

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



***ESTRATEGIA DE MEJORA EN LA CALIDAD DEL ALGORITMO DE LA  
PESQUISA NEONATAL DE FIBROSIS QUÍSTICA EN CHILE  
MEDIANTE LA INCORPORACIÓN DE LA DETECCIÓN DE  
MUTACIONES EN EL GEN CFTR***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de  
Magíster en Bioquímica área de Especialización en Bioquímica  
Clínica y Memoria para optar al Título de Bioquímico por:**

***CAMILA ALEJANDRA CHANDÍA CASTILLO***

**Directores de Tesis: Dr. Luis Quiñones Sepúlveda  
Dr. Gabriel Lobo Sotomayor**

**Santiago-CHILE**

**Noviembre 2020**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

**CAMILA ALEJANDRA CHANDÍA CASTILLO**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Bioquímica Clínica y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día

---

**Director de Tesis:**

**Dr. Luis Quiñones Sepúlveda**

---

**Co-director de Tesis:**

**Dr. Gabriel Lobo Sotomayor**

---

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**Dra. Lorena García Nannig**

---

**Dra. Valentina Parra Ortiz**

---

**M.Sc. Carolina Salas Palma**

---

## **DEDICATORIA**

Para todas las pequeñas y todos los pequeños valientes que viven el día a día con Fibrosis Quística, a sus incansables familias y a los profesionales de salud trabajan constantemente para darles una mejor vida.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar agradeciendo a la profe Dani, quien se da el tiempo de conocer a cada uno de sus alumnos y que sabía que encajaría perfectamente en este tema.

Agradecer a la gente del Hospital San Juan de Dios y del San Borja Arriarán. El Dr. Lobo y la Dra. Boza, quienes me ayudaron a dar los primeros pasos de esta tesis, a la Dra. Barrientos y la Dra. Oviedo que me recibieron en su espacio de trabajo y con la mejor disposición. Pero por sobre todo a Susana, quién creyó siempre en mí, escuchó mis ideas aplaudiéndolas cuando eran buenas y aconsejándome cuando no eran las correctas, una excelente tutora, profesional y persona. A la Corita y la Sol, siempre preocupadas por mí, dispuestas a escuchar y a reír conmigo en los ratos que ya no quería estar más en el computador. A Carmen Gloria, Ximena, Viviana y Yasna, por su disposición.

También a la gente del Laboratorio CQF, a todos por ir a los seminarios y ayudarme a mejorar la tesis desde distintos puntos de vista, por la buena onda y el cariño. Al profe Luis que sin conocerme me recibió en su laboratorio y me apoyó con la tesis. Al profe Nelson, dispuesto a ayudar y siempre con un sabio consejo. A Leslie, que fue una cara conocida en un nuevo lugar, la mujer multicanal, apañadora y amiga. A la Ale, que me enseñó muchas cosas y siempre se hacía el tiempo cuando tenía alguna duda. A la Dani, mi amiguita del corazón, la única otra miembro del club de tejido, la que siempre me escucha y se preocupa por mí, la que me acompaña con cafecito y galletas después de almuerzo, la que me hace reír con sus payasadas.

A mis amiguitos de la U, la Checha, el Hecti, Cris dud perro zorrón y sobre todo el Mati, mi amigo, mi confidente, mi compañero en el estudio y en la estupidez.

A mi familia. A mi Yeya, que siempre estuvo ahí, en las buenas y en las malas, la mujer que me enseñó tantas cosas, la que me llevaba comida cuando estaba estudiando y pasaban las horas sin acordarme que mi cuerpo funciona con alimento, la que me ragalona, la que me hace cariño, la que me enseña de la vida y de la familia, también la que me reta y que se enoja conmigo cuando la molesto o le pongo caras. A mi Tata, mi viejito matemático, al que le hago fosforito en la cabeza cuando lo saludo y se ríe, el mateo, el único de mi familia que leerá a profundidad

mi tesis y me hará preguntas, el que comparte conmigo la adicción por los útiles de escritorio. A mi mamá y mi papá, que siempre se han preocupado por mi, que no me falte nada, que me abrigue y que sea feliz. A mi hermana Paulina, donde quiera que estemos, estamos siempre conectadas, con quien siempre peleaba y que ahora se ha transformado en mi amiga, a sus hijas Antonia y Julieta, que me hicieron volver a jugar y me enseñaron a ver el mundo de otra forma. A mi hermano Rodrigo, que siempre está ahí, que me entiende y que me apaña. A la Pollo, una incondicional, que toda mi vida ha estado presente, siempre con un buen consejo, siempre preocupada, siempre defendiéndome y apoyándome. Al Chocho, mi hijo de cuatro patas y cola, al que cada vez que le digo “¿vamos a estudiar?”, entiende perfectamente que vamos al escritorio a que le haga cariño mientras trabajo.

A mi Sandecito, que me aguantó tantas veces estresada, agotada y cansada, que siempre estuvo ahí, escuchándome y acompañándome en mis frustraciones, el que me hace olvidar los problemas y el que celebra mis victorias. A su familia, que siempre han sido un apoyo y me han entregado su cariño.

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>I. RESUMEN</b> .....	7
<b>II. INTRODUCCIÓN</b> .....	8
<b>1. MARCO TEÓRICO</b> .....	10
<b>1.1. Fibrosis quística</b> .....	10
1.1.1. ¿Qué es la fibrosis quística? .....	10
1.1.2. Cuadro clínico.....	10
1.1.3. Canal regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística. ....	11
1.1.4. Clasificación de las mutaciones en el gen CFTR .....	11
1.1.5. Deleción de fenilalanina 508 en CFTR y otras mutaciones identificadas en Chile.....	12
<b>1.2. Pesquisa neonatal</b> .....	14
1.2.1. ¿Qué es la pesquisa neonatal?.....	14
1.2.2. Actualidad del tamizaje neonatal en Chile.....	14
1.2.3. Actualidad del tamizaje de fibrosis quística en Chile .....	16
1.2.4. Ventajas y desventajas del tamizaje neonatal para fibrosis quística .....	16
1.2.5. Estándares de calidad para la pesquisa neonatal de fibrosis quística .....	17
<b>1.3. Estrategias de búsqueda</b> .....	18
1.3.1. Tripsinógeno Inmunorreactivo.....	18
1.3.2. Proteína Asociada a Pancreatitis.....	18
1.3.3. Detección de mutaciones frecuentes en el gen CFTR .....	19
1.3.4. Secuenciación del gen <i>CFTR</i> .....	19
1.3.5. Ventajas y desventajas de las estrategias .....	19
1.3.6. Estrategias combinadas o algoritmos .....	20
1.3.7. Puntos de corte .....	21
1.3.8. Algoritmo y puntos de corte en Chile .....	21
1.3.9. Algoritmo en el mundo .....	23
<b>1.4. Diagnóstico de fibrosis quística</b> .....	25
1.4.1. <i>Test</i> de sudor.....	25
1.4.2. Criterios de diagnóstico en el mundo .....	25
1.4.3. Criterios de diagnóstico en Chile.....	25

<b>1.5. Tratamiento</b> .....	26
1.5.1. Tratamiento de la fibrosis quística en Chile .....	26
2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN .....	27
3. METODOLOGÍA.....	29
<b>3.1. Determinar el punto de corte óptimo de IRT, PAP y de IRTxPAP para la pesquisa neonatal de fibrosis quística.</b> .....	29
3.1.1. Población en estudio .....	29
3.1.2. Aspectos éticos.....	29
3.1.3. Recolección de muestras.....	29
3.1.4. Cuantificación de IRT y PAP, y verificación de métodos .....	30
3.1.5. Determinación del punto de corte para IRT.....	30
3.1.6. Determinación del punto de corte para el algoritmo IRTxPAP .....	33
3.1.7. Evaluación de la calidad .....	33
3.1.8. Análisis estadísticos.....	34
<b>3.2. Evaluar si las determinaciones de IRT y PAP para la pesquisa neonatal de fibrosis quística cumplen con los requerimientos de calidad, semejantes a las descritas para la pesquisa de Hipotiroidismo Congénito y Fenilcetonuria.</b> .....	34
3.2.1. Comparación de controles internos y externos .....	34
3.2.2. Comparación de criterios de calidad entre algoritmos.....	35
<b>3.3. Identificar las mutaciones más relevantes del gen de CFTR y establecer un conjunto de ellas que ayuden a mejorar el valor predictivo positivo de la pesquisa neonatal de fibrosis quística clásica.</b> .....	35
3.3.1. Población en estudio .....	35
3.3.2. Aspectos éticos.....	36
3.3.3. Análisis estadísticos.....	36
3.3.4. Secuenciación gen <i>CFTR</i> .....	36
3.4. Comparar el desempeño del algoritmo actual, IRTxPAP versus IRTxPAP con panel de mutaciones, para la pesquisa neonatal de fibrosis quística clásica. ....	37
3.4.1. Recolección de muestras.....	37
3.4.2. Elección del método de extracción de ADN .....	37
3.4.3. Análisis discriminante.....	37
3.4.4. Evaluación de la calidad .....	38
4. RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	39
<b>4.1. Determinar el punto de corte óptimo de IRT, PAP y de IRTxPAP para la pesquisa neonatal de fibrosis quística.</b> .....	39

4.1.1.	Población en estudio .....	39
4.1.2.	Concentraciones de IRT y PAP.....	39
4.1.3.	Puntos de corte para IRT .....	41
4.1.4.	Punto de corte para el algoritmo IRTxPAP .....	51
4.1.5.	Aplicación valores de corte por región para IRT e IRTxPAP .....	52
<b>4.2.</b>	<b>Evaluar si las determinaciones de IRT y PAP para la pesquisa neonatal de fibrosis quística cumplen con los requerimientos de calidad, semejantes a las descritas para la pesquisa de Hipotiroidismo Congénito y Fenilcetonuria.....</b>	<b>53</b>
4.2.1.	Calidad analítica de las técnicas utilizadas en el laboratorio de pesquisa neonatal para HC, PKU y FQ.53	
4.2.2.	Calidad de los algoritmos del LPN para la pesquisa de PKU, HC y FQ.....	56
<b>4.3.</b>	<b>Identificar las mutaciones más relevantes del gen de CFTR y establecer un conjunto de ellas que ayuden a mejorar el valor predictivo positivo de la pesquisa neonatal de fibrosis quística clásica.57</b>	
4.3.1.	Secuenciación del gen <i>CFTR</i> .....	57
<b>4.4.</b>	<b>Comparar el desempeño del algoritmo actual, IRTxPAP versus IRTxPAP con panel de mutaciones, para la pesquisa neonatal de fibrosis quística clásica. ....</b>	<b>58</b>
4.4.1.	Elección del método de extracción de ADN .....	58
4.4.2.	Análisis discriminante.....	63
4.4.3.	Comparación de los criterios de calidad de los algoritmos IRT+PAP, IRTxPAP e IRTxPAP con panel de mutaciones .....	65
5.	DISCUSIÓN.....	68
6.	CONCLUSIONES .....	76
7.	GLOSARIO .....	78
8.	CITAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
9.	ANEXOS .....	85

## I. RESUMEN

La fibrosis quística clásica es una enfermedad autosómica recesiva, que se manifiesta a edades tempranas y que afecta alrededor de 1/8000 recién nacidos vivos en nuestro país. La expectativa de vida en Chile es de aproximadamente 24 años cuando se hace un diagnóstico clínico tardío. Varios estudios respaldan el hecho de que al pesquisar a edades tempranas esta enfermedad, no solo mejora la calidad de vida, sino que la expectativa de vida podría superar los 40 años. Mundialmente se utilizan diferentes estrategias de búsqueda como la medición de tripsinógeno inmunorreactivo, proteína asociada a pancreatitis, panel de mutaciones y secuenciación, que alternativamente se usan en distintos algoritmos, para reducir el tiempo al diagnóstico. En Chile actualmente existe un plan piloto para la pesquisa neonatal de fibrosis quística clásica, que tiene un valor predictivo positivo que está por debajo de los estándares de calidad. Según lo descrito en la literatura, el valor predictivo positivo puede mejorar al incorporar estrategias de biología molecular a los algoritmos, por lo que esta tesis busca incorporar un panel de mutaciones a la pesquisa neonatal de fibrosis quística en Chile y comparar su desempeño con el del algoritmo actual.

Se trabajó con muestras en sangre seca de recién nacidos a los cuales se les cuantificó IRT y PAP mediante inmunofluorometría a tiempo resuelto. A aquellos que resultaron positivos para la pesquisa, se les realizó la secuenciación del gen *CFTR* y a partir de lo anterior se espera establecer un panel de mutaciones con las mutaciones más frecuentes en Chile. Se lograron mejorar los criterios de calidad ajustando los valores de corte para IRT e IRTxPAP y se estimaron los indicadores de calidad para un algoritmo que incluya un panel de mutaciones. Se espera que este estudio genere antecedentes que permitan mejorar las políticas de salud pública con respecto a la FQ.

## II. INTRODUCCIÓN

En el año 1992, se instauró en Chile una política de salud pública con el objetivo de prevenir el retardo mental y las consecuencias producidas por dos enfermedades tratables, pero que sin un diagnóstico precoz su avance se vuelve inevitable. Así es como nace en nuestro país la pesquisa neonatal (PN) de Hipotiroidismo Congénito (HC) y Fenilcetonuria (PKU), que tiene el fin de identificar aquellos recién nacidos aparentemente sanos y sin signo alguno de enfermedad en revisiones rutinarias. Pero no fue hasta el 2005 que se aseguró por ley que el 100% de los recién nacidos en Chile deben ser pesquisados (decreto N° 170 de la ley N° 19.966 del Programa de Garantías Explícitas en Salud del Régimen General de Garantías de Salud).

Además del HC y la PKU, puede existir la necesidad de pesquisar otras patologías según su incidencia en cada país, lo que debe ser evaluado por cada centro de pesquisa al estudiar las características de su población.

En el caso de Chile, la Fibrosis Quística (FQ) es una enfermedad candidata a la PN obligatoria, ya que es la enfermedad genética potencialmente letal más común en la población caucásica y en nuestro país tiene una incidencia de 1/8000 recién nacidos vivos y debido a sus características es muy importante dar un inicio temprano al tratamiento. Durante la década de los 50, la mayoría de los pacientes con FQ en el mundo fallecían antes de cumplir los dos años, en su mayoría por la afectación pulmonar, lo que ha cambiado debido al diagnóstico precoz, como consecuencia de los avances en la pesquisa de la FQ. En la actualidad la expectativa de vida supera los 40 años en varios países.

Es debido a lo anterior, que a partir del 2015 se da inicio al plan piloto de pesquisa neonatal de FQ en el Hospital San Juan de Dios (HSJD), que abarca a todos los recién nacidos en hospitales públicos de la V y XIII región, bajo consentimiento informado. Dicha iniciativa comienza su plan de expansión a todo el territorio nacional en enero del 2019, con la finalidad de realizar un diagnóstico y tratamiento precoz a todos los recién nacidos afectados por la enfermedad.

Actualmente no existe una evaluación formal del programa de PN de FQ, ni un plan de mejora de la calidad, por lo que existe una falencia importante en el programa de PN de FQ, la cual debe ser suplida antes de expandir el territorio objetivo de la pesquisa. Estas necesidades se pueden suplir con un estudio de los indicadores de calidad para los programas de PN, estableciendo puntos de corte adecuados para cada población e incorporando nuevas estrategias que permitan identificar de mejor forma a aquellos individuos que tengan la enfermedad.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. Fibrosis quística

#### 1.1.1. ¿Qué es la fibrosis quística?

La fibrosis quística, o mucoviscidosis, es una enfermedad autosómica recesiva (1), que afecta aproximadamente a 70.000 personas en el mundo (2), principalmente a la población caucásica (3). Esta enfermedad se caracteriza por aumentar la viscosidad de las secreciones exocrinas (3), causándole a los afectados problemas respiratorios (1), digestivos (1), endocrinos (1), entre otras complicaciones que pueden aparecer desde edades tempranas.

Existen dos tipos de FQ, la clásica o típica y la no clásica o atípica, la primera se caracteriza por manifestarse durante los primeros años de vida y tener consecuencias más graves que la no clásica, la segunda suele presentarse en la adolescencia tardía o durante la adultez.

#### 1.1.2. Cuadro clínico

De los múltiples problemas que son consecuencia de esta enfermedad, los más importantes están relacionados con los pulmones y el páncreas (1). Las complicaciones respiratorias se hacen evidentes al momento del primer resfrío en la vida del paciente y los problemas pancreáticos se ven reflejados por el mal estado nutricional de los bebés desde las pocas semanas de vida debido a la falta de lipasa pancreática (1), ya que el 85% de los recién nacidos con FQ tienen el páncreas casi destruido al momento de nacer (4).

Uno de los signos característicos que presentan los recién nacidos con FQ es el íleo meconial (5), debido a un meconio anormalmente denso y adherente. Además, es muy frecuente la infección por *Pseudomona aeruginosa* en pacientes sin diagnosticar (3).

Adicionalmente puede producirse diabetes asociada a FQ (1), osteoporosis (1), infertilidad masculina (1), sinusitis frecuente (1), obstrucción intestinal aguda (6), problemas hepáticos (7), entre otras.

### 1.1.3. Canal regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística.

El canal regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística, o CFTR por sus siglas en inglés, está codificado por el gen CFTR que fue descrito por primera vez en 1989 (8) y que está ubicado en el cromosoma 7 en la posición q31.2 (9), el cual tiene un tamaño aproximado de 189 kilobases. Este canal es un transportador de aniones de 1480 aminoácidos, con preferencia liotrópica (10) y es el principal responsable del transporte de  $\text{Cl}^-$  en el epitelio exocrino (11), que ocurre a favor del gradiente electroquímico (12), controlando la secreción y absorción de agua. Este canal se ubica en la membrana apical de una variedad de epitelios polarizados (11), lo que explica que esta enfermedad afecte varios sistemas.

El CFTR posee 2 dominios transmembrana los cuales atraviesan 6 veces cada uno la membrana plasmática, 2 dominios de unión a nucleótidos y 1 dominio regulador (MSD, NBD y R, respectivamente por sus siglas en inglés) (11). Esta proteína presenta gran homología con la familia de transportadores ABC (11), por lo que se la ha incluido dentro de esta clasificación a pesar de que las proteínas de esta familia no poseen dominio regulador y que son transportadores activos (13). Los dominios MSDs son los que forman el canal (13), los dominios NBDs regulan la apertura y cierre del canal a medida que se va uniendo o hidrolizando ATP respectivamente (13) y el dominio R regula la activación del canal dependiendo de su estado de fosforilación (13).

De las más de 2070 mutaciones descritas en el gen CFTR (14), sólo 346 han sido identificadas como causantes de FQ (15), debido a que se expresa una proteína defectuosa, lo que provoca la disminución parcial o total en el transporte de  $\text{Cl}^-$ , lo que a su vez provoca la deshidratación de las secreciones exocrinas con lo cual se forma un moco hiperviscoso (11) que produce una especie de tapón en los conductos de las glándulas exocrinas.

Este canal también es responsable de la regulación de otros canales celulares (16), incluso se le atribuye la regulación de  $\text{HCO}_3^-$  de forma indirecta (17).

### 1.1.4. Clasificación de las mutaciones en el gen CFTR

Dentro de las mutaciones causantes de FQ, existen 6 clases de mutaciones, clasificadas según el efecto que causan en la proteína, las cuales se nombran en la **Tabla 1**.

**Tabla 1. Clases de mutaciones del gen CFTR**

Clasificación mutaciones en el gen CFTR	
Clase	Nombre
<b>I</b>	Producción defectuosa de la proteína
<b>II</b>	Procesamiento defectuoso de la proteína
<b>III</b>	Regulación defectuosa del canal
<b>IV</b>	Conducción defectuosa del canal
<b>V</b>	Síntesis reducida de la proteína
<b>VI</b>	Estabilidad reducida de la proteína

*Nota. Fuente: Wang et. al. 2014 (2)*

Según la clase de mutación podemos asociar, en general, ciertas características fenotípicas. Las mutaciones de clase I, II, III y VI generalmente se asocian con una mayor gravedad en la enfermedad ya que hay muy poca o ninguna función del canal CFTR (2), lo que se conoce como FQ clásica o típica (2) que se caracteriza por presentar signos de la enfermedad en etapas muy tempranas de la vida. Además, estos tipos de mutaciones la mayoría de las veces produce un desequilibrio en el transporte de  $\text{HCO}_3^-$  (17), que a su vez se relaciona a una insuficiencia pancreática (17).

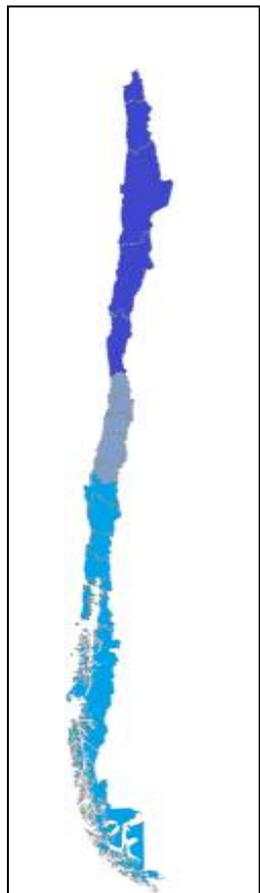
Por otro lado, las mutaciones clase IV y V generalmente se asocian a un fenotipo leve conocido como FQ atípica, que por lo general se presenta en etapas avanzadas de la vida (2), está relacionada con suficiencia pancreática (2) y enfermedad pulmonar de menor gravedad (2). Este tipo de FQ es más difícil de diagnosticar tempranamente, incluso mediante PN, debido a que la enfermedad se manifiesta años después del nacimiento.

#### 1.1.5. Deleción de fenilalanina 508 en CFTR y otras mutaciones identificadas en Chile

Existen ciertas mutaciones en CFTR que son más comunes en ciertas poblaciones que en otras. La mutación más estudiada a nivel mundial es la deleción de la fenilalanina 508 ( $\Delta\text{F508}$ ), producida por la pérdida de tres bases nitrogenadas en la secuencia del gen *CFTR*. Esta mutación es la más frecuente en la población caucásica y es la mayor responsable de expandir la FQ en esta etnia (11). En nuestro país entre el 28,9 y 45% de los alelos mutados corresponden a la deleción asociada a la pérdida de esta fenilalanina 508 (18).

El residuo aminoacídico de la posición 508 se encuentra en el primer dominio de unión a nucleótido (NBD1), lo que se asocia a un mal plegamiento de la proteína que es detectado por el mecanismo de control de calidad del retículo endoplasmático llevando a CFTR hacia la degradación vía proteosoma (2), esto clasifica a  $\Delta F508$  dentro del grupo de mutaciones de tipo II, aunque tiene características del tipo III y VI (2).

Hay otras mutaciones presentes en nuestro país con distinta frecuencia según la zona (18). En 2012 Lay-Son *et al.* hicieron un estudio de las prevalencias mutacionales en 36 pacientes chilenos con FQ, los resultados de este estudio se resumen en la **Figura 1** (18), sin embargo, aún hay un alto porcentaje de alelos sin identificar.



		Mutación	Alelos detectados	Frecuencia alélica
Zona Norte	Desconocida	28	46,7%	
	p.F508del	18	45,0%	
	p.R553X	3	5,0%	
	c.3849+10KbG>T	1	1,7%	
	c.3120+1G>A	1	1,7%	
Zona Centro	Desconocida	219	57,6%	
	p.F508del	110	28,9%	
	p.R334W	14	3,7%	
	p.G542X	13	3,4%	
	c.3849+10KbG>T	9	2,4%	
	p.R553X	3	0,8%	
	p.R1162X	2	0,5%	
	Otra	10	2,6%	
Zona Sur	Desconocida	88	63,8%	
	p.F508del	40	29,0%	
	p.R334W	4	2,9%	
	p.R1162X	3	2,2%	
	p.G542X	1	0,7%	
	p.R553X	1	0,7%	
	p.G85E	1	0,7%	

**Figura 1.** Frecuencias mutacionales del gen CFTR en la población según zona del país. Zona norte (Región de Arica y Parinacota, Región de Tarapacá, Región de Antofagasta, Región de Atacama y Región de Coquimbo); Zona centro (Región de Valparaíso, Región Metropolitana de Santiago, Región del Libertador General Bernardo O'Higgins, Región del Maule y Región del Ñuble); Zona sur (Región del Biobío, Región de La Araucanía, Región de Los Ríos, Región de Los Lagos, Región de Aysén del General Carlos Ibáñez del Campo y Región de Magallanes y la Antártica Chilena). Adaptado de Lay-Son et al. (18)

## 1.2. Pesquisa neonatal

### 1.2.1. ¿Qué es la pesquisa neonatal?

La pesquisa, tamizaje o cribado neonatal es un conjunto de pruebas analíticas que se realizan a todos los recién nacidos para identificar, dentro de una población aparentemente sana, a aquellos individuos que poseen un alto riesgo de presentar una enfermedad específica para la cual existe un examen de diagnóstico y un tratamiento capaz de sanar o mejorar la calidad de vida de dichos pacientes. El tamizaje se realiza una vez que el recién nacido (RN) ha cumplido un mínimo de 40 horas y máximo 5 días de vida. Cabe destacar que el cribado no es una prueba diagnóstica, por lo que se debe confirmar el resultado mediante un examen adicional, que en el caso de la FQ es el test de sudor (sección 4.1).

En 1968, Wilson y Jungner establecieron 10 principios y prácticas de cribado neonatal (19), los cuales fueron actualizados por el Comité Nacional de Cribado del Reino Unido quienes agregaron otros criterios para la implementación de un programa de tamizaje. Los grandes temas abarcados por este documento son las características de la enfermedad, la prueba de cribado como tal, el programa de cribado y el tratamiento (6). Destacan dentro de los criterios la evaluación de la eficacia, factibilidad y costo-efectividad del programa de cribado antes de su implementación (6). Dentro de los criterios más relevantes establecidos por Wilson y Jungner, se encuentran aquellos que hablan de que “debe haber un tratamiento aceptado para los pacientes con enfermedad reconocida” y “deben estar disponibles instalaciones para diagnóstico y tratamiento” (19).

### 1.2.2. Actualidad del tamizaje neonatal en Chile

Desde marzo de 1992, se realiza en Chile la PN de PKU e HC (20) y desde julio de 2005 por ley se estableció que “la Fenilcetonuria y el Hipotiroidismo Congénito deben ser tamizados en el 100% de los recién nacidos del país” (20).

La muestra del RN debe ser tomada por la matrona, según la norma vigente, idealmente luego de 48 horas de vida y lo más cercano posible al alta, en papel filtro 226 de PerkinElmer® Ltda (21), el cual es 100% algodón y está validado para este tipo de exámenes (**Figura 2**). Si el neonato tiene entre 36 y 37 semanas de gestación, la muestra debe tomarse al séptimo día de vida (20). Cuando el RN tiene una edad gestacional menor o igual a 35 semanas, deben tomarse dos muestras, la primera al séptimo día de vida y la segunda a los 15 días de vida (20).

MINISTERIO DE SALUD  
PROGRAMA NACIONAL DE BÚSQUEDA MASIVA DE  
HIPOTIROIDISMO CONGENITO Y FENILQUETONURIA

MUESTRA 1ª 2ª

ESTABLECIMIENTO CONSULTORIO

NOMBRE MADRE N° DE FICHA

RUT MADRE TELEFONO

NOMBRE DEL RECEN NACIDO PESO (GRAMOS)

NOMBRE MATRONA

DIRECCION

COMUNA OBSERVACIONES OTROS DIAGNOSTICOS

FECHA NACIMIENTO SEXO EDAD GESTACIONAL FECHA TOMA MUESTRA PREMATURO

HOSP. SAN JUAN DE DIOS LABORATORIO HC-PKU AV. PORTALES 3238 - SANTIAGO, FONO 333743189 / FONO-FAX: 225742228

**Figura 2.** Tarjeta de datos con papel filtro 226 para toma de muestras de la marca PerkinElmer® Ltda.

La matrona debe informar a los padres del RN sobre las enfermedades pesquisadas, los beneficios del tamizaje, en qué consiste la toma de muestra y todos los detalles que sean necesarios de explicar (20), como por ejemplo que el examen es gratuito, que el resultado se informa solo si el cribado es positivo, que la enfermedad está cubierta por el AUGE, entre otros. Todo lo anterior con el apoyo de un tríptico informativo proporcionado por el Laboratorio de Pesquisa Neonatal (LPN) (Figura 3).

**¿Qué son estas enfermedades?**

**FENILQUETONURIA (PKU)**  
Los niños que nacen con PKU no pueden utilizar todos los alimentos ricos en proteínas (leche, carne, etc.) lo que produce una acumulación de una sustancia que provoca daño progresivo en el cerebro y se traduce en retardo mental. Pero si esta enfermedad es diagnosticada en el período de recién nacido (antes de los 15 días de vida), y se da un tratamiento oportuno, ese niño será normal.

**HIPOTIROIDISMO CONGENITO (HC)**  
Estos niños no producen la hormona tiroidea, lo que hace más lento el crecimiento y causa retardo mental profundo. Si el niño es diagnosticado precozmente, antes de los 15 días de vida, y se le da la hormona tiroidea de reemplazo, el niño será normal.

**¿Cuándo debe tomarse el examen?**  
Todos los niños que tengan a lo menos 48 horas de vida, serán examinados en la Maternidad del Hospital, y solo por indicación especial en el Consultorio.

**¿En qué consiste el examen?**  
Se pincha el talón del niño y se extraen algunas gotas de sangre sobre una tarjeta de papel filtro. Esta técnica es muy sencilla y sin riesgo. Las muestras de sangre serán enviadas al Laboratorio de Referencia del Hospital San Juan de Dios donde serán analizadas.

**¿Cómo obtener los resultados?**  
TODO RESULTADO NEGATIVO NO SERÁ INFIRMADO. Si los padres lo requieren, deberán acudir al Laboratorio de Referencia del Hospital San Juan de Dios y solicitarlo. Si el examen resulta POSITIVO, se citará al niño dentro de 15 días a contar de la fecha de toma de muestra de sangre. Es muy importante dar una dirección verdadera y, en lo posible, un teléfono donde ubicar al niño.

**PROGRAMA NACIONAL DE BÚSQUEDA MASIVA DE FENILQUETONURIA E HIPOTIROIDISMO CONGENITO NEONATAL**

**Figura 3.** Tríptico informativo sobre la pesquisa neonatal. Fuente: Cornejo, V. et al. 2007 (20)

### 1.2.3. Actualidad del tamizaje de fibrosis quística en Chile

En Chile, la FQ es una enfermedad que tiene una incidencia estimada de 1 por cada 8000 recién nacidos vivos (22), una edad de diagnóstico promedio a los 3,6 años de vida (23) y una expectativa de vida promedio de 24 años (23) (24).

En Chile, el diagnóstico de FQ se hace cuando aparece la sintomatología clínica, la cuál es poco específica, y por lo tanto dificulta un diagnóstico temprano, pero la PN de FQ clásica llevada a cabo en el LPN del HSJD podría disminuir la edad a la que se diagnostica la enfermedad a nivel de todo Chile.

La PN de FQ chilena se basa en la medición del valor de dos proteínas pancreáticas; el tripsinógeno inmunorreactivo (IRT por sus siglas en inglés) y la proteína asociada a pancreatitis (PAP), el valor de corte para IRT fue establecido en el año 2015 por un grupo de expertos en FQ del plan piloto, que con el tiempo la estadística demostró que era un valor aceptable. Con respecto al valor de corte para PAP, este corresponde a datos encontrados en la literatura internacional.

### 1.2.4. Ventajas y desventajas del tamizaje neonatal para fibrosis quística

El diagnóstico y, por lo tanto, el tratamiento temprano de la FQ está asociado a una mejor calidad de vida (5) (25) y además a una mayor sobrevida, según se observó en un ensayo controlado aleatorio realizado en Reino Unido y otros estudios realizados en Inglaterra, Italia, Francia y Australia (25) (26). En países europeos, donde la edad de diagnóstico es menor a 35 días (3), el promedio de sobrevida supera fácilmente los 40 años (5) mientras que en nuestro país estos valores son muy diferentes (ver sección 2.3).

La detección de la enfermedad durante las primeras semanas de vida permite iniciar precozmente las terapias respiratorias, digestivas y endocrinas, con lo que disminuye el daño pulmonar (6) (27), mejora la absorción intestinal y por consecuencia el estado nutricional y crecimiento (7) (27), disminuyen las hospitalizaciones (28), se produce una identificación temprana de infecciones con *Pseudomona aeruginosa* (28), se previene la deficiencia de vitamina E (6), entre otros beneficios respiratorios, endocrinos y nutricionales (6).

Por otro lado, el tamizaje neonatal puede traer consecuencias no deseadas. Cuando se informan tamizajes positivos, ya sean verdaderos o falsos positivos, los padres pueden sufrir trastornos psicológicos como ansiedad (3) (7) (27), ira (27), incredulidad (27) y depresión (3)

(27) durante el período que existe entre que se les informa sobre el tamizaje positivo hasta que se hace el test diagnóstico de sudor. En caso de resultados inconclusos, también se puede presentar ansiedad (3) (7) y sentimientos de incerteza (3).

En aquellos países en que se hace el cribado con panel de mutaciones, se llegan a reconocer portadores sanos del gen mutado, lo que provoca estrés en los padres (3). Además, esto puede llevar a la búsqueda del progenitor portador, que a su vez podría llegar a la identificación no deseada de paternidad mal atribuida (3). Incluso, algunos autores dicen que la identificación de los portadores va en contra del “derecho a no saber” del paciente (3) (7). Adicionalmente, la identificación de ciertas mutaciones puede producir discriminación étnica (7).

En cuanto al estado de salud de los pacientes, se cree que el diagnóstico temprano de la FQ puede producir un aumento en el contagio de *P. aeruginosa* en pacientes identificados por tamizaje neonatal (7) (27), debido a la contaminación cruzada con otros pacientes asistentes a los centros médicos.

#### 1.2.5. Estándares de calidad para la pesquisa neonatal de fibrosis quística

Para discutir de calidad, es muy importante definirla primero. En el caso de la PN de FQ se han hecho guías para determinar buenas prácticas de laboratorios. La última versión de la *Best Practice Guidelines* (2018), de la Sociedad Europea de Fibrosis Quística (29), ECFS por sus siglas en inglés, dicta que el valor predictivo positivo para la PN de FQ, debe ser al menos de un 30% y la sensibilidad de al menos un 95% (29). La ECFS sugiere, además, que los laboratorios que realicen análisis de mutaciones mediante un panel de las más frecuentes deben reconocer al menos un alelo anormal en al menos un 96% de los individuos con FQ. Adicionalmente, los programas de PN en el mundo aceptan un porcentaje de falsos negativos de entre un 5% y un 10% (5).

Para el caso de las estrategias de cuantificación de proteínas, los estándares de calidad están estrechamente asociados a un punto de corte adecuado (sección 3.7 y 3.8).

### **1.3. Estrategias de búsqueda**

#### **1.3.1. Tripsinógeno Inmunorreactivo**

El tripsinógeno es una proenzima secretada por el páncreas, que es proteolizada a nivel duodenal para dar lugar a una peptidasa llamada tripsina. En 1979, Crossley describió por primera vez la asociación entre FQ y niveles elevados de tripsinógeno inmunorreactivo (IRT) (30), por lo que desde ese momento se comenzó a usar como estrategia para el tamizaje de FQ a partir de muestras de sangre seca. Desde entonces el IRT está incluido como primer paso en el tamizaje de FQ en todos los protocolos existentes en el mundo (1° IRT).

Los valores del IRT neonatal (1° IRT) pueden verse afectados por distintos factores que alteran los resultados del ensayo. Dentro de estas variables se presenta el íleo meconial (3), tiempo transcurrido entre la toma de la muestra y la realización del ensayo (3), temperatura de almacenamiento de la muestra (31), presencia de trazas fecales (6), transfusiones de sangre (6), infecciones virales (6), neonatos prematuros o de bajo peso (6), trisomía 13 (6), trisomía 18 (6), entre otros.

En el LPN del HSJD, la concentración de IRT se mide a partir de muestras de sangre seca del RN en papel filtro 226 y mediante el kit comercial GSP® Neonatal IRT de la marca PerkinElmer® Ltda, el cual es un inmunoensayo capaz de detectar indiferentemente las principales isoformas de tripsinógeno.

En algunos países el IRT puede utilizarse como segundo paso del algoritmo de pesquisa (2° IRT), lo que requiere una segunda toma de muestra algunas semanas después del nacimiento para aquellos recién nacidos cuyo resultado del primer IRT sea mayor al del punto de corte.

#### **1.3.2. Proteína Asociada a Pancreatitis**

La proteína asociada a pancreatitis (PAP) es conocida por producirse en grandes cantidades cuando el páncreas está bajo condiciones de estrés por enfermedad (32). Con el conocimiento de que FQ produce daño pancreático, en el año 1999 Sarles supuso que PAP podría estar aumentada en FQ y realizó un ensayo con 202.807 recién nacidos, lo que comprobó la asociación PAP-FQ (32). Por lo anterior, PAP es usado en varios países como segundo paso para el tamizaje neonatal de FQ.

Los valores de PAP pueden verse elevados como consecuencia de cualquier enfermedad que produzca pancreatitis, por lo que por sí solos, las concentraciones elevadas de PAP son inespecíficas.

Para determinar la concentración de PAP en sangre, el LPN del HSJD, analiza muestras de sangre seca en papel filtro 226 con el kit de inmunoensayo llamado Muco PAP-F (Dynabio®).

### 1.3.3. Detección de mutaciones frecuentes en el gen *CFTR*

Esta estrategia es utilizada como segundo paso del cribado en muchos países y consiste en determinar la presencia o ausencia de ciertas mutaciones genéticas. Para esto, cada país puede desarrollar su propio ensayo o usar kits comerciales para este fin, con la condición de que en ambos casos las mutaciones analizadas deben estar dentro del 96% más frecuente en esa población (29). La especificidad de este método depende del método de detección de mutaciones que se utilice (33). Algunos de los métodos de detección con mejor especificidad son el ensayo de ligación de oligonucleótidos (OLA, por sus siglas en inglés) e hibridación reversa en línea (Inno-LiPA®)

### 1.3.4. Secuenciación del gen *CFTR*

Esta estrategia consiste en secuenciar el gen completo de *CFTR* y a diferencia de la estrategia anterior que sólo busca las mutaciones más frecuentes en cada población, este ensayo busca detectar todas las mutaciones presentes en el gen, revelando no sólo a los que presentan la enfermedad, sino que a los portadores del gen mutado y aquellos alelos mutantes no causantes de FQ. Este *test* es útil para poblaciones con gran diversidad étnica (34).

### 1.3.5. Ventajas y desventajas de las estrategias

Cada una de las determinaciones tiene sus ventajas y desventajas en comparación a los otros y la decisión de usar uno u otro depende de la realidad de cada país. En la **Tabla 2** se presentan las ventajas y desventajas de cada ensayo.

**Tabla 2.** Ventajas y desventajas de las estrategias de cribado neonatal para la fibrosis quística.

	Ventajas	Desventajas
1° IRT (primer paso)	Gran sensibilidad	Bajo valor predictivo positivo Pobre especificidad en los primeros días de vida
2° IRT (segundo paso)	Tiene un valor predictivo positivo del 50% Gran sensibilidad No identifica portadores sanos	Requiere una segunda toma de muestras
PAP (segundo paso)	No requiere segunda muestra Buena sensibilidad Fácil implementación No identifica portadores sanos	Bajo valor predictivo positivo Difícil estandarización
ADN (segundo paso)	No requiere segunda muestra En poblaciones de poca diversidad se puede utilizar la búsqueda de solo una mutación Tiene gran sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo en poblaciones étnicamente homogéneas	Identificación de portadores sanos En zonas de gran diversidad étnica se pueden perder casos
Secuenciación (segundo paso)	No requiere segunda muestra Gran especificidad y sensibilidad Baja tasa de falsos positivos Elevado valor predictivo positivo	Identificación de portadores sanos

*Nota: Adaptado de Valiñas et al. (6) y Guo, B (35)*

### 1.3.6. Estrategias combinadas o algoritmos

De todos los países analizados, el 100% utiliza estrategias combinadas para el tamizaje neonatal para FQ y además como primera estrategia usan IRT, pero debido a su bajo valor predictivo positivo se necesitan análisis adicionales (3).

Se puede utilizar nuevamente IRT como segunda estrategia, lo que requiere de una segunda muestra de sangre entre los 14 y 21 días de nacido (6). Este método se basa en que los

niveles de IRT disminuyen más rápido en un niño sano que en uno con FQ, por lo que el IRT de la segunda muestra es más específico que el de la primera (35).

El resto de los países que hace tamizaje para FQ pueden usar PAP, panel de mutaciones y secuenciación del gen como segunda, tercera e incluso cuarta opción.

En el caso del plan piloto chileno, solo se utiliza la cuantificación de PAP como segundo paso, debido a que se sabe que a pesar de que IRT y PAP se elevan de forma inespecífica en niños sanos, un aumento del nivel de ambos es muy poco frecuente (32), por lo que al combinar estas estrategias aumenta el valor predictivo positivo. Además, hay un estudio francés que presenta el antecedente de que la combinación IRT-PAP en ese país tiene un 100% de sensibilidad (36), pero no puede ser usado como diagnóstico, ya que no es tan específico como el test de sudor (36).

### 1.3.7. Puntos de corte

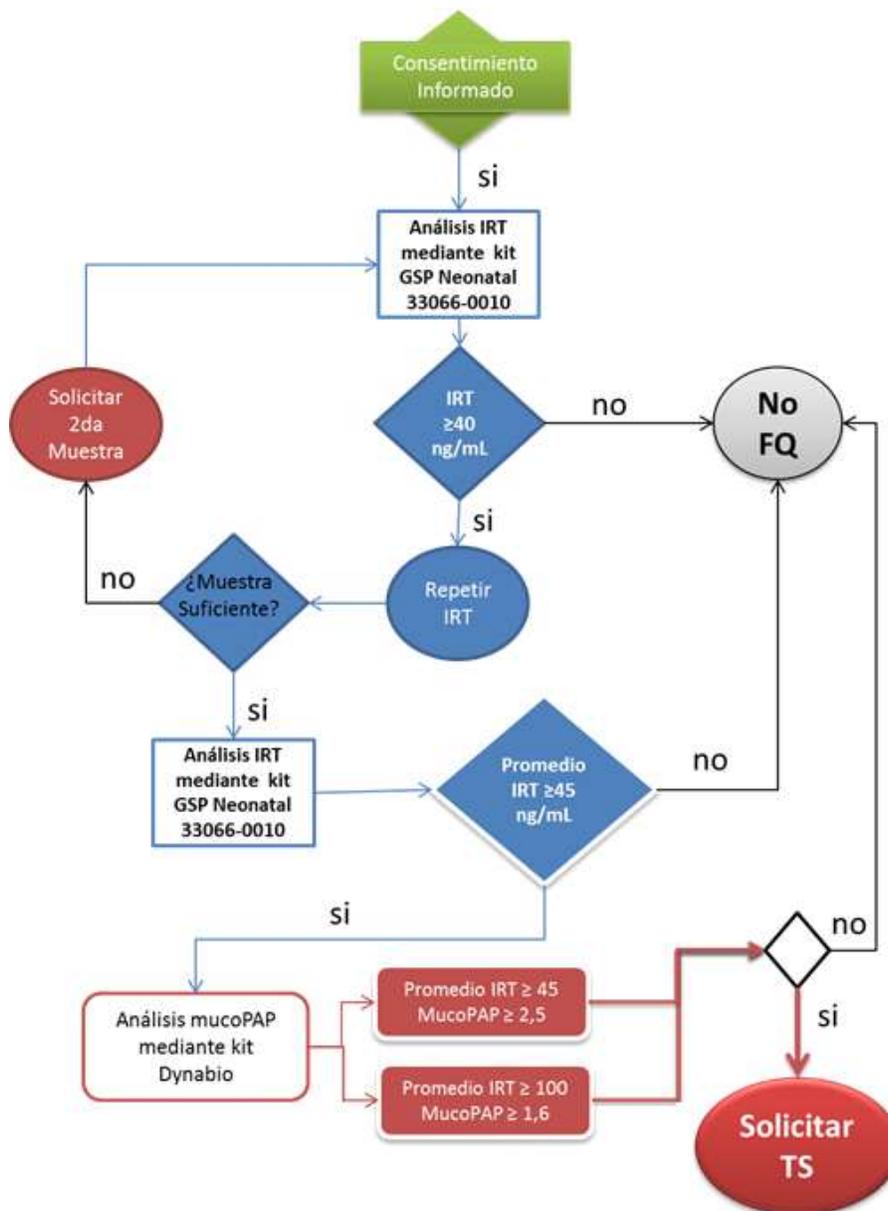
Para establecer los puntos de corte en una población, en primer lugar, se debe evaluar la normalidad de la distribución de datos (37). Si los datos tienen una distribución normal puede utilizarse como punto de corte la media más 3 desviaciones estándar o algún percentil en particular (37), que generalmente está en el 99% y 99,5% superior de los datos (3). Si por el contrario, la distribución no es normal, sólo se pueden ocupar los percentiles como punto de corte (37).

Una vez seleccionados los puntos de corte según lo mencionado en el párrafo anterior, éstos deben ser evaluados según su desempeño para diferenciar aquellos individuos sanos de los pacientes con FQ, mediante los criterios de calidad mencionados en la sección 2.5.

### 1.3.8. Algoritmo y puntos de corte en Chile

El algoritmo y puntos de corte utilizados para el plan piloto de PN de FQ fueron determinados por el comité de expertos del HSJD y del Hospital Clínico San Borja Arriarán (HCSBA). El algoritmo analiza en primer lugar los valores de IRT, si las concentraciones son iguales o superiores a 40  $\mu\text{g/L}$ , se repite el ensayo de IRT para la misma muestra, si el promedio es mayor que 45  $\mu\text{g/L}$  se realiza el ensayo para PAP. Cuando el promedio de IRT es mayor o igual a 45  $\mu\text{g/L}$  y la concentración de PAP es mayor o igual a 2,5  $\mu\text{g/L}$ , o si el promedio de IRT es mayor o igual a 100  $\mu\text{g/L}$  y PAP es mayor o igual 1,6  $\mu\text{g/L}$ , entonces se realiza el test de

sudor. Este punto de corte de PAP según el valor de IRT se basa en que se sabe que aquellos recién nacidos que tienen valores elevados de IRT, tienden a tener menores valores de PAP que aquellos neonatos que tienen bajos niveles de IRT (34). El algoritmo completo está esquematizado en la **Figura 4** (IRT+PAP).



**Figura 4.** Algoritmo IRT+PAP. TS: *Test* de sudor.

Cabe destacar que hay un algoritmo propuesto por Weidler *et al.*, donde comprobaron que el producto de los valores de IRT y PAP (algoritmo IRTxPAP) tiene mejores resultados que el algoritmo IRT+PAP (38).

### 1.3.9. Algoritmo en el mundo

En la **Tabla 3** se encuentra resumida la información encontrada en la bibliografía y recolectada por una encuesta realizada a distintos países europeos (ANEXO A), donde se describe la estrategia utilizada en cada país, el rendimiento de cada algoritmo y el costo que tiene para cada país el hacer el tamizaje de FQ a un RN, esta información fue obtenida a partir de la unidad de investigación 2 realizada en el LPN del HSJDD. En el ANEXO H se encuentra información adicional sobre el algoritmo usado en otros países del mundo.

**Tabla 3.** Estrategias, rendimiento de algoritmos y costos para el tamizaje neonatal de fibrosis quística en países europeos y Chile.

País	Cohorte en estudio	Estrategias de búsqueda	VPP (%)	Rendimiento de detección (%)	Especificidad algoritmo (%)	Costo tamizaje (USD)	Fuente
Chile	136.576	IRT/PAP	4	93	99,7	3,20*	LPN HSJD (ANEXO I)
Países bajos	145.499	IRT/PAP	12	95	99,9		Vernooij-van Langen <i>et al.</i> (39) Encuesta
		IRT/35 mutaciones/Seq	65	100	100		
		IRT/PAP/ADN/Seq "safety net"	88	95	100	4,02	
Alemania	328.176	IRT/PAP "Safety net"	9	96,0	99,9		Sommerburg <i>et al.</i> (40)
	252.020	IRT/4 mutaciones (Safety net)	15	95,1			
República Checa	106.522	IRT/PAP	7,8	76,2			Sommerburg <i>et al.</i> (40)
	106.522	IRT/50 mutaciones/IRT	16,1	90,5			
Francia	552.915	IRT/PAP	9	93,2			Sommerburg <i>et al.</i> (40)
	552.915	IRT/30mutaciones/IRT	27	91,9			
East Anlgia (Reino Unido)	582966	IRT/IRT	67,3	96,0		2	Sommerburg <i>et al.</i> (40) Encuesta
	147.764	IRT/29 mutaciones/ IRT	85,9	93,0		22	
Suiza		IRT/ADN/rIRT				6,12	Encuesta

**Nota.** En todos los países el primer ensayo es el IRT. IRT/IRT: el segundo ensayo es la medición de IRT a partir de una segunda muestra. ADN: se realiza la búsqueda de un número de mutaciones determinado por cada país. Sec: secuenciación del gen CFTR. PAP: se realiza el ensayo para determinar la concentración de PAP. "Safety net": cuando la concentración de IRT está por sobre el percentil 99.9 se realiza test de sudor. Los parámetros chilenos se calcularon en base al algoritmo IRT+PAP usado durante el plan piloto. \*Calculado en base al valor del dólar del 18-dic-17 (1 US = 633,85 CLP), los detalles de gastos se encuentran en el ANEXO I.

## 1.4. Diagnóstico de fibrosis quística

### 1.4.1. Test de sudor

El test de sudor es el examen *gold standard* para el diagnóstico de FQ a nivel mundial (1) (7), consiste en la estimulación del sudor con pilocarpina en el antebrazo, se estimula con una corriente de 1,5 mA durante 5 min y se recolecta el sudor en una gasa o papel filtro, a continuación, se mide el cloruro en el sudor mediante coulombimetría.

### 1.4.2. Criterios de diagnóstico en el mundo

Las concentraciones de cloruro en sudor para el diagnóstico de FQ van a depender de la edad del paciente, pero en este contexto, donde los pacientes vienen derivados de la PN, consideramos que para bebés de 0 a 6 meses los puntos de corte son los siguientes: 0-29 mEq/L es improbable la FQ a, 30-59 mEq/L es la zona gris del examen y mayor a 60 mEq/L se diagnostica FQ (41).

En cuanto a los criterios diagnósticos, se considera que un niño tiene FQ cuando el tamizaje resulta positivo (o tiene antecedentes familiares o antecedentes clínicos) y el test de sudor también resulta positivo (42). Además, la fundación de FQ, indica que se puede diagnosticar FQ cuando el test de sudor es mayor o igual a 60 mmol/L o cuando el test de sudor se encuentra en la zona gris (30-59 mmol/L) y además hay presentes dos mutaciones causantes de FQ en el gen *CFTR* (43).

### 1.4.3. Criterios de diagnóstico en Chile

En Chile, actualmente la mayor parte del diagnóstico se hace gracias a la sospecha del clínico y la posterior derivación al test de sudor. Debido a esta situación, la edad de diagnóstico puede variar desde unos pocos meses hasta varios años, siendo la edad promedio de diagnóstico de esta enfermedad de 3,6 años (23). Con el plan piloto en funcionamiento, la edad de diagnóstico promedio de los participantes de este estudio es de alrededor de 2 meses de vida.

En el caso de los pacientes positivos para la PN, que son derivados al test de sudor, este se considera positivo cuando la concentración de cloruro es mayor a 30 mEq/L (23).

## **1.5. Tratamiento**

### **1.5.1. Tratamiento de la fibrosis quística en Chile**

El tratamiento en Chile consiste en uso de antibióticos, sesiones de kinesiología 3 a 4 veces a la semana (se les enseña a los padres para que puedan realizar las sesiones en sus casas), reposo, ayuda en la nutrición (enzimas pancreáticas) y visitas periódicas al broncopulmonar según la gravedad de la enfermedad (42).

El tratamiento para la FQ está asegurado por ley a todos los niños chilenos por el sistema AUGE desde la confirmación diagnóstica (44), lo que está conforme a los criterios de Wilson y Jungner.

## 2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

A partir de lo expuesto anteriormente, surge la necesidad de evaluar el plan piloto que está en marcha en el HSJD, para que al instaurarse a nivel nacional haya un respaldo que valide la calidad de las técnicas utilizadas para el tamizaje y se logre una optimización de los algoritmos.

Es necesario entonces, en primera instancia evaluar el desempeño de las estrategias y los algoritmos de búsqueda actuales (IRT+PAP), así como también la idoneidad de éstas para nuestra población y en segundo lugar, mejorar los parámetros de calidad, optimizando las estrategias de búsqueda y los algoritmos actuales, e incorporando nuevas estrategias de búsqueda tales como las de biología molecular.

Por todo lo anterior es que se plantean la siguiente hipótesis y objetivos:

### **Hipótesis:**

*La pesquisa neonatal de fibrosis quística clásica en Chile mejora su calidad, en términos de valor predictivo positivo, porcentaje de falsos negativos, sensibilidad y especificidad, al ajustar los valores de corte de IRT y PAP e incorporar al algoritmo un panel de mutaciones que sea representativo de la población.*

### **Objetivo general:**

Evaluar los criterios de calidad del plan piloto de pesquisa neonatal de fibrosis quística clásica para ajustar los valores de corte de IRT y PAP e incorporar un panel de mutaciones relevantes en el gen CFTR y así mejorar el valor predictivo positivo, porcentaje de falsos negativos, sensibilidad y especificidad del algoritmo.

**Objetivos específicos:**

- 1.** Determinar el punto de corte óptimo de IRT, PAP y de IRTxPAP para la pesquisa neonatal de fibrosis quística.
- 2.** Evaluar si las determinaciones de IRT y PAP para la pesquisa neonatal de fibrosis quística cumplen con los requerimientos de calidad, semejantes a las descritas para la pesquisa de HC y PKU.
- 3.** Identificar las mutaciones más relevantes del gen de CFTR y establecer un conjunto de ellas que ayuden a mejorar el valor predictivo positivo de la pesquisa neonatal de fibrosis quística clásica.
- 4.** Comparar el desempeño del algoritmo actual, IRTxPAP versus IRTxPAP con panel de mutaciones, para la pesquisa neonatal de fibrosis quística clásica.

### **3. METODOLOGÍA**

#### **3.1. Determinar el punto de corte óptimo de IRT, PAP y de IRTxPAP para la pesquisa neonatal de fibrosis quística.**

##### **3.1.1. Población en estudio**

Para la determinación de los puntos de corte de las estrategias que cuantifican la concentración de proteínas IRT y PAP, se realizó un estudio descriptivo con 136.608 recién nacidos entre Marzo de 2015 y Octubre de 2017 en hospitales públicos de la Región Metropolitana (RM) y Región de Valparaíso (RV), los cuales fueron escogidos según criterios de inclusión y exclusión (ANEXO G).

##### **3.1.2. Aspectos éticos**

El protocolo para la realización del plan piloto para la PN de FQ se encontraba aprobado previo al inicio de esta tesis por el comité de ética del Ministerio de Salud. A los padres de los recién nacidos participantes se le entregó un informativo para explicarles sobre plan piloto y un consentimiento informado para autorizar el estudio (ANEXO B y C, respectivamente). La lista de hospitales participantes en el plan piloto de PN de FQ y región a la que pertenece cada uno se encuentra en el ANEXO F.

##### **3.1.3. Recolección de muestras**

La recolección de muestras para la PN e información a los padres estuvo a cargo de las matronas de cada hospital. Las muestras fueron recolectadas en papel filtro grado 226 de PerkinElmer Ltda. (21), según el protocolo que indica la norma chilena (20). Luego, todas las muestras fueron enviadas al LPN del HSJD, donde se mide la concentración de las proteínas IRT y PAP

#### 3.1.4. Cuantificación de IRT y PAP, y verificación de métodos

Todas las muestras fueron perforadas una vez con un DBS Puncher de PerkinElmer Ltda. sobre una microplaca de 96 pocillos y revisadas de forma manual. Las cuantificaciones de la concentración de IRT en sangre se hicieron en el equipo automatizado GSP® de PerkinElmer Ltda, que realiza un ensayo fluoroinmunométrico a tiempo resuelto. Las determinaciones de la concentración en sangre de PAP se hicieron en duplicado y de forma manual según las instrucciones del kit MucoPAP-F de Dynabio S.A. y la lectura fue realizada en el equipo VICTOR<sup>2</sup>D™ de PerkinElmer Ltda.

La verificación de los métodos se hizo según lo establecido por el instituto de salud pública (45).

#### 3.1.5. Determinación del punto de corte para IRT

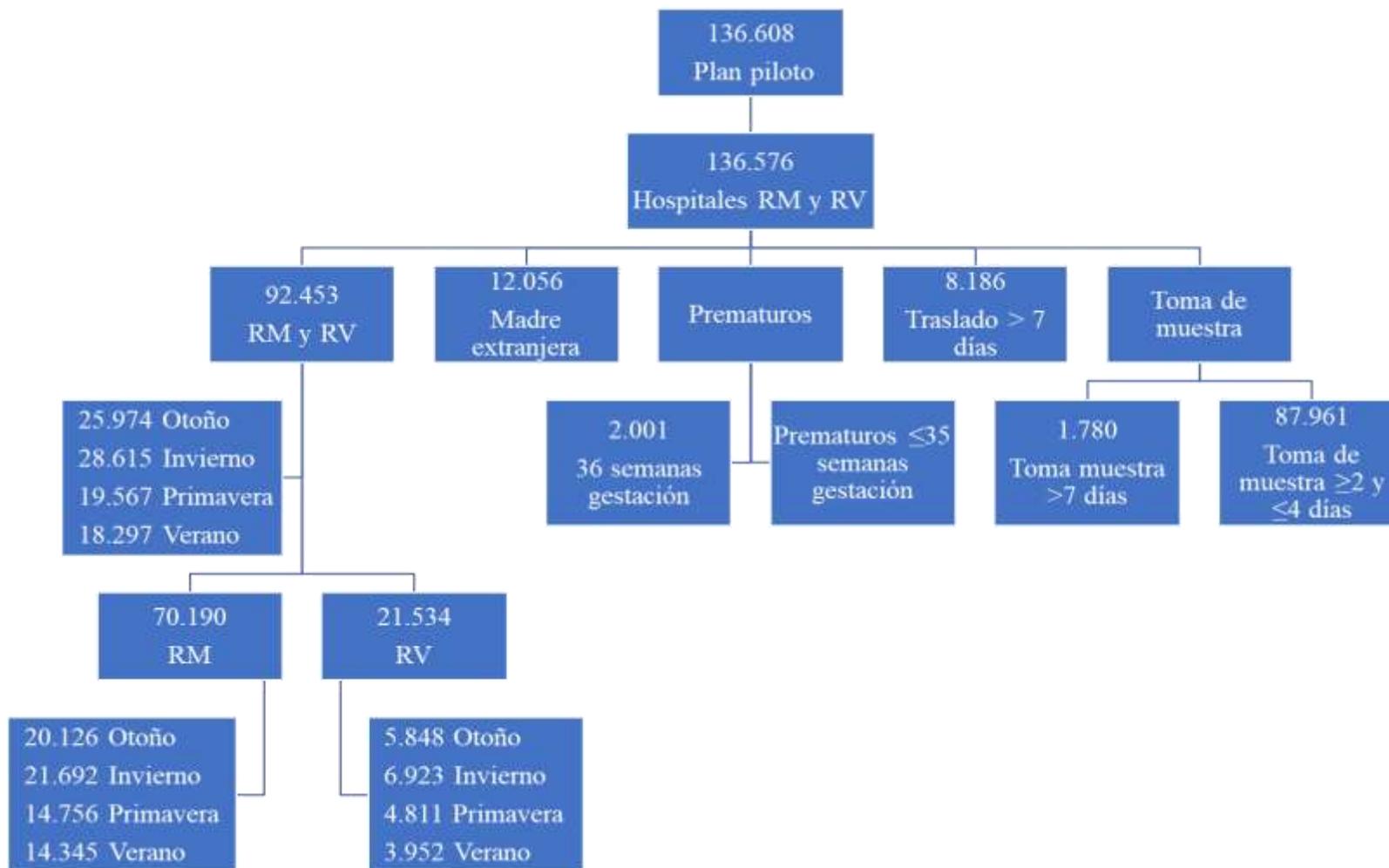
Los puntos de corte para el primer paso del tamizaje (IRT) fueron estudiados en los percentiles 98,5 y 99,5. Se establecieron puntos de corte para la RM, para la RV y un punto de corte global para ambas regiones, que luego fueron evaluados según sus parámetros de eficacia del tamizaje y se escogió el percentil más adecuado para cada población. Se excluyeron del análisis aquellos grupos que no cumplían con los criterios de inclusión y exclusión generales (ANEXO G).

Adicionalmente, se evaluaron los puntos de corte de IRT para algunas poblaciones inicialmente excluidas; recién nacidos hijos de madres extranjeras, prematuros, muestras atrasadas y muestras con más de 7 días de tránsito, cuyos criterios de inclusión y exclusión se encuentran en el ANEXO G.

También se evaluó el efecto de la temperatura en los valores de corte para la RM y RV, dividiendo los datos según la fecha de toma de muestra en 4 grupos; verano (21 diciembre al 20 de marzo), otoño (21 de marzo al 20 de junio), invierno (21 de junio al 20 septiembre) y primavera (21 de septiembre al 20 de diciembre).

En todos los casos mencionados, se seleccionó el percentil más adecuado según los criterios presentados en el punto 7 de la metodología para el objetivo específico 1. En

la **Figura 5**, podemos ver un resumen esquematizado de los grupos a los cuales se determinó el punto de corte para IRT.



**Figura 5.** Grupos análisis de percentiles para la determinación de valores de corte para IRT.

### 3.1.6. Determinación del punto de corte para el algoritmo IRTxPAP

Para aquellos valores de IRT mayores al punto de corte en el grupo RM+RV, se realizó la determinación de la concentración de PAP y se calculó el producto de IRTxPAP. En un rango de 0 a 3000, se calculó la sensibilidad del tamizaje para cada punto de corte determinado por el producto de IRTxPAP. En orden decreciente de sensibilidad del tamizaje, se seleccionó el punto de corte que incluyese a todos los pacientes con FQ conocidos por el plan piloto, similar a lo descrito por Weidler *et al.* (38). A continuación, se evaluaron los criterios presentados en el punto 7 de la metodología para el objetivo específico 1, para evaluar los puntos de corte sugeridos por el método de orden decreciente de sensibilidad.

### 3.1.7. Evaluación de la calidad

Debido a que la edad promedio del diagnóstico en Chile por cuadro clínico es de 3,6 años, es difícil conocer todos los falsos negativos, por lo que, para realizar los cálculos, asumimos los casos positivos conocidos como si fuesen todos los casos positivos existentes. La calidad de cada valor de corte según su percentil correspondiente para IRT e IRTxPAP, fue evaluada en términos de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) y porcentaje de falsos negativos (FN), de acuerdo a las siguientes fórmulas:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN} \times 100\%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP} \times 100\%$$

$$\text{VPP} = \frac{VP}{VP + FP} \times 100\%$$

$$\text{VPN} = \frac{VN}{VN + FN} \times 100\%$$

$$\text{Porcentaje FN} = \frac{FN}{FN + VP} \times 100\%$$

donde VP = verdaderos positivos, FN = falsos negativos, VN = verdaderos negativos y FP = falsos positivos.

### 3.1.8. Análisis estadísticos

Para determinar si los grupos analizados tenían o no una distribución normal, se realizó el test de Kolmogrov-Smirnov (con corrección de Lilliefors). Para determinar si las poblaciones son estadísticamente diferentes, se realizó el test de Mann-Whitney. Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa StatGraphics® Centurion XV y el *software* SPSS statistics 20®.

## **3.2. Evaluar si las determinaciones de IRT y PAP para la pesquisa neonatal de fibrosis quística cumplen con los requerimientos de calidad, semejantes a las descritas para la pesquisa de Hipotiroidismo Congénito y Fenilcetonuria.**

### 3.2.1. Comparación de controles internos y externos

Para comparar la calidad analítica de las técnicas utilizadas para la PN de FQ, HC y PKU se comparó la precisión y exactitud de cada una de las técnicas. Para evaluar la precisión se compararon los controles internos utilizados entre Enero y Octubre de 2017 de cada una de las técnicas, calculando las desviaciones estándar y porcentaje de covarianza de los controles internos de cada técnica. Para evaluar la exactitud, se compararon los controles externos de los cuales participó el LPN entre Marzo de 2015 y Octubre de 2017 calculando el error relativo a partir de la diferencia entre los resultados obtenidos en el laboratorio y el valor entregado por los laboratorios extranjeros que realizan los controles externos, destacando los controles que se encontraban por sobre el límite superior o por debajo del límite inferior de cada ente evaluador.

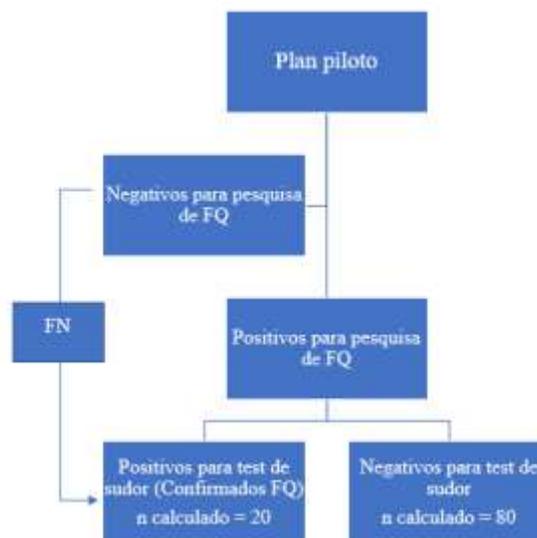
### 3.2.2. Comparación de criterios de calidad entre algoritmos

Para comparar la calidad de la pesquisa de las distintas enfermedades, se evaluaron los criterios presentados en el punto 7 de la metodología para el objetivo específico 1.

### 3.3. Identificar las mutaciones más relevantes del gen de CFTR y establecer un conjunto de ellas que ayuden a mejorar el valor predictivo positivo de la pesquisa neonatal de fibrosis quística clásica.

#### 3.3.1. Población en estudio

Para el estudio genético, se diseñó un estudio de caso-control, donde la proporción de casos y controles es de 1:4, con un n=100 (20 casos y 80 controles). Se consideran casos aquellos pacientes que han sido confirmados con FQ mediante test de sudor, estos pacientes se reclutaron a partir de los resultados obtenidos el programa de PN del HSJD. Por otro lado, se consideran controles a todos aquellos pacientes que son positivos para la PN de FQ y negativos para el test de sudor, los controles fueron reclutados en el HCSBA, donde se realiza el test confirmatorio. El esquema de reclutamiento de pacientes se muestra en la **Figura 6**.



**Figura 6.** Esquema reclutamiento pacientes para estudio genético.

### 3.3.2. Aspectos éticos

Para el estudio genético, el protocolo completo de investigación desarrollado para esta tesis, el consentimiento informado y el Formulario de Reporte de Caso (CRF, por sus siglas en inglés) fueron aprobados por el Comité Ético Científico del Servicio de Salud Metropolitano Central (CEC-SSMC), autorizado por el Comité de Ética Asistencial del HSJD y por el HCSBA (ANEXOS D y E).

### 3.3.3. Análisis estadísticos

El cálculo del n muestral fue realizado en la sección cálculo de tamaño de muestra para pruebas diagnósticas del programa Epidat 4.2, para una especificidad esperada del 95%, condición de enfermedad conocida, razón no enfermo/enfermo de 4 y un nivel de confianza del 95%.

### 3.3.4. Secuenciación gen *CFTR*

Para la secuenciación del gen *CFTR*, el personal correspondiente de cada hospital realizó una venopunción para la obtención de sangre completa. La secuenciación fue realizada por INVITAE ©, quienes mediante secuenciación de nueva generación (NGS) realizan una secuenciación del gen y un análisis de delección/duplicación, que incluye a los exones y 10 a 20 pares de bases de secuencias intrónicas adyacentes a cada lado de los exones. Además, analizan 5 de las variantes no codificantes más comunes. Adicionalmente, se realiza la misma secuenciación a 4 genes asociados con pancreatitis crónica; *CASR*, *CTRC*, *PRSS1* y *SPINK1*.

### **3.4. Comparar el desempeño del algoritmo actual, IRTxPAP versus IRTxPAP con panel de mutaciones, para la pesquisa neonatal de fibrosis quística clásica.**

#### 3.4.1. Recolección de muestras

Las muestras utilizadas para el estudio genético son las mismas que fueron tomadas para la PN, con algunas excepciones de muestras de casos de FQ con muestra insuficiente, las cuales fueron solicitadas como nueva muestra a los padres de los pacientes.

#### 3.4.2. Elección del método de extracción de ADN

Para la extracción de ADN a partir de muestras de sangre seca, se analizaron 3 kits comerciales diferentes, los cuales fueron comparados en cuatro aspectos:

- Características generales de cada kit
- Comparación de desempeño en términos de calidad de ADN extraído: para este aspecto se desarrolló un POE (Protocolo Operacional Estandarizado) especialmente para muestras de sangre seca en papel filtro, el cual se encuentra disponible en el ANEXO J.
- Costos económicos: estos incluyen el costo del kit, costo de envío y costos de aduana
- Requisitos de implementación: incluye utilización de insumos y reactivos adicionales a los proporcionados por cada kit de extracción, utilización de equipos de laboratorio y tiempo de extracción.

#### 3.4.3. Análisis discriminante

Para elegir el mejor algoritmo (IRT+PAP, IRTxPAP), se hizo un análisis discriminante, con aquellos casos que dieron positivos para el primer paso ( $IRT > 45 \mu\text{g/L}$ ), en la población de ambas regiones que cumplen los criterios de inclusión presentados en

la sección 1 del ANEXO G, mediante una curva COR con las concentraciones de IRT, PAP e IRTxPAP, similar a lo descrito por Weidler *et al.* (38).

#### 3.4.4. Evaluación de la calidad

Se hizo un análisis de los criterios de eficacia (punto 7 de la metodología para el objetivo específico 1) del tamizaje para ambos algoritmos con los puntos de corte establecidos por el comité de expertos en FQ (ver sección 3.5 del marco teórico) en el caso del algoritmo IRT+PAP y para el caso del algoritmo IRTxPAP se utilizó el punto de corte determinado en el objetivo específico 1, incluyendo a la población de las secciones 1 (RM+V), 2 (hijos de madre extranjera), 3 (sólo prematuros de 36 semanas) y 6 (solo traslados de 8 días) del ANEXO G.

Como prueba adicional, se evaluaron gráficamente las áreas cubiertas por uno de los algoritmos que no son cubiertas por el otro.

## 4. RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN

### 4.1. Determinar el punto de corte óptimo de IRT, PAP y de IRTxPAP para la pesquisa neonatal de fibrosis quística.

#### 4.1.1. Población en estudio

De los 136.608 recién nacidos iniciales, se excluyeron 32 por tener lugar de nacimiento en regiones distintas a la Metropolitana y de Valparaíso o por tener datos incópletos en sus fichas.

#### 4.1.2. Concentraciones de IRT y PAP

Las determinaciones de IRT y PAP fueron hechas con métodos normalizados. Por razones de espacio no se presentan los valores obtenidos de cada uno de los 136.576 recién nacidos. En la **Tabla 4** se encuentran los parámetros evaluados en la verificación de ambas técnicas (Linealidad, precisión y aplicabilidad).

**Tabla 4.** Verificación de las técnicas de cuantificación para IRT y PAP

<b>Criterio / Método</b>		<b>IRT</b>	<b>PAP</b>
<b>Linealidad</b>	Coefficiente de correlación promedio	0,999	0,999
	Valor p para correlación	0,0000	0,0000

**Tabla 4.** Continuación.

<b>Precisión</b>	Repetibilidad	Desviación estándar medición 30 µg/L: 1,593 70 µg/L: 1,835 110 µg/L: 3,285	Desviación estándar medición 1 µg/L: 0,086 2 µg/L: 0,236 3 µg/L: 0,207
		Coefficiente de variación medición 30 µg/L: 4,93% 70 µg/L: 2,74% 110 µg/L: 3,28%	Coefficiente de variación medición 1 µg/L: 8,38% 2 µg/L: 12,42% 3 µg/L: 7,15%
	Reproducibilidad	Desviación estándar medición 30 µg/L: 1,609 70 µg/L: 3,056 110 µg/L: 4,219	Desviación estándar medición 1 µg/L: 0,099 2 µg/L: 0,279 3 µg/L: 0,289
		Coefficiente de variación medición 30 µg/L: 5,16% 70 µg/L: 4,65% 110 µg/L: 4,25%	Coefficiente de variación medición 1 µg/L: 9,41% 2 µg/L: 13,75% 3 µg/L: 9,65%
<b>Aplicabilidad</b>	Identidad de la sustancia analizada	Tripsinógeno inmunorreactivo	Proteína asociada a pancreatitis
	Intervalo de concentración cubierto por la verificación	30 a 110 µg/L	1 a 3 µg/L
	Especificación de matrices del material de prueba cubierto por la verificación	Sangre seca en papel filtro de algodón	Sangre seca en papel filtro de algodón
	Aplicación prevista	Análisis de concentraciones de IRT en sangre seca de neonatos	Análisis de concentraciones de PAP en sangre seca de neonatos

**Nota:** La repetibilidad fue calculada a partir de los datos del último lote utilizado y la reproducibilidad fue calculada a partir de los últimos tres lotes utilizados. En el caso de la reproducibilidad, adicionalmente hubo un cambio de operador. IRT: Tripsinógeno Inmunorreactivo; PAP: Proteína Asociada a Pancreatitis.

#### 4.1.3. Puntos de corte para IRT

Para establecer los puntos de corte se descartaron las segundas tomas de muestras de los recién nacidos y se aplicaron los criterios de inclusión y exclusión generales del ANEXO G, resultando en un total de 119.549 muestras para ser analizadas.

##### A. Recién nacidos de la Región Metropolitana y Región de Valparaíso

Para el cálculo de percentiles se utilizaron todos los valores del primer IRT de aquellos recién nacidos que cumplen los criterios de inclusión (ANEXO G, sección 1). El análisis de cada percentil, presentado en la **Tabla 5**, se hizo con los pacientes FQ positivos que cumplen los mismos criterios de inclusión.

**Tabla 5.** Evaluación percentiles de los recién nacidos tamizados en la Región Metropolitana y Región de Valparaíso (n = 92.453)

<b>Percentil</b>	<b>98,5</b>	<b>99</b>	<b>99,5</b>
<b>Valor de corte según percentil</b>	44,8 µg/L	48,7 µg/L	55,3 µg/L
<b>Positivos</b>	1.375	916	460
<b>Negativos</b>	91.078	91.537	91.993
<b>VPP (%)</b>	0,9	1,2	2,2
<b>VPN (%)</b>	100	100	100
<b>Sensibilidad de tamizaje (%)</b>	100	91,7	83,3
<b>Especificidad de tamizaje (%)</b>	98,5	99,0	99,5
<b>VP</b>	12	11	10
<b>VN</b>	91.077	91.536	91.991
<b>FP</b>	1.364	905	450
<b>FN</b>	0	1	2
<b>FN (%)</b>	0	8,3	16,7

*VPP: Valor Predictivo Positivo; VPN: Valor Predictivo Negativo; VP: Verdaderos Positivos; VN: Verdaderos Negativos; FP: Falsos Positivos; FN: Falsos Negativos.*

## B. Recién nacidos de la Región Metropolitana

Se realizó un análisis de los percentiles de aquellos recién nacidos pertenecientes a la RM. Para el cálculo de percentiles se utilizaron todos los valores del primer IRT de aquellos recién nacidos que cumplen los mismos criterios de inclusión que en el punto A., pero se excluyen aquellos recién nacidos de la RV. El análisis de cada percentil, presentado en la **Tabla 6**, se hizo con los pacientes FQ positivos que cumplen los mismos criterios de inclusión.

**Tabla 6.** Evaluación percentiles de los recién nacidos tamizados en la Región Metropolitana (RM) (n=70.190)

<b>Percentil</b>	<b>98,5</b>	<b>99</b>	<b>99,5</b>
<b>Valor de corte según percentil</b>	45,5 µg/L	49,4 µg/L	56,2 µg/L
<b>Positivos</b>	1.052	707	355
<b>Negativos</b>	69.867	70.212	70.564
<b>VPP (%)</b>	0,6	0,8	1,7
<b>VPN (%)</b>	100	100	100
<b>Sensibilidad de tamizaje (%)</b>	100	100	100
<b>Especificidad de tamizaje (%)</b>	98,5	99,0	99,5
<b>VP</b>	6	6	6
<b>VN</b>	69.867	70.212	70.564
<b>FP</b>	1.046	701	349
<b>FN</b>	0	0	0
<b>FN (%)</b>	0	0	0

*VPP: Valor Predictivo Positivo; VPN: Valor Predictivo Negativo; VP: Verdaderos Positivos; VN: Verdaderos Negativos; FP: Falsos Positivos; FN: Falsos Negativos.*

## C. Recién nacidos de la Región de Valparaíso

Se realizó un análisis de los percentiles de aquellos recién nacidos pertenecientes a la RV. Para el cálculo de percentiles se utilizaron todos los valores del primer IRT de aquellos recién nacidos que cumplen los mismos criterios de inclusión que en el punto A., pero se excluyen aquellos recién nacidos de la RM. El análisis de cada percentil,

presentado en la **Tabla 7**, se hizo con los pacientes FQ positivos que cumplen los mismos criterios de inclusión. Cabe destacar que la población de la RM, presenta diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con la población de la RV. De acuerdo a la prueba U de Mann-Whitney, la población de la RM y RV son estadísticamente diferentes con un valor  $p < 0,05$ .

**Tabla 7.** Evaluación percentiles de los recién nacidos tamizados en la Región de Valparaíso (n=21.534)

<b>Percentil</b>	<b>98,5</b>	<b>99</b>	<b>99,5</b>
<b>Valor de corte según percentil</b>	43,2 µg/L	46,5 µg/L	52,3 µg/L
<b>Positivos</b>	323	213	107
<b>Negativos</b>	21.211	21.321	21.427
<b>VPP (%)</b>	1,9	2,8	3,7
<b>VPN (%)</b>	100	100	100
<b>Sensibilidad de tamizaje (%)</b>	100	100	66,7
<b>Especificidad de tamizaje (%)</b>	98,5	99,0	99,5
<b>VP</b>	6	6	4
<b>VN</b>	21.211	21.320	21.425
<b>FP</b>	318	208	103
<b>FN</b>	0	0	2
<b>FN (%)</b>	0	0	33,3

*VPP: Valor Predictivo Positivo; VPN: Valor Predictivo Negativo; VP: Verdaderos Positivos; VN: Verdaderos Negativos; FP: Falsos Positivos; FN: Falsos Negativos.*

#### D. Cambio estacional

Se realizó un análisis de los percentiles de aquellos recién nacidos pertenecientes a la RM y RV. Para el cálculo de percentiles se utilizaron todos los valores del primer IRT de aquellos recién nacidos que cumplen los mismos criterios de inclusión que en el punto A, pero separándolos en estaciones de otoño, invierno, primavera y verano, según la fecha de toma de muestra. El análisis de cada percentil se hizo con los pacientes FQ positivos que cumplen los mismos criterios de inclusión. En la **Tabla 8** se muestran los resultados por estación de ambas regiones y en la **Tabla 9 y 10**, se muestran los resultados por estación de la RM y RV, respectivamente. Cabe destacar que de acuerdo a la prueba U de

Mann-Whitney, hay una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre todas las estaciones del año entre sí de la RM y RV en conjunto, a excepción de las estaciones otoño e invierno que no presentaron diferencias significativas. Estos resultados se repiten al separar las estaciones de la RM y RV de forma separada.

**Tabla 8.** Evaluación percentiles por estación en las regiones Metropolitana y de Valparaíso.

	Otoño <sup>#</sup>	Invierno*	Primavera* <sup>#</sup>	Verano* <sup>#</sup>	Total* <sup>#</sup>
<b>Tamaño muestral</b>	25.974	28.615	19.567	18.297	92.453
<b>Percentil</b>	99	99	99	99	-
<b>Valor de corte según percentil</b>	48,7 µg/L	49,4 µg/L	48,5 µg/L	47,1 µg/L	-
<b>Positivos</b>	260	290	197	183	930
<b>Negativos</b>	25.714	28.325	19.370	18.114	91.523
<b>VPP (%)</b>	-	1,0%	1,5%	2,7%	1,2%
<b>VPN (%)</b>	100	99,9	100	100	99,9
<b>Sensibilidad de tamizaje (%)</b>	-	75	100	100	92
<b>Especificidad de tamizaje (%)</b>	99	99	99	99	99
<b>VP</b>	0	3	3	5	11
<b>VN</b>	25.713	28.325	19.370	18.114	91.522
<b>FP</b>	259	287	194	176	916
<b>FN</b>	0	1	0	0	1
<b>FN (%)</b>	-	25	0	0	8,3

VPP: Valor Predictivo Positivo; VPN: Valor Predictivo Negativo; VP: Verdaderos Positivos; VN: Verdaderos Negativos; FP: Falsos Positivos; FN: Falsos Negativos.

\*<sup>#</sup> $p < 0,05$  para prueba U de Mann-Whitney .

**Tabla 9.** Evaluación percentiles por estación en la Región Metropolitana.

	<b>Otoño RM<sup>#</sup></b>	<b>Invierno RM*</b>	<b>Primavera RM**</b>	<b>Verano RM**</b>	<b>Total**</b>
<b>Tamaño muestral</b>	20.126	21.692	14.756	14.345	70.919
<b>Percentil</b>	99	99	99	99	-
<b>Valor de corte según percentil</b>	49,3 µg/L	50,5 µg/L	49,5 µg/L	47,3 µg/L	-
<b>Positivos</b>	201	217	148	145	711
<b>Negativos</b>	19.925	21.475	14.608	14.200	70.208
<b>VPP (%)</b>	-	0,9	1,4	1,4	0,8
<b>VPN (%)</b>	100	100	100	100	100
<b>Sensibilidad de tamizaje (%)</b>	-	100	100	100	100
<b>Especificidad de tamizaje (%)</b>	99	99	99,0	99,0	99,0
<b>VP</b>	0	2	2	2	6
<b>VN</b>	19.925	21.475	14.608	14.200	70.208
<b>FP</b>	201	215	146	143	705
<b>FN</b>	0	0	0	0	0
<b>FN (%)</b>	-	0	0	0	0

*RM: Región Metropolitana; VPP: Valor Predictivo Positivo; VPN: Valor Predictivo Negativo; VP: Verdaderos Positivos; VN: Verdaderos Negativos; FP: Falsos Positivos; FN: Falsos Negativos. \*<sup>#</sup>p<0,05 para prueba U de Mann-Whitney .*

**Tabla 10.** Evaluación percentiles por estación en la Región de Valparaíso

	Otoño RV#	Invierno RV*	Primavera RV**	Verano RV**	Total**
<b>Tamaño muestral</b>	5.848	6.923	4.811	3.952	21.534
<b>Percentil</b>	99	99	99	99	-
<b>Valor de corte según percentil</b>	46,7 µg/L	46,7 µg/L	46,2 µg/L	45,8 µg/L	-
<b>Positivos</b>	58	70	48	39	215
<b>Negativos</b>	5.790	6.853	4.763	3.913	21.319
<b>VPP (%)</b>	-	1,4	2,1	7,7	2,3
<b>VPN (%)</b>	100	99,9	100	100	99,9
<b>Sensibilidad de tamizaje (%)</b>	-	50	100	100	83
<b>Especificidad de tamizaje (%)</b>	99,0	99,0	99,0	99,1	99,0
<b>VP</b>	0	1	1	3	5
<b>VN</b>	5.790	6.852	4.763	3.913	21.318
<b>FP</b>	58	69	47	36	210
<b>FN</b>	0	1	0	0	1
<b>FN (%)</b>	-	50	0	0	20

*RV: Región de Valparaíso; VPP: Valor Predictivo Positivo; VPN: Valor Predictivo Negativo; VP: Verdaderos Positivos; VN: Verdaderos Negativos; FP: Falsos Positivos; FN: Falsos Negativos.  
\*<sup>#</sup>p<0,05 para prueba U de Mann-Whitney.*

#### E. Recién nacidos de madre extranjera

Se realizó un análisis de los percentiles de aquellos recién nacidos hijos de madres extranjeras pertenecientes a la RM y RV. Para el cálculo de percentiles se utilizaron todos los valores del primer IRT de aquellos recién nacidos que cumplen los criterios de inclusión que aparecen en el ANEXO G, sección 2. El análisis de cada percentil, presentado en la **Tabla 11**, se hizo con los pacientes FQ positivos que cumplen los mismos criterios de inclusión. Cabe destacar que la población de recién nacidos hijos de madre extranjera presenta una diferencia estadísticamente significativa ( $p<0,05$ ) con la población de recién nacidos hijos de madre chilena según la prueba U de Mann-Whitney. Pero al comparar la población de hijos de madre extranjera de la RM con hijos de madre chilena de la RM, no hay diferencias significativas y lo mismo ocurre al comparar estos grupos en la RV.

**Tabla 11.** Evaluación percentiles de los recién nacidos hijos de madres extranjera (n=12.056)

<b>Percentil</b>	<b>99</b>	<b>99,5</b>
<b>Valor de corte según percentil</b>	54,0 µg/L	61,7 µg/L
<b>Positivos</b>	120	61
<b>Negativos</b>	11936	11995
<b>VPP (%)</b>	0,83	1,64
<b>VPN (%)</b>	100	100
<b>Sensibilidad de tamizaje (%)</b>	100	100
<b>Especificidad de tamizaje (%)</b>	99,0	99,5
<b>VP</b>	1	1
<b>VN</b>	11.936	11.995
<b>FP</b>	119	60
<b>FN</b>	0	0
<b>FN (%)</b>	0	0

*VPP: Valor Predictivo Positivo; VPN: Valor Predictivo Negativo; VP: Verdaderos Positivos; VN: Verdaderos Negativos; FP: Falsos Positivos; FN: Falsos Negativos.*

#### F. Prematuros de 36 semanas de gestación

Se realizó un análisis de los percentiles de aquellos recién nacidos prematuros de 36 semanas de gestación pertenecientes a la RM y RV. Para el cálculo de percentiles se utilizaron todos los valores del primer IRT de aquellos recién nacidos que cumplen los criterios de inclusión que aparecen en el ANEXO G, sección 3. El análisis de cada percentil, presentado en la **Tabla 12**, se hizo con los pacientes FQ positivos que cumplen los mismos criterios de inclusión. Cabe destacar que la población prematuros, presenta una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) con la población de recién nacidos de término, según la prueba U de Mann-Whitney.

**Tabla 12.** Evaluación percentiles de los prematuros de 36 semanas (n=2.001).

<b>Percentil</b>	<b>99</b>	<b>99,5</b>
<b>Valor de corte según percentil</b>	48,4 µg/L	52,3 µg/L
<b>Positivos</b>	20	10
<b>Negativos</b>	1.981	1.991
<b>VPP (%)</b>	5,0	10,0
<b>VPN (%)</b>	100	100
<b>Sensibilidad de tamizaje (%)</b>	100	100
<b>Especificidad de tamizaje (%)</b>	99,1	99,6
<b>VP</b>	1	1
<b>VN</b>	1.981	1.991
<b>FP</b>	19	9
<b>FN</b>	0	0
<b>FN (%)</b>	0	0

**Nota:** El número de muestras es menor a 3000. VPP: Valor Predictivo Positivo; VPN: Valor Predictivo Negativo; VP: Verdaderos Positivos; VN: Verdaderos Negativos; FP: Falsos Positivos; FN: Falsos Negativos.

#### G. Prematuros extremos

Por falta de datos (n<3000 por semana de gestación), no se hizo análisis de percentiles para los prematuros extremos (menores de 36 semanas de gestación). De todas formas, cabe destacar que, dentro de los recién nacidos tamizados, no se conoce ningún caso de FQ en prematuros extremos. Cabe destacar que la población prematuros extremos, presenta una diferencia estadísticamente significativa ( $p<0,05$ ) con la población de prematuros de 36 semanas, de acuerdo a la prueba U de Mann-Whitney.

#### H. Traslado de muestra mayor a siete días

Se realizó un análisis de los percentiles de aquellos recién nacidos pertenecientes a la RM y RV, cuya muestra demoró más de 7 días en ser trasladada hasta el laboratorio desde la fecha de toma de muestra. Para el cálculo de percentiles se utilizaron todos los valores del primer IRT de aquellos recién nacidos que cumplen los criterios de inclusión que aparecen en el ANEXO G, sección 4. El análisis de cada percentil, presentado en la **Tabla 13**, se hizo con los pacientes FQ positivos que cumplen los mismos criterios de inclusión. Cabe destacar que la población de recién nacidos cuya muestra presenta un

tiempo de traslado mayor a 7 días, presenta, de acuerdo a la prueba U de Mann-Whitney, una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) con la población de recién nacidos cuya muestra presenta un tiempo de traslado dentro de lo descrito en la norma chilena (20).

**Tabla 13.** Evaluación percentiles de aquellas muestras con días de traslado superiores a los que dicta la norma.

	Traslado mayor 7 días*	Traslado 8 días*
<b>Tamaño muestral</b>	8.186	3.094
<b>Percentil</b>	99,5	99,5
<b>Valor de corte según percentil</b>	53,5 $\mu\text{g/L}$	53,3 $\mu\text{g/L}$
<b>Positivos</b>	42	15
<b>Negativos</b>	8.144	3.079
<b>VPP (%)</b>	2,38	7
<b>VPN (%)</b>	100	100
<b>Sensibilidad de tamizaje (%)</b>	100	100
<b>Especificidad de tamizaje (%)</b>	99,5	99
<b>VP</b>	1	1
<b>VN</b>	8.144	3.079
<b>FP</b>	41	14
<b>FN</b>	0	0
<b>FN (%)</b>	0	0

*Nota:* Se muestran los percentiles más altos que no presenten falsos negativos. VPP: Valor Predictivo Positivo; VPN: Valor Predictivo Negativo; VP: Verdaderos Positivos; VN: Verdaderos Negativos; FP: Falsos Positivos; FN: Falsos Negativos. \* $p < 0,05$  para prueba U de Mann-Whitney.

#### I. Toma de muestra atrasada

Por falta de datos ( $n=1.780$ ), no se hizo análisis de percentiles para los recién nacidos cuya muestra fue tomada después de los 7 días de vida. De todas formas, cabe destacar que, dentro de los neonatos tamizados, no se conoce ningún caso de FQ cuya muestra haya sido tomada después del plazo correspondiente. Aún así, se comparó la población de recién nacidos con toma de muestra atrasada, con la población de recién nacidos con toma de muestra según indica la norma chilena (20) y se encontraron

diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre ambas poblaciones, según la prueba U de Mann-Whitney.

#### J. Toma de muestra entre 40 horas y 4 días

En 2009 Carlo Castellani *et al.* publicaron las “Guías de buenas prácticas europeas para el cribado neonatal de la fibrosis quística” (7), donde indican que la mejor edad para tomar la muestra es sobre las 40 horas y menor a los 5 días de vida. Para el cálculo de percentiles se utilizaron todos los valores del primer IRT de aquellos recién nacidos que cumplen los criterios de inclusión (**ANEXO G**, sección 5). El análisis de cada percentil, presentado en la **Tabla 14**, se hizo con los pacientes FQ positivos que cumplen los mismos criterios de inclusión.

Al comparar la población de recién nacidos cuya toma de muestra se adecúa a la norma chilena y la población de recién nacidos cuya muestra se adecúa a la toma de muestra descrita por Castellani, mediante la prueba U de Mann-Whitney, se pueden apreciar una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre las poblaciones.

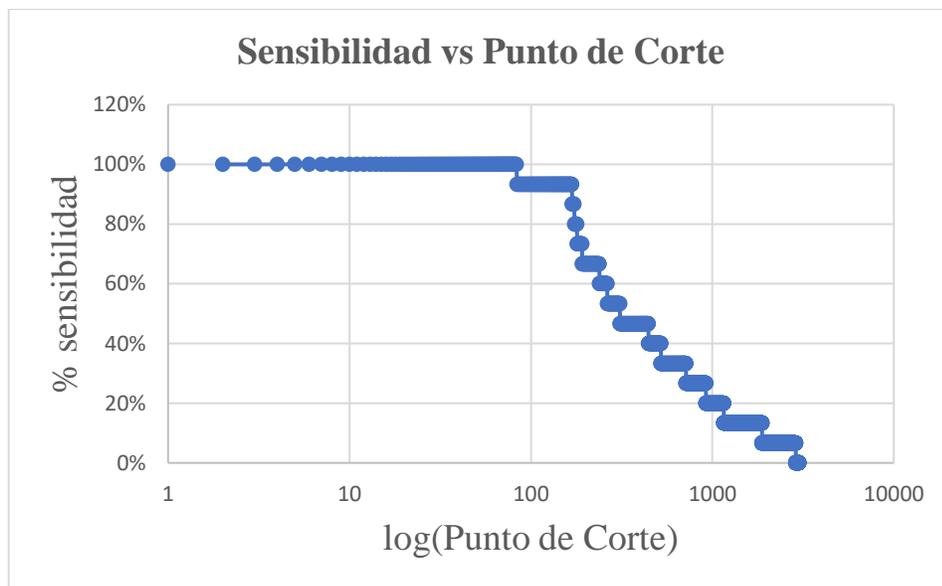
**Tabla 14.** Evaluación percentiles de toma de muestra entre 2 y 4 días de vida.

Tamaño muestral	Toma de muestra de 2 a 4 días de vida		
	87961		
Percentil	98	99	99,5
Valor de corte según percentil	42,1 $\mu\text{g/L}$	48,3 $\mu\text{g/L}$	54,9 $\mu\text{g/L}$
Positivos	1.769	885	443
Negativos	86.192	87.076	87.518
VPP (%)	0,68%	1,36%	2,48%
VPN (%)	100%	99,9%	99,9%
Sensibilidad de tamizaje (%)	100%	92,3%	84,6%
Especificidad de tamizaje (%)	98%	99%	99%
VP	12	12	10
VN	86.192	87.075	87.516
FP	1757	873	432
FN	0	0	2
FN (%)	0	0	16,7

VPP: Valor Predictivo Positivo; VPN: Valor Predictivo Negativo; VP: Verdaderos Positivos; VN: Verdaderos Negativos; FP: Falsos Positivos; FN: Falsos Negativos.

#### 4.1.4. Punto de corte para el algoritmo IRTxPAP

Debido a los análisis del punto 3 de los resultados y lo determinado por el comité de expertos en FQ, se estableció el punto de corte para el promedio IRT en  $45 \mu\text{g/L}$ , por lo que para analizar el punto de corte para el producto de IRTxPAP, se utilizaron las muestras de los recién nacidos que cumplen con los criterios de inclusión y exclusión de la sección 1 (RM y V) del ANEXO G y cuyo valor de  $\text{IRT} \geq 45 \mu\text{g/L}$ . Los resultados se presentan en el Gráfico 1, donde se puede apreciar que la sensibilidad del algoritmo es 100% hasta el valor de corte de  $\text{IRTxPAP} = 82,3 \mu\text{g}^2/\text{L}^2$ , lo que en orden decreciente de sensibilidad corresponde al primer paciente con FQ (38). El siguiente valor de corte en el cual disminuye la sensibilidad es de  $\text{IRTxPAP} = 168,8 \mu\text{g}^2/\text{L}^2$ .



**Gráfico 1.** Sensibilidad *versus* punto de corte del algoritmo IRTxPAP.

Al hacer un análisis de los criterios de calidad para ambos puntos críticos se obtienen los valores presentados en la **Tabla 15**.

**Tabla 15.** Evaluación puntos de corte IRTxPAP.

	<b>Punto de corte 82,3 <math>\mu\text{g}^2/\text{L}^2</math></b>	<b>Punto de corte 168,8 <math>\mu\text{g}^2/\text{L}^2</math></b>
<b>Tamaño muestral</b>	1.142	1.142
<b>Positivos</b>	530	137
<b>Negativos</b>	612	1005
<b>VPP (%)</b>	2,3	8
<b>VPN (%)</b>	100	99,9
<b>Sensibilidad de tamizaje (%)</b>	100	91,7
<b>Especificidad de tamizaje (%)</b>	54	89
<b>VP</b>	12	11
<b>VN</b>	612	1004
<b>FP</b>	518	126
<b>FN</b>	0	1
<b>FN (%)</b>	0	8,3

*VPP: Valor Predictivo Positivo; VPN: Valor Predictivo Negativo; VP: Verdaderos Positivos; VN: Verdaderos Negativos; FP: Falsos Positivos; FN: Falsos Negativos.*

#### 4.1.5. Aplicación valores de corte por región para IRT e IRTxPAP

En la **Tabla 16** se presentan los criterios de calidad obtenidos al aplicar en conjunto los valores de corte según región para IRT (sección 4.1.3 de resultados) y el valor de corte para IRTxPAP (sección 4.1.4 de resultados) a la población de la sección del ANEXO G.

**Tabla 16.** Criterios de calidad para valor de corte de IRT por región y valor de corte de IRTxPAP de 168,8  $\mu\text{g}^2/\text{L}^2$ .

Algoritmo	RM	V	Total
Valor de corte	IRT>56,2 IRTxPAP>168,8	IRT>46,5 IRTxPAP>168,8	
Positivos	85	19	104
Negativos	70.834	21.515	92349
VPP (%)	7,0	26,3	10,6
VPN (%)	100	99,9	99,9
Sensibilidad de tamizaje (%)	100	83,3	91,70
Especificidad de tamizaje (%)	99,9	99,9	99,9
VP	6	5	11
VN	70.834	21.514	92348
FP	79	14	93
FN	0	1	1
FN (%)	0	16,7	8,3

VPP: Valor Predictivo Positivo; VPN: Valor Predictivo Negativo; VP: Verdaderos Positivos; VN: Verdaderos Negativos; FP: Falsos Positivos; FN: Falsos Negativos.

#### **4.2. Evaluar si las determinaciones de IRT y PAP para la pesquisa neonatal de fibrosis quística cumplen con los requerimientos de calidad, semejantes a las descritas para la pesquisa de Hipotiroidismo Congénito y Fenilcetonuria.**

4.2.1. Calidad analítica de las técnicas utilizadas en el laboratorio de pesquisa neonatal para HC, PKU y FQ.

Se analizó la precisión y exactitud para evaluar la calidad analítica de las técnicas utilizadas en el laboratorio para pesquisar HC, PKU y FQ. En la **Tabla 17** se presentan las desviaciones estándar y coeficientes de variación de cada uno de los controles de calidad internos de las técnicas.

**Tabla 17.** Parámetros de evaluación de la precisión de técnicas de tamizaje.

	QC1				QC2				QC3			
	Media	DE	%CV	n	Media	DE	%CV	n	Media	DE	%CV	n
IRT	31,9	1,4	4,5	71	66,8	2,7	4,1	71	100,7	4,2	4,1	71
	30,4	1,4	4,6	65	64,7	2,9	4,5	65	98,1	3,9	3,9	65
	32,3	1,3	4,1	71	67,6	2,3	3,3	71	101,3	4,1	4,0	71
	30,9	1,1	3,7	72	65,5	2,3	3,5	72	99,0	4,2	4,2	72
	29,0	1,2	4,3	79	61,0	2,4	3,9	79	91,7	4,0	4,3	79
PAP	Low				Medium				High			
	Media	DE	%CV	n	Media	DE	%CV	n	Media	DE	%CV	n
	1,05	0,10	9,3	6	2,06	0,24	11,7	6	2,98	0,36	12,2	6
	1,02	0,09	8,4	9	1,90	0,24	12,4	9	2,90	0,21	7,2	9
	1,13	0,11	9,8	4	2,27	0,30	13,4	4	3,24	0,24	7,4	4
TSH	QC1				QC2							
	Media	DE	%CV	n	Media	DE	%CV	n				
	35,8	3,3	9,2	242	150,3	12,6	8,4	242				
	34,7	2,3	6,6	72	133,0	10,2	7,6	72				
	31,6	2,8	8,7	84	138,1	13,0	9,4	84				
	30,8	2,7	8,7%	84	132,1	10,5	8,	84				
	30,2	2,5	8,3%	101	134,0	13,0	9,7	101				
Phe	Low				High							
	Media	DE	%CV	n	Media	DE	%CV	n				
	1,8	0,2	9,9	341	9,8	1,2	12,6	345				
	2,0	0,2	8,5	60	10,0	0,7	7,1	60				
	1,9	0,2	8,9	301	9,4	0,6	6,6	300				
	1,9	0,1	7,8	58	9,3	0,5	5,5	57				
	2,1	0,2	9,0	7	10,3	1,1	10,9	7				

**Nota:** Cada media corresponde al promedio de los controles para cada lote con n cantidad de kits. La media y desviación estándar para IRT y PAP están en µg/L. La media y desviación estándar para TSH están en µU/mL. La media y desviación estándar para Phe están en mg/dL. DE: desviación estándar; %CV: porcentaje de coeficiente de variación con respecto a la media; TSH: Hormona Tiroestimulante; Phe: Fenilalanina.

En las **Tablas 18 y 19**, se muestran los errores relativos de las técnicas para los controles de calidad externos del CDC (estadounidense) y RfB (alemán), respectivamente.

**Tabla 18.** Control externo CDC.

	ID	Phe			TSH			IRT		
		RL	VR	ER	RL	VR	ER	RL	VR	ER
Q1	11751	4,90	4,49	9%	85,5	80,6	6%	26,1	29,0	-10%
	11752	1,30	0,78	67%	10,7	12,1	-12%	9,7	9,9	-2%
	11753	1,10	0,78	42%	8,9	11,2	-21%	156,0	169	-8%
	11754	1,30	0,78	67%	7,6	10,0	-24%	14,7	16,3	-10%
	11755	1,10	0,59	88%	9,2	11,8	-22%	195,6	208	-6%
Q3	31751	1,00	0,82	22%	10,4	12,2	-15%	198,6	208	-4%
	31752	0,90	0,82	10%	8,3	11,4	-27%	17,2	16,3	6%
	31753	4,50	4,53	-1%	12,2	11,5	6%	153,6	169	-9%
	31754	1,30	0,82	59%	11,1	11,4	-3%	9,7	9,9	-2%
	31755	0,90	0,56	61%	9,5	11,7	-19%	24,5	29,0	-16%
Q4	41751	0,80	0,73	9%	11,6	11,4	2%	26,2	29,0	-10%
	41752	0,95	0,97	-2%	84,8	85,6	-1%	9,6	9,9	-3%
	41753	1,05	0,92	14%	11,0	11,5	-4%	135,7	169	-20%
	41754	0,65	0,73	-11%	7,3	11,4	-36%	14,6	16,3	-10%
	41755	0,70	0,73	-5%	9,9	12,2	-19%	171	208	-18%

**Nota:** Se destacan en rojo aquellos valores que salen de los límites inferiores o superiores de la certificación. Los controles del CDC son trimestrales, cada Q representa un grupo de controles enviado en trimestres diferentes. El resultado de laboratorio y valor de referencia para Phe, TSH e IRT están en mg/dL,  $\mu$ U/mL y  $\mu$ g/L, respectivamente. RL: resultado obtenido por el laboratorio; VR: valor real determinado por espectrometría de masas en el CDC; ER: error relativo en porcentaje con respecto al VR; Phe: Fenilalanina; TSH: Hormona Tiroestimulante.

**Tabla 19.** Control externo RfB

	ID	IRT				TSH				PAP			
		RL	VO	ER	n	RL	VO	ER	n	RL	VO	ER	n
NBS 1/17	A	14,6	15	-3%	33	10,0	10,6	-6%	49	1,76	1,70	4%	13
	B	46	48	-5%	33	29,3	33	-11%	49	3,29	2,95	12%	13
NBS 2/17	A	123	123	0%	37	8,9	4,8	85%	54	3,2	3,17	1%	13
	B	11,9	11	5%	37	35,5	17,6	102%	54	1,3	1,3	0%	13
NBS 3/17	A	9,5	9,1	5%	40	35,2	35,2	0%	56	8,8	6,97	26%	13
	B	57,3	54	6%	40	7,2	6,9	4%	56	3	2,3	30%	13
NBS 4/17	A	29,4	31	-5%	28	14,6	14,4	1%	36	5,6	5,8	-3%	9
	B	15,9	17	-6%	28	11,4	9,88	15%	36	8,6	8	8%	9

**Nota:** Se destacan en rojo aquellos valores que salen de los límites inferiores o superiores de la certificación. Los controles del RfB son trimestrales, cada NBS representa un grupo de controles enviado en trimestres diferentes. El resultado de laboratorio y valor objetivo para IRT, TSH y PAP están en  $\mu\text{g/L}$ ,  $\mu\text{U/mL}$  y  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente. RL: resultado obtenido por el laboratorio; VO: valor objetivo determinado según la media de los laboratorios participantes que usan la misma metodología de cuantificación del analito.; ER: error relativo en porcentaje con respecto al VO; TSH: Hormona Tiroestimulante.

#### 4.2.2. Calidad de los algoritmos del LPN para la pesquisa de PKU, HC y FQ.

Se analizó la eficacia de las técnicas del laboratorio mediante la sensibilidad del tamizaje, la especificidad del tamizaje, el valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN). Ya que el laboratorio fue automatizado a principios del 2015, la comparación de las técnicas se hizo entre los años 2015 y 2017. Los resultados se presentan en la **Tabla 20**.

**Tabla 20.** Criterios de eficacia de las técnicas utilizadas en el laboratorio de pesquisa neonatal.

	<b>Phe</b>	<b>TSH</b>	<b>IRT+PAP</b>	<b>IRTxPAP</b>
<b>Tamaño muestral</b>	342.042	342.042	109.611	109.611
<b>Positivos</b>	157	162	258	190
<b>Negativos</b>	341.885	341.880	109.353	109.421
<b>VPP (%)</b>	17,83	85,19	5,0	7,4
<b>VPN (%)</b>	100	100	99,99	99,99
<b>Sensibilidad de tamizaje (%)</b>	100	100	86,7	93,3
<b>Especificidad de tamizaje (%)</b>	99,96	99,99	99,8	99,8
<b>VP</b>	28	138	13	14
<b>VN</b>	341.885	341.880	109.351	109.420
<b>FP</b>	129	24	245	176
<b>FN</b>	0	0	2	1
<b>FN (%)</b>	0	0	13,3	6,7

*Nota:* Las estadísticas para Phe y TSH se hicieron en el período comprendido entre enero de 2015 y diciembre de 2017, debido a que en 2015 se automatizaron ambos procesos. TSH: Hormona Tiroestimulante; Phe: Fenilalanina. VPP: Valor Predictivo Positivo; VPN: Valor Predictivo Negativo; VP: Verdaderos Positivos; VN: Verdaderos Negativos; FP: Falsos Positivos; FN: Falsos Negativos.

### **4.3. Identificar las mutaciones más relevantes del gen de CFTR y establecer un conjunto de ellas que ayuden a mejorar el valor predictivo positivo de la pesquisa neonatal de fibrosis quística clásica.**

#### **4.3.1. Secuenciación del gen CFTR**

En la **Tabla 21** se muestran los resultados de las variantes encontradas mediante la secuenciación del gen *CFTR*. El 100% de los casos reclutados hasta la fecha pertenecen a la RM. La variante p.Phe508del se encuentra presente en el 83% de los pacientes y tiene una frecuencia alélica dentro del grupo de estudio de un 41,7%.

**Tabla 21.** Resultados secuenciación de pacientes con Fibrosis Quística.

<b>Código paciente</b>	<b>Alelo</b>	<b>Tipo variante</b>	<b>Cigosidad</b>
<b>FQ01</b>	c.1521_1523delCTT (p.Phe508del)	Patogénica	Heterocigoto
	c.1624G>T (p.Gly542*)	Patogénica	Heterocigoto
<b>FQ02</b>	c.1521_1523delCTT (p.Phe508del)	Patogénica	Heterocigoto
	c.1210-34TG[12]T[5] (Intrónica)	Patogénica	Heterocigoto
<b>FQ03</b>	c.1521_1523delCTT (p.Phe508del)	Patogénica	Heterocigoto
	c.2353C>T (p.Arg785*)	Patogénica	Heterocigoto
<b>FQ04</b>	c.1210-34TG[13]T[5] (Intrónica)	Patogénica	Heterocigoto
	c.1496C>T (p.Pro499Leu)	Significado incierto	Heterocigoto
<b>FQ05</b>	c.1521_1523delCTT (p.Phe508del)	Patogénica	Heterocigoto
	c.1330_1331delAT (p.Ile444*)	Patogénica	Heterocigoto
<b>FQ06*</b>	c.1521_1523delCTT (p.Phe508del)	Patogénica	Heterocigoto
	-	-	-

*Las mutaciones presentes en esta tabla corresponden a las halladas en el gen CFTR.*

*No se detectaron mutaciones en los genes CASR, CTSC, PRSS1 y SPINK1.*

*\*Falta el informe genético, solo se pudo rescatar una de las mutaciones de la ficha de este paciente.*

#### **4.4. Comparar el desempeño del algoritmo actual, IRTxPAP versus IRTxPAP con panel de mutaciones, para la pesquisa neonatal de fibrosis quística clásica.**

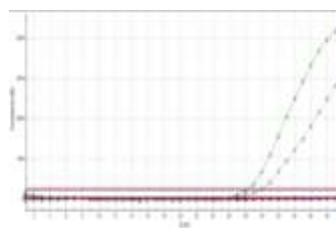
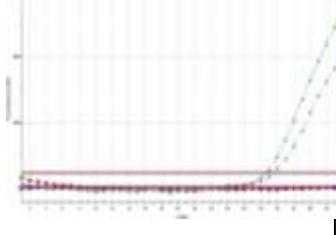
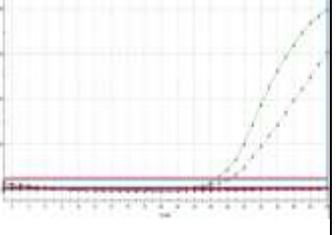
##### **4.4.1. Elección del método de extracción de ADN**

Para la elección del método de extracción se probaron 3 kit comerciales de diferentes marcas, sus características generales se presentan a continuación:

- *Dried Blood Spot (DBS) DNA Isolation Kit*: Es un kit de extracción de ADN desde sangre seca de NORGEN BIOTEC CORP. LA extracción es en base a columnas. Tiene una sola presentación de 50 preparaciones.
- *EXTRACTA DBS*: Es un reactivo para la extracción de ADN desde sangre seca de Quantabio. Es un único reactivo para la extracción de ADN. Tiene presentaciones de 10mL y 500mL.
- *E.Z.N.A.® Blood DNA Mini Kit*: Es un kit de extracción de ADN desde distintas matrices, incluyendo sangre seca, de OMEGA bio-tek. La extracción es en base a columnas. Tiene presentaciones de 5, 50 y 200 preparaciones.

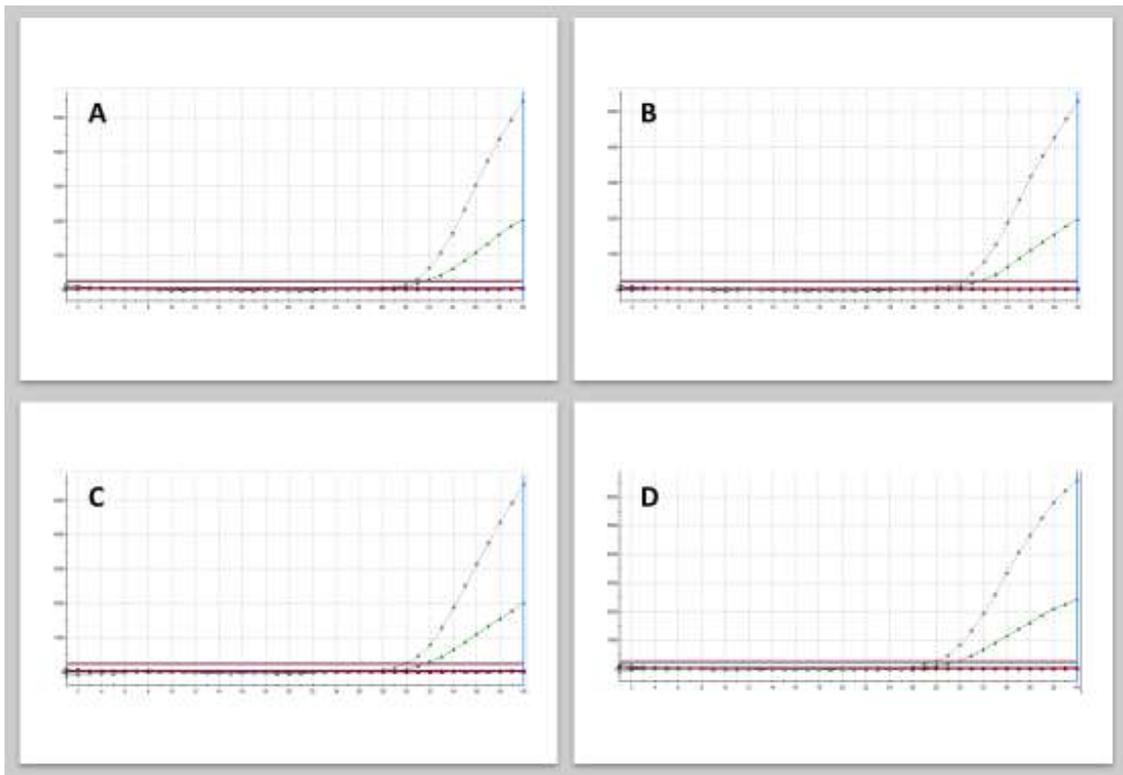
**Tabla 22.** Comparación métodos de extracción desde sangre seca en papel filtro.

		<b>NORGEN</b>	<b>EXTRACTA DBS</b>	<b>EZNA</b>
<b>Costos</b>	<b>Valor por kit (CLP)</b>	250.186	772.151	257.352
	<b>Reacciones</b>	50	3.000	200
	<b>Valor por muestra (CLP)</b>	5.003	257	1.286
<b>Requisitos de implementación</b>	<b>Insumos</b>	2 tubo de microcentrífuga de 1,5 mL	2 microtubos de PCR de 0,2 mL	3 tubo de microcentrífuga de 1,5 mL
		6 puntas p1000		7 puntas p1000
		3 puntas p200	4 puntas p200	2 puntas p200
	<b>Reactivos</b>	250 µL etanol 96-100% (extracción)		275 µL etanol 96-100% (extracción)
		66 mL etanol 96-100% (preparación reactivos)		300 mL etanol 100% (preparación reactivos)
				32 mL isopropanol 100% (preparación reactivos)
				250 µL PBS 1X
	<b>Almacenamiento kit</b>	Temperatura ambiente	4°C	Temperatura ambiente
	<b>Equipamento</b>	Microcentrífuga	Microcentrífuga	Microcentrífuga
		Minicentrífuga		
		Micropipeta p200	Micropipeta p200	Micropipeta p200
		Micropipeta p1000		Micropipeta p1000
		Agitador de tubos		Agitador de tubos
Incubadora de bloque			Incubadora de bloque	
		Termociclador		

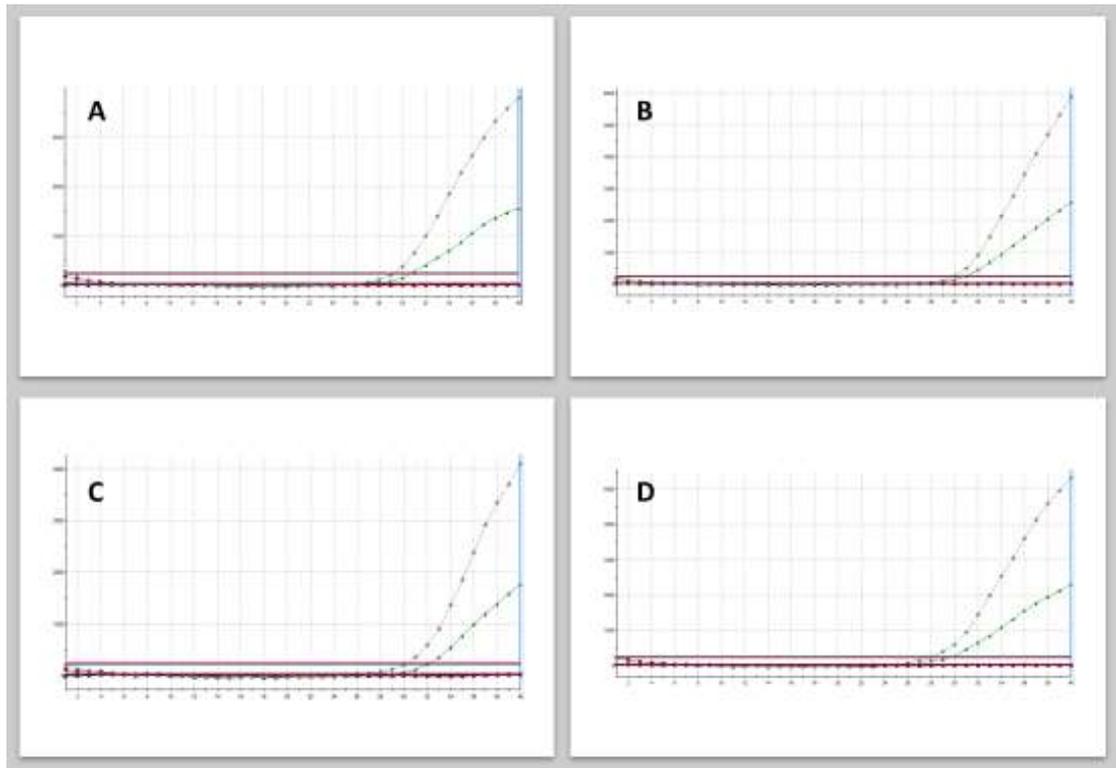
	<b>Tiempo extracción (2-3 muestras)</b>	60-70 min	40 min (20 min de dependencia)	135 min
<b>Calidad de extracción</b>	<b>Número de discos de sangre recomendados para la extracción</b>	3 x 3mm	1 x 3,2mm	Mancha de sangre completa
	<b>Concentración ADN <math>\pm</math> de (ng/<math>\mu</math>l)*</b>	5,54 $\pm$ 0,36 (3 discos)	43,57 $\pm$ 14,02 (1 disco)	5,37 $\pm$ 2,51 (6 discos)
	<b>Razón 260/280 <math>\pm</math> DE</b>	3,66 $\pm$ 1,76	1,07 $\pm$ 0,02	0,94 $\pm$ 1,63
	<b>Integridad</b>	Óptima	No se aprecia	Óptima
	<b>Housekeeping</b>	Aceptable	Aceptable	Aceptable
	<b>PCR en tiempo real (Fluorescencia vs Ciclos)</b>	Amplifica 	Amplifica 	Amplifica 

DE= Desviación Estándar. \*La concentración de ADN fue medida por espectrofotometría.

Adicionalmente, se hizo una dilución seriada de las muestras extraídas con el reactivo EXTRACTA DBS a partir de una misma muestra, pero con extracciones desde 1 y 2 discos de sangre seca de 3,2mm. Las diluciones se hicieron con el fin de obtener 36, 18, 9 y 4,5 ng de ADN por pocillo para realizar un PCR en tiempo real a modo de probar el límite de detección para sondas *TaqMan*® con ADN extraído desde sangre seca y concentración determinada por espectrofotometría. En las **Figura 7 y 8**, se muestran las curvas de amplificación para la dilución seriada de ADN extraído a partir de 1 y 2 discos de sangre seca respectivamente.



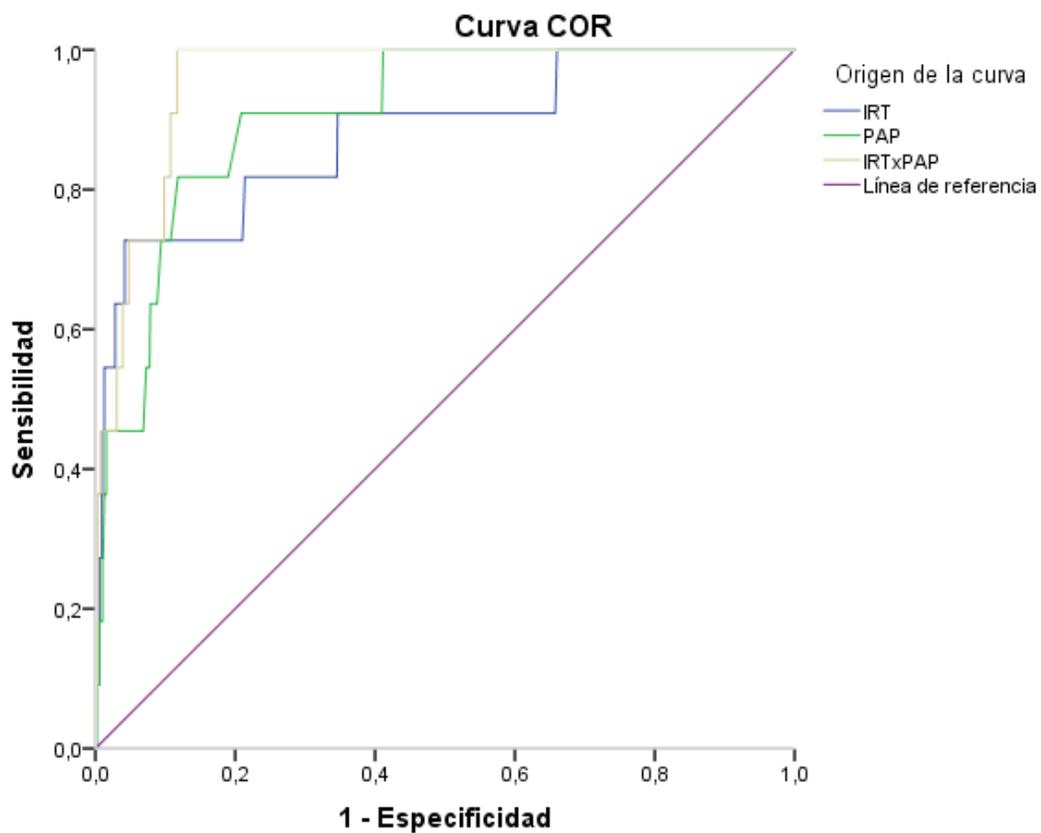
**Figura 7.** Curvas de amplificación PCR en tiempo real con sonda *TaqMan* a partir de ADN extraído con EXTRACTA DBS de un disco de sangre seca. (A) 36 ng de ADN en pocillo de reacción. (B) 18 ng de ADN en pocillo de reacción. (C) 9 ng de ADN en pocillo de reacción. (D) 4,5 ng de ADN en pocillo de reacción.



**Figura 8.** Curvas de amplificación PCR en tiempo real con sonda TaqMan a partir de ADN extraído con EXTRACTA DBS de dos discos de sangre seca. (A) 36 ng de ADN en pocillo de reacción. (B) 18 ng de ADN en pocillo de reacción. (C) 9 ng de ADN en pocillo de reacción. (D) 4,5 ng de ADN en pocillo de reacción.

#### 4.4.2. Análisis discriminante

Debido a los análisis de percentiles presentados en los resultados y lo determinado por el comité de expertos en FQ, se estableció el punto de corte para el promedio IRT en  $45 \mu\text{g/L}$ . Por lo que el análisis discriminante para los algoritmos se hizo con un  $n=1.142$ , dentro de los cuales se encuentran los pacientes que cumplen con los criterios de inclusión de la sección 1 del **ANEXO G** y además cuyo promedio de IRT es  $\geq 45 \mu\text{g/L}$ , por lo que se realizó la cuantificación de la concentración de la proteína PAP. La curva COR se presenta en el Gráfico 2 y las áreas bajo la curva se presentan en la **Tabla 23**.



**Gráfico 2.** Análisis discriminante para la detección de fibrosis quística en recién nacidos.

**Tabla 23.** Área bajo la curva de los algoritmos analizados mediante la curva COR.

<b>Variables de resultado de prueba</b>	<b>Área bajo la curva</b>
IRT	0,879
IRT+PAP	0,908
IRTxPAP	0,958

#### 4.4.3. Comparación de los criterios de calidad de los algoritmos IRT+PAP, IRTxPAP e IRTxPAP con panel de mutaciones

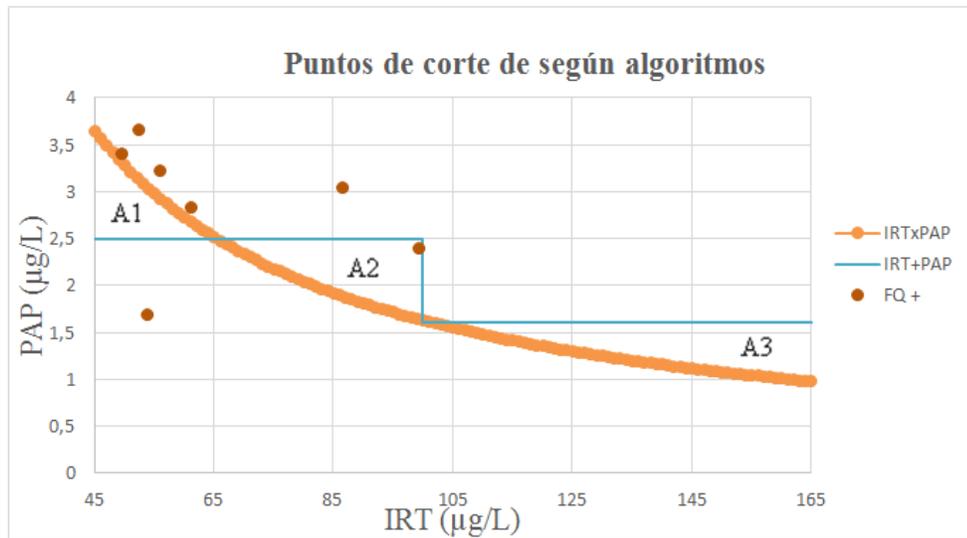
Se realizó una evaluación de los criterios de eficacia para los algoritmos IRT+PAP, IRTxPAP e IRTxPAP con panel de mutaciones, este análisis se hizo incluyendo los grupos descritos en las secciones 1 (RM+V), 2 (hijos de madre extranjera), 3 (sólo prematuros de 36 semanas) y 6 (solo traslados de 8 días) del ANEXO G. Para este análisis se consideraron los 14 pacientes con FQ pesquisados por el plan piloto que cumplen las condiciones antes mencionadas y además se incluye un falso negativo para el algoritmo IRTxPAP descubierto durante 2018. El valor de corte para IRT utilizado es de 45 µg/L y el de IRTxPAP de 165 µg<sup>2</sup>/L<sup>2</sup>, según lo propuesto por el comité de expertos y los resultados de la sección 4.1 de resultados. Para poder calcular los criterios de calidad del algoritmo IRTxPAP con panel de mutaciones, se realizaron aproximaciones según lo descrito en la literatura sobre la frecuencia de portadores sanos de mutaciones causantes de FQ en población general (1/25 – 1/30) (46) y en recién nacidos con hipertripsinemia (2 a 4 veces mayor que en población general) (47) (48). Los resultados del análisis se presentan en la **Tabla 24**.

**Tabla 24.** Criterios de eficacia de los algoritmos IRT+PAP, IRTxPAP e IRTxPAP con panel de mutaciones (n=109.604).

Algoritmo	IRT + PAP	IRT x PAP	IRTxPAP con panel FPS=1/6,25	IRTxPAP con panel FPS=1/15
<b>Positivos</b>	258	190	44	27
<b>Negativos</b>	109353	109421	109567	109584
<b>VPP (%)</b>	5,0	7,4	32	53
<b>VPN (%)</b>	99,99	99,99	100	100
<b>Sensibilidad de tamizaje (%)</b>	86,7	93,3	93	93
<b>Especificidad de tamizaje (%)</b>	99,8	99,8	100	100
<b>VP</b>	13	14	14	14
<b>VN</b>	109.351	109.420	109566	109583
<b>FP</b>	245	176	30	13
<b>FN</b>	2	1	1	1
<b>FN (%)</b>	13,3	6,7	6,7	6,7

VPP: Valor Predictivo Positivo; VPN: Valor Predictivo Negativo; VP: Verdaderos Positivos; VN: Verdaderos Negativos; FP: Falsos Positivos; FN: Falsos Negativos. FPS: Frecuencia Portador Sano.

Por último, en el **Gráfico 3**, se muestran los puntos de corte de cada algoritmo y los casos confirmados de FQ cercanos a la zona gris de ambos algoritmos. Adicionalmente se ven representadas las áreas cubiertas por uno de los algoritmos y no por el otro (A1, A2 y A3). Dentro de A1, no se encuentran casos de FQ positiva, aunque hay un punto muy cercano al valor de corte del algoritmo IRTxPAP. Dentro del área A2, se encuentra un falso negativo para el algoritmo IRT+PAP, pero cubierto por el algoritmo IRTxPAP. Por último, el área A3 no presenta ningún caso de FQ confirmado.



**Gráfico 3.** Áreas cubiertas por los algoritmos IRT+PAP e IRTxPAP. La curva naranja representa las combinaciones de IRT y PAP cuyo producto es 165. La línea celeste representa los puntos de corte de la estrategia IRT+PAP. Los puntos representan los casos confirmados de FQ. A1, A2 y A3 representan las áreas cubiertas por uno de los algoritmos, pero no por el otro. Nota: no aparecen todos los casos confirmados de FQ, ya que se salen de los límites de los ejes que representan los puntos de IRT y PAP.

## 5. DISCUSIÓN

A partir de los resultados expuestos en la sección anterior, podemos evaluar el desempeño estratégico y analítico del Plan Piloto de pesquisa neonatal de fibrosis quística en Chile, además de proponer mejoras al sistema actual.

En la verificación de las técnicas se utilizaron 3 criterios según lo indicado por el Instituto de Salud Pública (45). Con respecto a la linealidad de ambos métodos, al mirar los coeficientes de correlación y los valores  $p$ , podemos decir que existe una correlación significativa entre las concentraciones y las señales medidas por los equipos, por lo anterior es que podemos decir que ambos métodos cumplen con el criterio de linealidad (45). En lo que se refiere a precisión, al evaluar los coeficientes de variación, podemos notar que en la técnica para la determinación de la concentración de IRT, ningún punto supera el 10% de coeficiente de variación, por lo que podemos decir que la técnica es precisa (45) (49). No podemos decir lo mismo del método para la determinación de las concentraciones de PAP, ya que, si bien ningún punto supera el 20% de coeficiente de variación, en un sentido más estricto donde el máximo permitido es 10%, la técnica no puede ser calificada como precisa (49), lo que es de esperar considerando que la técnica para la cuantificación de PAP es manual. En cuanto a la aplicabilidad, ambas técnicas cumplen con los requisitos (45), ya que están hechas particularmente para la detección de los analitos IRT y PAP en sangre seca sobre papel filtro, además de cubrir los intervalos dentro de los cuales se encuentran los puntos de corte utilizados en la actualidad.

Los puntos de corte de IRT para el grupo A (RM y RV) muestra un falso negativo a partir del percentil 99 y que corresponde a un RN con un IRT= 48,4  $\mu\text{g/L}$ , por lo que la tasa de falsos negativos para este percentil es de un 8,3%, lo que se encuentra dentro de los criterios de calidad (5), en cuanto al valor predictivo positivo, este aumenta en un 50%

al correr el valor de corte desde el percentil 98,5 al percentil 99. Por lo anterior, el percentil más adecuado para este grupo según los criterios de calidad es el percentil 99.

Los puntos de corte para IRT para el grupo B (Región Metropolitana) no muestran falsos negativos para ninguno de los percentiles, en cuanto al valor predictivo positivo podemos encontrar el valor más alto en el percentil 99,5 y una tasa de falsos negativos para ese mismo percentil de un 0%. Por lo anterior, el percentil más adecuado para este grupo según los criterios de calidad es el percentil 99,5.

Los puntos de corte de IRT para el grupo C (RV) muestran dos falsos negativos para el percentil 99,5, por lo que la tasa de falsos negativos es de un 33% y se encuentra muy por encima del máximo establecido en los criterios de calidad (5). Por lo anterior, es que el percentil más adecuado para este grupo es el percentil 99, el cual tiene un valor predictivo positivo de un 2,8%.

De lo discutido anteriormente, podemos deducir que sería adecuado tener un punto de corte diferencial dependiendo de la región de nacimiento de cada individuo, esto no solo se traduciría en una tasa de 0% de falsos negativos, si no que la suma de los individuos falsos positivos para la pesquisa en cada región sería menor que al tener un solo punto de corte en común, es decir, para un punto de corte común a las dos regiones hay 905 falsos positivos y para ambas regiones con puntos de corte separados hay un total de 557 falsos positivos (RM: 349 FP – VR: 208 FP), lo que significa una reducción de un 38,5% de los falsos positivos.

La diferencia entre los percentiles de la RM y los de la RV, podrían deberse a diferencia genéticas de las poblaciones, ya que en literatura se ha demostrado que hay mutaciones en el gen CFTR que suelen manifestar menores niveles de IRT (29), pero también debemos considerar que el LPN se encuentra en la RM, por lo que las muestras de la RV deben viajar por largo tiempo y mayores distancias que las muestras de la RM, produciendo un mayor tiempo de exposición a la temperatura ambiente, lo que finalmente podría producir una disminución de la concentración medida de IRT al llegar al laboratorio (31).

Con respecto a los valores de corte flotantes por estaciones (grupo D), que fueron evaluados en el percentil 99, no muestran diferencias relevantes al comparar la cantidad de falsos negativos y el valor predictivo positivo, e incluso estos criterios de calidad son inferiores al compararlo con los percentiles 99 de los grupos A, B y C según corresponda. Por lo tanto, no es recomendable para ninguna de las regiones utilizar valores de corte flotantes de acuerdo a la estación, no solo por el hecho de que los indicadores de calidad no mejoran al aplicar puntos de corte diferenciales, si no también porque esto introduciría una carga adicional al equipo de PN

Para la población de recién nacidos hijos de madres extranjeras, grupo E, no encontramos ningún falso negativo y el valor predictivo positivo más alto lo encontramos en el percentil 99,5. En este grupo solo podemos encontrar un RN positivo para FQ, por lo que necesitaríamos más datos para evaluar mejor este grupo. Los percentiles para este grupo presentan valores de corte más altos que los valores encontrados en recién nacidos hijos de madres chilenas, por lo que si incluimos este grupo para establecer un valor de corte global, debemos considerar que este grupo puede modificar dicho valor de corte global. Por otro lado, si el valor de corte es establecido de acuerdo a los RN hijos de madre chilena, el grupo de hijos de madre extranjera produciría un aumento en los falsos positivos del Plan Piloto de PN y disminuiría el valor predictivo positivo de éste.

Los recién nacidos de 36 semanas de gestación (grupo F), tienen un tamaño muestral menor al necesario para poder establecer un punto de corte específico para su grupo, sin embargo, se realizó la evaluación de los percentiles para estimar los valores de corte de IRT y así poder compararlos con los de la población de recién nacidos de término (grupo A) cuyo percentil 99 corresponde a un IRT de 48,7  $\mu\text{g/L}$ , muy similar al percentil 99 de el grupo de prematuros que corresponde a un IRT de 48,4  $\mu\text{g/L}$ . Considerando lo anterior y que los prematuros son una fuente conocida de falsos positivos (6), podríamos pensar que los individuos con valores altos para este grupo en particular, estaría cubiertos por el plan de PN para la población general (grupo A).

En cuanto al grupo de prematuros extremos (grupo G), los individuos por cada semana de gestación están muy por debajo de lo necesario para establecer puntos de corte para cada uno de estos grupos. Esto plantea un desafío importante para el equipo de PN de FQ, para este caso se sugiere realizar un estudio con un grupo mayor de individuos para poder relacionar las semanas de gestación con un punto de corte diferencial, o evaluar la posibilidad de establecer un punto de corte diferencial de acuerdo al peso del RN, tal como lo hace Gustavo Borrajo en el algoritmo argentino para la pesquisa de hiperplasia suprarrenal congénita (37).

En cuanto a la población de recién nacidos cuya muestra llegó al LPN después de 7 días de tomada (grupo H), presenta una diferencia estadísticamente significativa con la población del grupo A, y al comparar los percentiles 99,5 de cada uno de estos grupos, los valores de IRT son levemente menores en el grupo de mayor días de traslado, lo que corresponde a una disminución del 3,3% de las concentraciones de IRT en el percentil 99,5. Sin embargo, lo anterior no descarta la aparición de falsos negativos causados por el deterioro de la muestra, por lo que se debe insistir a las matronas de cada centro que deben enviar las muestras al LPN dentro del período que indica la norma chilena (20). Por otro lado, el LPN puede flexibilizar el valor de corte para el IRT en aquellos casos en que las muestras tengan un traslado mayor a 7 días y realizar la cuantificación de la proteína PAP a dichas muestras de la zona gris. Se sugiere evaluar el grupo I, de toma de muestra mayor a 7 días con un número mayor de muestras.

Al comparar el percentil 99 del grupo de toma de muestra entre 40 horas y 4 días (grupo J) con el percentil 99 del grupo A, podemos ver una disminución del valor de corte de IRT de un 0,8%. A pesar de que este valor es bajo, no es lo que esperábamos encontrar debido a que los valores de IRT disminuyen con el paso de los días (50), por lo que se espera encontrar valores de IRT más altos en una población más joven. Sin embargo, es importante considerar que el VPP, sensibilidad y porcentaje de falsos negativos, mejoran al realizar la toma de muestra de acuerdo a lo propuesto por la ECFS, por lo que se debe considerar cambiar este punto en la norma chilena de pesquisa neonatal.

Para determinar el punto de corte del producto IRTxPAP se escogieron dos valores según la metodología descrita en la literatura (38), ya que el tamaño muestral para realizarlo mediante percentiles era demasiado bajo. Adicionalmente se hizo una evaluación de los criterios de calidad para estos dos valores. En cuanto a la sensibilidad solo uno de los valores de corte cumple con el criterio ( $82,3 \mu\text{g}^2/\text{L}^2$ ). En lo que se refiere al porcentaje de falsos negativos, ambos cumplen con el criterio. Por último, el valor de corte  $168,8 \mu\text{g}^2/\text{L}^2$  presenta un valor predictivo positivo casi 4 veces más alto. Considerando estos criterios, se decidió establecer como punto de corte para el producto de IRTxPAP  $165 \mu\text{g}^2/\text{L}^2$ , ya que este es el valor actualmente utilizado por el LPN y a pesar de presentar un nivel de sensibilidad por debajo de los criterios de calidad, el resto de los parámetros cumple perfectamente con la norma y produce una disminución del 76% de los falsos positivos, que hasta hoy es uno de los desafíos más grandes de la PN de FQ en Chile.

La cantidad de datos proporcionados por el plan piloto permite no sólo evaluar a la población nacida en las regiones Metropolitana y de Valparaíso, si no que también admite la separación en subgrupos que influyen en las concentraciones promedio de las proteínas IRT y PAP, demostrando que hay diferencias significativas no sólo por la región del RN, si no que en otros aspectos que son importantes de considerar al momento de establecer valores de corte, especialmente cuando el plan piloto de PN se expanda a todo el territorio nacional.

Al comparar las técnicas usadas para la pesquisa de FQ con aquellas utilizadas en el laboratorio para detectar niveles elevados de la hormona tiroestimulante (TSH) y fenilalanina (Phe), podemos decir desde el punto de vista de la precisión que todas las técnicas son similares y que están dentro de los rangos aceptados de coeficiente de variación, que deben ser menores al 15% (49). Sin embargo, se deben considerar una zona gris cercana a los valores de corte de IRT, ya que como primera etapa del algoritmo, determina a cuáles muestras se les medirá la concentración de PAP.

En cuanto a la exactitud, evaluada mediante controles externos del CDC, el análisis IRT se encuentra dentro de los rangos establecidos por ambas instituciones, similar a lo que ocurre con TSH y en algunas ocasiones superior a Fenilalanina.

Al comparar los resultados del control RfB de IRT con los resultados de TSH en lo que se refiere a errores relativos podemos notar que los de IRT se mantienen menores al 7%, lo cual es similar e incluso mejor que lo descrito para TSH. En cuanto al MucoPAP, a pesar de ser una técnica manual se suele mantener dentro de los rangos de aceptabilidad para el control alemán. Debemos considerar que durante el control NBS 3/17, hubo un cambio de operador para la técnica del MucoPAP, a lo que podría asociarse la desaprobación de ese control, debido a que el nuevo operador se encontraba en un período de aprendizaje. Sin embargo, para el resto de los controles de ese año, la exactitud del PAP y TSH se mantienen en rangos similares.

Por lo anterior podemos decir que las técnicas de IRT y PAP satisfacen los criterios de calidad y están al nivel de las otras dos técnicas realizadas por el LPN. De todas formas, se sugiere que para determinación de PAP, al ser una técnica manual, se sume otro control externo para poder evaluar con mayor frecuencia la exactitud.

Al comparar los indicadores de calidad de los algoritmos IRT+PAP e IRTxPAP, con los indicadores de la pesquisa de PKU e HC, podemos notar que las especificidades son bastante similares y que para las tres enfermedades pesquisadas se encuentran dentro de los criterios de calidad, lo mismo ocurre al mirar los valores predictivos negativos. En cuanto a la sensibilidad, la pesquisa de PKU y HC son de un 100%, a diferencia de ambos algoritmos de pesquisa de FQ, esto podría ser causado ya que los analitos estudiados para la pesquisa de PKU y HC tienen una relación directa con la enfermedad, a diferencia de las proteínas IRT y PAP que aumentan su concentración a consecuencia del daño pancreático producido por la enfermedad y esto a su vez dependerá de las mutaciones que porte cada paciente (29), esto mismo podría dar cuenta del por qué en la PN de HQ y PKU no existen falsos negativos hasta la fecha, pero sí hay en la pesquisa de FQ. En cuanto a los valores predictivos positivos, el HC tiene el valor más alto, seguido de la pesquisa de

PKU cuyo VPP está por debajo de los criterios de calidad al igual que los VPP para ambos algoritmos de FQ.

En cuanto al reclutamiento de pacientes para el estudio de mutaciones frecuentes en CFTR de recién nacidos, se ha obtenido la información de secuenciación de 5 pacientes confirmados con FQ más un paciente con información parcial, lo que representa el 30% de los 20 casos calculados como necesarios para hacer el estudio de frecuencia. Sin embargo, hasta ahora podemos notar que la frecuencia alélica de p.Phe508.del en los pacientes provenientes de la PN (41,7%) es mayor que el 28,9% esperado para la zona central de Chile (18).

De los tres métodos de extracción de ADN desde sangre seca, el que mejor se adapta a las necesidades y características del LPN, es el EXTRACTA DBS, ya que el valor por muestra parece ser el más económico, requiere menos insumos y equipamientos y es el más rápido. Además, es el que requiere menos muestra y es compatible con la amplificación en PCR en tiempo real y detección de mutaciones mediante sondas *TaqMan*®. En comparación con los otros métodos de extracción, es desventajoso ya que se debe almacenar a 4°C, sin embargo, el LPN cuenta con vitrinas refrigeradas con espacio suficiente para el reactivo. Otra desventaja es que se requiere un termociclador para el proceso de extracción, pero este equipo es un activo fijo, ya que es una inversión de una sola vez. Adicionalmente, el límite de detección para realizar un PCR en tiempo real con ADN extraído desde sangre seca con el reactivo EXTRACTA DBS, es de 4,5 ng de ADN por pocillo, lo que se obtiene al agregar a cada pocillo de reacción 3,15µL de ADN a una concentración de 1,4 ng/µL, lo que es más de 30 veces la concentración promedio para una extracción con un solo disco de sangre seca.

Para comparar los algoritmos IRT+PAP e IRTxPAP, se realizó un análisis discriminante mediante una curva ROC, los resultados del área bajo la curva demuestran que el algoritmo IRTxPAP es capaz de realizar una mejor discriminación entre la población con y sin FQ, que la que es capaz de realizar el algoritmo IRT+PAP y a su vez, éste es mejor discriminante que el IRT por sí sólo.

Adicionalmente, la comparación de los criterios de eficacia es en todos los puntos mejor en el caso del algoritmo IRTxPAP con panel de mutaciones, seguido del algoritmo IRTxPAP. Los cálculos realizados para los criterios de calidad del algoritmo IRTxPAP con panel de mutaciones se hicieron estimando la frecuencia de portadores sanos de mutaciones causantes de FQ en RN con hipertripsinemia, debido a que el test de sudor para los RN positivos para la pesquisa y la atención rutinaria de los pacientes con FQ, se encuentran suspendidos desde Marzo de 2020 de forma indefinida a causa de la pandemia de COVID-19, por lo que el reclutamiento de pacientes para esta tesis también se encuentra suspendido.

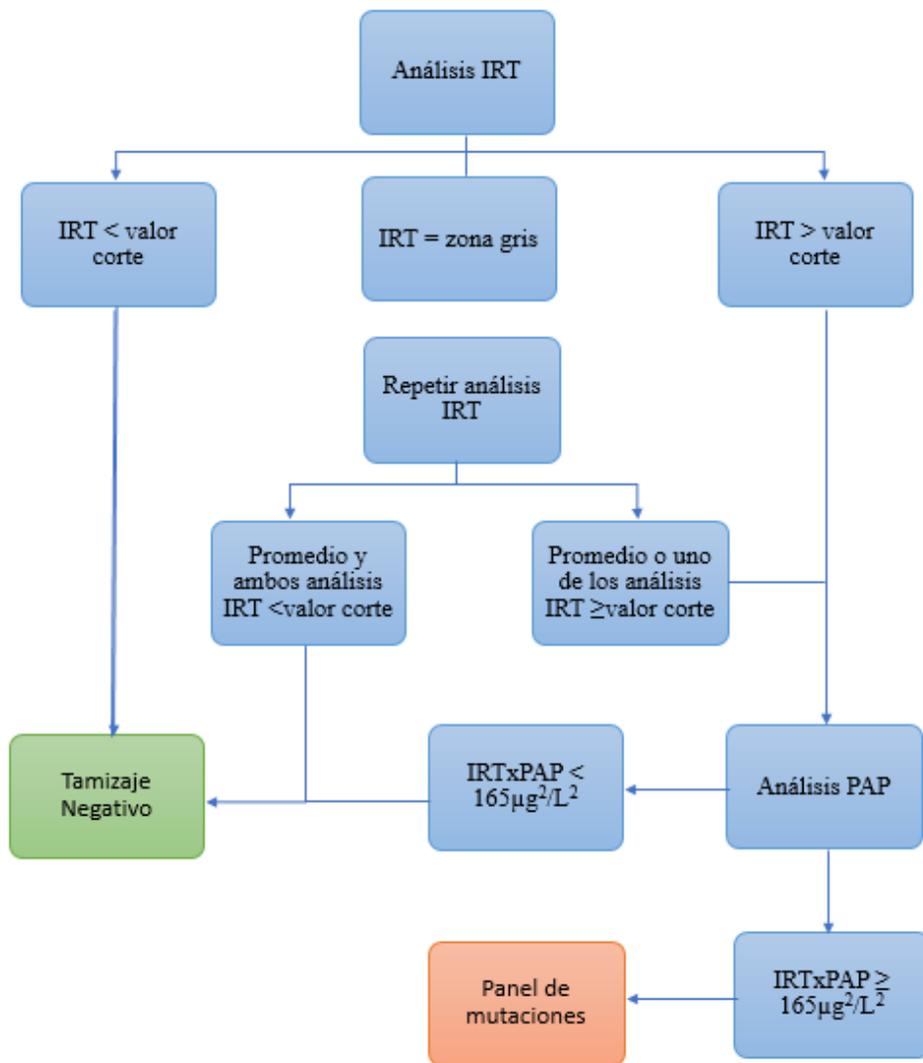
Por todo lo anterior, podemos recomendar el algoritmo IRTxPAP para la PN de FQ en Chile, pero debemos ser precavidos ya que a pesar de que hasta ahora presenta un mejor desempeño que el algoritmo IRT+PAP, la zona A1 presentada en el Gráfico 3, que corresponde a valores menores de IRT podría llegar a ser una fuente de falsos negativos. Por otro lado, es indispensable seguir estudiando las frecuencias de las mutaciones causante de FQ en Chile, para así incorporar un panel de mutaciones al algoritmo actual, ya que los resultados esperados indican que el VPP podría aumentar considerablemente al incorporar dicho panel, superando los valores de los criterios de calidad de la ECFS.

La hipótesis presentada al inicio de la tesis fue cumplida parcialmente, ya que los criterios de calidad mejoran al reestablecer los valores de corte de IRT y PAP, sin embargo, el panel de mutaciones no se logró establecer y sólo se pudo realizar una simulación de los criterios de calidad a partir de lo descrito en la literatura internacional.

Los resultados presentados en esta tesis sientan las bases para un trabajo a mayor escala, donde se pueda establecer un panel de mutaciones adecuado para la población chilena. Además, aporta sugerencias para publicar una versión actualizada de la norma chilena para pesquisa neonatal, cuyo alcance llega no solo a la pesquisa de FQ, si no que a la pesquisa de HC, PKU y otras enfermedades que se puedan incluir a futuro en el plan nacional de PN.

## 6. CONCLUSIONES

1. Las metodologías utilizadas para la cuantificación de IRT y PAP cumplen con los criterios de precisión y exactitud para ambas determinaciones. Sin embargo, es recomendable realizar controles de exactitud externos con mayor frecuencia para la técnica MucoPAP.
2. Se debe considerar establecer puntos de corte diferenciados de IRT para cada región; 56,2  $\mu\text{g/L}$  para la RM y 46,5  $\mu\text{g/L}$  para la RV. No se recomiendan puntos de corte flotante según la época del año, sin embargo, debe considerarse una zona gris para aquellas muestras cuyo traslado sea mayor a 7 días. Las poblaciones de hijos de madre extranjera y los prematuros producen una variación del valor de corte y deben ser considerados como una fuente importante de falsos positivos. Al momento de ampliar la pesquisa a nivel nacional, deben considerarse puntos de corte regionales para IRT.
3. El algoritmo IRTxPAP es el más adecuado por el momento para las poblaciones estudiadas de la RM y RV, con un punto de corte de 165  $\mu\text{g}^2/\text{L}^2$ . A pesar de que este algoritmo cumple en cuanto a sensibilidad y especificidad, similar a lo descrito la pesquisa de HC y PKU, en lo que se refiere a VPP aún se encuentra por debajo de los criterios de calidad, por lo que es recomendable continuar con el estudio de un panel de mutaciones.
4. Considerando los aspectos revisados durante este trabajo, se sugiere utilizar el algoritmo representado en la **Figura 9** para la PN de FQ en Chile.



**Figura 9.** Algoritmo y valores de corte propuestos para la pesquisa neonatal de fibrosis quística en Chile.

## 7. GLOSARIO

- **Algoritmo:** secuencia mediante la cual se realiza una o más estrategias de búsqueda, que considera los puntos de corte para cada estrategia, las repeticiones, la zona gris y solicitud de segunda muestra.
- **Días de tránsito:** tiempo en días desde la toma de muestra hasta que esta llega al laboratorio.
- **Estrategia de búsqueda:** método por el cual se determina la concentración de un analito o la presencia de mutaciones, para identificar a aquellos individuos con mayor probabilidad de padecer determinada enfermedad.
- **Extranjera:** mujer nacida fuera del territorio chileno.
- **Falso negativo:** aquellos casos en los que el resultado del tamizaje es negativo, pero que en realidad padecen de la enfermedad tamizada.
- **Falso positivo:** aquellos casos en los que el resultado del tamizaje es positivo, pero que en realidad no padecen de la enfermedad tamizada.
- **Invierno:** época comprendida entre el 21 de junio y el 20 de septiembre de cada año.
- **Muestra adelantada:** muestra tomada antes de las 40 horas de vida.
- **Muestra atrasada:** muestra tomada después de los 7 días de vida.
- **Valor predictivo negativo:** probabilidad de que un resultado de tamizaje negativo sea realmente negativo.
- **Valor predictivo positivo:** probabilidad de que un resultado de tamizaje positivo sea realmente positivo.
- **Verdadero negativo:** aquellos casos en los que el resultado del tamizaje es negativo y que en realidad no padecen de la enfermedad tamizada.
- **Verdadero positivo:** aquellos casos en los que el resultado del tamizaje es positivo y que en realidad padecen de la enfermedad tamizada.

- **Zona gris:** zona cercana y por debajo del valor de corte. Esta zona se produce debido a la incertidumbre de cada técnica.

## 8. CITAS BIBLIOGRÁFICAS

1. *Programa de Fibrosis Quística, G. (2012). Orientaciones Técnicas Programáticas para Diagnóstico y Tratamiento. Programa Nacional de Fibrosis Quística, Unidad de Salud Respiratoria, Subsecretaría de Redes Asistenciales, Ministerio de Salud.*
2. Wang, Y., Wrennall, J. A., Cai, Z., Li, H., & Sheppard, D. N. (2014). Understanding how cystic fibrosis mutations disrupt CFTR function: from single molecules to animal models. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 52, 47-57.
3. Proesmans, M., Cuppens, H., Vincent, M. F., Palem, A., De Boeck, C., Dierickx, K., ... & Lebecque, P. (2010). Is neonatale screening op mucoviscidose aangewezen in België?
4. Saint-Criq, V., & Gray, M. A. (2017). Role of CFTR in epithelial physiology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(1), 93-115.
5. Lina Boza, M. (2016). Fibrosis quística y tamizaje neonatal. *Neumol. pediátr. (En línea)*, 10-14.
6. Valiñas, L. P. (2013). Cribado neonatal de la fibrosis quística: eficacia/efectividad y protocolos de implementación. *Axencia de Avaliación de Tecnoloxías Sanitarias de Galicia, Consellería de Sanidade.*
7. Castellani, C., Southern, K. W., Brownlee, K., Roelse, J. D., Duff, A., Farrell, M., ... & Wilcken, B. (2009). European best practice guidelines for cystic fibrosis neonatal screening. *Journal of Cystic Fibrosis*, 8(3), 153-173.
8. Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B. S., Alon, N., & Rozmahel, R. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, 245(4922), 1066.
9. Zielenski, J., Rozmahel, R., Bozon, D., Kerem, B. S., Grzelczak, Z., Riordan, J. R., ... & Tsui, L. C. (1991). Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics*, 10(1), 214-228.
10. Linsdell, P. (2016). Anion conductance selectivity mechanism of the CFTR chloride channel. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1858(4), 740-747.
11. Lubamba, B., Dhooghe, B., Noel, S., & Leal, T. (2012). Cystic fibrosis: insight into CFTR pathophysiology and pharmacotherapy. *Clinical biochemistry*, 45(15), 1132-1144. .

12. Schmid, A., Meili, D., & Salathe, M. (2014). Soluble adenylyl cyclase in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1842(12), 2584-2592.
13. Linsdell, P. (2014). Functional architecture of the CFTR chloride channel. *Molecular membrane biology*, 31(1), 1-16.
14. CFMDB Statistics. (2019). Cystic Fibrosis Mutation Database. Revisado el 10 de septiembre de 2019. Disponible en <http://www.genet.sickkids.on.ca>.
15. The Clinical and Functional TRAnslation of CFTR (CFTR2). (2019). CFTR2 Variant List History. Revisado el 12 de septiembre de 2019. Disponible en <https://www.cftr2.org>.
16. Berdiev, B. K., Qadri, Y. J., & Benos, D. J. (2009). Assessment of the CFTR and ENaC association. *Molecular BioSystems*, 5(2), 123-127.
17. Choi, J. Y., Muallem, D., Kiselyov, K., Lee, M. G., Thomas, P. J., & Muallem, S. (2001). Aberrant CFTR-dependent HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport in mutations associated with cystic fibrosis. *Nature*, 410(6824), 94.
18. Lay-Son, G., Puga, A., Astudillo, P., Repetto, G. M., & Collaborative Group of the Chilean National Cystic Fibrosis Program. (2011). Cystic fibrosis in Chilean patients: Analysis of 36 common CFTR gene mutations. *Journal of Cystic Fibrosis*, 10(1), 66-70.
19. Wilson JMG, Jungner YG. Principles and practices of screening for disease. Geneva: World Health Organisation; 1968. Informe No.: Public. Health Paper 34.
20. Cornejo, V. (2007). Normas para el óptimo desarrollo de programas de búsqueda masiva de fenilquetonuria (PKU) e hipotiroidismo congénito (HC) y otros errores congénitos del metabolismo. Santiago, Chile: Ministerio de Salud.
21. PerkinElmer 226 Sample collection device. (2020). Retrieved 22 July 2020, from [https://newbornscreening.perkinelmer.com/products/perkinelmer\\_226\\_sample\\_collection\\_device](https://newbornscreening.perkinelmer.com/products/perkinelmer_226_sample_collection_device) .
22. MINSAL. Guía Clínica Fibrosis Quística 2012. .
23. Boza, M. L.(2017). Resultado Programa Piloto. Pesquisa Neonatal de Fibrosis Quística en la Región Metropolitana Y V Región. Período 2015 – 2017. Presentación, XIII Congreso Chileno de Neumología Pediátrica.
24. Fernández, P. (2017). Médico especialista en enfermedades respiratorias.

25. Grosse, S. D., Rosenfeld, M., Devine, O. J., Lai, H. J., & Farrell, P. M. (2006). Potential impact of newborn screening for cystic fibrosis on child survival: a systematic review and analysis. *The Journal of pediatrics*, 149(3), 362-366.
26. Tridello, G., Castellani, C., Meneghelli, I., Tamanini, A., & Assael, B. M. (2018). Early diagnosis from newborn screening maximises survival in severe cystic fibrosis. *ERJ open research*, 4(2), 00109-2017.
27. Southern, K. W., Mérelle, M. M., Dankert-Roelse, J. E., & Nagelkerke, A. D. (2009). Newborn screening for cystic fibrosis. *The Cochrane Library*.
28. Balfour-Lynn, I. M. (2008). Newborn screening for cystic fibrosis: evidence for benefit. *Archives of disease in childhood*, 93(1), 7-10.
29. Castellani, C., Duff, A. J., Bell, S. C., Heijerman, H. G., Munck, A., Ratjen, F., ... & Hodková, P. (2018). ECFS best practice guidelines: the 2018 revision. *Journal of Cystic Fibrosis*, 17(2), 153-178.
30. Crossle, J., Elliot, R. B., & Smith, P. (1979). Dried-blood spot screening for cystic fibrosis in the newborn. *The Lancet*, 313(8114), 472-474.
31. Therrell, B. L., Hannon, W. H., Hoffman, G., Ojodu, J., & Farrell, P. M. (2012). Immunoreactive trypsinogen (IRT) as a biomarker for cystic fibrosis: challenges in newborn dried blood spot screening. *Molecular genetics and metabolism*, 106(1), 1-6.
32. Sarles, J., Barthelémy, S., Férec, C., Iovanna, J., Roussey, M., Farriaux, J. P., ... & Berthézène, P. (1999). Blood concentrations of pancreatitis associated protein in neonates: relevance to neonatal screening for cystic fibrosis. *Archives of Disease i*.
33. Dequeker, E., Stuhmann, M., Morris, M. A., Casals, T., Castellani, C., Claustres, M., ... & Pignatti, P. F. (2009). Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders—updated European recommendations. *E*.
34. Sarles, J., Giorgi, R., Berthézène, P., Munck, A., Cheillan, D., Dagorn, J. C., & Roussey, M. (2014). Neonatal screening for cystic fibrosis: comparing the performances of IRT/DNA and IRT/PAP. *Journal of Cystic Fibrosis*, 13(4), 384-390.
35. Guo, B. (2017). *Screening Newborns for Cystic Fibrosis*. Alberta, Canada: Institute of Health Economics.
36. Barthelémy S, Maurin N, Roussey M, Ferec C, Murolo S, Berthe´ze`ne P, et al. Evaluation of 47,213 infants in neonatal screening for cystic fibrosis, using pancreatitis-associated protein and immunoreactive trypsinogen assays. *Arch Pediatr* 2001;8:275-81.
37. Borrajo, G. (2015). Criterios para la definición de valores de corte. Presentación, En línea.

38. Weidler, S., Stopsack, K. H., Hammermann, J., Sommerburg, O., Mall, M. A., Hoffmann, G. F., ... & Krulišová, V. (2016). A product of immunoreactive trypsinogen and pancreatitis-associated protein as second-tier strategy in cystic fibrosis newborn screenin.
39. Vernooij-van Langen, A. M., Loeber, J. G., Elvers, B., Triepels, R. H., Gille, J. J., Van der Ploeg, C. P., ... & Dankert-Roelse, J. E. (2012). Novel strategies in newborn screening for cystic fibrosis: a prospective controlled study. *Thorax*, *thoraxjnl-20*.
40. Sommerburg, O., Hammermann, J., Lindner, M., Stahl, M., Muckenthaler, M., Kohlmüller, D., ... & Hoffmann, G. F. (2015). Five years of experience with biochemical cystic fibrosis newborn screening based on IRT/PAP in Germany. *Pediatric pulmonology*, *50*(7),.
41. Paranjape, S. M., & Mogayzel, P. J. (2017). Cystic fibrosis in the era of precision medicine. *Paediatric Respiratory Reviews*.
42. Jakubson, L. (2017). Fibrosis quística y el manejo de los pacientes con diagnóstico por screening neonatal. Presentation, Auditorio Armas Cruz del Hospital San Juan de Dios.
43. Farrell, P. M., Rosenstein, B. J., White, T. B., Accurso, F. J., Castellani, C., Cutting, G. R., ... & Rock, M. J. (2008). Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *The Journ*.
44. Fibrosis Quística. (2017). Orientación en Salud. Superintendencia de Salud, Gobierno de Chile. Recuperado 20 November 2017, a partir de [http://www.supersalud.gob.cl/difusion/665/w3-article-3701.html#accordion\\_3](http://www.supersalud.gob.cl/difusion/665/w3-article-3701.html#accordion_3).
45. Duffau, B., Rojas, F., Guerrero, I., Roa, L., Rodríguez, L., Soto, M., & Sandoval, S. (2010). Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: “aspectos generales sobre la validación de métodos”. Santiago: Instituto de Salud Pública.
46. Grody, W., Desnick, R. Cystic fibrosis population carrier screening: Here at last—Are we ready?. *Genet Med* 3, 87–90 (2001). <https://doi.org/10.1097/00125817-200103000-00001>.
47. Travert, G., Heeley, M., & Heeley, A. (2020). history of newborn screening for cystic fibrosis—The early years. *International Journal of Neonatal Screening*, *6*(1), 8.
48. Castellani, C., Picci, L., Scarpa, M., Dechecchi, M. C., Zanolla, L., Assael, B. M., & Zacchello, F. (2005). Cystic fibrosis carriers have higher neonatal immunoreactive trypsinogen values than non-carriers. *American Journal of Medical Genetics Part A*, *13*.

49. Borrajo, G. (2015). Control de calidad interno y evaluación externa de calidad en pesquisa neonatal. Presentación, En línea.
50. Wilcken, B. (2007). Newborn screening for cystic fibrosis: techniques and strategies. *Journal of Inherited Metabolic Disease: Official Journal of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism*, 30(4), 537-543.
51. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (2014). Sistema de Información del Programa Poblacional de Cribado Neonatal del Sistema Nacional de Salud. España: Elena Andradás Aragonés, Vicenta María Lizarbe Alonso y María Vicenta Labrador Cañadas.
52. Therrell, B. L., Padilla, C. D., Loeber, J. G., Kneisser, I., Saadallah, A., Borrajo, G. J., & Adams, J. (2015, April). Current status of newborn screening worldwide: 2015. In *Seminars in perinatology* (Vol. 39, No. 3, pp. 171-187). WB Saunders.
53. Public Health England (2014). A Laboratory Guide to Newborn Screening in the UK for Cystic Fibrosis. UK National Screening Committee.
54. Barben, J., Castellani, C., Dankert-Roelse, J., Gartner, S., Kashirskaya, N., Linnane, B., ... & Pybus, S. (2017). The expansion and performance of national newborn screening programmes for cystic fibrosis in Europe. *Journal of Cystic fibrosis*, 16(2), 207.
55. Dankert-Roelse, J., Bouva, M., de Winter-de Groot, K., Schönbeck, Y., Gille, H., Gulmans, V. A. M., ... & Verkerk, P. (2017). WS10. 4 Performance of a four-step newborn screening strategy for CF in the Dutch screening program. *Journal of Cystic Fibrosis*, .
56. Noni, M., Katelari, A., Petrocheilou, A., Papakonstantinou, E., Loukas, I., & Doudounakis, S. E. (2016). 13 Cases of false negative cystic fibrosis newborn screening in Greece. *Journal of Cystic Fibrosis*, 15, S54.
57. Makukh, H., Myronenko, V., Bober, L., Heiner, N., Tyrkus, M., & Hnateyko, O. (2017). WS15. 6 The results of four year IRT/IRT CF-NBS screening program in four districts of Ukraine. *Journal of Cystic Fibrosis*, 16, S28.
58. Lundman, E., Gaup, H. J., Bakkeheim, E., Olafsdottir, E. J., Rootwelt, T., Storrøsten, O. T., & Pettersen, R. D. (2016). Implementation of newborn screening for cystic fibrosis in Norway. Results from the first three years. *Journal of Cystic Fibrosis*, 15(.
59. Barben, J., Castellani, C., Dankert-Roelse, J., Gartner, S., Kashirskaya, N., Linnane, B., ... & Pybus, S. (2017). The expansion and performance of national newborn screening programmes for cystic fibrosis in Europe. *Journal of Cystic fibrosis*, 16(2), 207.

## 9. ANEXOS

### ANEXO A: ENCUESTA A PAÍSES EUROPEOS

La encuesta presentada a continuación fue enviada a expertos en fibrosis quística de los siguientes países; Albania, Alemania, Andorra, Armenia, Austria, Bélgica, Bielorrusia, Bosnia y Herzegovina, Bulgaria, Chipre, Croacia, Dinamarca, Eslovaquia, Eslovenia, Escocia, España, Estonia, Finlandia, Francia, Grecia, Holanda, Hungría, Inglaterra, Irlanda, Islandia, Italia, Letonia, Lituania, Liechtenstein, Luxemburgo, Macedonia, Malta, Moldovia, Mónaco, Noruega, Países bajos, Polonia, Portugal, República Checa, Rumania, Rusia, San Marino, Serbia, Suecia, Suiza, Turquía y Ucrania.

This is a short poll about the real status of the newborn screening for cystic fibrosis in your country. The poll could be easily answered in less than 10 minutes. Please respond conscientiously, try to respond all the questions and if you don't know the answer, omit the question.

Indicate your country or region

Haga clic o pulse aquí  
para escribir texto.

Please consider “ADN” like search for a group of mutation that are more common in your country and “ADNSeq” like the sequencing of the complete *cftr* gen.

### ADMINISTRATIVE MODULE

Indicate the year of newborn screening implementation

Haga clic o pulse aquí  
para escribir texto.

Indicate the coverage of the newborn screening.

- National
- Regional
- Pilot

Which strategy use to screening cystic fibrosis? Please indicate the order in wich you use the strategies. Mention if you use additional strategies in the "other" box.

IRT	PAP	ADN	ADNSeq	Other
e.g. 1°	2°			4° Meconial elastase

Which is the money cost for each test (one test)? Please indicate the value in dollars.

IRT	PAP	ADN	ADNSeq	Other

Indicate the methodology used for the strategies (e.g. GSP® Neonatal IRT kit)

IRT	PAP	ADN	ADNSeq	Other

How many tests do you realize in average in a year? (One test = one newborn)

IRT		PAP		ADN		ADNSeq		Other	
2016	2017	2016	2017	2016	2017	2016	2017	2016	2017

### PRE-ANALYTICAL MODULE

Indicate the filter paper you use to take the sample.

Paper used
Haga clic o pulse aquí para escribir texto.

Indicate the time to sampling (average age of the baby in hours).

IRT	PAP	ADN	ADNSeq	Other

### ANALYTICAL MODULE

Indicate the time to screening (average days from sampling to test).

IRT	PAP	ADN	ADNSeq	Other

Indicate the cut-off value in each case or the criteria in case of ADN. Please indicate the unit of measurement.

IRT	PAP	ADN	ADNSeq	Other

Do you consider the station change for the cut-off? Please explain briefly how you do it.

Do you make the test once, in duplicate or in triplicate?

IRT	PAP	ADN	ADNSeq	Other

Wich external quality control you use?

IRT	PAP	ADN	ADNSeq	Other

### **POST-ANALYTICAL MODULE**

Indicate the time to diagnosis (average age of the baby in days).

IRT	PAP	ADN	ADNSeq	Other

Please indicate the coefficient of variation and the acceptable percentage of covariance.

	IRT	PAP	ADN	ADNSeq	Other
Coefficient of variation	Haga clic o pulse aquí				
Acceptable percentage	Haga clic o pulse	Haga clic o pulse aquí			

How many true positives (TP), true negatives (TN), false positives (FP), false negatives (FN) and borderline (BL) have in average in a year?

	IRT		PAP		ADN		ADNSeq		Other	
	2016	2017	2016	2017	2016	2017	2016	2017	2016	2017
T P	Haga clic o									
T N	Haga clic o									
F P	Haga clic o									
F N	Haga clic o									
B L	Haga clic o									

### ADN MODULE

If you use “ADN” for screening, please answer the following questions:

A) How many mutations you screen?

B) You make your own assay or you buy a commercial kit?

C) Which class of assay use? (Microarray, PCR, others)

## ANEXO B: INFORMATIVO PARA PADRES.



Subsecretaría de Redes Asistenciales  
División de Atención Primaria  
Unidad de Salud Respiratoria

### **Información para padres, madre y/o tutores sobre Tamizaje Neonatal en Fibrosis Quística.**

**Esta información deberá ser adjuntada en el cuaderno de salud del niño.**

#### **¿Qué es Fibrosis Quística?**

Es una enfermedad hereditaria (genética) que compromete el pulmón y los órganos digestivos (páncreas, hígado, intestino) que afecta a pocos niños en Chile que se manifiesta con mal incremento de peso, tos, diarrea, infecciones pulmonares repetidas, que van determinando daño progresivo de los pulmones.

#### **¿Por qué debe hacerse este examen?**

Para realizar el diagnóstico en forma precoz e iniciar seguimiento y cuidados a penas se confirme diagnóstico lo que lograr mejorar la calidad de vida y sobrevivencia de estos niños(as).

#### **¿En qué consiste el examen?**

Se toma una muestra de sangre del talón (la misma que para tamizaje hipotiroidismo y fenilcetonuria) y se mide tripsinógeno inmunorreactivo.

#### **¿Qué es tripsinógeno?**

Es una sustancia del páncreas (órgano abdominal) que se eleva cuando el recién nacido(a) tiene Fibrosis quística, pero también en casos de parto prematuro o partos laboriosos. Si el primer resultado es positivo, se buscará en la misma muestra de sangre la presencia de otra sustancia química que se llama Proteína Asociada a Pancreatitis.

#### **¿Qué es Proteína Asociada a Pancreatitis?**

Otra sustancia química derivada del páncreas que también aumenta en paciente con fibrosis quística.

#### **¿Si, existe presencia de Proteína Asociada a Pancreatitis, que se hace?**

El diagnóstico debe confirmarse con el especialista, con la toma de Test del Sudor que mide la cantidad de sal presente en el sudor del niño.

Si el test del Sudor está alterado, el recién nacido(a) se derivará a control con especialista broncopulmonar.

## ANEXO C: CONSENTIMIENTO INFORMADO PLAN PILOTO.



Subsecretaría de Redes Asistenciales  
División de Atención Primaria  
Unidad de Salud Respiratoria

### CONSENTIMIENTO INFORMADO “Pesquisa de Fibrosis Quística en Recién Nacidos”

Estimada(o),

La invitamos a usted a que su recién nacido(a) participe en un estudio que pretende identificar una enfermedad que se llama Fibrosis Quística, antes de que se manifiesten los síntomas, y recibir sus tratamientos lo antes posible. Es importante realizarlo en este momento ya que si se diagnostican antes de los 4 meses de vida, tienen mejor pronóstico y mayor sobrevida.

El examen se realizará con la misma muestra de sangre que se toma a todos los recién nacidos(as) para detección de Fenilquetonuria e Hipotiroidismo, y que se envía al laboratorio de pesquisa neonatal del Hospital San Juan de Dios. Se mide una sustancia que se llama Tripsinógeno Inmuno-Reactivo, que esta aumentada en recién nacidos(as) que pudieran tener Fibrosis Quística. Si el nivel de Tripsinogeno esta aumentado, en la misma muestra (NO es necesario otra muestra de sangre) se realiza medición de otra sustancia llamada proteína asociada a pancreatitis que si esta esta aumentado, será referido a un especialista para certificar el diagnóstico con la realización del Test del Sudor.

Este estudio permitirá reunir información para implementar un programa de pesquisa neonatal para todo Chile. Su participación es completamente voluntaria y sin costo. Usted puede negarse a participar o retirar su consentimiento en cualquier momento. La negativa a participar o su retiro del estudio no altera la atención de salud que requiera su recién nacido(a). Usted no recibirá compensación económica por su participación.

Los datos recolectados serán conocidos solo por el equipo que atiende a su recién nacido(a) y por los investigadores de la Unidad Respiratoria del Ministerio de Salud, quienes le entregaran la información de su recién nacido(a) a usted. Es posible que se realicen presentaciones o publicaciones de los resultados, pero en ningún caso la identidad suya o la de su recién nacido(a) será dada a conocer. Si tiene alguna duda sobre su participación en este estudio, puede contactar a: Investigadores responsables: Dra. María Lina Boza Fono: 98211566 o Dra. Rebeca Paiva Fono: 74530965 Unidad de Salud Respiratoria. Ministerio de Salud

He leído la información escrita en este formulario de Consentimiento Informado del proyecto de investigación llamado “Proyecto piloto de pesquisa de Fibrosis Quística en recién nacidos”

Nombre completo de quien autoriza: \_\_\_\_\_

Parentesco con el (la) recién nacido(a): \_\_\_\_\_

Fecha de la Firma: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Nombre persona que toma Consentimiento Informado: \_\_\_\_\_

Cargo: \_\_\_\_\_

Establecimiento : \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_ Fecha de la firma \_\_\_\_\_

## **ANEXO D: CONSENTIMIENTO INFORMADO CEC-SSMC**

Versión: Tercera versión

10 de octubre de 2019

### **CONSENTIMIENTO INFORMADO**

#### **ESTRATEGIA DE MEJORA EN LA CALIDAD DEL ALGORITMO DE LA PESQUISA NEONATAL DE FIBROSIS QUÍSTICA EN CHILE MEDIANTE LA INCORPORACIÓN DE LA DETECCIÓN DE MUTACIONES RELEVANTES EN EL GEN CFTR.**

Patrocinante: Dr. Luis Abel Quiñones Sepúlveda.  
Nombre de investigadora principal: Mg(c) Camila Alejandra Chandía Castillo  
R.U.T. de investigador principal: 18.537.350-9  
Institución de investigadora principal y patrocinante: Facultad de Medicina, U. De Chile.  
Teléfonos investigadora principal y patrocinante: 562 29770741-44.  
Correo electrónico investigadora principal: [camila.chandia.c@ug.uchile.cl](mailto:camila.chandia.c@ug.uchile.cl)  
Correo electrónico patrocinante: [lquinone@med.uchile.cl](mailto:lquinone@med.uchile.cl)

Coinvestigadora: Dra. María Lina Boza Castagliola.  
Institución coinvestigadora: Hospital Clínico San Borja Arriarán  
Teléfono coinvestigadora: 222423326  
Correo electrónico coinvestigadora: [bozaml@gmail.com](mailto:bozaml@gmail.com)

**Invitación a participar:** Estamos invitando a su hijo o hija a participar en el proyecto de investigación "ESTRATEGIA DE MEJORA EN LA CALIDAD DEL ALGORITMO DE LA PESQUISA NEONATAL DE FIBROSIS QUÍSTICA EN CHILE MEDIANTE LA INCORPORACIÓN DE LA DETECCIÓN DE MUTACIONES RELEVANTES EN EL GEN CFTR.", debido a él o ella ha sido diagnosticado(a) con fibrosis quística o ha tenido un resultado de pesquisa neonatal para fibrosis quística positivo y un test de sudor negativo.

**Objetivos:** Esta investigación tiene por objetivos mejorar la calidad de la pesquisa neonatal de fibrosis quística, para conseguir una detección más temprana de la enfermedad, lo que como consecuencia mejorará la calidad de vida y la expectativa de vida de los recién nacidos que tengan la enfermedad. El estudio incluirá a un número total de 20 pacientes y 80 controles, de diferentes hospitales o centros de salud de la Región Metropolitana y Quinta Región.

**Procedimientos:** Si Ud. acepta que su hijo o hija participe, será sometido por un período de una mañana o una tarde a los siguientes procedimientos:

1. Los análisis se realizarán a partir de la muestra en papel Guthrie tomada a su hijo o hija a las pocas horas de nacer y que se encuentra almacenada en el Laboratorio de Pesquisa Neonatal del Hospital San Juan de Dios. En caso de que la cantidad de muestra en la tarjeta sea insuficiente para los análisis, se le solicitará una nueva muestra de aproximadamente 5 gotas de sangre, la cual puede ser obtenida de una

extracción de sangre de rutina o, si es necesario, mediante una venopunción en uno de los brazos de su hijo o hija. Estas gotas serán almacenadas en un papel filtro especial, el cual va acompañado de una tarjeta con un formulario para su identificación.

2. Además, se solicitará que conteste una encuesta, donde se solicitarán datos demográficos y relacionados con la enfermedad. Esta entrevista no debería tomar más de media hora.

**Riesgos:** La venopunción puede acompañarse de los siguientes efectos indeseados: dolor en el lugar de la punción, hematoma, infección bacteriana en el lugar donde se insertó la aguja en la piel. Cualquier otro efecto que Ud. considera que puede derivarse de la venopunción, deberá comunicarlo a Luis A. Quiñones S. en el teléfono 229770741-44.

**Costos:** La venopunción para el estudio y los filtros para la muestra, serán aportados por el laboratorio CQF y el laboratorio de Pesquisa Neonatal del Hospital San Juan de Dios, sin costo alguno para Ud. durante el desarrollo de este proyecto.

Todos los incidentes que ocurran por razones ajenas al protocolo, deberán ser financiados por usted o su sistema de salud.

**Beneficios:** Su hijo o hija no recibirá ningún beneficio directo al participar en esta investigación, pero estará contribuyendo al progreso del conocimiento y ayudará a los futuros recién nacidos con fibrosis quística a recibir un diagnóstico temprano, lo que conducirá a un tratamiento temprano de la enfermedad y por lo tanto a una mejor calidad de vida y expectativa de vida.

**Alternativas:** Ud. puede decidir si su hijo o hija participa o no participar en esta investigación.

**Compensación:** Ud. no recibirá ninguna compensación económica por su participación en el estudio.

**Confidencialidad:** Toda la información derivada de su participación en este estudio será conservada en forma de estricta confidencialidad, solo se permitirá el acceso a la información a los investigadores y agencias supervisoras de la investigación. Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de la investigación será completamente anónima.

**Usos potenciales de los resultados de la investigación, incluyendo los comerciales:**

Los resultados de esta investigación podrían llevar al desarrollo de una estrategia de búsqueda de mutaciones en el gen afectado en pacientes con fibrosis quística, dicha estrategia podría ser incluida en la pesquisa neonatal de fibrosis quística actual.

**Información adicional:** Ud. o su médico tratante serán informados si durante el desarrollo de este estudio surgen nuevos conocimientos o complicaciones que puedan afectar su voluntad de continuar participando en la investigación.

**Voluntariedad:** Su participación y la de su hijo o hija en esta investigación es totalmente voluntaria y se pueden retirar en cualquier momento comunicándolo al investigador y a su médico tratante, sin que ello signifique modificaciones en el estudio y tratamiento habituales de la enfermedad de su hijo o hija. De igual manera su médico tratante o el investigador podrán determinar el retiro del estudio si consideran que esa decisión va en beneficio de su hijo o hija.

**Complicaciones:** En el improbable caso de que su hijo o hija presente complicaciones directamente dependientes de la venopunción, él o ella recibirá el tratamiento médico completo de dicha complicación, financiado por el laboratorio CQF, y sin costo alguno para Ud. o su sistema previsional. Esto no incluye las complicaciones propias de su enfermedad y de su curso natural.

**Derechos del participante:** Usted recibirá una copia íntegra y escrita de este documento firmado. Si usted requiere cualquier otra información sobre su participación en este estudio o bien conocer los resultados puede comunicarse con:

Investigador: Luis A. Quiñones S., F: 229770741-44., e-mail : [lquinone@med.uchile.cl](mailto:lquinone@med.uchile.cl)  
Autoridad de la Institución: Dr. Manuel Kukuljan P., F: (562) 2 9786400 - 2 9786401

**Otros Derechos del participante**

En caso de duda sobre sus derechos debe comunicarse con el Presidente del "Comité Ético Científico del Servicio de Salud Metropolitano Central", Dr. Emiliano Soto Romo, Teléfono: 25746900, cuya oficina se encuentra ubicada en Victoria Subercaseaux 381.

**Conclusión:**

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, otorgo mi consentimiento para que mi hijo o hija

RUT \_\_\_\_\_ participe en el proyecto "ESTRATEGIA DE MEJORA EN LA CALIDAD DEL ALGORITMO DE LA PESQUISA NEONATAL DE FIBROSIS QUÍSTICA EN CHILE MEDIANTE LA INCORPORACIÓN DE LA DETECCIÓN DE MUTACIONES RELEVANTES EN EL GEN CFTR".

---

Nombre completo del padre, madre o tutor legal.

---

Firma

---

Fecha

---

Nombre completo del Director de Institución o delegado. Art. 11 Ley 20120.

---

Firma

---

Fecha

---

Nombre completo del investigador.

---

Firma

---

Fecha

De los derechos de las personas con discapacidad psíquica o intelectual.

**Artículo 28.-** "Ninguna persona con discapacidad psíquica o intelectual que no pueda expresar su voluntad podrá participar en una investigación científica. En los casos en que se realice investigación científica con participación de personas con discapacidad psíquica o intelectual que tengan la capacidad de manifestar su voluntad y que hayan dado consentimiento informado, además de la evaluación ético científica que corresponda, será necesaria la autorización de la Autoridad Sanitaria competente, además de la manifestación de voluntad expresa de participar tanto de parte del paciente como de su representante legal. En contra de las actuaciones de los prestadores y la Autoridad Sanitaria en relación a investigación científica, podrá presentarse un reclamo a la Comisión Regional indicada en el artículo siguiente que corresponda, a fin de que ésta revise los procedimientos en cuestión".

## ANEXO E: CRF CEC-SSMC

Segunda versión  10 de octubre de 2019	<b>BASE DE DATOS</b>  Ficha de reclutamiento:	Página 1 de 2  Fecha reclutamiento:  _____  _____
--	---	---

**“Estrategia de mejora en la calidad del algoritmo de la pesquisa neonatal de Fibrosis Quística en Chile, mediante la incorporación de la detección de mutaciones en el gen CFTR”**

1. Antecedentes sociodemográficos					
Código:		Número de Folio:	Fecha de nacimiento:		
Hospital de nacimiento		Hospital de diagnóstico		Hospital tratamiento	
Observaciones:					
2. Antecedentes familiares					
Alelo paterno:				Alelo materno:	
Nacionalidad/ etnia paterna				Nacionalidad/ etnia materna	
Ancestro extranjero(a)	Parentesco			Nacionalidad/ etnia	
Ancestro extranjero(a)	Parentesco			Nacionalidad/ etnia	
Ancestro extranjero(a)	Parentesco			Nacionalidad/ etnia	
Familiar(es) con fibrosis quística	Parentesco	Fecha de screening: ____/____/____	Fecha de diagnóstico: ____/____/____	Observaciones:	
	Participación en el estudio	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO		Código:	Número de folio:
	Parentesco	Fecha de screening: ____/____/____	Fecha de diagnóstico: ____/____/____	Observaciones	
	Participación en el estudio	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO		Código:	Número de folio:
	Parentesco	Fecha de screening: ____/____/____	Fecha de diagnóstico: ____/____/____	Observaciones:	
	Participación en el estudio	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO		Código:	Número de folio:

Segunda versión 10 de octubre de 2019	BASE DE DATOS Ficha de reclutamiento:	Página 2 de 2
		Fecha reclutamiento:

3. Antecedentes enfermedad		
Screening	Resultado: Fecha: Conclusión:	
Test de sudor	Resultado: Fecha: Conclusión:	
Diagnóstico		
Información de secuenciación		
Otras observaciones		
Cumple		4. CRITERIOS DE INCLUSIÓN
Si	No	
		Pacientes pertenecientes al plan piloto de pesquisa neonatal de fibrosis quística
		Pacientes con diagnóstico confirmado fibrosis quística*
		Personas positivas para la pesquisa de fibrosis quística, pero negativas para el diagnóstico*
Deben cumplir con el primer criterio de inclusión, más uno de los criterios con *.		
Observaciones:		
¿Paciente es incluido?	Si: _____ No: _____	Código transitorio:

**ANEXO F: CENTROS INCLUIDOS EN LA PESQUISA NEONATAL DE  
FIBROSIS QUÍSTICA**

**Tabla anexa 1.** Hospitales participantes en el plan piloto de la pesquisa neonatal de fibrosis quística y sus respectivas regiones. RM: Región Metropolitana; RV: Región de Valparaíso.

Hospital	Región
Hospital Luis Calvo Mackenna	RM
Hospital Provincial de Talagante	RM
Hospital El Pino	RM
Hospital El Carmen	RM
Hospital Clínico Félix Bulnes	RM
Hospital La Florida	RM
Hospital Dr. Luis Tisné Brousse	RM
Hospital Padre Hurtado	RM
Hospital Parroquial de San Bernardo	RM
Hospital Peñaflor	RM
Hospital San José	RM
Hospital San José de Melipilla	RM
Hospital San Juan de Dios	RM

Hospital San Luis de Buin	RM
Hospital Sótero del Río	RM
Hospital Barros Luco Trudeau	RM
Hospital Claudio Vicuña	RV
Hospital Dr. Víctor Hugo Möll De Cabildo	RV
Hospital de Hanga Roa	RV
Hospital Santo Tomás de Limache	RV
Hospital de Petorca	RV
Hospital de Quilpué	RV
Hospital Adriana Cousiño	RV
Hospital San Camilo	RV
Hospital Dr. Gustavo Fricke	RV
Hospital Mario Sánchez Vergara	RV
Hospital San Agustín de La Ligua	RV
Hospital de Los Andes	RV
Hospital San Martín de Quillota	RV
Hospital Carlos van Buren	RV

## **ANEXO G: CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN**

### **Criterios de inclusión y exclusión generales**

Criterios de inclusión:

- Recién nacidos en Chile en hospitales públicos de la Región Metropolitana o Región de Valparaíso.
- Recién nacidos cuyos padres hayan decidido participar en el estudio y lo han autorizado mediante consentimiento informado.

Criterios de exclusión:

- Recién nacidos con íleo meconial (3)
- Recién nacidos con transfusiones de sangre (6)
- Recién nacidos con infecciones virales (6)
- Recién nacidos con trisomía 13 (6)
- Recién nacidos con trisomía 18 (6)
- Muestra insuficiente. No se incluyen aquellos recién nacidos cuya muestra sea clasificada como escasa, es decir, que no haya muestra suficiente para realizar el examen.
- Se excluyen aquellos niños cuyos datos están incompletos.

### **1. Recién nacidos de la Región Metropolitana y Región de Valparaíso.**

Para este grupo los criterios de inclusión y exclusión son los siguientes:

- El recién nacido debe ser hijo de madre chilena.
- El recién nacido deber tener 37 o más semanas de gestación.
- Muestras tomadas fuera de tiempo. Se excluyen aquellas muestras tomadas antes de las 40 horas de vida y aquellas muestras tomadas después de 7 días de vida.

- Tiempo de traslado excesivo. Se excluyen aquellas muestras que tienen un tiempo de traslado, desde el momento de la toma de muestra hasta la fecha de llegada al laboratorio de pesquisa neonatal, mayor a 7 días.

## **2. Recién nacidos hijos de madre extranjera.**

Para este grupo los criterios de inclusión y exclusión son los siguientes:

- El recién nacido debe ser hijo de madre extranjera. Se considera extranjera a aquellas mujeres que tienen por identificación un número de pasaporte, un RUT extranjero y aquellas mujeres nacidas en el extranjero y nacionalizadas chilenas.
- El recién nacido deber tener 37 o más semanas de gestación.
- Muestras tomadas fuera de tiempo. Se excluyen aquellas muestras tomadas antes de las 40 horas de vida y aquellas muestras tomadas después de 7 días de vida.
- Tiempo de traslado excesivo. Se excluyen aquellas muestras que tienen un tiempo de traslado, desde el momento de la toma de muestra hasta la fecha de llegada al laboratorio de pesquisa neonatal, mayor a 7 días.

## **3. Recién nacidos prematuros de 36 semanas y prematuros extremos.**

Para este grupo los criterios de inclusión y exclusión son los siguientes:

- El recién nacido debe ser hijo de madre chilena.
- El recién nacido deber tener 36 semanas de gestación para ser considerado prematuro o menos de 36 semanas de gestación para ser considerado prematuro extremo.
- Muestras tomadas en el tiempo correcto. Se incluyen solo los casos en que las muestras fueron tomadas en el tiempo correcto. Debe tomarse una muestra a los 7 días de vida para ambos casos. Para los prematuros extremos debe tomarse una muestra adicional a los 15 días de vida.

- Tiempo de traslado excesivo. Se excluyen aquellas muestras que tienen un tiempo de traslado, desde el momento de la toma de muestra hasta la fecha de llegada al laboratorio de pesquisa neonatal, mayor a 7 días.

#### **4. Recién nacidos cuya muestra tiene más de 7 días de traslado.**

Para este grupo los criterios de inclusión y exclusión son los siguientes:

- El recién nacido debe ser hijo de madre chilena
- Las muestras deben tener un tiempo de traslado, desde el momento de la toma de muestra hasta la fecha de llegada al laboratorio de pesquisa neonatal, mayor a 7 días.
- El recién nacido deber tener 37 o más semanas de gestación.
- Muestras tomadas fuera de tiempo. Se excluyen aquellas muestras tomadas antes de las 40 horas de vida y aquellas muestras tomadas después de 7 días de vida.

#### **5. Recién nacidos cuya muestra cuya muestra fue tomada antes de los 5 días de vida.**

Para este grupo los criterios de inclusión y exclusión son los siguientes:

- El recién nacido debe ser hijo de madre chilena
- Muestras tomadas fuera de tiempo. Se excluyen aquellas muestras tomadas antes de las 40 horas de vida y aquellas muestras tomadas después de 5 días de vida.
- El recién nacido deber tener 37 o más semanas de gestación.
- Tiempo de traslado excesivo. Se excluyen aquellas muestras que tienen un tiempo de traslado, desde el momento de la toma de muestra hasta la fecha de llegada al laboratorio de pesquisa neonatal, mayor a 7 días.

## ANEXO H: ALGORITMO UTILIZADO POR PAÍSES DEL MUNDO

Tabla anexa 2. Algoritmos usados por países del mundo.

País o región	Algoritmo
Austria	IRT/IRT
Eslovaquia	IRT/IRT
Grecia	IRT/IRT
Holanda	IRT/PAP/ADN/Sec
Inglaterra	IRT/ADN/IRT
Irlanda	IRT/ADN
Italia	IRT/ADN o IRT/Sec*
Liechtenstein	Tamizaje en Suiza
Mónaco	Tamizaje en Francia
Noruega	IRT/ADN "safety-net"
Polonia	IRT/Sec
Portugal	IRT/PAP/IRT
Rusia	IRT/IRT
San Marino	Tamizaje en Italia
Vojvodina (Serbia)	IRT/IRT
Ucrania	IRT/IRT

**Nota.** En todos los países el primer ensayo es el IRT. IRT/IRT: el segundo ensayo es la medición de IRT a partir de una segunda muestra. ADN: se realiza la búsqueda de un número de mutaciones determinado por cada país. Sec: secuenciación del gen *cftr*. PAP: se realiza el ensayo para determinar la concentración de PAP. "Safety net": cuando la concentración de IRT está por sobre el percentil 99.9 se realiza test de sudor. \*En Italia la estrategia depende de la firma del consentimiento informado. Fuentes: Referencias (3), (6), (51), (52), (53), (54), (55), (56), (57) y (58)

## ANEXO I: COSTOS DEL TAMIZAJE EN CHILE

**Tabla anexa 3.**

RECURSOS HUMANOS	Sueldos a pagar (m=meses)	Sueldo mensual (CLP)	Total costo en sueldos (CLP)
Tecnólogo Médico 44hr contrato desde enero	12m	1.000.000	12.000.000
Técnico Paramédico asimilado Grado 21, 44h contrato desde enero	12m	435.406	5.224.872
REACTIVOS, INSUMOS Y ADUANA	Cantidad solicitadas	Valor unitarios IVA incluido (CLP)	Total costo en reactivos (CLP)
KIT IRT Neonatal + insumos + controles y calibradores (1056 determinaciones)	60 kit	1.266.382	75.982.921
MucoPAP-f (39 determinaciones)	30 kit	544.900	16.347.000
Gasto de internación	3 veces	2.000.000	6.000.000
Consentimiento Informados FQ (50 unidades)	1.200	2.856	3.427.200
Formularios de información para padres FQ (1 unidad)	60.000	20	1.200.000
Test de Control de Calidad equipo Victor (Multilabel test plate)	1	633.080	633.080
Control de Calidad Externo Alemán Rfb (4 controles)	1	120.000	120.000
EQUIPAMIENTO Y MANTENCION EQUIPAMIENTO PAP			
Servicio Mantenición Preventiva equipo VICTOR2D™			940.998
<b>GASTO TOTAL PILOTO FQ</b>			<b>\$ 121.876.071</b>
<b>GASTO POR RECIÉN NACIDO</b>			<b>\$ 2.031</b>

**Nota:** Cotización gastos IRT y mantención de equipos en Perkin Elmer. Cotización gastos PAP en Dynabio. Cotización internación con Iván Campos. Cantidad de determinaciones de PAP corresponde al 1,6% de la población. La cotización se hizo para 60000 recién nacidos proyectados para el 2018. Los costos involucrados con la toma de muestra no fueron incluidos ya que estos están dentro del presupuesto del Programa Nacional de Pesquisa Neonatal de Hipotiroidismo Congénito y Fenilcetonuria.

**ANEXO J: POE CALIDAD ADN EXTRAÍDO DESDE SANGRE SECA EN  
PAPEL FILTRO**

**Control de calidad de ADN desde  
sangre seca**

	<b>Nombre</b>	<b>Fecha</b>	<b>Firma</b>
<b>Elaboró</b>	Camila Chandía Castillo	29/08/2019	

Propiedad de Laboratorio de Carcinogénesis Química y Farmacogenética de la  
Universidad de Chile

## **1. Objetivo**

Describir el procedimiento de control de calidad de ADN proveniente de muestras de sangre seca en papel Guthrie mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

## **2. Alcance**

Este procedimiento describe al proceso de control de calidad de ADN proveniente de muestras de sangre seca en papel Guthrie extraído en el laboratorio de Carcinogénesis Química y Farmacogenética (CQF) de la Universidad de Chile.

## **3. Responsabilidad**

Matronas o enfermeras(os): Son responsables de realizar la toma de muestra y resguardar el cumplimiento de las normas para el óptimo desarrollo de programas de búsqueda masiva de fenilquetonuria (PKU) e hipotiroidismo congénito (HC) y otros errores innatos del metabolismo (EIM).

Encargado(a) de extracción de ADN: Responsable de realizar el punchado de las muestras y la extracción de ADN según las instrucciones del kit.

Encargado de calidad de muestras de ADN: Responsable de revisar y aprobar la calidad de la extracción de ADN genómico.

## 1. Términos y definiciones

**4.1 ADN:** ácido desoxirribonucleico, es el ácido nucleico que está localizado en el núcleo celular, codifica información funcional y de desarrollo y contiene la información genética heredable de un individuo.

**4.2. Espectrofotómetro**

**4.3. Gel de agarosa:** Matriz porosa donde migrará el ADN de acuerdo a su tamaño, impulsado por un campo eléctrico.

**4.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** es una reacción que genera copias de ADN en secuencias determinadas (blanco).

**4.5. Templado de ADN:** muestra de ADN que contiene la secuencia blanco.

**4.6. Partidores:** secuencias cortas de ADN de una hebra que son complementarias a la secuencia blanco.

**4.7. ADN polimerasa:** enzima que sintetiza nueva hebra de ADN complementaria en una reacción de PCR.

**4.8. Nucleótidos de ADN (dNTPs o trifosfatos deoxinucleotidos):** nucleótidos utilizados para la síntesis de ADN desde el final del partidor.

**4.9. Amplicon o producto de PCR:** trozo de ADN que es fuente y/o producto de amplificación artificial o natural del ADN.

## 1. Actividades del procedimiento

### 5.1 Cuantificación y grado de pureza

#### 5.1.1 Materiales, reactivos y equipos:

- ✓ Espectrofotómetro DeNovix DS-11
- ✓ Agua nanopura
- ✓ Pipeta p10
- ✓ Puntas p10
- ✓ Papel kimwipes
- ✓ Muestras

**Nota:** Para este procedimiento las muestras deben estar correctamente identificadas y ordenadas en una gradilla.

#### **Espectrofotómetro DeNovix DS-11:**

Este equipo, entre muchas de sus funciones, permite cuantificar y determinar el grado de pureza de los ácidos nucleicos de manera eficaz usando un volumen muy pequeño de la muestra (1,1  $\mu\text{L}$ ).

#### 5.1.2 Instructivo de uso equipo DeNovix DS-11:

5.1.2.1 Limpiar el lector con agua destilada y secar con papel kimwipes antes de realizar las mediciones

Encender el equipo DeNovix (el interruptor esta por detrás). En la pantalla del escritorio del PC, seleccionar el icono “dsADN”

Cargar 1  $\mu\text{L}$  de agua nanopura en el lector o el reactivo de elución correspondiente al kit de extracción, luego presionar el botón “blanco” que aparece en la pantalla. A continuación, limpiar nuevamente y cargar 1  $\mu\text{L}$  de muestra, presionar el botón “lectura” que aparece en la

pantalla. Realizar un duplicado de la lectura de la muestra y repetir con todas las muestras los pasos de limpieza y lectura. Los resultados de la medición serán exportado en una tabla Excel, la cual puede ser compartida mediante correo electrónico.

### 5.1.2 Interpretación de los resultados.

Ac. Nucleico	Relación abs	Resultado	Interpretación
ADN	260/280	> 2.1	Contaminacion con restos de ARN
		1.8 – 2.0	ADN de pureza óptima
		1.6 – 1.8	ADN de pureza aceptable
		< 1,6	Presencia de compuestos aromáticos

Una cuantificación varía de acuerdo a la cantidad celular presente en la muestra, método de extracción y matriz. Para muestras de ADN extraído desde sangre seca, la concentración mínima esperada es de 50 ng/uL, para ser posteriormente analizada.

## 5.2. Gel de integridad

### 5.2.1. Materiales, equipos y reactivos

- ✓ Muestras
- ✓ Microondas.
- ✓ Camara de electroforesis.
- ✓ Peines de la camara de electroforesis.
- ✓ Buffer TAE 1X
- ✓ Parafilm
- ✓ Gel Red
- ✓ Gradilla para tubos eppendorf
- ✓ Micropipeta p10
- ✓ Puntas p10

- ✓ Marcador de peso molecular de 1kb Hyperladder
- ✓ Buffer de carga para electroforesis
- ✓ Marcador de ADN "Gel red" en dilución 1:100.
- ✓ Agarosa en polvo para biología molecular.
- ✓ Transiluminador
- ✓ Cámara fotográfica

### 5.2.1. **Gel y electroforesis**

5.2.1.1. Para la preparación del gel se dispone de agarosa en polvo, por lo tanto, para preparar agarosa al 0.8% se deben disolver 0,4 gramos en 50mL de Buffer TAE. Para disolver completamente, calentar la solución en el microondas a temperatura media alta por 2 minutos, evitar la ebullición de la solución.

Preparar la cámara de electroforesis, sin conectar los cables. Esperar que la solución del gel se enfríe un poco (la temperatura ideal de la solución es cuando se hace soportable en la mano o el dorso de la muñeca). Una vez alcanzada la temperatura, vaciar en el molde con cuidado y sin generar burbujas. Colocar el peine en la posición que corresponde y esperar que la agarosa solidifique (esto se notará cuando la agarosa se vea opalescente). Una vez gelificada la agarosa, retirar el peine, colocarla en la cámara de los electrodos, y agregar buffer TAE 1X, hasta sobrepasar el nivel del gel.

5.2.2.2. Se debe cargar al gel por cada pocillo 5  $\mu$ L de muestra, más 1  $\mu$ L de buffer de carga y 1  $\mu$ L GelRed. Preparar en un tubo eppendorf estéril cada muestra y mezclar con los reactivos mencionados mediante pipeteo suave.

En el primer pocillo se debe cargar 5 uL del ladder como control de peso molecular y en los siguientes pocillos cargar las muestras según el orden predeterminado.

Tapar la cámara con la tapa, y conectar los cables, recordar que la dirección de la corrida es del polo negativo (cátodo -cable

1.1.1.2. negro-) al polo positivo (ánodo -cable rojo-). Conectar los cables a la fuente de poder, cada cable con su color. Ajustar el voltaje en 70V y el tiempo en 50 min. Presionar el botón "start" de la fuente de poder para comenzar la electroforesis. Observar el burbujeo en el extremo inferior de la cámara, lo que indica el correcto flujo de corriente. Observar el frente de migración marcado por el buffer de carga, y considerar unos 8 a 10 cm de migración al momento de terminar la corrida. Cuando termine la corrida, se debe apagar la fuente de poder y retirar los cables de la cámara.

1.1.2. **Observación del gel de agarosa 0.8% con GelRed en transiluminador**

5.2.3.1. Sacar el gel con mucho cuidado de no romperlo durante la manipulación y dejarlo en el transiluminador. Observar que las bandas en el gel hayan quedado correctamente teñidas e interpretar y asignar puntaje.

La integridad de la purificación se observa como una banda gruesa al principio de la migración, con un tamaño de 20-25 Kb. Lo que indica buena integridad del ADN y la muestra. Un patrón de migración degradada, con una difuminado o "smear", indica mala integridad del ADN por lo tanto mala muestra.

**Tabla 1.** Asignación de puntaje para interpretación y registro de la integridad.

<b>Patron migratorio en el gel de agarosa.</b>	<b>Puntuación</b>	<b>Interpretación</b>
Banda definida > 1000 pb	<b>3</b>	Óptima
Banda “ <i>smear</i> ” menos definida alrededor de 1000 pb a 800 pb	<b>2</b>	Aceptable
Banda “ <i>smear</i> ” menos definida alrededor de 800 pb a 200 pb	<b>1</b>	Deficiente, definir con análisis de PCR housekeeping
Desaparición de “ <i>smear</i> ” en pesos moleculares medios-altos y/o aparición de “ <i>smear</i> ” bajo los 200 pb	<b>0,5</b>	Integridad no aceptable, definir con análisis de PCR housekeeping

### **5.3 Control de calidad mediante la reacción de PCR**

#### **5.3.1 Equipamentos y materiales**

- ✓ Vortex
- ✓ Microcentrifuga
- ✓ Micropipeta p10, p20 y p200.
- ✓ Partidores para los genes GADPH, B-actina y globina (Ver anexo).
- ✓ Enzima ADN polimerasa “MyTaq” marca Bioline.
- ✓ Buffer enzima ADN Polimerasa “MyTaq” marca Bioline.
- ✓ Agua nanopura
- ✓ Marcador de peso molecular de 100 pb Hyperladder.
- ✓ Buffer de carga para electroforesis
- ✓ Buffer de carga TBE 1x y 10x.
- ✓ Marcador de ADN “Gel red” en dilución 1:100.
- ✓ Agarosa en polvo para biología molecular.
- ✓ Campana Pre-PCR

### 5.3.1 Amplificación del ADN

Limpiar de manera intensa la cabina de Pre-PCR de acuerdo a las instrucciones de uso y disponer los reactivos utilizados bajo campana de bioseguridad (excepto la MyTaq y las muestras de ADN).

En tubos estériles eppendorf de 1,5 ml preparar el mix de PCR con los siguientes componentes y mezclar utilizando vortex durante 30 segundos. Considerar que esto es un PCR múltiplex, por lo que todos los pares de primers se incorporan en el mix de PCR.

Para 1 muestra:

- ✓ H<sub>2</sub>O nanopura 21,4 µl
- ✓ Buffer MyTaq 5 µl
- ✓ Primer Forward 0,2 µl por cada primer de los genes housekeeping
- ✓ Primer Reverse 0,2 µl por cada primer de los genes housekeeping

**Nota:** multiplicar este contenido por la cantidad muestras que procesará más 1 muestra adicional (por pérdida del Mix de PCR en el siguiente paso).

En un tubo de 0,2 ml eppendorf agregar la cantidad de 2 µl de ADN y 28 µl de Mix de PCR y agitar mediante vortex durante 30 segundos.

Agregar a cada tubo la cantidad de 0,4 µl de la enzima MyTaq, mezclar con punta de micropipeta y agitar en vortex brevemente (5 segundos). Realizar spin down y disponer en termociclador.

**Nota:** la enzima MyTaq es sensible a la agitación excesiva y al aumento de temperatura. Por lo tanto, **sacar desde el congelador a -20°C sólo en este paso** y agitar en vortex brevemente antes de usar.

Realizar PCR mediante el uso de termociclador con las siguientes condiciones generales:

Paso	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
1	94 °C	30 segundos	1
2	94 °C	30 segundos	35
3	64 °C	30 segundos	
4	72 °C	30 segundos	
5	72 °C	5 minutos	1

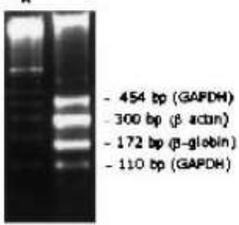
Una vez completo el programa de PCR, congelar el producto de PCR a -20°C.

### 5.3.1 Electroforesis y visualización.

Para la preparación del gel se dispone de agarosa en polvo, por lo tanto, para preparar agarosa al 2% se debe disolver 1 gramo en 50mL de Buffer TAE. Repetir las instrucciones del punto 5.2.2., modificando el voltaje y el tiempo de corrida a 90 volts y 1,5 horas. En esta oportunidad se debe utilizar el Hyperladder de 100kb como control de peso molecular.

Repetir las instrucciones del punto 5.2.3.1 y asignar puntaje según la tabla 2.

**Tabla 2.** Asignación de puntaje para interpretación y registro del PCR Housekeeping.

Banda de amplicon	Peso molecular	Gen de amplicon	
	I	454 pb	GAPDH
	II	300 pb	B-actina
	III	172 pb	B-globina
	IV	110 pb	GAPDH
	<b>Amplicones positivos.</b>	<b>Interpretación</b>	
	4	Óptima	
	3 - 2	Aceptable	
	1	Deficiente, definir con análisis de integridad	
	0	Integridad no aceptable	

Ref: Stefanoff CG et al. Diagn Mol Pathol. 2003 Jun;12(2):79-87.

## 6. Referencias

1. Stefanoff, C. G., Hassan, R., Gonzalez, A. C., Andrade, L. A. B., Tabak, D. G., Romano, S., & Zalberg, I. R. (2003). Laboratory strategies for efficient handling of paraffin-embedded tissues for molecular detection of clonality in non-hodgkin lymphomas. *Diagnostic Molecular Pathology*, 12(2), 79-87.
2. Hardin, J., Finnell, R. H., Wong, D., Hogan, M. E., Horovitz, J., Shu, J., & Shaw, G. M. (2009). Whole genome microarray analysis, from neonatal blood cards. *BMC genetics*, 10(1), 38.

## 7. Anexos: Partidores diseñados para control de calidad.

GAPDH-7

Sequence: ATG CCA GTG AGC TTC CCG TTC AGC

GAPDH-6

Sequence: GTA TCG TGG AAG GAC TCA TG

bactin-AS-Reverse

Sequence: CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G

bactin-S-Forward

Sequence: TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A

globin-AS-Reverse

Sequence: TAT TGG TCT CCT TAA ACC TGT CTT G

globin-S-Forward

Sequence: TTC TGA CAC AAC TGT GTT CAC TAG C

GAPDH-AS-Reverse

Sequence: AGT CCC AGG GCT TTG ATT TG

GAPDH-S-Forward

Sequence: CAT CCC TTC TCC CCA CAC AC