resultantes de la deficiencia de una de las cinco enzimas requeridas para la biosíntesis de corticosteroides en la corteza adrenal (1). En más del 90 % de los casos es provocada por la deficiencia de la enzima 21-hidroxilasa, resultando en un aumento en los niveles de la 17 α -hidroxiprogesterona (17OHP), cuyo exceso es desviado hacia la vía de andrógenos. Entre los síntomas asociados con la enfermedad se encuentran la deshidratación severa, la virilización de los genitales externos femeninos y el desarrollo prematuro de características sexuales secundarias en los varones (2).

La detección de la HAC en el período neonatal reduce la mortalidad y morbilidad asociada a las crisis adrenales de pérdida salina, así como evita la asignación incorrecta del sexo en las niñas con genitales externos virilizados (3). En enero de 2005 comenzó en nuestro país un programa nacional para la pesquisa neonatal de la HAC, el cual es dirigido por el Ministerio de Salud Pública a través del Programa de Atención Materno-Infantil y el Instituto Nacional de Endocrinología.

El Centro de Inmunoensayo (CIE) produce y comercializa el UMELISA 17OH Progesterona Suero, ensayo que permite la determinación de los niveles de 17OHP en muestras de suero humano y es empleado en el programa cubano para la confirmación y seguimiento de los pacientes con sospecha y los casos positivos de HAC. El UMELISA 17OH Progesterona Suero es un inmunoensayo enzimático heterólogo competitivo, donde el antígeno natural y el antígeno marcado con una enzima, compiten por una cantidad limitada de sitios de unión a los anticuerpos específicos anti-17OHP (4).

Hasta el momento, la sostenibilidad del diagnosticador se ha garantizado gracias al empleo de antisueros específicos de conejo, que presentan valores de reactividad cruzada (RC) que varían de un antisuero policlonal a otro, dificultando contar con un ensayo que mantenga valores de RC homogéneos en el tiempo.

La obtención de anticuerpos monoclonales (AcM) anti-17OHP específicos, permite contar con una fuente inagotable y reproducible de anticuerpos con especificidad, afinidad y clase conocidas que, aplicados en la fase sólida del ensayo, resultaría en una mejora del proceso productivo y el desempeño del UMELISA 17OH Progesterona Suero, en comparación con el que emplea los antisueros convencionales en el recubrimiento.

En este trabajo se describe la evaluación de un anticuerpo monoclonal (AcM) anti-17OHP (6E2G9) obtenido en el CIE para la sustitución del actual anticuerpo policlonal (AcP) en la fase sólida del UMELISA 17OH Progesterona Suero.

II. MÉTODO

Se evaluaron las características funcionales del UMELISA 17OH Progesterona Suero con las nuevas condiciones de recubrimiento. Para ello se sensibilizaron las placas de poliestireno con el AcM 6E2G9 mediante inmovilización mediada por inmunoglobulinas, se prepararon calibradores con diferentes concentraciones de 17OHP y un control y se realizaron los diferentes estudios de revalidación del ensayo.

Los indicadores evaluados fueron: la precisión, la exactitud, los límites de detección y cuantificación y la especificidad del método. Se realizó un estudio de comparación entre ambas fases sólidas empleando 1 715 muestras de suero procedentes del Hospital Gineco-Obstétrico “Ramón González Coro”.

A. Sensibilización de la fase sólida con el anticuerpo monoclonal 6E2G9 mediante inmovilización mediada por inmunoglobulinas

Las placas de poliestireno de 96 pocillos se recubrieron con AcP anti-IgG de ratón obtenidos en carnero en disolución amortiguadora para el recubrimiento y se incubaron durante 18 horas en cámara húmeda entre 20 y 25 °C. Transcurrido este tiempo, se aspiró la solución de AcP y se realizó un ciclo de lavado empleando el lavador de placas de la Tecnología SUMA. Posteriormente, se adicionó el AcM anti-17OHP y se incubó dos horas entre 20 y 25 °C. Se retiró la solución por aspiración y se procedió a secar las placas durante dos horas a 37 °C. Se sellaron herméticamente en una cubierta de cloruro de polivinilo y papel de aluminio y fueron conservadas entre 2-8 °C.

B. Preparación de los calibradores y el control del ensayo

Se prepararon calibradores en suero humano libre de 17OHP con concentraciones de 0, 50, 100 y 200 ng/mL y un control del ensayo con una concentración aproximada de 70 ng/mL. Los calibradores y control fueron liofilizados y conservados de 2-8 °C.

C. Ensayo para la determinación de los niveles de 17 α -hidroxiprogesterona en muestras de suero humano (UMELISA 17OH Progesterona Suero)

Se adicionaron 5 μ L de los calibradores, control y muestras en cada pocillo de la placa de microELISA y se le añadió el conjugado 17OHP-fosfata alcalina. Tras completa homogenización, se transfirieron 10 μ L a las placas de poliestireno y se incubaron dos horas en cámara húmeda de 20 a 25 °C. Transcurrido este tiempo, se realizaron cuatro ciclos de lavados empleando el lavador de placas de la Tecnología SUMA. Se adicionaron 10 μ L del sustrato y se incubaron las placas en cámara húmeda entre 20 y 25 °C durante 30 minutos. Para la lectura e interpretación de los resultados se empleó el lector de placas fluorímetro/fotómetro PR 621.

D. Procedimientos para la validación de UMELISA 17OH Progesterona Suero con las nuevas condiciones de recubrimiento

Se evaluaron las características funcionales de UMELISA 17OH Progesterona Suero con las nuevas condiciones de recubrimiento, para lo cual se determinó el perfil de precisión calculando los coeficientes de variación (CV) intra- e inter-ensayo de controles con diferentes concentraciones de 17OHP. La exactitud fue evaluada mediante la realización de las pruebas de recuperación y paralelismo. Se calcularon los límites de detección y cuantificación y se evaluó la especificidad del ensayo mediante pruebas de RC con 23 hormonas.

Adicionalmente, se realizó un estudio de correlación utilizando muestras de suero humano pertenecientes a niños en etapa de confirmación y seguimiento del programa de HAC. Las diferencias entre los valores de concentración obtenidos se determinaron mediante el estudio de correlación de Pearson y el cálculo del coeficiente de concordancia de la correlación (5).

III. RESULTADOS

A. Curva de calibración típica del ensayo

La curva de calibración típica del nuevo ensayo y el perfil de precisión se muestran en la Figura 1. Los valores calculados de las muestras y controles se interpolan en un gráfico de F/F_0 (%) contra la concentración de 17OHP de cada punto de la curva de calibración, expresándose los resultados en ng/mL de suero, donde F es la fluorescencia promedio de cada uno de los calibradores del ensayo y F_0 el promedio del calibrador de concentración 0 ng/mL de 17OHP.

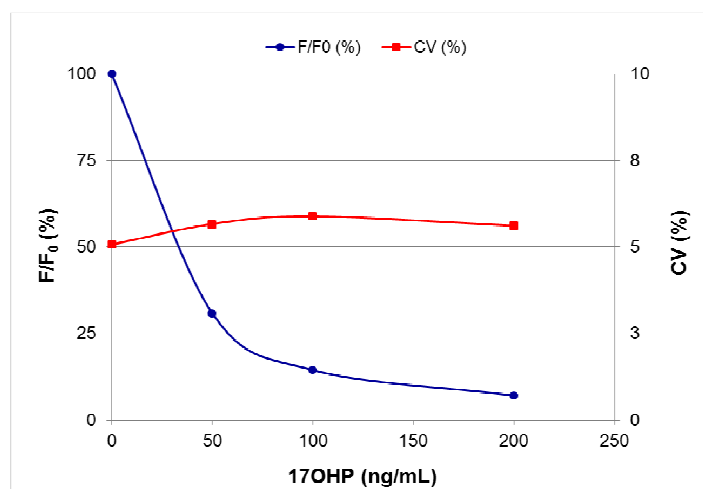


Figura 1. Curva de calibración típica y perfil de precisión del UMELISA 17OH Progesterona Suero con las nuevas condiciones de recubrimiento.

B. Prueba de precisión

La Tabla 1 muestra el perfil de precisión obtenido a partir de la evaluación de tres controles con diferentes concentraciones de 17OHP evaluados en 20 réplicas en un mismo experimento durante 10 días.

Tabla 1. Perfil de precisión del UMELISA 17OHP Suero con las nuevas condiciones de recubrimiento.

17OHP (ng/mL de suero)	Intraensayo (n=20)		Interensayo (n=10)	
	$\sqrt{W_V}$	CV (%)	$\sqrt{V_b}$	CV (%)
20,90	1,02	4,88	1,13	5,41
77,00	1,98	2,57	2,63	3,42
173,15	7,72	4,46	8,06	4,65

Los CV intra- e inter-ensayos fueron inferiores al 6 %, valores que se encuentran entre los parámetros establecidos para este tipo de ensayos (6).

C. Prueba de recuperación

La Tabla 2 recoge los porcentajes de recuperación obtenidos al evaluar tres controles preparados en suero humano libre de 17OHP adicionando cantidades conocidas de la hormona.

Tabla 2. Prueba de recuperación del UMELISA 17OHP Suero con las nuevas condiciones de recubrimiento.

Control	Concentración Esperada (ng/mL)	Concentración Obtenida (ng/mL)	Recuperación (%)
1	20,0	20,9	104,5
2	75,0	77,0	102,7
3	175,0	173,2	99,0

Los valores de recobrado se corresponden con los criterios establecidos para este tipo de ensayos (6)

C. Prueba de paralelismo

En la Figura 2 se grafica el promedio de las concentraciones corregidas por el factor de dilución de cuatro muestras neonatales con altas concentraciones de la hormona y un control de concentración de 190 ng/mL, a los que se le realizaron diluciones seriadas (1:2, 1:4, 1:8) con un suero humano libre de 17OHP. Se observan curvas paralelas al eje de las abscisas, evidenciando la linealidad del método.

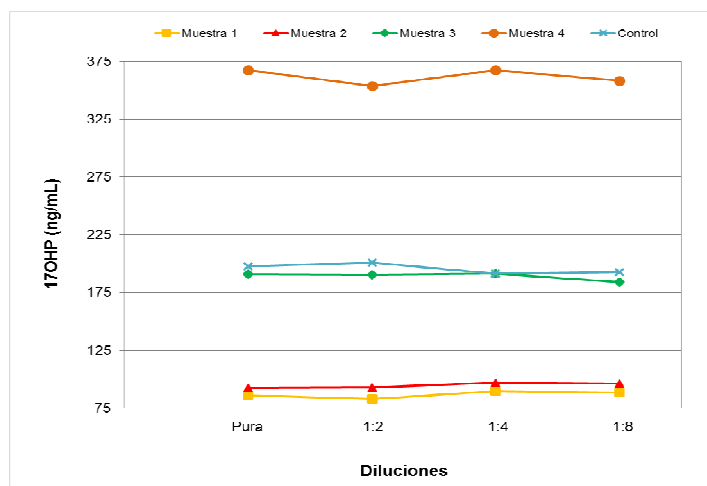


Figura 2. Prueba de paralelismo del UMELISA 17OH Progesterona Suero con las nuevas condiciones de recubrimiento.

D. Determinación del límite de detección y cuantificación

Los límites de detección y cuantificación del ensayo se determinaron de acuerdo a las normas del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (7). Los límites de detección y cuantificación fueron de 1,4 y 3,6 ng/mL, respectivamente. Estos valores son similares a los reportados para el actual UMELISA 17OH Progesterona Suero (8).

E. Evaluación de la especificidad mediante pruebas de reactividad cruzada

En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos al evaluar la RC del AcM 6E2G9 con sustancias relacionadas estructuralmente con la 17OHP. La RC fue inferior al 6 % para todos los compuestos evaluados. Los porcentajes más elevados se obtuvieron con la hidrocortisona, la progesterona, la sustancia de Reichstein y la 17 α -hidroxipregnenolona, encontrándose por debajo de los valores considerados que pueden afectar significativamente los resultados del ensayo (10 %) (9).

La obtención de anticuerpos que sólo detecten la hormona de interés es una tarea difícil, ya que existe gran similitud estructural entre los esteroides que forman parte del ciclo de síntesis de cortisol en las glándulas suprarrenales. Se reconoce que todos los inmunoensayos para la cuantificación de la 17OHP sobrestiman las concentraciones de la hormona debido a la RC de los anticuerpos empleados en los ensayos con las hormonas adrenales de origen fetal (10).

Tabla 3. Evaluación de la especificidad mediante pruebas de RC.

Compuestos	RC (%)	Compuestos	RC (%)
Hidrocortisona	5,7	Aldosterona	< 0,1
Progesterona	3,0	17 α -estradiol	< 0,1
Sustancia de Reichstein	2,7	β -estradiol	< 0,1
17 α -hidroxipregnenolona	2,5	Estrona	< 0,1
17 α -hidroxipregnenolona 3-acetato	1,0	Estriol	< 0,1
Pregnenolona	< 0,1	Prednisona	< 0,1
Sulfato de pregnenolona	< 0,1	Prednisolona	< 0,1
Sal sódica de sulfato de pregnenolona	< 0,1	Cortisona	< 0,1
17OHP 17-acetato	< 0,1	Corticosterona	< 0,1
Caproato de 17OHP	< 0,1	Colesterol	< 0,1
Dehidroepiandrosterona	< 0,1	Danazol	< 0,1
Sulfato de dehidroepiandrosterona	< 0,1		

F. Comparación de métodos

La Figura 3 muestra el estudio de correlación entre el ensayo con las condiciones actuales y el nuevo ensayo que utiliza AcM en la fase sólida (n=1 715 muestras de suero humano).

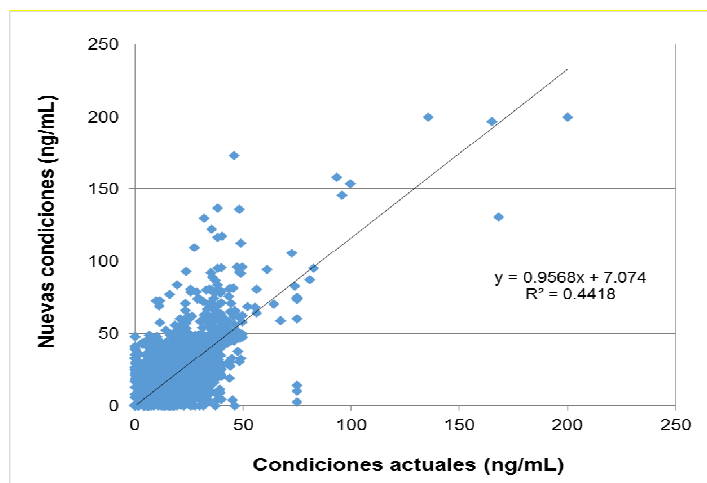


Figura 3. Correlación entre los resultados obtenidos con el UMELISA 17OH Progesterona en su formato actual y empleando las nuevas condiciones de recubrimiento.

Se obtuvo una baja correlación ($r=0,6646$) y concordancia de la correlación ($pc=0,59$) entre ambos ensayos debido a que las concentraciones de las muestras obtenidas con las nuevas condiciones de recubrimiento son inferiores a las obtenidas con el AcP en fase sólida. Este comportamiento se puede observar en la Tabla 4, donde se muestra una disminución de la concentración promedio de 17OHP cuando

se emplea el AcM y en el gráfico de distribución de frecuencias (Figura 8), donde aprecia un desplazamiento general de los niveles de la hormona hacia valores más bajos de concentración (Figura 8).

Tabla 4. Resultados obtenidos al evaluar muestras de suero humano en el UMELISA 17OH Progesterona Suero con las condiciones actuales de recubrimiento (AcP) y las nuevas (AcM).

	Ensayo actual (AcP)	Nuevas condiciones (AcM)
Media total (ng/mL)	30,9	24,9
Mediana total (ng/mL)	28,3	22,9
Elevados (Nivel de corte \geq 50 ng/mL)	144 (8,4 %)	21 (1,2 %)

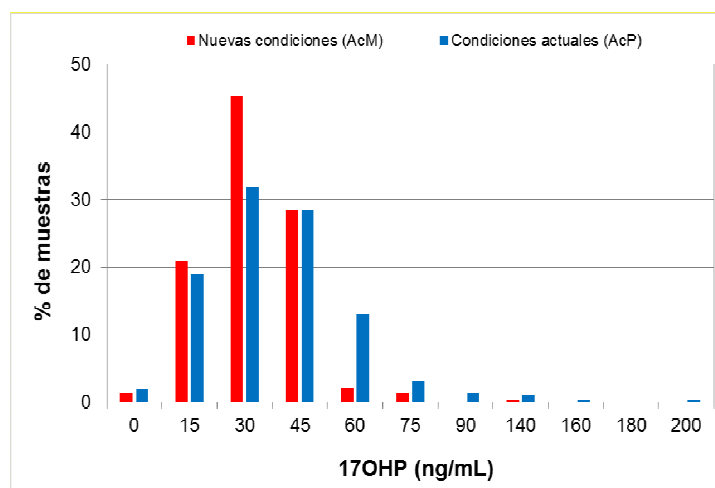


Figura 8. Distribución de frecuencia de las muestras según la concentración de 17OHP obtenida con el UMELISA 17OH Progesterona Suero en su formato actual y empleando las nuevas condiciones de recubrimiento.

La disminución de los niveles de 17OHP de las muestras, así como la considerable reducción del número de elevados, está asociado a la especificidad del AcM por la hormona. El empleo de antisueros policlonales en inmunoensayos destinados al diagnóstico de la HAC resulta en un incremento del número de falsos positivos, atribuible, entre otros factores, a las inespecificidades con otros esteroides que forman parte del ciclo de síntesis del cortisol en las glándulas suprarrenales que presentan gran similitud estructural con la 17OHP. La considerable reducción en el porcentaje de elevados empleando el AcM en fase sólida, contribuirá a la disminución del número de sucesivas recitaciones y los efectos no deseados asociados a ello, como son los problemas psicosociales derivados de la angustia generada en la familia de los neonatos y los costos económicos que derivan de la reevaluación de las muestras.

Este comportamiento también puede estar asociado a las nuevas condiciones de recubrimiento, ya que la unión a la matriz de poliestireno mediada por inmunoglobulinas, permite una mejor exposición de los sitios de unión del AcM a la hormona, con el consiguiente aumento de la especificidad del reconocimiento (11). Adicionalmente, el aumento de la concentración de proteínas en la fase sólida (empleadas en el boqueo + AcP anti-IgG de ratón) reducen las interacciones inespecíficas de la muestra con la placa de poliestireno, disminuyendo así los fondos del ensayo.

Una dificultad presentada durante estos años de programa ha sido los cambios de AcP en la fase sólida del ensayo, que ha conllevado a reajustes en los niveles de corte debido a los diferentes valores de

RC de un antisuero policlonal a otro. El uso del AcM 6E2G9 en el ensayo aventaja a los actuales AcP obtenidos en conejo en cuanto a su homogeneidad, reproducibilidad y disponibilidad ilimitada, por lo que su sustitución en el UMELISA 17OH Progesterona Suero resultaría en una mejora en el proceso productivo del diagnosticador y el desempeño del programa.

IV. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten recomendar la introducción del AcM anti-17OHP (6E2G9) en la fase sólida del UMELISA 17OH Progesterona Suero, ya que perfecciona el proceso productivo del componente y permite contar con un ensayo que mantiene sus características funcionales para la confirmación y seguimiento de la HAC en muestras de suero humano.

REFERENCIAS

- (1) White PC, Bachega TASS. Congenital adrenal hyperplasia due to 21 hydroxylase deficiency: from birth to adulthood. *Semin Reprod Med* 2012; 30:400-409.
- (2) Gidlöf S, Wedell A, Guthenberg C, von Döbeln U, Nordenström A. Nationwide Neonatal Screening for Congenital Adrenal Hyperplasia in Sweden: A 26-Year Longitudinal Prospective Population-Based Study. *JAMA Pediatr* 2014; 168(6):567-574.
- (3) Dörr HG, Odenwald B, Nennstiel-Ratzel U. Early Diagnosis of Children with Classic Congenital Adrenal Hyperplasia Due to 21-Hydroxylase Deficiency by Newborn Screening. *Int J Neonatal Screen* 2015; 1:36-44.
- (4) González EC, Carvajal F, Frómeta A, Arteaga AL, Castells EM, Espinosa T, Coto R, Pérez PL, Tejeda Y, del Río L, Segura MT, Almenares P, Robaina R, Fernández JL. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in Cuba: Six years of experience. *Clin Chim Acta* 2013; 421:73-78.
- (5) Lin LI. A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. *Biometrics* 1989; 45:255-268.
- (6) Ochoa RF. Validación de los inmunoensayos empleados para evaluar la inmunogenicidad de vacunas. En: Finlay Ediciones. Bases metodológicas para la evaluación de anticuerpos en ensayos clínicos de vacunas mediante técnicas inmunoenzimáticas. 2da edición; 2008; p. 46-67.
- (7) 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.
- (8) González EC, Mónaga M, Herrera D, Pérez PL, Frómeta A, Castells EM, Baloy A. UMELISA 17OHP Suero: ensayo para la determinación de 17 α -hidroxiprogesterona (17OHP) en muestras de suero humano. *Rev Cubana Endocrinol* 2003; 14:23.
- (9) Sinikka KM, Graham E. Nonespecificity of a direct 17-hydroxyprogesterone radioimmunoassays kit when used with samples of neonates. *Clin Chem* 1988; 34(10):2070-2075.
- (10) Riepe FG, Sippell WG. Recent advances in diagnosis, treatment, and outcome of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Rev Endocr Metab Disord* 2007; 8(4):349-363.
- (11) Batalla P. Nuevos métodos para la inmovilización orientada de anticuerpos sobre soportes sólidos. Memoria presentada para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid. Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid; 2009.