

Normalización del UMELISA TSH NEONATAL® a discos de 3 mm

Darlenis Herrera Vallejera, Ernesto Carlos González Reyes, Pedro Lucio Pérez Moras y Amarilys Frómata Suárez.

Laboratorio de Pesquisa Neonatal, Centro de Inmunoensayo, Calle 134 y Avenida 25, Apartado Postal 6653, Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 15 de marzo de 2005. Aceptado: 18 de noviembre de 2005.

Palabras clave: hipotiroidismo congénito, TSH, discos de 3 mm, pesquisa neonatal.
Key words: congenital hypothyroidism, TSH, 3 mm discs, neonatal screening.

RESUMEN. El hipotiroidismo congénito (HC), reconocido como la causa más frecuente de retraso mental evitable en la infancia, es una enfermedad heredo metabólica con una incidencia mundial de 1 : 4 000. La detección precoz y el inicio de una terapia temprana evita el retardo en el crecimiento y en la maduración ósea, lográndose un desarrollo psicomotor normal en los niños. La disponibilidad de ensayos para la determinación de las hormonas T4 y de estimulación de la tiroides (HET) ha permitido el establecimiento de programas de pesquisa neonatal del HC. En el Centro de Inmunoensayo se desarrolló el UMELISA TSH NEONATAL®, ensayo para la determinación de la HET en muestras de sangre seca sobre papel de filtro de recién nacidos. En este ensayo, se emplean discos de 5 mm de las muestras, calibradores y un control. Con el incremento del número de enfermedades a diagnosticar en los programas de pesquisa, es necesario aprovechar al máximo las muestras de sangre colectadas en papel de filtro. En este trabajo, se describen las modificaciones realizadas al UMELISA TSH NEONATAL® que permiten el empleo de discos de 3 mm. Se obtuvieron perfiles de precisión entre 7,0 y 10,4 % y una exactitud relativa del 96,3 %. El límite de detección es de 1 mUI/L. El ensayo modificado mostró una buena correlación lineal con el UMELISA TSH NEONATAL® ($r = 0,9$). Las modificaciones realizadas al ensayo no afectan su sensibilidad, precisión y exactitud, por lo que puede ser empleado en la pesquisa neonatal del hipotiroidismo congénito.

ABSTRACT. Congenital hypothyroidism (CH), known as one of the most frequent inherited-metabolic diseases in the world and the cause of avoidable mental retardation in children, has a worldwide incidence of 1 : 4 000. Developmental delay and bone's maturity is avoided by an early diagnosis and the beginning of a rapid treatment, obtaining a normal psychomotor development in children. The availability of assays to determine T4 and thyroid stimulating hormones (TSH) might be implemented on neonatal screening programs of congenital hypothyroidism. Immunoassay Center developed the UMELISA TSH NEONATAL® to determine neonatal TSH levels in dry blood on filter paper. This assay uses 5 mm discs in samples, standards and control. The number of diseases to diagnose in Neonatal Screening Programs has increased, that is why it is necessary the maximum use of samples of blood collected in filter paper, using 3 mm discs in many assays. The current work shows the modification performed to UMELISA TSH NEONATAL®. These changes allow the use of 3 mm discs. The authors obtain precision profiles among 7.0, 10.4 and 96.3 % of relative accuracy. The sensitivity is 1 mUI/L. The modified assay shows a good linear correlation and accuracy with the UMELISA TSH NEONATAL® ($r = 0.9$). That modification does not affect the sensitivity, precision and accuracy of UMELISA TSH NEONATAL® that is why it can be used in neonatal screening of congenital hypothyroidism.

INTRODUCCION

El hipotiroidismo congénito (HC) es una enfermedad heredo metabólica, reconocida como la causa más frecuente de retraso mental evitable en la infancia y se caracteriza por el déficit en la producción o utilización de las hormonas tiroideas, causada por la ausencia anatómica o funcional de la tiroides. El HC presenta una incidencia mundial de 1 : 4 000,¹⁻⁵ en nuestro país es aproximadamente de 1 : 3 000.^{6,7}

Los pacientes no tratados pueden presentar retardo en el crecimiento y en la maduración ósea, así como una disminución de la actividad metabólica basal de los neonatos.¹ La detección precoz y el inicio de una terapia temprana con hormonas tiroideas evita que se produzcan estas afectaciones, lográndose un desarrollo psicomotor normal en los niños.⁸

La disponibilidad de ensayos para la determinación de las hormonas T4 y de estimulación de la tiroides ha permitido establecer programas de pesquisa en varios países para detectar los recién nacidos con T4 baja o HET elevada. La mayoría de estos programas utilizan la HET como determinación primaria en los de pesquisa neonatal, lo que ha permitido que su relación costo/beneficio se vea favorecida al disminuir el número de falsos positivos.⁹

El UMELISA TSH NEONATAL® fue diseñado para la determinación de las concentraciones de HET en sangre de talón, utilizando discos de

sangre de 5 mm de diámetro.¹⁰ Actualmente, con el incremento del número de ensayos en los programas de pesquisa neonatal, existe la tendencia a realizar estas pruebas usando discos de sangre de menor diámetro para lograr un mejor aprovechamiento de las muestras.

El objetivo de este trabajo fue la normalización de un ensayo para cuantificar las concentraciones de HET en discos de 3 mm de sangre seca sobre papel de filtro, con la calidad analítica requerida; que fuera comparable con los resultados del UME-LISA TSH NEONATAL[®], actualmente empleado en la red de laboratorios de varios países latinoamericanos.

MATERIALES Y METODOS

Disoluciones de trabajo

De conjugado prediluido del UME-LISA TSH NEONATAL[®] (disolución A). Dilución intermedia del conjugado anti- α -HET-fosfatasa alcalina en disolución reguladora Tris-BSA, ZnCl₂ 1,25 mol/L, NaN₃ 3 mmol/L, pH = 8.

De conjugado pre-diluido del ensayo modificado (disolución B). Dilución intermedia del conjugado anti- α -HET-fosfatasa alcalina en disolución reguladora Tris-BSA, ZnCl₂ 1,25 mol/L, NaN₃ 3 mmol/L, Tween 20, pH = 8.

De conjugado listo para el uso del ensayo modificado (disolución C). Conjugado anti- α -HET-fosfatasa alcalina en disolución reguladora Tris-BSA, ZnCl₂ 1,25 mol/L, NaN₃ 3 mmol/L, Tween 20, suero de carnero 0,3 %, pH = 8.

De lavado (disolución D). Disolución reguladora Tris-HCl 0,37 mol/L, NaCl 3,76 mol/L, Tween 20, pH = 8.

Equipos y accesorios

El lector de placas fluorímetro-fotómetro PR-521, el lavador automático de placas de Ultra MicroELISA, MAS-301, el perforador de mano P-51 para discos de 3 y 5 mm de diámetro han sido desarrollados y producidos en el Centro de Inmunoensayo.

Anticuerpos monoclonales anti- β -HET

Fueron empleados dos anticuerpos monoclonales que reconocen sitios diferentes de la cadena β de la HET. Estos anticuerpos se purificaron por cromatografía de afinidad en proteína A-Sepharose CL-4B.¹⁰ Las placas de poliestireno de 96 posiciones con capacidad máxima de 30 μ L,

(Greiner, Alemania), fueron sensibilizadas con estos anticuerpos a concentraciones de 10 μ g/mL.

Conjugado anti- α -HET-fosfatasa alcalina

El antisuero policlonal específico anti- α -HET fue obtenido en carnero. Según el esquema de inmunización empleado, los animales se inmunizaron con una mezcla de HET comercial homogenizada con adyuvante completo e incompleto de Freund. Los anticuerpos específicos anti cadena α se purificaron por cromatografía de afinidad en AH Sepharose 4B¹⁰ y se unieron covalentemente a la enzima fosfatasa alcalina mediante una reacción con glutaraldehído en un paso, según el procedimiento descrito por Avrameas.¹¹

Preparación de calibradores y control en sangre seca sobre papel de filtro

Los calibradores y el control empleados en el ensayo, fueron preparados con sangre humana proveniente de los Bancos de Sangre de Ciudad de La Habana, negativa a las pruebas de detección de anti-VIH 1 + 2, HBsAg y anti-VHC. Los eritrocitos fueron lavados con disolución de NaCl 0,85 %. Se realizaron tres centrifugaciones a 4 °C durante 5 min a 1 235 g hasta que se eliminó la interfase salina-sangre. Posteriormente, se realizó la determinación analítica del hematocrito por centrifugación en tubo capilar, durante 5 min a 2 470 g a 25 °C. La masa de eritrocitos se ajustó al 55 % con suero humano con bajas concentraciones de HET. Los calibradores fueron preparados con HET comercial a concentraciones de 10, 25, 50, 100 y 200 mUI/L y el control del ensayo a una concentración de 20 mUI/L. Después, fueron aplicados sobre papel de filtro Schleicher and Schuell 903. Los calibradores y el control fueron calibrados frente al patrón internacional de HET humana para inmunoensayos (segunda preparación de referencia 80 558) de la OMS.¹²

Procedimiento de trabajo del UME-LISA TSH NEONATAL[®]

Fueron cortados discos de 5 mm de las manchas de sangre seca empleando el perforador de mano P-51, se depositaron en las placas de elución y se adicionaron 70 μ L de la disolución de elución (Dilución 1 : 21 de disolución A en otra de suero de carnero preparada al 5 % con disolución D). Se incubaron las placas de elución durante 1 h a temperatura

ambiente (20 a 25 °C) en cámara húmeda. Posteriormente, se transfirieron 10 μ L del eluato hacia la placa de inmunoreacción y se incubaron durante 2 h a 37 °C en cámara húmeda. Se realizaron seis ciclos de lavado con disolución D, para eliminar los componentes no fijados. Se procedió al revelado de la reacción inmunoenzimática mediante la incubación del sustrato fluorescente 4-metilumbeliferilfosfato durante 30 min a 23 °C en cámara húmeda con lo que se obtuvo el producto fluorescente 4-metilumbeliferona. La intensidad de la fluorescencia emitida fue proporcional a la concentración de HET presente en la muestra y fue medida en el lector de placas fluorímetro-fotómetro PR-521.

Procedimiento de trabajo del ensayo modificado para discos de 3 mm

Procedimiento de elución con disolución B. Fueron cortados discos de 3 mm en las manchas de sangre seca sobre papel de filtro. A cada disco se le adicionaron 40 μ L de la disolución de elución (dilución 1 : 21 de la disolución B en otra de suero de carnero preparada al 5 % con disolución D).

Procedimiento de elución con disolución C. Fueron cortados discos de 3 mm en las manchas de sangre seca sobre papel de filtro. A cada disco se le adicionaron 40 μ L de la disolución C.

En ambos procedimientos, las placas de elución se incubaron durante 30 min en cámara húmeda a temperatura ambiente. A partir de este paso, se siguió con el mismo procedimiento de trabajo del ensayo que emplea discos de 5 mm.

Pruebas para la optimización del ensayo

Para la determinación de los coeficientes de variación (CV) intra e inter-ensayo y los porcentajes de recobrado, se evaluaron controles a los que se añadieron cantidades conocidas de HET. Se evaluó el paralelismo del ensayo mediante diluciones seriadas, con sangre cuyas concentraciones de HET fueron inferiores a 1 mUI/L, a tres muestras con elevados contenidos de HET. Cada muestra se evaluó en tres ensayos independientes. Las concentraciones obtenidas para cada dilución se corrigieron multiplicando por el factor de dilución.

Para calcular el límite de detección del ensayo se evaluó el calibrador de concentración 0 (n = 240). A la fluorescencia media obtenida se le adicionaron tres desviaciones

estándar y el resultado se interpoló en la curva de calibración, lo que permitió obtener la concentración equivalente al límite de detección.

Determinación de las concentraciones de HET en muestras de sangre seca sobre papel de filtro

Fueron determinadas las concentraciones de HET en 1 843 muestras de sangre seca sobre papel de filtro de recién nacidos. Las muestras, provenientes del programa cubano de detección de la fenilcetonuria, fueron colectadas entre el quinto y séptimo días de nacidos y evaluadas en el UMELISA TSH NEONATAL® y en el ensayo modificado para discos de 3 mm. Se estableció la correlación entre ambos ensayos.

Pruebas de estabilidad

Para verificar la estabilidad en el tiempo de las disoluciones de conjugado pre-diluido y listo para el uso del ensayo modificado, se prepararon tres lotes de cada reactivo, los que fueron sometidos durante un año a un estudio de estabilidad en vida de estante (2 a 8 °C). Para realizar el gráfico de estabilidad, se calcularon los porcentajes de recuperación (R) del conjugado a través de la expresión siguiente:

$$R = \frac{F_{Conj.(Tiempo\ estabilidad)}}{F_{Conj.(Tiempo\ 0)}} \cdot 100 \text{ (\%)}$$

donde:

$F_{Conj.(Tiempo\ estabilidad)}$ Fluorescencia promedio de los lotes del conjugado en estudio.

$F_{Conj.(Tiempo\ 0)}$ Fluorescencia promedio de los lotes de conjugado en tiempo inicial del estudio.

RESULTADOS

Con ambos procedimientos de elución en el ensayo modificado (disoluciones B o C), se obtuvo un comportamiento similar por lo que solo se muestran los resultados con el procedimiento de elución con la disolución B (Fig. 1).

Se observó un incremento de la fluorescencia en relación con la concentración de HET que asociado a una buena precisión intra-ensayo permite una adecuada sensibilidad analítica. La determinación de la concentración de HET en las muestras se efectuó por interpolación en la curva de calibración. El intervalo útil de la curva fue de 10 a 200 mUI/L de sangre y el modelo matemático se ajustó a una función *spline* cúbica, similar a la obtenida con el UMELISA TSH NEONATAL® que emplea discos de 5 mm.¹⁰

La relación lineal ante la respuesta a bajas concentraciones de HET permitió estimar que la concentración mínima detectable es de 1 mUI/L, teniendo en cuenta la fluorescencia del calibrador 0 + 3 desviaciones estándar.

Precisión y exactitud

Se evaluaron controles preparados a concentraciones de HET que abarcaron un amplio intervalo de la curva de calibración del ensayo. Se obtuvieron coeficientes de variación intra-ensayo inferiores al 8 % y coeficientes de variación inter-ensayo por debajo de 10,5 % (Tabla 1). Al evaluar los controles a los que se añadieron cantidades conocidas de HET, el recobrado medio fue de (96,3 ± 4,1) % y los porcentajes individuales oscilaron entre 93 y 101 % (Tabla 2).

Ensayo de paralelismo

Se realizaron diluciones seriadas a muestras de sangre, con elevadas concentraciones de HET, se dispensaron en tarjetas de papel de filtro Scheicher and Schuell 903 y se evaluaron en el ensayo. Se obtuvieron curvas paralelas al eje de las abscisas (Fig. 2). Las concentraciones calculadas después de la corrección con el factor de dilución fueron de ± 3,2 % de la concentración original en la muestra pura.

Determinación de las concentraciones de HET en muestras sangre seca sobre papel de filtro

Al evaluar la correlación (n = 1 843) entre el ensayo modificado para discos de 3 mm y el UMELISA TSH NEONATAL® (Fig. 3) se obtuvo la ecuación de regresión: $y = 0,875x + 0,094$.

Tabla 1. Coeficientes de variación intra- e inter-ensayo correspondientes a la determinación de la precisión del ensayo.

TSH (mUI/L)	Intra-ensayo (n = 16)		Inter-ensayo (n = 10)	
	DE	CV (%)	DE	CV (%)
20,2	1,6	7,9	2,1	10,4
62,9	4,4	7,0	5,8	9,2
94,7	7,1	7,5	8,7	9,2

DE Desviación estándar. CV Coeficiente de desviación.

Tabla 2. Recobrados correspondientes a la determinación de la exactitud del ensayo.

Valor esperado (mUI/L)	Valor obtenido (mUI/L)	Recobrado (%)
20,2	20,4	101,0
62,9	58,6	93,2
94,7	89,7	94,7

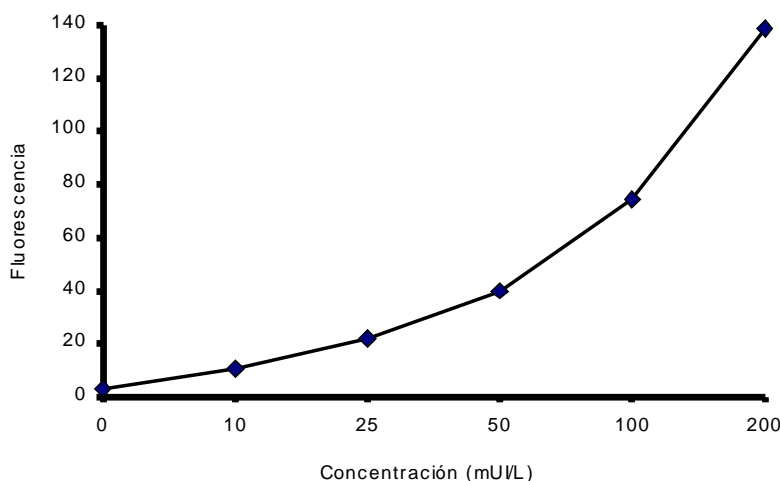


Fig. 1. Curva de calibración obtenida con el UMELISA TSH NEONATAL® modificado para discos de 3 mm de sangre seca sobre papel de filtro.

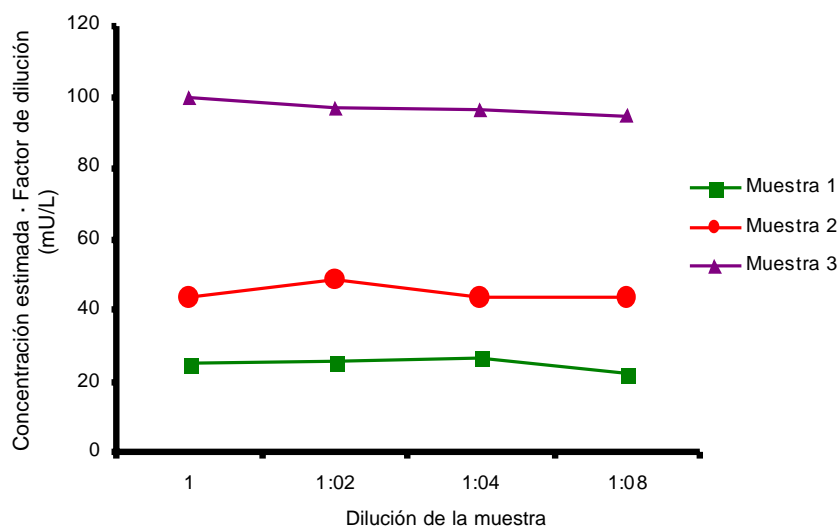


Fig. 2. Resultados correspondientes al ensayo de paralelismo del UMELISA TSH NEONATAL® para discos de 3 mm .

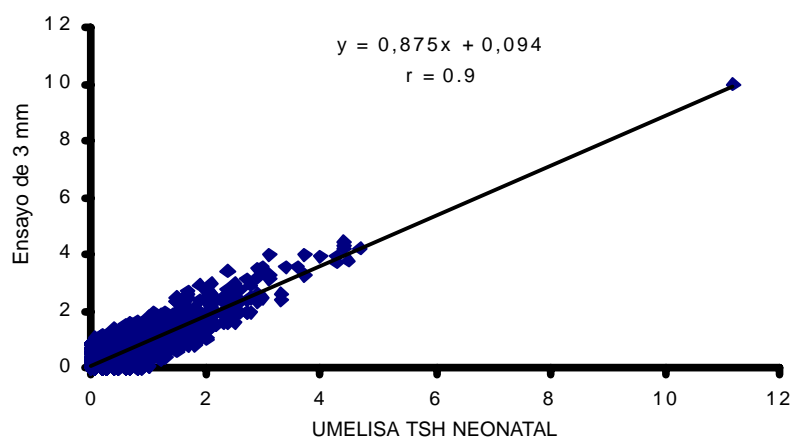


Fig. 3. Correlación del ensayo modificado para discos de 3 mm y el UMELISA TSH NEONATAL®.

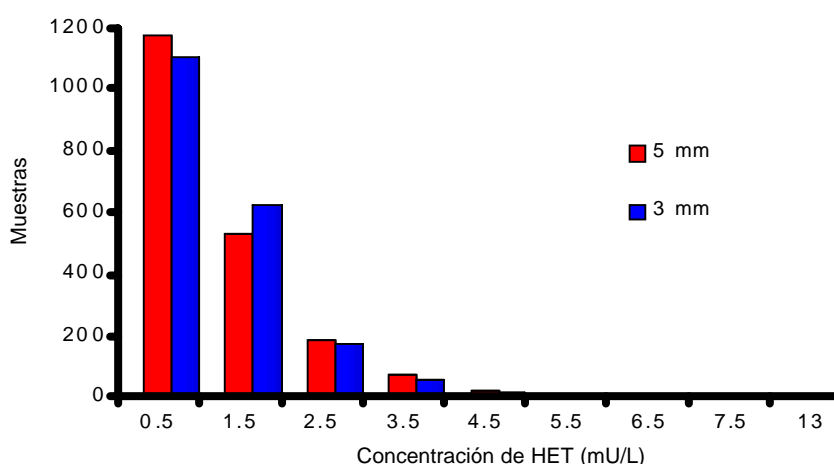


Fig. 4. Distribución de las concentraciones de HET en sangre seca sobre papel de filtro obtenidas en el ensayo modificado para discos de 3 mm y el UMELISA TSH NEONATAL®.

En esta ocasión, se pudo determinar la presencia de una muestra con una concentración de HET por encima de 10 mUI/L (valor de corte em-

pleado para las muestras de talón). Tal elevado resultado se corroboró con el UMELISA TSH NEONATAL®. Al evaluar las muestras en el UME-

LISA TSH NEONATAL® y en el ensayo modificado para discos de 3 mm, en ambos casos se obtuvieron patrones de distribución similares (Fig. 4).

Pruebas de estabilidad

Se comprobó que los lotes de la disolución de conjugado pre-diluido fueron estables durante 12 meses, pues los porcentajes de recuperación estuvieron por encima del 88 % (Fig. 5). En el caso de la disolución de conjugado listo para el uso, se observó que a partir de los 8 meses de almacenamiento, se obtienen fluorescencias inferiores en un 20 % a las obtenidas al inicio del estudio. Para los objetivos del trabajo, fue más factible emplear la disolución de conjugado pre-diluido por su mayor estabilidad en el tiempo.

DISCUSION

Actualmente, existen muchos métodos para determinar hipotiroidismo congénito, ya sea por determinación de T4 (para confirmar los casos positivos se realiza la cuantificación de HET) o de HET (para confirmar los casos elevados evaluar la T4), siendo esta última la vía más utilizada.¹³⁻¹⁵ Ambas hormonas pueden detectarse en suero humano o sangre seca sobre papel de filtro siendo esta última la modalidad más usada internacionalmente en la pesquisa neonatal.¹⁶

La determinación de las concentraciones de HET en el período neonatal y los estudios que han evaluado las funciones cerebrales de los niños hipotiroideos tratados precozmente, muestran la importancia de la implementación de estos programas en muchos países, ya que se ha logrado que lo niños aquejados de la enfermedad presenten un rendimiento intelectual normal, pudiendo cursar y vencer los niveles académicos correspondientes a su edades. También ha permitido un crecimiento y desarrollo acorde a sus edades.¹⁷

Con la modificación del UMELISA TSH NEONATAL® para discos de 3 mm de sangre seca sobre papel de filtro, se logra un mejor aprovechamiento de la muestras, lo que posibilita su empleo en el diagnóstico de otras enfermedades incluidas en los programas de pesquisa neonatal.

El ensayo modificado presenta un tiempo de duración de 3 h y un límite de detección de 1 mUI/L de HET, lo que permite cuantificar cantidades mínimas de esta hormona y favorecer de este modo, la sensibilidad del ensayo.

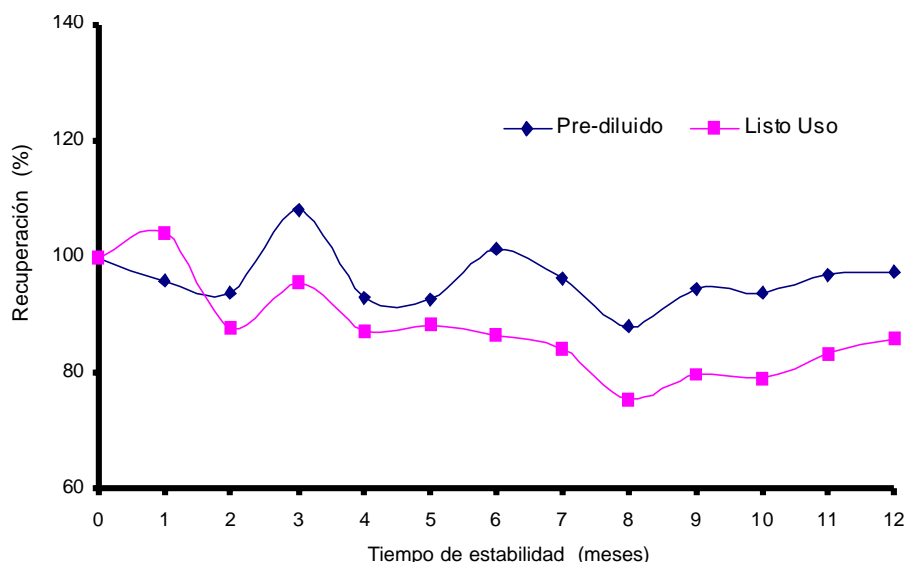


Fig. 5. Estudio de estabilidad a tiempo real de las disoluciones de conjugado pre-diluido y listo para el uso.

El ensayo presenta una aceptable precisión con coeficientes de variación intra-ensayo menores del 8 % y coeficientes de variación inter-ensayo inferiores al 10,5 %. Se logra detectar con exactitud al analito en cuestión y no a otras hormonas que presentan en su estructura una cadena α similar a la encontrada en la HET. Los resultados de las pruebas de recuperación indican que muestras de sangre cuya concentración de HET se encuentren dentro del intervalo de estimación del ensayo pueden medirse con una eficiencia de recobrado del 96,3 %. Con el ensayo de paralelismo se logró demostrar la exactitud y reproducibilidad del ensayo, con lo que se obtuvieron en todos los casos concentraciones similares a las de las muestras puras, al multiplicar por el factor de dilución.

Al evaluar las 1 843 muestras de recién nacidos, se pudo correlacionar el ensayo modificado para discos de 3 mm con el UMELISA TSH NEONATAL[®] y lograr un coeficiente de correlación de 0,9. Además, se calculó y graficó la distribución de frecuencias, para las concentraciones obtenidas por ambos ensayos con lo que en cada caso se lograron distribuciones similares y características de esta hormona en poblaciones de recién nacidos.¹⁸⁻²⁶

CONCLUSIONES

Los resultados indican que el ensayo modificado para discos de 3 mm responde a los criterios de calidad internacionalmente aceptados para este tipo de inmunoensayos enzimáticos, además de ser un método rápido, preciso y exacto que

puede emplearse como una opción para los programas de pesquisa neonatal, pues permite el procesamiento de grandes cantidades de muestras garantizándose la eficiencia en los resultados.

El hecho de poder modificar el UMELISA TSH NEONATAL[®] a discos de 3 mm de sangre seca sobre papel de filtro permite hacer un aprovechamiento máximo de las muestras de sangre del talón tomadas en el período neonatal e incluir una mayor cantidad de pruebas dentro de los programas de pesquisa neonatal de enfermedades heredo metabólicas.

BIBLIOGRAFIA

1. Dussault J.H. The impact of systematic screening for congenital hypothyroidism. New horizons in neonatal screening. 9th International Screening Symposium and the 2nd Meeting of the International Society for Neonatal Screening. International Society for Neonatal Screening. Farriaux J.P., Dhondt J.L. Lille, France, 1993.
2. Toublanc J.E. Worldwide inquiry on incidence of congenital hypothyroidism. New horizons in neonatal screening. 9th International Neonatal Screening Symposium and the 2nd Meeting of the International Society for Neonatal Screening. International Society for Neonatal Screening. Farriaux J.P., Dhondt J.L. Lille, France, 1993.
3. Fischer D.A. 2nd International Conference in Neonatal Thyroid Screening: progress report. *J. Pediatr.*, **102**, 653-654, 1983.
4. Toublanc J.E. Comparison of epidemiological data on congenital hypothyroidism in Europe with those of other parts in the world. *Horm. Res.*, **38**, 230-235, 1992.

5. Virtanen M., Mainpaa J., Pikkarainen J., Pitkanen L., Perhientupa J. Aetiology of congenital hypothyroidism in Finland. *Acta Pediatr. Scand.*, **78**, 67-73, 1989.
6. Aliño M. El programa de pesquisa neonatal en Cuba. I Congreso Latinoamericano de Pesquisa Neonatal y Enfermedades Heredo metabólicas. Ciudad de La Habana, Cuba, 1997.
7. Guell R., Robaina R., Álvarez M.A., Fernández J.L. Más de 10 años de pesquiasje neonatal de hipotiroidismo congénito. I Congreso Latinoamericano de Pesquisa Neonatal y Enfermedades Heredo metabólicas. Ciudad de La Habana, Cuba, 1997.
8. Robaina R., Guell R., Fernández J.L., Lechuga M.F., Álvarez M.A., Solís R.L., et al. The Cuban National Program for detection of Congenital Hypothyroidism after 10 year. Third Meeting of the International Society for Neonatal Screening. Levy H.L., Hermos R.J., Grady G.F. Boston, EUA, 1996.
9. Alonso J.R. Prevención de enfermedades metabólicas congénitas. Cobertura de los programas Tría Neonatal en España y estrategias de toma de muestras. Ediciones Recién Nacido. Motger J. Barcelona, España, 1993.
10. Frómata A. Desarrollo y utilización de un ultramicroELISA para medir la Hormona Estimulante de la Tiroides (TSH) en manchas de sangre seca colectadas en papel de filtro. Tesis en opción del título de Maestro en Bioquímica, Universidad de la Habana, Ciudad de La Habana, 2000.
11. Avrameas S. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. *Immunochemistry*, **6**, 43-52, 1969.
12. WHO Technical Report Series, No. 565, Anex 1, 1975.
13. Yhong W. Simultaneous determination of thyrotropin (TSH) and thyrox-

- ine (T4) in blood spots on filter paper for hypothyroidism screening in the newborn. Neonatal Screening in the nineties. 8th International Neonatal Screening Symposium. International Society for Neonatal Screening. Webster D. New South Wales, Australia, 1991.
14. Coelho J.R., Shumizu M.S.O., Loghini N.S., Corvalho T.N., Schimicht B.J. Congenital hypothyroidism: T4 screening x TSH sequential to T4 (p10) screening. A comparative study. Third Meeting of the International Society for Neonatal Screening. Levy H.L., Hermos R.J., Grady G.F. Boston, EUA, 1996.
 15. Matsumura L.K., Kunii J.S., Furuzawa G.K., Faria A.M., Almeida M.F., Viera J.G.H., *et al.* Cord TSH vs heel T4 blood screening for Neonatal Hypothyroidism. Third Meeting of the International Society for Neonatal Screening. Levy H.L., Hermos R.J., Grady G.F. Boston, EUA, 1996.
 16. Prieto L., Gruñeiro de Papendieck L., Chiesa A., Bergudá C. Screening of congenital hypothyroidism (CH): experience in cord blood. Third Meeting of the International Society for Neonatal Screening. Levy H.L., Hermos R.J., Grady G.F. Boston, EUA, 1996.
 17. Álvarez M.A., Berzain A., Alonso E., Hernández D., Carbajal F., Hernández M., y col. Estado neurocognitivo en niños con hipotiroidismo congénito tratados precozmente. Seguimiento de 10 años. II Congreso Latinoamericano de Errores Innatos del Metabolismo y Pesquisa Neonatal. Caupolicán Servicios Figuras. Cornejo V., Raimann E., Colombo M. Santiago de Chile, Chile, 1999.
 18. Spencer C., Eigen A., Shen D., Duda M., Qualls S., Weiss S., Nicoloff J. Specificity of the sensitive assays of thyrotropin (TSH). Used to screen for thyroid disease in hospitalized patients. **Clin. Chem.**, **33**, 1391-1396, 1978.
 19. Weeks I., Sturgess M., Siddle K., y col. A high sensitivity Immunochemiluminometric assay for human thyrotropin. **Clin. Endocrinol.**, **20**, 489-495, 1984.
 20. Cobb W.E., Lamberton R.P., Jackson I.M.D. Used of a rapid sensitive immunoradiometric assay to distinguish normal from hyperthyroid subject. **Clin. Chem.**, **30**, 1558-1560, 1984.
 21. Allen K.R., Watson D. Thyrotropin as the initial screening test for thyroid disease. **Clin. Chem.**, **30**, 502-503, 1984.
 22. Bayer M.F., Kriss J.P., McDougall R. Clinical experience with sensitive thyrotropin measurements: diagnostic and therapeutic implication. **J. Nucl. Med.**, **26**, 1248-1256, 1985.
 23. Roddis M.J., Burrin J.M., Johansen A., *et al.* Serum thyrotropin: a first line discriminatory test of thyroid function. **Lancet**, **2**, 277-278, 1985.
 24. Kaihola H.L., Irjala K., Viikari J., *et al.* Determination of thyrotropin in serum by time-resolved fluoroimmunoassay evaluated. **Clin. Chem.**, **31**, 1706-1709, 1985.
 25. Bassett F., Eastment C.J., Ma G., *et al.* Diagnostic value of thyrotropin concentration in serum as measured by a sensitive immunoradiometric assay. **Clin. Chem.**, **32**, 461-464, 1986.
 26. Kreutzer H.J.H., Terloolen J.F.W., Thijssen J.H.H., *et al.* Analytical evaluation of four sensitive assays of thyrotropin, including effect of variations in patient sampling. **Clin. Chem.**, **32**, 2085-2090, 1986.

ozoney®

OZONEY® está diseñado para para desinfectar pequeños volúmenes de agua para beber, lavar los alimentos que se ingieren crudos, enjuagar la vajilla y los utensilios de cocina, así como para la higiene bucal y otros usos.

OZONEY® puede convertirse en un gran aliado para la salud, ya que permite obtener agua de elevada calidad sin tener que hervir el agua o adquirir agua embotellada, porque al emplearlo se dispone de todas las ventajas que proporciona el ozono, entre las que se encuentra su elevado poder germicida. Su poder desinfectante es mayor que el de todos los agentes de este tipo que se emplean hasta el momento.

OZONEY® es ideal para oficinas, el hogar u otros lugares donde se requieran pequeños volúmenes de agua para consumo humano con elevada calidad.

Las concentraciones de ozono disuelto que se alcanzan con él, aseguran una desinfección total del agua tratada.



Características técnicas
Alimentación: 110 V-CA +/- 10 %.
Frecuencia: 50 Hz .
Concentración de ozono en el agua: 0,4 ppm (mínimo).
Caudal de agua recomendado: 1,5 a 2 L/min .
Potencia: 10 VA (máximo).
Dimensiones: (195X285X185) mm .
Peso: 1,8 kg .

Para mayor información:



Centro de Investigaciones del Ozono

Calle 230 y 15, No. 1313, Siboney, Playa, Apartado Postal 6412, Ciudad de La Habana, Cuba.

Teléfonos: (53-7) 271-9264; 271-2089. Fax: (53-7) 271-0233. E-mail: ozono@infomed.sld.cu <http://www.ozono.cubaweb.cu>