ENFERMEDADES HUÉRFANAS - ESTUDIO DE LA PREVALENCIA DE LOS ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO (EIM) POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM EN EL VALLE DEL CAUCA

Entidades proponentes:
Centro Internacional de Vacunas
Laboratorio Asoclinic Inmunología Ltda.
Fundación Instituto de Salud del Pacífico (INSALPA)

Entidades asociadas:
Gobernación del Valle del Cauca
Hospital Universitario del Valle, Cali
Hospital Luis Ablanque de la Plata, Buenaventura
Hospital Raúl Orejuela Bueno, Palmira
Fundación Hospital San José, Buga

Investigador Principal: Myriam Arévalo Ramírez, Ph.D.

Abril 18, 2017

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN **3**

1. IDENTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA **6**

1.1 Problema central *6*
1.2 Limitaciones actuales y acciones para la atención de los EIM en Colombia y el Valle del Cauca *8*
1.3 Marco legal actual como oportunidad para la investigación actual y el futuro establecimiento de un proyecto nacional. *9*
1.4 Resultados preliminares y antecedentes del uso de la MS/MS en Colombia y el Valle del Cauca *10*

2. JUSTIFICACIÓN **14**

3. OBJETIVOS **17**

3.1 Objetivo general *17*
3.2 Objetivos específicos *17*

4. MARCO TEÓRICO **19**

4.1 Errores Innatos del Metabolismo (EIM) *19*
4.2 Tamizaje Neonatal Metabólico Ampliado *21*
4.3 Tamizaje Neonatal en Colombia *22*

5. POBLACIÓN OBJETO DEL PRESENTE ESTUDIO **23**

6. METODOLOGÍA **26**

6.1 Objetivo # 1: Determinar la prevalencia de los EIM en la población de recién nacidos del Valle del Cauca *26*
6.2 Objetivo # 2: Determinar los perfiles metabólicos de aminoácidos, acilcarnitinas y galactosa-1-fosfato en una población con sospecha del Valle del Cauca *31*
6.3 Objetivo # 3: Desarrollar un algoritmo computacional que permita integrar la información de los marcadores producidos por el MS/MS para el diagnóstico de EIM *34*
6.4 Objetivo # 4: Conformar un equipo de trabajo multidisciplinario para el estudio de los EIM y otras enfermedades huérfanas. *36*

7. LICENCIAS O PERMISOS **41**

8. CRONOGRAMA **43**

9. PLAN OPERATIVO **44**

10. RESULTADOS/PRODUCTOS ESPERADOS **46**

11. EVALUACIÓN DE RIESGOS **48**

12. SEGUIMIENTO Y EVOLUCIÓN: INDICADORES **50**

13. IMPACTOS **51**

14. GRUPO DE COLABORADORES **52**

15. TIPO DE CONCERTACIÓN **58**

16. REFERENCIAS **59**

ANEXO 1. RANGOS NORMALES PARA ALGUNOS ANALITOS **62**

ANEXO 2. ANÁLISIS DE PARTICIPANTES DEL ESTUDIO **65**

RESUMEN

Como **antecedente** es importante mencionar que las Enfermedades Huérfanas son un extenso grupo de patologías denominadas así porque debido a su rara ocurrencia (menor a 1:5.000 personas) usualmente son desatendidas por los sistemas de salud. Dentro de estas enfermedades, se encuentran incluidos los **errores innatos del metabolismo** (EIM), que son enfermedades de origen genético caracterizados por presentar alteraciones en la función de proteínas, enzimas o mecanismos de transporte celular, que originan severos bloqueos en algunos procesos metabólicos, y como consecuencia conducen a serios trastornos clínicos en los neonatos que incluyen: incapacidad física, retraso mental y/o la muerte, lo que representa una carga familiar y social extraordinariamente alta. Aunque de acuerdo a estudios realizados en otros países, la frecuencia individual de estos desórdenes es baja, cuando los EIM son tomados en conjunto presentan prevalencias importantes (1:1.000 a 1:5.000 recién nacidos vivos) sin tener en cuenta la potencialmente alta ocurrencia de abortos y mortinatos que escapan a esta estadística.

En países industrializados y en algunos de América Latina se ha establecido un sistema de **Tamizaje Neonatal Ampliado** (TNA) que permite detectar, identificar y clasificar estos EIM en el recién nacido (RN) antes que se manifiesten clínicamente, permitiendo en muchos de estos casos ofrecer oportunamente un tratamiento adecuado y prevenir el establecimiento de secuelas severas en los neonatos. Mientras tanto, en Colombia solo se realiza tamizaje para hipotiroidismo, debido principalmente a limitaciones tecnológicas para la realización del TNA, además de la existencia de un vacío legal del Estado en esta materia. Estos factores dificultan una estimación seria de la prevalencia de EIM en Colombia y la oferta de un manejo médico adecuado de los mismos, con la consecuente carga social para el Estado y un enorme trauma sicológico para las familias.

En términos de tecnología, es importante destacar la enorme utilidad de la **espectrometría de masas en tándem** (MS/MS) y las plataformas de "alto rendimiento" para el análisis de alteraciones genéticas y sus efectos en metabolitos claves para el organismo, que han hecho posible que actualmente se puedan evaluar más de 26 enfermedades genéticas diferentes utilizando una muestra mínima de sangre (~100 μl) del RN, con una precisión analítica actualmente insuperable por otros métodos. En este sentido, durante los últimos años, **el Centro Internacional de Vacunas (CIV) y el Laboratorio Asoclinic de Cali** han venido trabajando en la implementación de un método para el diagnóstico de errores asociados al metabolismo de aminoácidos (AA), ácidos orgánicos (AO) y carbohidratos utilizando la tecnología de MS/MS. De otro lado, simultáneamente el estado Colombiano ha promulgado la ley 1392 de 2010 de **enfermedades huérfanas**, así como la resolución 2048 de 2015 por

la cual se define el listado de 2.149 enfermedades clasificadas dentro de esta categoría, las cuales se encuentran dentro de políticas de salud priorizadas del Plan Decenal de Salud Pública (PDSP) 2012-2021.

Por lo anterior, el presente proyecto se plantea como un **objetivo general**: investigar la prevalencia de los EIM dependientes de aminoácidos, acilcarnitinas y galactosa-1-fosfato por espectrometría de masas en tándem en RN y lactantes menores del Valle del Cauca, el cual servirá como fase preliminar no solo para la evaluación de estas enfermedades en la región, sino para determinar la factibilidad de su proyección en la investigación de la prevalencia a escala nacional. Este objetivo se desarrollará a través de los siguientes **objetivos específicos**: 1) Determinar la prevalencia de los EIM en la población de recién nacidos del Valle del Cauca; 2) Determinar los perfiles metabólicos de aminoácidos, acilcarnitinas y galactosa-1-fosfato en una población con sospecha de EIM en el Valle del Cauca; 3) Desarrollar un algoritmo computacional que permita integrar la información de los marcadores producidos por el MS/MS para el diagnóstico de EIM; 4) Conformar un equipo de trabajo multidisciplinario para el estudio de los EIM y otras Enfermedades Huérfanas.

Como **metodología** se propone: 1) realizar un estudio de corte transversal en los principales centros asistenciales de los municipios de Cali, Buenaventura, Palmira y Buga, para el tamizaje de ~30.000 RN de la población general de RN de dichos municipios, y de 1.500 lactantes menores con sospecha de EIM que ingresen a los diferentes centros asistenciales. El tamizaje consistirá en la determinación de alteraciones dependientes del metabolismo de AA, AO y galactosa-1-fosfato (Gal-1-P) por MS/MS; 2) Para el análisis de los datos, se propone el desarrollo de un algoritmo computacional para el diagnóstico de EIM que permitirá reducir los tiempos entre el análisis de la muestra y la entrega de resultados; y 3) Se propone además la conformación de un equipo de trabajo con médicos pediatras, neonatólogos, genetistas, neurólogos pediatras, epidemiólogos y químicos, nutricionistas y psicólogos de las diferentes instituciones vinculadas en este estudio, con participación de asesores y consultores nacionales y extranjeros quienes orientarán a los padres en los cuidados de los niños con alguna de las patologías encontradas, y servirá de base para el establecimiento de la Sociedad Vallecaucana de Enfermedades Huérfanas. La Sociedad trabajará estrechamente con la Secretaria de Salud Departamental del Valle (SSDV) y el Instituto Nacional de Salud (INS), y constituirá un órgano consultor de estas entidades y del Ministerio de Salud (MSP).

Con este estudio se pretende también fortalecer el vínculo entre la investigación básica y la clínica, a través de la asociación de Centros de Investigación (CIV y Asoclinic) con las entidades de salud públicas y privadas correspondientes en los niveles municipal, regional y nacional, y sentará las bases para la creación de un programa nacional de TNA, generando

un escenario de trabajo científico multidisciplinario ideal para la articulación de profesionales que, por las limitaciones tecnológicas descritas previamente, en la actualidad afrontan estas patologías de manera individual y aislada. A pesar que por la corta duración de este estudio preliminar no será posible ofrecer formación conducente a títulos de postgrado, el proyecto ofrecerá espacio de entrenamiento corto a estudiantes de MSc y Doctorado del Sur Occidente de Colombia y del resto del país en investigación epidemiológica, básica y clínica, en una atmosfera de cooperación interdisciplinaria nacional e internacional. El proyecto promoverá la publicación de resultados tanto en revistas de circulación nacional como internacional, así como una amplia difusión a través de medios masivos y digitales. Los resultados serán ampliamente difundidos por medio de conferencias en eventos científicos nacionales o internaciones y a través de publicaciones en revistas indexadas.

El proyecto se plantea para una duración de dos años y como entidad ejecutora se propone a INFIVALLE.

PALABRAS CLAVES: Errores Innatos del Metabolismo, Tamizaje, Espectrometría de Masas, Neonatos, aminoácidos, acilcarnitinas, acidurias orgánicas, galactosemias, ley 1392 de 2010.

1. IDENTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Problema central

Los **errores innatos del metabolismo** (**EIM)** hacen parte del grupo de las denominadas **enfermedades huérfanas o raras** que como su nombre lo indica por fortuna, afectan a muy pocas personas en el mundo, sin embargo, esto hace que no se dedique el presupuesto y esfuerzo que su diagnóstico y manejo requieren para disminuir su negativo impacto social. Para las más comunes, la incidencia puede ser de una persona por cada 1.000 habitantes, pero, en algunos casos, puede ser tan baja como una por cada 10 mil o más habitantes, lo que hace que estas enfermedades sean poco conocidas, poco estudiadas y en consecuencia **desatendidas** [1]. A pesar de su baja prevalencia, la gravedad de estas enfermedades, debido a sus manifestaciones dolorosas, degenerativas y crónicas, representa un importante problema social y de salud pública que urge la atención del estado Colombiano [2]. Dentro de las manifestaciones clínicas para estas alteraciones se encuentra una gran variedad de síntomas que incluyen episodios de descompensación metabólica, problemas neurológicos, de aprendizaje, del comportamiento, retraso mental y falla orgánica múltiple, los cuales constituyen toda una pesada carga para los individuos que las padecen, sus familias, su entorno y la sociedad en general. Se considera que estas patologías generan una carga comparable a la que se presenta en enfermedades terminales, por lo que se deben generar herramientas y modelos de intervención para ayudar a sobrellevar estos problemas [3,4].

En países industrializados y en algunos de América Latina se ha establecido un sistema de **Tamizaje Neonatal Ampliado** (TNA) que permite identificar en el recién nacido (RN) un gran número EIM antes que se manifiesten clínicamente. Por otro lado, en países en vía de desarrollo usualmente no hay suficiente consciencia alrededor del problema que representan los EIM, lo que redunda en carencia de especialistas y laboratorios con capacidad de responder oportunamente al diagnóstico y tratamiento de estas alteraciones, traduciéndose en una falta de claridad con relación a las políticas en salud pública para su manejo [5,6]. En Colombia por ejemplo, actualmente se realiza de manera obligatoria solamente el tamizaje para hipotiroidismo, y en algunos casos de la fenilcetonuria, dependiendo de la cobertura de salud de la madre y el niño [7], adicionalmente, se realiza diagnóstico de enfermedades metabólicas en pacientes con sospecha clínica.

El tamizaje de EIM que se ofrece en Colombia actualmente, es extraordinariamente limitado y cuando se realiza, puede tardar un tiempo considerable (~1-3 meses), debido a la necesidad de hacer la remisión de las muestras al exterior para su análisis, proceso que aumenta considerablemente los costos del diagnóstico e imposibilita cubrir grandes tamaños

poblacionales, debido a lo laborioso del proceso de remisión y espera de resultados. En contraste, el **TNA** para la detección de EIM dependientes de aminoácidos (AA), acilcarnitinas (AC) y galactosa-1-fosfato (Gal-1-P) que se plantea en el presente proyecto, usa la MS/MS que puede generar resultados con una alta sensibilidad y especificidad para más de 26 enfermedades en menos de una semana, y utilizando una muestra mínima de sangre (~100 μL), lo cual representa el uso de una tecnología de alto rendimiento y con una buena relación costo/beneficio.

En el caso de niños con sospecha de presentar un EIM, la dificultad del diagnóstico radica en que la presentación clínica de estas alteraciones puede ser confundida con otras patologías del periodo perinatal como asfixia al nacer, dificultad respiratoria, malformaciones congénitas y anomalías cromosómicas y sepsis entre otras, originando una gran mortalidad [8]. En Colombia, según los indicadores básicos del Ministerio de Salud y Protección Social (MSP), en el 2012 se presentaron un total de 8.220 muertes en infantes menores de 1 año, 600 de los cuales se presentaron en el Valle del Cauca, debido en su mayoría a las causas mencionadas anteriormente. Por la carga clínica que representa para la sociedad este tipo de patologías, sumado a la precaria información existente sobre su prevalencia y caracterización en Colombia, se hace imprescindible la disponibilidad de un método de diagnóstico altamente sensible y efectivo que permita el tamizaje ampliado de varios desórdenes, además de la determinación de la prevalencia de estas enfermedades en el país.

Considerando estos antecedentes, y la importancia de desarrollar un programa de TNA fundamentado en principios éticos, garantizando el acceso equitativo y de todos los recién nacidos (RN), en el Valle del Cauca, el CIV y Asoclinic Inmunología Ltda., en asocio con la Universidad Javeriana de Cali, el Laboratorio de Metabolopatías del Complejo Hospital Universitario de Santiago de Compostela-España, y la financiación de Colciencias, han venido abordando el problema de la disponibilidad de una técnica confiable y de alto rendimiento para el TNA en Colombia. En los últimos años en el marco de este esfuerzo piloto, se ha implementado la herramienta diagnóstica eficaz que permite la detección temprana de los EIM en el país.

El presente proyecto, que da continuidad al estudio piloto financiado por Colciencias, se propone estudiar de manera preliminar la prevalencia de los EIM utilizando muestras de sangre de RN colectadas al momento del nacimiento en hospitales seleccionados de varios municipios del Valle del Cauca. Se plantea que esta investigación permita definir y establecer condiciones adecuadas para su futura aplicación no solo en todo el Valle del Cauca sino en toda Colombia. En este contexto, las alianzas investigativas con las unidades clínicas de pediatría y neonatología de cuatro de los principales centros asistenciales de Cali, Buenaventura, Palmira y Buga, así como con otras instituciones académicas del país, con la

SSDV y el INS facilitarán esta expansión prevista, y la transferencia de tecnología a otras regiones del país. Mediante discusión con las entidades de salud participantes del estudio, se ha establecido como meta realizar el tamizaje de ~30.000 RN y 1.500 lactantes menores con sospecha, de manera que se pueda tener una visión más clara sobre la frecuencia de los EIM. La información obtenida del presente estudio, permitirá generar las bases para la implementación del programa de TNA por MS/MS en todas las entidades de salud del Departamento y posteriormente para todo el país.

1.2 Limitaciones actuales y acciones para la atención de los EIM en Colombia y el Valle del Cauca

Como se mencionó previamente, a pesar que en países industrializados el TNA se realiza como una prueba de rutina a todos los RN utilizando técnicas de alto rendimiento como la MS/MS, en Colombia, solo se realiza el tamizaje obligatorio para hipotiroidismo y no existe un programa de TNA, generando una enorme brecha de conocimiento epidemiológico que redunda en detrimento de la salud pública. Los mayores inconvenientes que se han presentado en la implementación de un programa de TNA en el país y los avances recientes en la solución de algunos de ellos son:

a) Falta de legislación respecto a las enfermedades huérfanas, incluidas los EIM. Afortunadamente en el año 2010 se promulgó la ley 1392 de Enfermedades huérfanas [9], que busca reglamentar y generar herramientas jurídicas a los pacientes que las padecen y sus cuidadores, para acceder a procedimientos diagnósticos y tratamientos.
b) Normatización de la ley 1392 de 2010. Recientemente se viene adelantando una evaluación nacional para determinar las capacidades instaladas y los avances en lo referente al marco legal de las enfermedades raras en el país, mediante reuniones con el INS, SSDV y concejo municipal de Cali, haciendo un análisis de la atención en salud brindada por las aseguradoras de salud [9].
c) Limitadas fuentes de financiación que permitan investigar estas patologías e implementar y mantener un programa adecuado de estudio y atención. Recientemente Colciencias financió un proyecto (proy # 230456933672) para la implementación y estandarización de las pruebas para la detección de EIM dependientes de AA y ácidos grasos.
d) Un desconocimiento total de la prevalencia de EIM en la población, por lo que no se puede dimensionar la magnitud del problema de salud real. El presente estudio preliminar de prevalencia se orienta a llenar este vacío a escala regional.
e) Dificultades en la integración del programa de TNA al Sistema Nacional de Salud.
f) Un rezago tecnológico comparativo con Estados Unidos, Europa y otros países de la región como México, Brasil y Chile que ya tienen instaurado el TNA, hace más lento

el proceso de adecuación del programa nacional, debido a la posibilidad de realizar el análisis en cualquiera de esos países. Gracias a la financiación del MSP el CIV adquirió un primer equipo de MS/MS (proy # 2304-04-19524) y ha venido trabajando con apoyo Asoclinic y la asesoría del Laboratorio de Metabolopatías del Complejo Hospital Universitario de Santiago de Compostela en España para la instauración de un programa de TNA en el país, y la realización de estudios pilotos de prevalencia de EIM.

g) Alta prevalencia de otras patologías consideradas prioritarias sobre las enfermedades congénitas, tales como malnutrición, parasitosis, enfermedades transmitidas por vectores, violencia, enfermedades crónicas además de los problemas sociales relacionados con el conflicto armado, desplazamientos forzados etc., que desvían la atención de las organizaciones responsables de la salud.

1.3 Marco legal actual como oportunidad para la investigación actual y el futuro establecimiento de un proyecto nacional.

Como se mencionó, en años recientes en Colombia se estableció una reglamentación que cubre las enfermedades metabólicas, mediante la expedición del decreto 1954 de 2012 en el cual se dictan las disposiciones para la implementación de un sistema de información de pacientes con enfermedades huérfanas, y la resolución 0430 de 2013 actualizada en el 2015 por la 2048, por la cual se define el listado de estas enfermedades. El MSP ha incluido políticas de salud priorizadas para los pacientes que padecen estas enfermedades en el PDSP de cada Departamento [10]. Según datos del MSP en el país hay un total de 13.168 pacientes que padecen enfermedades huérfanas con un costo promedio para el sistema de salud de 37 millones por persona [11]. Los datos del Censo Nacional de Enfermedades Huérfanas disponible en la base de datos del MSP (SISPRO) para este año 2017 reportan tasas del 52,28 al 2,34 por cada 100.000 habitantes, siendo los departamentos con más casos: Cundinamarca (Bogotá DC) con 266 Antioquia con 180, Valle del Cauca con 132 y Santander con 62. El presente proyecto, permitirá por lo tanto fortalecer el Censo de Enfermedades Huérfanas, incluyendo los datos del estudio que, a pesar de tener limitaciones geográficas, serán un aporte al mismo.

Sin embargo, a pesar de contar con un registro obligatorio de este tipo de enfermedades, existe un sub-registro enorme de este número de casos de EIM, ya que no se tienen en cuenta la grave problemática actual en cuanto al número de decesos de neonatos cuyas causas se encuentran sin especificar o presentan un cuadro clínico que encaja en su mayoría con el de las enfermedades huérfanas, siendo más específicos con los EIM.

Según cifras del Instituto de Errores Innatos del Metabolismo (IEIM) de la Universidad Javeriana de Bogotá, entre el periodo de 2007-2008 fueron detectados 222 casos de

aminoacidopatías sin clasificar, 48 acidemias orgánicas sin confirmación, 94 mucopolisacaridosis, 4 hiperglicemia cetósica, 4 defectos del ciclo de la urea, 4 acidemias metilmalónica, 3 enfermedad con olor a jarabe de arce, 2 acidemias glutárica tipo I, 2 tirosinemias, 2 adrenolicoudistrofia ligada X, 1 acidemia propiónica, 1 hiperfenilalaninemia, 1 glucogenosis tipo I, 1 Morquio A y 1 enfermedad de Hunter [12].

En el Valle del Cauca, actualmente no existe información sobre la prevalencia de las enfermedades dependientes del metabolismo de AA, AO y Gal-1-P, sin embargo de los 600 casos de muertes en infantes menores de 1 año reportados en el 2012 en el Departamento, el 50,7% corresponden a afecciones originadas en el periodo perinatal, de las cuales el 25,0 % tuvo como causa malformaciones congénitas, deformidades y anomalías cromosómicas, el 21,5% correspondiente a trastornos respiratorios específicos del periodo perinatal, el 11,4% a otras afecciones originadas en el periodo perinatal, el 10,0% a las sepsis bacterianas e infecciones respiratorias agudas y el 32,1% restante sin especificar, las cuales corresponden a cuadros clínicos similares a los de EIM [13], lo que llevaría a pensar que la prevalencia de este tipo de enfermedades podría ser considerablemente alta en el Departamento.

Tomando en cuenta las recomendaciones para la introducción de un programa de TNA de la Organización Mundial para la Salud (OMS), donde se establece que el tipo de enfermedad detectada debe tener una frecuencia elevada en el país donde se quiera implementar, posibilidad de un tratamiento médico efectivo después del diagnóstico temprano de la alteración, utilización de técnicas de tamizaje sensibles y específicas con manejo de bajos volúmenes de muestra, además de que debe existir una buena relación costo-beneficio para la identificación y tratamiento [14].

Estos antecedentes hacen evidente que Colombia tiene un escenario que demanda la implementación urgente de un programa de diagnóstico de alteraciones metabólicas usando técnicas analíticas de alta eficiencia como la MS/MS, de manera que se puedan detectar múltiples enfermedades y estudiar sus prevalencias, para de este modo evaluar la gravedad de la problemática. Además, que a través del apoyo del estado Colombiano, a través del MSP (proy # 2304-04-19524) y de Colciencias (proy # 230456933672), se han establecido en Cali, condiciones que favorecen el planteamiento y desarrollo del presente proyecto de investigación que determinará la prevalencia de los EIM en el Valle del Cauca y aportará evidencia para el establecimiento de una investigación de alcance nacional.

1.4 Resultados preliminares y antecedentes del uso de la MS/MS en Colombia y el Valle del Cauca

El método más sensible reconocido internacionalmente para la determinación de los trastornos metabólicos es la MS/MS [15,16]. El CIV adquirió un equipo MS/MS (AB Siex 3200 Q Trap) con el apoyo del MSP para su utilización en el análisis de moléculas de *Plasmodium* en la búsqueda de vacunas contra la malaria (proy # 2304-04-19524). Aprovechando la disponibilidad del equipo, y su gran potencial para el estudio de los EIM, hace ~4 años el CIV comenzó a trabajar en Departamentos como el Valle del Cauca (Cali) y Choco (Chocó), los cuales son sujetos de los estudios de malaria y adolecen de mínima información sobre patologías metabólicas. Con esta infraestructura se inició el estudio piloto en el que se estandarizó la técnica para la detección de más de 40 desórdenes metabólicos, específicamente relacionados con aminoacidopatías, acidemias orgánicas, desórdenes de oxidación de ácidos grasos y galactosemia tipo I que contó con financiación de Colciencias, y con cuyos resultados se cuenta un artículo científico actualmente sometido a publicación en la revista Colombia médica.

Este estudio piloto contó con la participación de la Universidad Javeriana de Cali, la Clínica Versalles de Cali y el Laboratorio de Metabolopatías de Santiago de Compostela, España, donde se determinaron los valores normales de AA y AC en sangre de ~1.000 niños sanos entre 2 y 18 días de nacidos. En la figura 1 se observa un esquema de la distribución de los datos obtenidos, concentraciones y desviación para algunos de los analitos evaluados. Las AC por ejemplo se encuentran en concentraciones muy bajas, entre 0-2 µM, lo que demuestra la alta sensibilidad de la técnica. Los AA en general se encuentran en altas concentraciones en sangre (10–500 µM) y son fácilmente detectables (Ver anexo 1).

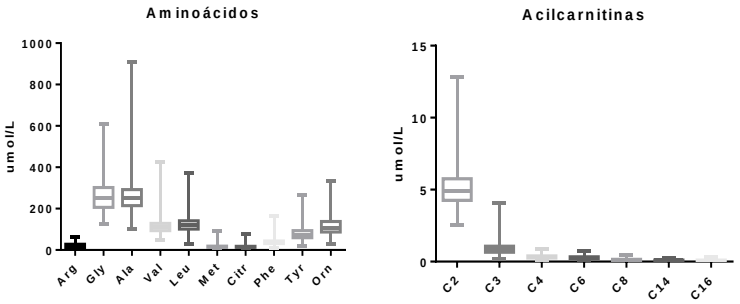


Figura 1. Distribución de la concentración de AA y AC.

En este estudio se observaron diferencias significativas en las concentraciones de AA y AC en muestras de sangre de los niños de Cali y Quibdó. Interesantemente, se observó una mayor concentración de AC en las muestras de los niños de Quibdó, mientras en las muestras de los niños de Cali se observaron concentraciones de AA más altas (Figura 2), estas diferencias se

presentan posiblemente debido a variaciones en los patrones de alimentación de los habitantes de las dos ciudades.

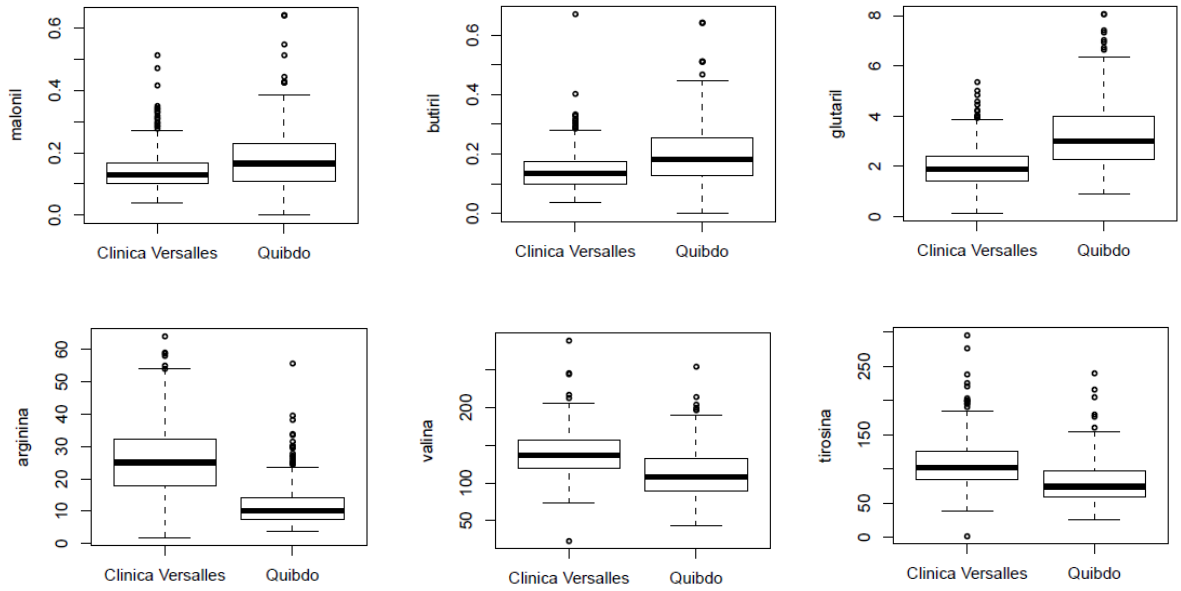


Figura 2. Comparaciones concentraciones de AA y AC en muestras de sangre seca de niños de las ciudades de Cali y Quibdó.

Cuando se evalúan las concentraciones en diferentes grupos de edades, se observa una tendencia a una disminución en las concentraciones en las AC que se marcan predominantemente en las de mayor peso molecular (Figura 3). Respecto a los AA, en la mayoría de los casos no se observan diferencias en las concentraciones en sangre con la edad, sin embargo, se observa una tendencia a un aumento de las concentraciones de algunos de los analitos como Alanina, Leucina, Valina y Arginina (Figura 4). Estos resultados resaltan la importancia de evaluar RN de varias regiones del País con el objetivo de tener una población representativa que permita diferenciar muestras normales y anormales en la población colombiana, de manera que se puedan diagnosticar los EIM. La metodología aquí implementada resultó ser reproducible y exacta, con límites de detección bajos para todos los analitos estudiados, lo cual es importante para la detección en casos donde se presenten deficiencias de los mismos.

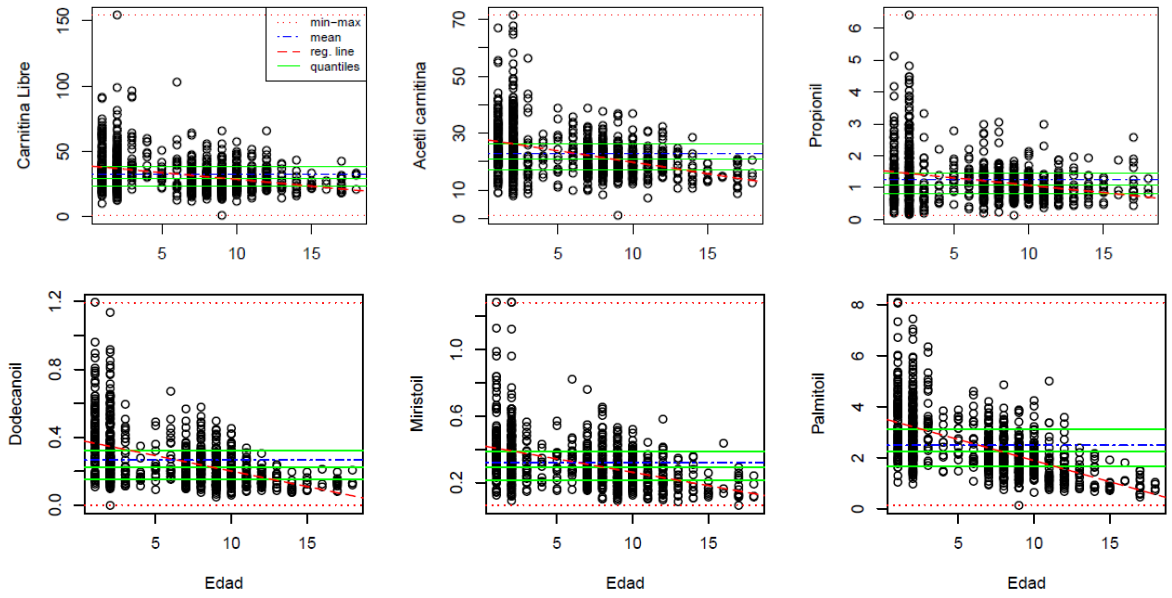


Figura 3. Análisis de regresión de concentración de AC en sangre seca de niños de Cali y Quibdó a diferentes grupos de edades.

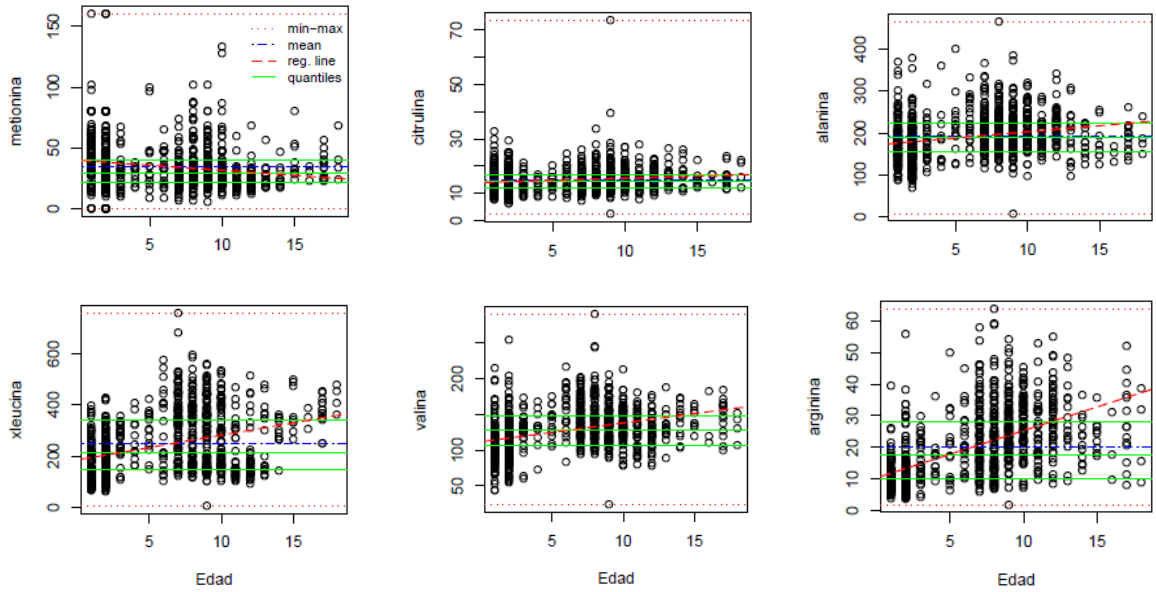


Figura 4. Análisis de regresión de concentración de AA en sangre seca de niños de Cali y Quibdó a diferentes grupos de edades.

Una vez estandarizado el método, se realizó el tamizaje con muestras de RN con sospecha de enfermedad metabólica remitidas por la Clínica Valle del Lili en Cali. Tomando como ejemplo una de las muestras analizadas por los investigadores del CIV que mostró un

aumento significativo en las concentraciones de la propionil carnitina y dos ratios relacionados propionil carnitina/acetilcarnitina (C3/C2) y propionil carnitina/palmitoil carnitina (C3/C16) que sugería una aciduria propiónica o metilmalónica, la cual fue confirmada por el Laboratorio de Metabolopatías del Hospital Clínico Universitario de Santiago, España, y posteriormente por un laboratorio en los Estados Unidos. Estos resultados evidencian el gran avance que se ha tenido en la implementación del método y corroboran su validación como contribución al diagnóstico múltiple de EIM por el CIV en la ciudad de Cali.

De otro lado, actualmente el CIV trabaja estrechamente con la SSDV en la aplicación de la MS/MS para la confirmación de un número importante de pacientes con enfermedades clasificadas como enfermedades huérfanas (>300 pacientes) de los cuales una proporción significativa (~40% = 144 pacientes) se encuentran registrados como posibles EIM, debido a la sintomatología que presentan como encefalopatía epiléptica infantil, albinismo ocular, trastornos del metabolismo de carbohidratos, déficit congénito en la síntesis de ácidos biliares e hipercolesterinemia. Dado que dichos pacientes no son aun cubiertos por el régimen de Plan Obligatorio de Salud (POS), su tratamiento y manejo general debe ser cubierto directamente por la SSDV del Valle, lo que representa una carga económica para el Departamento.

2. JUSTIFICACIÓN

El desconocimiento de la prevalencia de las enfermedades huérfanas en Colombia, en particular de los EIM, requiere investigaciones que permitan generar evidencias epidemiológicas que conduzcan a definir estrategias de diagnóstico y manejo de las mismas. Hasta antes de la promulgación de la ley 1392, en Colombia, solo se contemplaba el diagnóstico de hipotiroidismo como tamizaje neonatal. Mediante el artículo 5 de esta ley, el Estado Colombiano se obliga a brindar financiación para el diagnóstico, tratamiento, medicamentos, procedimientos y cualquier otra prestación de salud que requieran las personas que padezcan estas enfermedades, comprometiéndose a generar incentivos para el desarrollo de conocimiento científico sobre las mismas. A este contexto se suma el actual crecimiento poblacional y económico de Colombia que de un lado representa el riesgo de un mayor número de casos, pero del otro la oportunidad que las familias afectadas tengan el apoyo del estado a través de servicios adecuados de diagnóstico y tratamiento, y asesoría genética entre otras [17].

Los EIM clasificados dentro las enfermedades huérfanas, requieren una intervención oportuna de los RN y lactantes menores afectados, para evitar complicaciones graves que conduzcan al retraso mental y/o la muerte, además del consecuente impacto socio-económico

y el padecimiento de las familias afectadas. El diagnóstico de estas patologías se realiza de manera discrecional a través de varias pruebas para evaluar los diferentes metabolitos involucrados, sumado a la necesidad de que los RN presenten síntomas para guiar el diagnóstico médico, conduciendo a un alto consumo de tiempo, costo, y sobre todo un alto riesgo debido a las consecuencias clínicas incapacitantes de estas enfermedades.

En contraste, el uso de la MS/MS permite la rápida cuantificación de una gran variedad de metabolitos cuya acumulación o deficiencia se asocia a diversas enfermedades, utilizando una pequeña muestra de sangre del RN (100 μL), en un tiempo record (<5 minutos/muestra) y a un bajo costo, sin la necesidad de que los RN presenten sintomatología clínica para guiar el diagnóstico, momento para el cual algunas manifestaciones clínicas podrían representar daños irreversibles en el RN y lactante menor. Para la realización del TNA por MS/MS existen instituciones que ofrecen el servicio en el país, sin embargo el análisis de la muestra de sangre se realiza en el extranjero, con costos en el rango de 250.000 a 450.000 pesos, y los resultados de los mismos solo están disponibles en un periodo de un mes.

Teniendo en cuenta la gravedad de este tipo de alteraciones, es necesario adelantar un estudio sobre la prevalencia de los EIM en la población del Valle del Cauca, de manera que se pueda conocer el estado actual de este grave problema de salud. La generación de nuevo conocimiento sobre la prevalencia de los EIM permitirá que se brinde ayuda a la población mediante la utilización de metodologías analíticas que están a la vanguardia en el diagnóstico oportuno de estas enfermedades de alto impacto. En este sentido el CIV ha venido desarrollando una estrategia progresiva para asegurar el éxito del presente proyecto, en condiciones de máxima calidad y confiabilidad. Tomando ventaja de la adquisición de un primer equipo de MS/MS financiado por el MSP (proy # 2304-04-19524), con el cual se desarrolló el entrenamiento en el uso de esta tecnología para análisis de proteínas de protozoarios (vacunas de malaria); en una primera etapa se adelantó un estudio piloto que permitió definir los valores de los metabolitos de estudio en población de Cali, específicamente de AA, AC y Gal-1-P, que permiten el diagnóstico de aminoacidopatías, acidurias orgánicas, defectos de oxidación de ácidos grasos y galactosemias (ver anexos); en una segunda etapa se ha iniciado el análisis de muestras de pacientes del programa de Enfermedades Huérfanas de la SSDV y de la Fundación Clínica Valle del Lili, y el presente proyecto representa una tercera etapa en la cual no solo se cuenta con la metodología ya estandarizada, sino con un avance en la articulación con las entidades oficiales responsables de la atención en Salud: SSDV e INS, además de un grupo de profesionales de la salud de múltiples disciplinas, que facilitará la conformación de la Sociedad Vallecaucana de Enfermedades Huérfanas. Para la ejecución de esta tercera etapa, se plantea realizar la optimización de la capacidad de análisis actualmente instaurada en el CIV, mediante la adquisición de un segundo equipo de MS/MS, de manera que se pueda cumplir con la

proyección de tamizar el tamaño poblacional propuesto (~31.500 RN y lactantes menores) en el tiempo de duración de proyecto.

El desarrollo de este estudio permitirá la obtención de datos de prevalencia regional de los EIM, que en una siguiente etapa podrán ser escalados a nivel nacional, aportando evidencia para el diseño de estrategias de manejo de estas enfermedades. La vinculación de los entes oficiales responsables de la salud, así como de entidades académicas, permitirá diseñar en un futuro cercano planes curriculares que den énfasis a la educación sobre los EIM y otras enfermedades huérfanas como una realidad del país, con recursos diagnósticos y de tratamiento. Así mismo, el desarrollo del proyecto brindará un escenario para entrenamiento corto de estudiantes de postgrado y pregrado de áreas como la química, estadística, ingeniería en sistemas, medicina, epidemiología y enfermería.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Investigar la prevalencia de los EIM dependientes de aminoácidos, acilcarnitinas y galactosa-1-fosfato por espectrometría de masas en tándem en recién nacidos y lactantes menores del Valle del Cauca.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1. Determinar la prevalencia de los EIM en la población de recién nacidos del Valle del Cauca

En el Valle del Cauca, actualmente no existe información sobre la prevalencia de las enfermedades dependientes del metabolismo de AA, AC y Gal-1-P. Teniendo en cuenta la necesidad de que exista un registro departamental de pacientes afectados por estas enfermedades, se aborda la hipótesis que las prevalencias con las que se presentan los EIM en el Valle del Cauca son similares con las estadísticas mostradas en otros países. Por lo cual se propone determinar la prevalencia al momento del nacimiento con la que se presentan aminoacidopatías, acidurias orgánicas, defectos de oxidación de ácidos grasos y galactosemia tipo I, mediante la realización de TNA por MS/MS en una población ~30.000 RN de los hospitales participantes del estudio.

3.2.2. Determinar los perfiles metabólicos de aminoácidos, acilcarnitinas y galactosa-1-fosfato en una población con sospecha del Valle del Cauca

Considerando la falta de un programa de tamizaje metabólico neonatal ampliado en el país que se traduce en desconocimiento de la actual prevalencia de EIM así como subdiagnóstico de estas alteraciones que pueden ser confundidas con otras patologías del periodo perinatal, se plantea la hipótesis que existe una alta frecuencia de pacientes con algún EIM en la población de niños con patologías del periodo perinatal en el Departamento del Valle, nos proponemos a abordar esta problemática mediante la determinación de los perfiles metabólicos de 1.500 lactantes menores que se encuentren recluidos en las respectivas salas de emergencia de los centros asistenciales.

3.2.3. Desarrollar un algoritmo computacional que permita integrar la información de los marcadores producidos por el MS/MS para el diagnóstico de EIM

Debido a que el número de datos agrupables por el análisis de la muestra individual por MS/MS es muy grande, a causa del número de analitos cuantificados por muestra (58 metabolitos, además de 32 ratios de estos metabolitos), se hace imprescindible la elaboración de herramientas computacionales para el manejo ideal de estos datos. Con la hipótesis que la creación de un algoritmo computacional que tenga en cuenta las particularidades de Colombia

permitirá hacer el diagnóstico de EIM más rápido y efectivo, nos proponemos desarrollar una herramienta que permita el un manejo eficiente de los datos obtenidos en el análisis de las muestras de una manera rápida y eficiente.

3.2.4. Conformar un equipo de trabajo multidisciplinario para el estudio de los EIM y otras Enfermedades huérfanas.

Con la necesidad de que exista en un futuro unidades clínicas para el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de las patologías detectadas, se hace obligatorio la socialización y reconocimiento de la problemática que aborda este proyecto, además de los resultados que se obtendrán, de manera que se pueda realizar un manejo integral de pacientes que presenten EIM, garantizando que los niños diagnosticados con alguna alteración de este tipo, sean atendidos correctamente. Finalmente, se propone la conformación de una "Sociedad Vallecaucana de Enfermedades Huérfanas" como un grupo de trabajo multidisciplinario que contribuya al diagnóstico, seguimiento y tratamiento oportuno de las mismas, además de brindar asesoramiento sobre la utilización de la MS/MS para realizar el TNA en Colombia.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Errores Innatos del Metabolismo (EIM)

Entre 1902 y 1909, Archibald Garrod describió patologías como alcaptonuria, albinismo y la cistinuria, aparentemente causadas por defectos puntuales en el metabolismo de AA y monosacáridos, y permitió así al mundo científico introducirse en el estudio y entendimiento de un complejo grupo de patologías conocidas hoy como **EIM**.

Los EIM son trastornos bioquímicos de origen genético, ocasionados por defectos específicos en la estructura o función de proteínas con funciones específicas, ocasionando alteración en el metabolismo de los AA, AO, carbohidratos simples o complejos, o en la síntesis de hormonas. Esencialmente los EIM pueden originarse por mutaciones en genes que determinan la secuencia de AA de la proteína efectora o receptora, pero también por mutaciones en secuencias del DNA controlando la transcripción del gen que codifica la proteína o la traducción del mRNA, modificando la calidad de la proteína [18]. La gravedad de estas alteraciones depende de la importancia de la proteína defectuosa o carente para el metabolismo, lo cual mantiene también una estrecha relación con la edad de presentación de la sintomatología en el periodo neonatal. Este tipo de alteraciones pueden ser clasificadas según su fisiopatología en tres grupos importantes de estudio, de los cuales los grupos 2 y 3 hacen parte del objetivo del presente proyecto:

Grupo 1. Enfermedades derivadas de la alteración en la síntesis o catabolismo de moléculas complejas: enfermedades lisosomales y peroxisomales (mucopolisacaridosis y esfingolipidosis), enfermedades por alteraciones del transporte y procesamiento intracelular. Son enfermedades que afectan principalmente hígado, bazo, riñón, sistema nervioso central, músculo esquelético y miocárdico. Este tipo de alteraciones derivan en enfermedades cerebrales que manifiestan síntomas como retardo mental, demencia, pérdida sensorial, disfunción motora, convulsiones y problemas del comportamiento, los cuales son progresivos y se presentan en individuos que al parecer son normales al momento de nacer, sin embargo presentan cuadros clínicos años después [19].

Grupo 2. Enfermedades derivadas de la acumulación de sustancias tóxicas: aminoacidopatías (fenilcetonuria, enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce, homocistinuria, tirosinemia etc.), acidurias orgánicas (metilmalónica, isopropiónica, isovalérica etc.), defecto en el ciclo de la urea, intolerancia a azúcares (galactosemia) y porfirias. Este grupo de enfermedades incluyen errores innatos en el metabolismo intermediario que conduce a una intoxicación aguda y progresiva, generando por último un

bloqueo metabólico. Generalmente, los RN provienen de un embarazo normal con un periodo libre de síntomas, sin embargo después de la alimentación regular los neonatos comienzan a presentar sintomatología relacionada con una intoxicación generando pérdida de apetito, vómito, convulsiones, estrés respiratorio y deshidratación, conduciendo por último a un deterioro neurológico. La detección temprana de estas alteraciones permite evitar el daño neurológico severo mediante control dietario [20].

Grupo 3. Enfermedades por déficit energético: Glucogenosis, acidemias lácticas congénitas, trastornos en la β-oxidación, enfermedades de la cadena respiratoria mitocondrial. Los síntomas comunes de estas enfermedades incluyen hipoglicemia, hiperlactatemia, hepatomegalia, hipotonía, miopatía, cardiomiopatía, falla cardiaca y colapso circulatorio, muerte súbita infantil y daño cerebral.

Desde el punto de vista epidemiológico, las diferentes enfermedades derivadas de estas alteraciones, son consideradas de manera individual y en general como enfermedades raras, pero en su conjunto son relativamente frecuentes alcanzando una prevalencia de 1:1000 a 1:5000 nacidos vivos. En países como Canadá y Australia, se conoce que la incidencia de estas patologías varía entre 40 y 15.7 casos por 100.000 nacidos vivos, respectivamente [21]. Mientras un estudio realizado por Wilcox y col, se reporta una prevalencia de 1 por 5000 nacidos vivos [22]; y en Estados Unidos, Amed Soliz informa 14 casos en 55.000 nacimientos en el Miami Children Hospital, cifra equivalente a una frecuencia de 1 por 3.900 nacidos vivos [23], en España, Baldellou, informa una frecuencia de 1 por 1.176 nacidos vivos en el Hospital Infantil Miguel Servet de Zaragoza, además de 1 por cada 274 ingresos hospitalarios [24].

En Canadá, un estudio de la incidencia de EIM en British Columbia entre 1.142.912 nacimientos ocurridos desde 1969 hasta 1996, en una población casi toda de origen caucásico, se encontraron 40 casos por 100.000 nacimientos. De estos, 24 correspondieron a amino-acidopatías, acidurias orgánicas, acidosis láctica primaria, galactosemia y defectos del ciclo de la úrea, 8 tuvieron un desorden de depósito lisosomal, 3 un desorden peroxisomal, 3 un desorden de la cadena respiratoria mitocondrial y 2 una enfermedad por depósito de glucógeno. Esto da una frecuencia de 1 por cada 2.500 nacimientos para todos los errores estudiados, 1 por cada 4.167 nacimientos para amino-acidopatías, acidemias orgánicas, acidosis láctica primaria, galactosemia y defectos del ciclo de la urea, 1 por cada 12.500 para desorden de depósito lisosomal, 1 por cada 33.333 para desorden peroxisomal, 1 por cada 33.333 para desorden de la cadena respiratoria mitocondrial y 1 por cada 50.000 para enfermedad por depósito de glucógeno [21].

4.2 Tamizaje Neonatal Metabólico Ampliado

El programa de tamizaje neonatal metabólico comenzó en los años 60 en los Estados Unidos, mediante el análisis sencillo para la detección de algunas aminoacidopatías [25]. Con la implementación de herramientas analíticas automatizadas como la cromatografía de gases (CG), se inició en la década de los 70 el diagnóstico de los EIM, lo cual fue ampliamente mejorado con la utilización de la espectrometría de masas (MS) como detector de la CG [16].

Después de 1980, se comenzó a relacionar las variaciones en las AC con algunos EIM, realizándose los primeros reportes del uso de la MS/MS en la determinación de desórdenes metabólicos por Millington, quién demostró que la espectrometría de masas en tándem es un método específico y selectivo para la determinación de metabolitos de concentraciones anómalas, permitiendo la detección de estos desórdenes incluso antes de que se presentaran las manifestaciones clínicas de la enfermedad [26,27]. Desde entonces, el uso de la MS/MS en la detección de múltiples enfermedades se ha convertido en casi una generalidad, haciendo parte del programa de tamizaje neonatal de la mayoría de países. Este tamizaje más reciente y completo ha sido denominado **tamizaje neonatal ampliado** (TNA), y constituye una de las principales herramientas para la detección de EIM de RN durante los primeros días de vida.

La MS/MS es una técnica de separación e identificación de múltiples analitos que se basa en un patrón específico de fragmentación iónica que produce cada compuesto bajo determinadas condiciones de análisis, y en la separación-detección de cada especie iónica según su relación masa/carga. Su introducción ha permitido la detección de gran cantidad de aminoacidemias, acidemias orgánicas, desórdenes de oxidación de ácidos grasos y galactosemias en una sola corrida, además con tiempos de análisis muy cortos (<5 minutos por muestra). Otra de las grandes ventajas del uso de la MS/MS en la detección de EIM, es que permite la reducción de los falsos positivos diagnosticados con el aumento del número de trastornos discriminados [28], además de una menor manipulación de las muestras utilizadas en este tipo de análisis.

Tanto en Estado Unidos como en Europa el tamizaje neonatal es de cumplimiento obligatorio por ley, encontrándose que la mayoría de los estados realizan TNA por MS/MS [29]. En América Latina, se ha venido implementando poco a poco el TN en la mayoría de los 20 países que la conforman, iniciándose las primeras etapas del proceso a mediados de 1970. Esta implementación se inició en México en 1973 con la determinación de fenilcetonuria y otras aminoacidopatías, seguido de la implementación en Brasil en 1976 del primer programa de tamizaje neonatal de la región para la detección de fenilcetonuria y otros EIM capaces de causar deficiencia mental [30]. Además de estos, en países como Cuba, Chile, Costa Rica y

Uruguay, el programa de tamizaje neonatal está bastante organizado en la identificación, diagnóstico y tratamiento de los EIM [31].

Desde la instauración de los programas de TN en los diferentes países de América Latina, se han realizado algunos estudios importantes en cuanto a la evaluación de prevalencias de estos desórdenes en pacientes con sospecha de presentar un EIM [32]. En 1997, Brasil reportó un estudio de prevalencia entre 9.901 pacientes con un alto riesgo de presentar EIM, tales como desórdenes en el metabolismo de AA, acidurias orgánicas, desórdenes en el metabolismo de carbohidratos y enfermedades de depósito lisosomal, encontrándose una frecuencia de EIM en población de alto riesgo de 6,5%, siendo las enfermedades de depósito lisosomal las que presentaron la mayor frecuencia equivalente a 59,8% y los desórdenes en el metabolismo de AA con 21,2% [33]. En la misma publicación, se menciona también que en Argentina entre 14.928 pacientes con sospecha de presentar un cuadro de EIM, se encontró una prevalencia de 6,25%, mostrando una cercanía con los valores reportados en Brasil.

4.3 Tamizaje Neonatal en Colombia

En Colombia, el programa de Tamizaje Neonatal es bastante nuevo, iniciándose con la detección de algunos EIM como el hipotiroidismo en 1986 [34]. Reportes en la literatura acerca del tamizaje de los EIM antes de 1986 son limitados, debido tal vez a la falta de metodologías bioquímicas para la confirmación de estos desórdenes. El protocolo clínico para el tamizaje de pacientes con alto riesgo de presentar algún EIM, fue introducido en un gran número de países desde 1950, incluido Colombia, el cual comprendía metodologías simples que permitían la detección de un pequeño número de estas enfermedades. La introducción al país de nuevas técnicas analíticas automatizadas como el cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas, además de nuevos procedimientos más elaborados tales como cultura de tejidos, ensayos enzimáticos específicos y análisis molecular, ha permitido la detección de un número cada vez mayor de desórdenes relacionados con los EIM [12].

En el año de 1990, el Instituto Materno Infantil de Bogotá inició el estudio de los neonatos con sospecha de EIM, con el estudio selectivo de la población denominada de riesgo para enfermedad metabólica. Más recientemente, en cooperación entre el Laboratorio de Detección Precoz de Metabolopatías del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, el Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid, el CIBI de la Universidad de Los Andes y el Instituto de Errores Innatos de la Universidad Javeriana se realizó un estudio de diagnóstico de EIM donde se diagnosticaron pacientes con hiperglicinemia no cetósica [35,36], trastorno en la biogénesis de los peroxisomas, defecto congénito de la glicosilación,

acidemia láctica primaria, defectos del ciclo de la úrea [37], galactosemia [38], aciduria piroglutámica [39], acidemia propiónica [40], enfermedad de jarabe de arce, tirosinemia, aciduria 3-hidroxi-3-metil glutárica, deficiencia de beta cetotiolasa, deficiencia de acilCoA dehidrogenasa de cadena media.

Sin embargo, hasta la fecha, en Colombia no se han reportado estudios epidemiológicos acerca de la prevalencia de estas enfermedades, y solo existen reportes de casos aislados o estadística de algunos grupos de investigación como los de la Universidad de los Andes y la Universidad Javeriana de Bogotá que realizan algunas de estas pruebas a nivel privado, pero no dentro de un Sistema Público.

Como se menciona en el numeral 1, en los últimos 4 años, el CIV y Asoclinic han venido avanzando en el establecimiento de las condiciones para la realización de TNA para EIM utilizando la técnica de MS/MS. (ver secciones 1.3 y 1.4)

5. POBLACIÓN OBJETO DEL PRESENTE ESTUDIO

El presente estudio se centra en el Departamento del Valle del Cauca, uno de los 32 Departamentos de Colombia, situado entre las cordilleras occidental y central, limita al norte con Chocó y Risaralda, al sur con Cauca, al oriente con Quindío y Tolima y al occidente con el Océano Pacífico. El Valle del Cauca es el tercer Departamento en población (DANE) con una proyección al 2016 de ~4,7 millones de habitantes, de los cuales el ~86% vive en las ciudades y cabeceras municipales. Su capital es Santiago de Cali.

En Colombia nacen anualmente alrededor de ~650.000 infantes, de los cuales ~50.000 nacen en el Valle del cauca cada año según las estadísticas del DANE (Estadísticas vitales 2013, ver tabla 1), con lo cual se establece que la probabilidad de casos de niños reportados con EIM se encuentra entre 10 y 50 niños al año, de acuerdo a datos de prevalencia de la literatura (1:1000 a 1:5000 RN vivos). Según cifras del DANE, en el año 2013 se presentaron 507 muertes de infantes menores de 1 año en el Valle del Cauca, de los cuales 320 fallecieron por causas que hacen parte de los cuadros clínicos definidos para los EIM, tales como enfermedades del sistema nervioso, insuficiencias cardiacas, enfermedades del hígado, retardo en el crecimiento y malformaciones congénitas entre otros. En el Departamento existen 56 hospitales de los cuales se han seleccionado los centros asistenciales de primer nivel de los principales municipios del Departamento los cuales cuentan con personal de alta calidad en las áreas de pediatría y neonatología, como son el Hospital Universitario del Valle (Cali), Hospital Luis Ablanque de la Plata (Buenaventura), Hospital Raúl Orejuela Bueno (Palmira) y Fundación Hospital San José de Buga (Anexo 2). Actualmente, el CIV tiene convenio con la SSDV a la cabeza de la Dra. María Cristina Lesmes y el Dr. Carlos Robledo,

en el cual la SSDV brinda su apoyo para facilitar el acceso a muestras de RN de las instituciones prestadoras de salud de todo el Departamento para lograr abarcar el tamaño de muestras propuestos para el presente proyecto, el cual se describe a continuación.

El presente estudio se define como una investigación epidemiológica observacional/descriptiva que busca determinar la prevalencia y describir las características más importantes del grave problema de salud como son las enfermedades metabólicas. Haciendo un análisis de las dificultades en la medición de la incidencia de este tipo de alteraciones, debido principalmente a la cantidad de decesos de neonatos sin un diagnóstico acertado que no se incluirían en el estudio y que podrían ser producto de un EIM, lo cual impactaría negativamente la medida de esta incidencia, se propone la determinación de la prevalencia de los EIM dependientes de AA, AC y Gal-1-P al momento del nacimiento en un periodo de dos años, tal como se ha descrito antes en otros países [41,42]. Para este estudio, nuestra población objetivo son los RN y lactantes menores en las entidades prestadoras de salud de cuatro de los municipios del Departamento con mayor población: Cali, Buenaventura, Palmira y Buga, donde consecuentemente se presentan la mayor cantidad de nacimientos, esto con el fin de cubrir la totalidad de la población propuesta (~30.000 RN y 1500 infantes con sospecha) requerida para el estudio, (ver tabla 1).

Tabla 1. Estadísticas de nacimientos y mortalidad en el Valle del Cauca*

Número de nacimientos totales a nivel nacional	648,835
Número de nacimientos en el Valle del Cauca	53,951
Nacimientos por municipios	
Cali	34,830
Buenaventura	4,461
Tuluá	3,797
Palmira	3,786
Buga	2,078
Cartago	1,552
Mortalidad en el Valle del Cauca	507
Menores de 1 hora	39
De 1 a 23 horas	79
De 1 a 6 días	131
De 7 a 27 días	92
De 28 a 29 días	6
De 1 a 5 meses	108
De 6 a 11 meses	52

* Estadísticas vitales del DANE-2013 [43].

Población de RN: Teniendo en cuenta la capacidad de análisis que se tiene actualmente en el CIV (~192 muestras/día), la tasa de natalidad anual del Departamento, la dependencia del número de muestras a analizar respecto a que los padres accedan a firmar el consentimiento informado, además de los datos de prevalencia de estas enfermedades en otros países (1:1000 a 1:5000 RN vivos), se plantea la realización del TNA de ~30.000 RN, de manera que se asegure encontrar al menos dos casos de personas con estas alteraciones por año de estudio.

Población de lactantes menores con sospecha de presentar un EIM: En el caso de los lactantes menores con sospecha de EIM que se encuentran recluidos en las respectivas salas de emergencia de los centros asistenciales se realizará el tamizaje de 1500 infantes, realizándose la estimación de este tamaño de muestra representativo por medio de la ecuación (1), con un nivel de confianza del 95%, con una proporción de 0.01 y un margen de error de 0.005, considerando que las prevalencias de estas alteraciones son muy bajas [44].

$$n = \frac{(z^2)P(1-P)}{d^2} \qquad (1)$$

n= tamaño de la muestra
P= proporción esperada
d= error permitido
z=1.96

6. METODOLOGÍA

Se propone estudiar la prevalencia al momento del nacimiento de los EIM dependientes de AA, AC y Gal-1-P entre RN del Valle del Cauca, así como el estudio de los perfiles de estos metabolitos en una población de lactantes menores con sospecha de presentar un EIM mediante la utilización de la técnica de MS/MS. El proyecto se ejecutará en asociación con las principales entidades de salud de los municipios de Cali, Buenaventura, Palmira y Buga, los cuales contribuirán a la captación de los RN, al análisis clínico e inclusión en la población de lactantes menores con sospecha de EIM y análisis de los resultados de prevalencia encontrada (ver Anexo 2). Durante la ejecución del proyecto, se contará con la asesoría de grupos de investigación de la Universidad Nacional (Bogotá) a la cabeza de Dra. Yolanda Cifuentes y la asesoría del Laboratorio de Detección Precoz de Enfermedades Metabólicas del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela. Se tendrá como sede principal de coordinación el CIV donde ha sido establecida la metodología para determinar aminoacidopatías, acidurias orgánicas, defectos en la oxidación de ácidos grasos y galactosemias. El desarrollo del proyecto, contribuirá a la conformación de la Sociedad Vallecaucana de Enfermedades Huérfanas, que tendrá como misión establecer la prevalencia y características de los EIM en la región, adelantar investigación en las mismas, generar condiciones que faciliten a los pacientes y sus familias el acceso al diagnóstico temprano y en cuanto se pueda a tratamiento oportuno, así como la socialización de estas patologías entre la sociedad general, la comunidad médica, los grupos paramédicos y las autoridades de salud. Los casos de EIM identificados serán reportados al Instituto Nacional de Salud para ser incluidos en el Sistema de Salud Pública (SIVIGILA) y serán socializados con el Ministerio de Salud y Protección social.

6.1 Objetivo # 1: Determinar la prevalencia de los EIM en la población de recién nacidos del Valle del Cauca

Hipótesis del objetivo # 1: Las prevalencias con las que se presentan los EIM en el Valle del Cauca son similares con las estadísticas mostradas en otros países.

Para abordar esta hipótesis, se propone estudiar mediante la realización del TNA a través del uso de la MS/MS, la prevalencia de EIM al momento del nacimiento. Específicamente se propone realizar la búsqueda de alrededor de 40 enfermedades asociadas con el metabolismo de AA, AO y Gal-1-P (ver Anexos, Tabla A1 y A2) que afectan a los RN en el Valle del Cauca.

Antecedentes del objetivo # 1: Actualmente en Colombia, no existen estudios de prevalencia de muchas de las enfermedades incluidas en los programas de tamizaje neonatal

de otros países, lo cual constituye una brecha enorme de desconocimiento de estas alteraciones, aun cuando las principales causas de mortalidad de los recién nacidos corresponden a sintomatología que está estrechamente ligadas al cuadro clínico de los EIM. Por tal motivo, y tomando en cuenta la escasez de información y estudios epidemiológicos sobre los EIM, nos proponemos determinar la prevalencia al nacer de EIM dependientes del metabolismo de AA, AO y carbohidratos, de manera que con los resultados se pueda justificar la implementación en todo el país de programas de prevención intensiva dentro de los que se incluya tamizaje metabólico ampliado y consejería genética, que permitan disminuir la carga de los EIM sobre el sistema de salud.

Metodología específica:

Diseño Experimental

Se planea realizar un estudio de corte transversal en ~30.000 RN de los municipios de Cali, Buenaventura, Buga y Palmira, para determinar la prevalencia de errores del metabolismo mediante el TNA por MS/MS. El estudio se realizará en colaboración con la SSDV, las Secretarías Municipales de Salud (SSM) y las entidades de salud participantes. Los RN nacidos serán captados de madres que acudan a centros asistenciales para control prenatal y postparto, entregándose volantes (brochures) con información sobre el estudio, lo cual facilitará que los padres accedan a firmar el consentimiento informado (CI). A las madres de los RN una vez que acepten la inclusión de los RN en el estudio se les pedirá diligenciar el CI y autorización para toma de muestra de sangre por punción de talón. Se tomará un registro de la edad de los RN, peso al nacer, condiciones socio económicas, entre otras variables. Las muestras de sangre serán usadas para determinar las concentraciones de AA, AC y galactosa en sangre de RN, que posteriormente usando software especializado, y mediante la creación de un algoritmo computacional, se determinará la presencia de algún error en el metabolismo de estos analitos, comparando además los perfiles de estos analitos en las diferentes poblaciones de estudio. Todos los procedimientos del estudio se resumen en la figura 5.

Reclutamiento y criterios de inclusión

La captación de los padres quienes autorizarán el procedimiento y diligenciarán el formato de CI, así como una encuesta que incluirá información de procedencia, fecha de toma, fecha de nacimiento del bebé, lugar de atención, datos de contacto de los padres, y otra información clínica relevante. La captación se realizará en las áreas de neonatología y pediatría de cada una de las instituciones de salud participantes del estudio, donde se les explicarán los objetivos de la captación de la muestra, además de los beneficios que tendrán los infantes con la realización del TNA. Para los RN cuyos padres hayan firmado el formato de CI se realizará la toma de muestras de sangre mínimo 48 horas después del inicio de la alimentación

proteica enteral o parental, siguiendo todos los procedimiento y aspectos ético-legales establecidos en la sección 7 de este documento.

Procedimientos de estudio

Toma de muestras: Las muestras de sangre se recolectarán mediante punción de talón o venopunción, por dos auxiliares capacitadas por el CIV para toma de muestras siguiendo los estándares de calidad de la guía internacionales del Clinical Laboratory Standard Intitute (CLSI -guía NBS01-A6: Blood collection on filter paper for neowborn screening programs; Approved Standars- Sixth edition). A su vez esta capacitación se socializará con el grupo de enfermeras de las unidades de neanotologia de los hospitales seleccionados a través de videos y procedimientos operativos estandarizados. Brevemente, se coloca una gota de sangre (25 μL) en cada circulo impreso en el papel filtro (Whatman #903), las cuales se dejarán secar a temperatura ambiente en un lugar fresco y libre de contaminación por un mínimo de 3h. Posteriormente, las muestras (un total aproximado de 300 muestras/semana) serán empacadas en bolsas plásticas Ziploc con desecante, almacenadas a 4°C y finalmente enviadas al laboratorio del CIV una vez por semana. Las muestras en papel de filtro se almacenarán a 4°C con desecante hasta su uso. Un remanente de las muestras se almacenará a -20°C en desecante e indicador de humedad, por si se hace necesaria la repetición del análisis.

Determinación de AA y AC: el análisis de las muestras se realizará usando un espectrómetro de masas en tándem 3200 Q Trap (AB Siex) equipado con ionización en electrospray y acoplado a un cromatógrafo líquido HPLC (Shimadzu) en modo positivo para los análisis de AA y AC. El método permite evaluar un total de 57 analitos en una sola corrida, 36 derivados de AC con los que se pueden diagnosticar más de 20 desórdenes entre acidemias orgánicas y desórdenes de oxidación de ácidos grasos; 20 derivados de AA que hacen posible diagnosticar más de 15 aminoacidopatías, además de la succinilacetona (SUAC) la cual es un marcador específico para el diagnóstico de la tirosinemia tipo I. Para la cuantificación de AA y el perfil de AC se utilizarán estándares internos de los analitos (Cambridge Isotope Laboratorios, Inc), se tomarán cortes de 3 mm de diámetro de muestra en papel de filtro dopada con estándar interno, los analitos serán extraídos con metanol y sometidos a proceso de derivatización por medio de esterificación con butanol/HCl 4N. Finalmente, la muestra es evaporada a sequedad y reconstituida en acetonitrilo al 50% con ácido fórmico, para posteriormente ser inyectada en el LC-MS/MS a las condiciones previamente establecidas.

Determinación de Gal-1-P: Se propone optimizar la metodología para la determinación de los EIM, individualizando la cuantificación de Gal-1-P mediante el uso de un espectrómetro de masas independiente con similares características al que se encuentra actualmente en el CIV. Esto se realizará, debido a la necesidad de operar la MS/MS en modo negativo para el

análisis de carbohidratos, contrario a lo que se realiza para la cuantificación de AA y AC, por lo que utilizar un único espectrómetro conduciría a realizar cambios frecuentes de polaridad, que requieren un proceso laborioso de limpieza y estabilización del equipo con cada cambio. Para la determinación de la Gal-1-P se utilizarán controles en papel filtro en el rango de concentraciones 0.0-3.0 mM. Inicialmente las muestras y los controles se someterán a un proceso de extracción con una solución de acetonitrilo y agua 50:50, seguido de una reconstitución con fase móvil e inyección en el LC-MS/MS a las condiciones previamente establecidas.

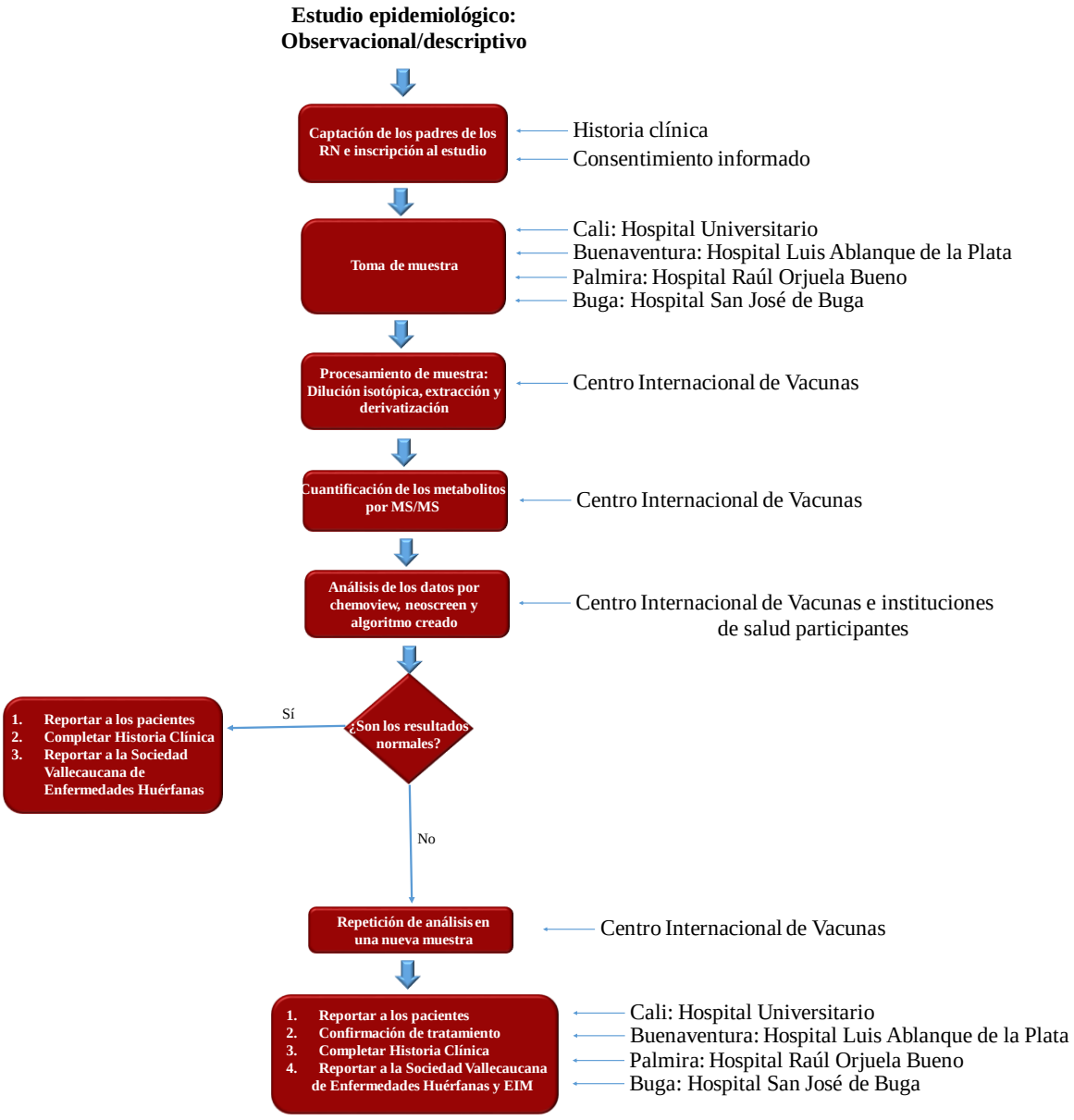


Figura 5. Representación esquemática de la logística del estudio

Manejo de resultados y registro de datos

Los datos de todos los participantes, y los resultados del análisis se introducirán en una base de datos de RedCap y serán analizados con el programa ChemoView (Microsoft Access database program, Applied Biosystem) para determinar las concentraciones de los distintos metabolitos en sangre. Los resultados serán pasados por el algoritmo computacional desarrollado (objetivo # 3), el cual leerá los datos arrojados por el ChemoView, los almacenará y marcará las variables sospechosas. Seguido se realizará un análisis univariado y cálculo de los intervalos de confianza para cada uno de los parámetros establecidos en el estudio. La información se ingresará en una base de datos Neoscreen y se analizará con el paquete estadístico STATA versión 10. Los datos consignados en las bases de datos del CIV permitirán realizar el estudio de prevalencia de los EIM, mediante el software de análisis estadístico R Project, que permitirá el cálculo de los rangos para cada analito, estadísticos de resumen y la correlación con los diferentes parámetros poblacionales como edad, género y lugar de muestreo.

Después del análisis de los resultados obtenidos, con el acompañamiento del personal médico encargado, se realizará la repetición del análisis en los casos donde se presenten resultados anormales, utilizando una nueva muestra de sangre para validar dichos resultados. Para la asesoría en general del proyecto, se contará con el apoyo del Dr. José Ángel Cocho, director del laboratorio de Metabolopatías del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, España, considerado como unidad de referencia nacional en el diagnóstico de enfermedades metabólicas congénitas en este país. Los resultados obtenidos se comunicarán inmediatamente al área de pediatría de las instituciones colaboradoras del estudio, los cuales tomarán las decisiones respecto al tratamiento de la alteración, además al Instituto Nacional de Salud, (SIVIGILA), la Federación Colombiana de Enfermedades Raras (FECOER) y a la Sociedad Vallecaucana de Enfermedades Huérfanas.

Resultados esperados: Luego de la realización de este objetivo se espera tener cifras de la prevalencia de los EIM en el Valle del cauca, además de un registro único de pacientes en el Departamento, lo cual influirá positivamente en la manera de dimensionar el problema de las enfermedades metabólicas, constituyendo a la MS/MS como una herramienta necesaria en conjunto con la clínica, para el apoyo de un diagnóstico temprano y herramientas de prevención. Adicionalmente, el desarrollo de esta propuesta permitirá la publicación de un artículo científico, la vinculación a las actividades de un estudiante de maestría en epidemiología o estadística y la realización de dos ponencias en eventos nacionales o internacionales.

6.2 Objetivo # 2: Determinar los perfiles metabólicos de aminoácidos, acilcarnitinas y galactosa-1-fosfato en una población con sospecha del Valle del Cauca

Hipótesis del objetivo #2: Existe un alto número de niños lactantes con sospecha clínica de EIM cuyo diagnóstico no se realiza por métodos de TNA como la MS/MS.

Con el presente objetivo se pretende determinar los perfiles metabólicos de AA, AC y Gal-1-P en lactantes menores con sospecha clínica de presentar un EIM, de manera que se pueda confirmar o descartar su diagnóstico presuntivo y sugerir un manejo adecuado (ver Anexos, Tabla A1 y A2). Este objetivo se apoyará en la realización del TNA mediante el uso de la MS/MS.

Antecedentes del objetivo #2: Actualmente en Colombia, existe una amplia población infantil recluida en las áreas de urgencia de los sistemas prestadores de salud del Departamento los cuales tienen una alta sospecha de presentar un EIM, y por lo tanto constituyen a pacientes en alto riesgo y vulnerabilidad. Tomando como ejemplo el Hospital Universitario, uno de los principales centros asistenciales del Valle del Cauca y del país, el cual reporta ~1.200 casos anuales de infantes con sintomatología inespecífica que cabría dentro del cuadro clínico de un EIM, de los cuales en algunos de ellos no se llega a un diagnóstico acertado.

Metodología específica:

Diseño experimental

En colaboración con la SSDV, las Secretarías Municipales de Salud (SSM) y las entidades de salud de los municipios nombrados con anterioridad, se plantea realizar el TNA por MS/MS en un estudio de corte transversal con 1.500 lactantes menores que ingresen a centros asistenciales con sospecha de EIM de los municipios de Cali, Buenaventura, Buga y Palmira, siguiendo como metodología del siguiente estudio la mostrada en la Figura 6. Las muestras de sangre captadas serán usadas para determinar las concentraciones de AA, AC y galactosa en sangre de la población con sospecha, que posteriormente usando un software especializado, se determinará la presencia de algún error en el metabolismo de estos analitos.

Reclutamiento y criterios de inclusión

Las muestras de pacientes con sospecha se remitirán desde las áreas de neonatología y pediatría de las instituciones participantes del estudio. Los lactantes menores consultados en las instituciones de salud, serán aquellos sin diagnóstico de alteración genética, que presenten sospecha clínica de enfermedad metabólica por presentar uno o más de los signos, síntomas y hallazgos listados en esta sección, los cuales fueron estipulados mediante reunión de un

comité de especialistas en pediatría y neonatología de los principales centros de salud del país, dentro de los que se contó con la participación de la Dra. Yolanda Cifuentes, profesora titular de la Universidad Nacional en el instituto materno infantil de la ciudad de Bogotá, quien se especializa en el diagnóstico, seguimiento y tratamiento de pacientes con EIM [45]. Los signos, síntomas y hallazgos para la clasificación de población con sospecha, se mencionan a continuación:

- Asfixia perinatal sin causa evidente
- Encefalopatía, microcefalia, macrocefalia
- SDR severo sin causa evidente
- Sepsis que no responde al tratamiento antibiótico o con hemocultivo negativo
- Hiperbilirrubinemia indirecta, hiperbilirrubinemia conjugada y disfunción hepática
- Falla cardíaca, hipoglicemia persistente o recurrente
- Acidosis metabólica severa
- Anion gap aumentado
- Lactato persistentemente aumentado
- Cetosis
- Hiperamonemia
- Vómito persistente o dificultad en la alimentación
- Hepatomegalia
- Dimorfismo
- Anomalía congénita
- Olor raro
- Antecedente de hidrops recurrente
- Antecedente materno de hígado graso agudo de la gestación
- Antecedente de cuadro similar en hermanos, consanguinidad, muerte súbita en un lactante, muerte del neonato sin diagnóstico o historia familiar de abortos, mortinatos o muerte neonatal.

Evaluación de los lactantes menores por pediatría, toma y análisis de las muestras

Inicialmente los lactantes menores serán evaluados en las respectivas áreas de neonatología y pediatría de las instituciones de salud participantes del estudio, los cuales diligenciarán un formato donde se consignará toda la historia clínica del paciente, haciendo una descripción detallada de la sintomatología que permite clasificarlos como población en riesgo de padecer un EIM, además de los hallazgos de laboratorio previos al análisis por MS/MS. Los padres de los lactantes menores que después de la evaluación clínica presenten sospecha de EIM, recibirán toda la información pertinente del estudio y diligenciarán el CI para ser incluidos en el mismo. Posterior a esto, se realizará la toma de muestra de sangre de 1.500 pacientes

en papel filtro, colocando una gota de sangre en cada circulo impreso en el papel (Whatman #903), las cuales se dejarán secar a temperatura ambiente en un lugar fresco y libre de contaminación por un mínimo de 3 h. Posteriormente, las muestras serán empacadas y enviadas al laboratorio del Centro Internacional de Vacunas, donde se realizará el análisis por MS/MS, siguiendo el procedimiento descrito en el objetivo #1 y resumido en la figura 6.

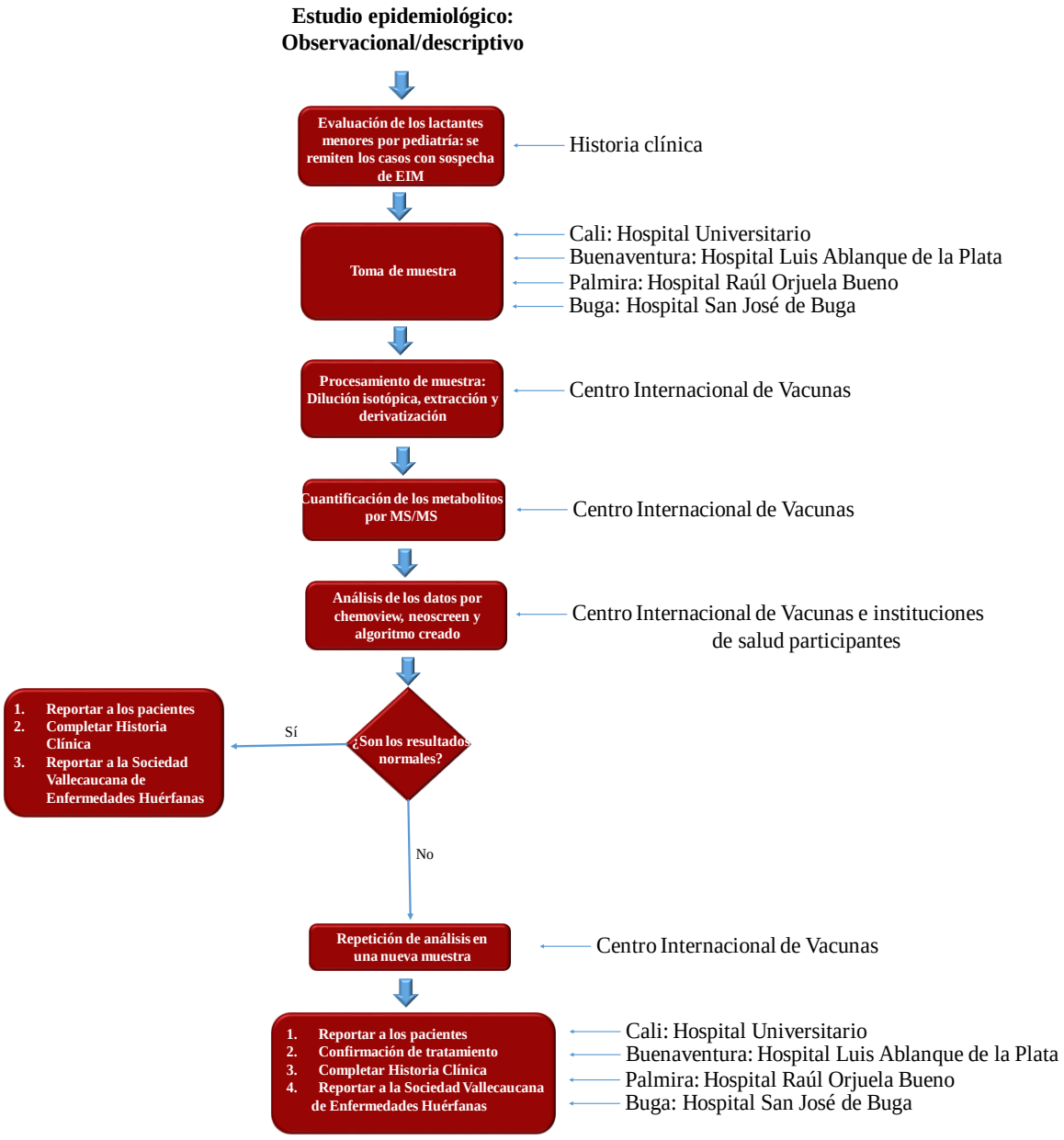


Figura 6. Representación esquemática de la logística del estudio

Manejo de resultados
El manejo de los resultados se realizará siguiendo el procedimiento descrito en el objetivo # 1, usando además el algoritmo computacional desarrollado (ver objetivo # 3). Los resultados se discutirán y analizarán con los pediatras y personal médico a cargo de las instituciones colaboradoras del estudio, además con el acompañamiento de la Sociedad Vallecaucana de Enfermedades Huérfanas.

Resultados esperados: Luego de la realización de este objetivo se espera poder diagnosticar y brindar tratamiento oportuno a una población en riesgo de presentar un EIM, lo cual es el máximo fin de este estudio, además de tener los perfiles metabólicos de AA, AC y Gal-1-P de una población en riesgo, comparándolos con los perfiles de concentración de estos metabolitos en una población sana, de los municipios bajo estudio. Los datos recolectados en este objetivo alimentarán los resultados de medición de prevalencia estudiados en el objetivo #1. El desarrollo de este objetivo permitirá la publicación de un artículo científico.

6.3 Objetivo # 3: Desarrollar un algoritmo computacional que permita integrar la información de los marcadores producidos por el MS/MS para el diagnóstico de EIM

Hipótesis del objetivo # 3: La creación de un algoritmo computacional que tenga en cuenta las particularidades de Colombia permitirá hacer el diagnóstico de EIM más rápido y efectivo.

Antecedentes del objetivo # 3: En Cali en el CIV, se cuenta con un método validado para la detección de EIM por MS/MS, mediante la cuantificación de 58 metabolitos y el análisis de 32 ratios adicionales de estos metabolitos, dando un total de 90 datos por muestra analizada. Tomando en cuenta la capacidad máxima de análisis de 192 muestras, esto correspondería a manejar ~17.280 datos/día, por lo que se hace imprescindible la elaboración de herramientas computacionales para el manejo de estos datos de manera que se logre un diagnóstico rápido y eficiente.

Metodología específica

Desarrollo del algoritmo
El algoritmo computacional hará uso de un lenguaje de programación Python y como sistema de persistencia el MySQL, además del Framework Django para garantizar la correcta organización y sostenibilidad del sistema. El desarrollo de este algoritmo se dividirá en 4 módulos:

1. Módulo de carga de datos y persistencia: Este paso consiste en desarrollar un algoritmo capaz de leer los resultados producidos por el ChemoView™ y almacenarlos en una base de datos identificando los grupos de datos por lotes, esta interface deberá proveer mensajes de error al usuario al momento de la carga y proveerá la opción de guardar resultados específicos que se generen en el módulo de procesamiento.

2. Módulo de procesamiento: Capaz de interpretar un juego de datos almacenado en el módulo de carga y persistencia, para luego organizarlos por enfermedad y marcar las variables sospechosas usando una serie de algoritmos que las harán fácilmente identificables y agilizarán su diagnóstico.

3. Modulo Presentación: Se encargará de exportar los resultados del módulo de procesamiento a una interfaz gráfica amigable para el usuario, se crearán interfaces en Excel y HTML fáciles de imprimir para facilitar la entrega de resultados a los médicos solicitantes y/o los padres solicitantes.

4. Seguridad: Es necesario crear una capa de seguridad en el sistema que limite el acceso y la visualización de los resultados obtenidos, generando usuarios independientes que tendrán distintos niveles de acceso a la aplicación, esto con el fin de garantizar la privacidad de la información.

Al finalizar el proceso se llevará a cabo una estrategia de pruebas para asegurar el correcto funcionamiento del algoritmo, mediante la ejecución de los siguientes pasos:

1. Inicialmente se realizará una prueba de unidad en donde se centrará todo el proceso de verificación en cada módulo diseñado, mediante la extracción de los datos generados en el ChemoView™ y siguiendo como guía la descripción detallada en el diseño del módulo, con el fin de descubrir los errores en el funcionamiento del mismo. Se probarán todas las condiciones límites establecidas en la creación de cada módulo, lo que permitirá determinar la robustez del mismo.

2. Después de la verificación del funcionamiento de cada módulo, se realizará un plan de integración de los módulos para constituir el sistema, seguido de la ejecución del plan mediante la realización de la prueba de integración incremental de cada módulo, que permitirá detectar errores de interacción que podrán ser aislados y corregidos con cada integración. En cada fase de la integración se debe evaluar la interacción de cada interface, el contenido de información, validez funcional y rendimiento.

3. Se realizará una prueba de validación mediante la utilización de todos los módulos, de manera que se garantice que las características de funcionamiento y el rendimiento cumple con las especificaciones descritas para cada módulo, y el tiempo de análisis es óptimo o aceptable. En caso de descubrir desviaciones de las especificaciones, estas deben ser identificadas y documentadas para estudiar sus fuentes de error.

4. Finalmente se realizará una prueba del sistema integrado total, mediante la ejecución de cuatro sub - pruebas de recuperación, seguridad, resistencia y rendimiento, de manera que se garantice el correcto funcionamiento del algoritmo en condiciones normales de uso.

- **Sub - prueba de recuperación:** Verifica el correcto funcionamiento de los mecanismos de reinicialización, recuperación del estado del sistema y recuperación de datos después de forzar un fallo en el sistema.
- **Sub - prueba de seguridad:** Verifica que la capa de seguridad en el sistema funciona correctamente, de manera que se garantice la protección adecuada de los datos.
- **Sub - prueba de resistencia:** Verifica el funcionamiento del sistema en condiciones demandantes para el mismo, mediante el análisis de grandes volúmenes de datos o datos que pudiesen conducir a inestabilidades, de manera que se evalúe un correcto procesamiento de los mismos.
- **Sub – prueba de rendimiento:** Verifica el tiempo de ejecución en el procesamiento de los datos en todos los pasos del proceso.

La determinación de la eficiencia final del proceso de diagnóstico en términos de capacidad y facilidad en la entrega de los resultados, se realizará mediante el análisis de muestras de RN y lactantes menores del Valle del Cauca, evaluando en conjunto con la prevalencia de los EIM (objetivos # 1 y # 2).

Resultados esperados: Al finalizar este objetivo se espera contar con un algoritmo computacional que permita agrupar y clasificar los datos arrojados por la MS/MS después del análisis y cuantificación de los distintos metabolitos, facilitando la entrega de resultados y haciendo el proceso más eficiente. Adicionalmente, el desarrollo de este objetivo permitirá la vinculación a las actividades de un estudiante de maestría en ingeniería de sistemas.

6.4 Objetivo # 4: Conformar un equipo de trabajo multidisciplinario para el estudio de los EIM y otras enfermedades huérfanas.

Premisa 1: Los EIM y otras enfermedades huérfanas requieren de una aproximación diagnóstica y un manejo clínico multidisciplinario.

Premisa 2: El desconocimiento del problema de los EIM en el país se debe principalmente a la falta de resultados referentes a la prevalencia de los mismos, además de la falta de integración de profesionales en el tema.

Antecedentes del Objetivo #4: En Colombia existe un desconocimiento acerca de la dimensión del problema de los EIM, aun cuando el estado a través de la ley 1392 de 2010, reconoce este tipo de enfermedades como de especial interés, adoptando normas para salvaguardar a la población que las padece. Sin embargo, actualmente no se alcanza a dimensionar la magnitud de un problema de salud que necesita promoción, prevención, diagnóstico y tratamiento, debido principalmente a que no se tienen resultados acerca de las frecuencias de estas alteraciones. Consecuentemente, las Facultades de Medicina y en general las Facultades de Ciencias de la Salud adolecen de un escaso o inexistente componente de EIM y en general de las Enfermedades Huérfanas en sus currículos académicos. Por lo tanto, existe un escaso número de especialistas en las áreas correspondientes y sobre todo un trabajo aislado de los mismos. En años recientes, la presión de la comunidad de padres y familias afectadas por EIM y otras Enfermedades Huérfanas, viene contribuyendo a la creación de un trabajo más articulado de los profesionales de la salud, y de estos con los organismos del estado.

Metodología específica

Conformación:

Se propone conformar un grupo multidisciplinario de estudio de los EIM actúe como un grupo de referencia, asesoría, capacitación y seguimiento de los casos encontrados en términos de verificar el desenlace de estos niños y familias. Para la conformación del equipo de trabajo y la subsecuente creación de la Sociedad Vallecaucana de Enfermedades Huérfanas, se seguirá la siguiente metodología:

1. Inicialmente se programará reuniones con los pediatras y neonatólogos de las entidades de salud participantes del estudio. El Centro estimulará que la participación de personal científico de las entidades de salud involucradas en el estudio, así como la de consultores externos, será compensada en especie cuando sea pertinente o requerido. Se contará con la participación de la secretaria de Salud Departamental la Dra. María Cristina Lesmes y el coordinador de dimensiones condiciones no transmisibles Dr. Carlos Robledo, para la preparación del acta de la asamblea de constitución de la Sociedad. Adicionalmente, se invitará a participar al personal médico del Departamento que trabaja en Enfermedades Huérfanas como los médicos genetistas de la Fundación Valle del Lili, Universidad del Valle y representantes del sector privado (Sociedad de Enfermedades Huérfanas).

2. Subsecuentemente, se constituirán y documentarán los estatutos que regirán la Sociedad formada, en los que se definirá la información de la sociedad, actividades a realizar, organigrama de la sociedad (figura 7), órganos de administración y vigilancia, patrimonio y periodicidad de las reuniones ordinarios y extraordinarias. Los documentos serán firmados por el presidente y secretario de la reunión, cuyas firmas deberán ser reconocidas ante un notario.

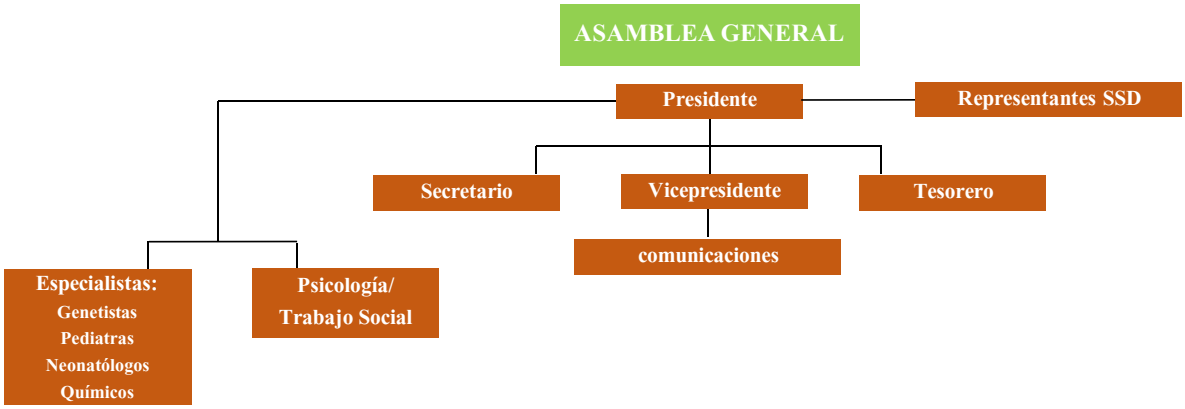


Figura 7. Organigrama Sociedad Vallecaucana de Enfermedades Huérfanas.

Responsabilidades

La sociedad será una organización multi-disciplinaria y multisectorial de carácter académico, cuya responsabilidad será promover el interés en las Enfermedades Huérfanas, inicialmente con énfasis en los EIM, tanto en profesionales de la salud, estudiantes de pre y postgrado de las facultades de medicina, biología, química y otras afines que pudieran tener interés y capacidad para aportar al fortalecimiento del diagnóstico y manejo de estas patologías. Igualmente, estará abierta y promoverá la participación de asociaciones de padres familias, industria farmacéutica, y gobierno. Adicionalmente la Sociedad, buscará su inserción en organizaciones internacionales del área.

Este equipo contribuirá a la socialización del riesgo y la prevalencia de los EIM en Colombia, la disponibilidad de TNA en el Departamento del Valle y la necesidad de promover su realización en todo el país. Brindar apoyo a las familias afectadas por la presencia de EIM y otras enfermedades huérfanas, y constituirse en grupo asesor para las autoridades de salud del Departamento y el país. Adicionalmente este grupo multidisciplinario promoverá que los resultados obtenidos en este proyecto sean socializados con todas las entidades gubernamentales responsables de la salud en el Departamento del Valle del Cauca y en el país, de manera que se pueda tener datos estadísticos fehacientes, que permitan medir el problema real de los EIM. La Sociedad Vallecaucana de Enfermedades Huérfanas trabajará en estrecha articulación con la mesa Nacional de Enfermedades Raras liderada por el

Ministerio de Salud y Protección Social (FECOER, Federación Colombiana de Enfermedades Raras) y otras asociaciones interesadas. El grupo adelantará las siguientes acciones:

1. De acuerdo con los reportes de casos de pacientes con EIM, producto del análisis ejecutado en los objetivos # 1 y 2 con el acompañamiento de la Sociedad, se implementarán estrategias efectivas de seguimiento a pacientes con estas enfermedades, de manera que se pueda tener un protocolo para el tratamiento de estos pacientes, además de acceder a pruebas de confirmación, que conduzcan a la generación de bases para la implementación del programa nacional de TNA. Para esta actividad se contará con la asesoría internacional del Dr. Jose Ángel Cocho Director del Laboratorio de Metabolopatías del Complejo Hospital Universitario de Santiago de Compostela, España, programando una visita a la Sociedad en el segundo año de ejecución, donde se tocarán temas relacionados con la realización del TNA, pruebas confirmatorias, acceso a población vulnerable, y estrategias de comunicación entre los pacientes y familias que padecen el suplicio de una Enfermedad Huérfana con las autoridades de salud.

2. Facilitar actividades de entrenamiento y capacitación de estudiantes postgrado, así como a postgraduados en EIM. Se realizarán talleres de entrenamiento en la aplicación de la técnica de diagnóstico, en tratamiento de las muestras biológicas, en diseños de estudios epidemiológicos, y en talleres multidisciplinarios de diagnóstico y tratamiento temprano. El entrenamiento y la formación de profesionales e investigadores jóvenes será un ejercicio crítico de este proyecto, para darle continuidad y sostenibilidad futura a este estudio preliminar, contemplándose la realización de 15 capacitaciones a los profesionales mencionados anteriormente.

3. Presentación de los datos de prevalencia de los EIM en congresos médicos, en Facultades de Ciencias de la Salud, ante las autoridades de Salud y ante todos los interesados. Esta actividad vendrá de la mano con la elaboración de comunicados de prensa, intervenciones televisivas y radiales, de manera que la información llegue también en un lenguaje acorde a los principales beneficiados, que en nuestro caso son los padres de los RN y lactantes menores que se encuentran diariamente en las unidades de neonatología y pediatría de las instituciones de salud del país.

Resultados esperados: Con la realización del presente objetivo se espera formalizar una alianza estratégica entre el CIV y las entidades de salud de la región, que permitirá realizar investigaciones en el campo de las enfermedades huérfanas, ayudando a dimensionar el problema de los EIM en la región, y por ende en el país, de manera que se fortalezca el área de diagnóstico para estas alteraciones. Los resultados serán socializados con las SS

departamentales y el MSP, y “los datos obtenidos de casos positivos serán inmediatamente informados al área de pediatría de las instituciones colaboradoras del estudio, los cuales tomarán las decisiones respecto al tratamiento de la alteración y registrados en la ficha técnica del INS Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública Subdirección de Prevención, Vigilancia y Control en Salud Pública Grupo de Enfermedades no Transmisibles quienes notificarán al MSP a través del programa SISPRO. Igualmente, desde las Escuelas de Laboratorio Clínico, Ciencias Básicas de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle se liderará la inclusión de los conceptos de TNA en el currículo de las Facultades de Salud de la región. Finalmente, se promoverá la educación de mujeres en edad reproductiva sobre la existencia e importancia del TNA.

7. LICENCIAS O PERMISOS

Teniendo en cuenta que este estudio realizará investigación en seres humanos, es importante contar con el aval de un órgano académico independiente que verifique que quienes se encuentren involucrados en el estudio en la parte científico técnica cumplan con todas las normas y regulaciones para la ejecución, y que los participantes tengan seguridad, respeto, libertad, autonomía, dignidad e intimidad y demás derechos de las personas, así como del medio ambiente y las instituciones participantes en forma activa o pasiva en actividades de investigación.

Aspectos éticos: Esta investigación se considera de mínimo riesgo de acuerdo a la resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia, y se guiará por las declaraciones internacionales como Buenas Prácticas Clínicas y la declaración de Helsinki. Todas las personas serán libres de elegir su participación o no en el estudio y se tomará firma de un consentimiento informado previamente avalado por un Comité de Ética en Investigación, como aprobación del tutor legal al momento de la inclusión.

Consentimiento Informado: A las personas presentes en el momento de la visita, y quienes responden con la tutoría legal de los infantes, se les explicarán claramente los objetivos del estudio, los procedimientos, riesgos y beneficios. Se les solicitará que permitan la toma de aproximadamente 500 μL de sangre para la realización de la prueba. Si los sujetos están interesados en participar, se les pedirá que firmen el formulario de CI, previamente revisado y aprobado por el Comité de Ética Institucional.

Riesgos: La realización de este estudio no implica un riesgo mayor para los participantes, sin embargo pueden presentarse pequeñas incomodidades en la toma de la muestra como dolor en el sitio de la punción y en ocasiones aparición de hematomas, equimosis o infección. Estas complicaciones se evitarán asegurando que solo personal calificado tome las muestras, permitiendo que el niño se encuentre en una posición cómoda y teniendo en cuenta las normas de bioseguridad.

Confidencialidad: El IP y cada una de las personas que participan en el estudio clínico deben guardar como confidencial toda la información producida. Todos los datos obtenidos durante el estudio serán anónimos. La lista de nombres codificados permanecerá exclusivamente en poder del IP.

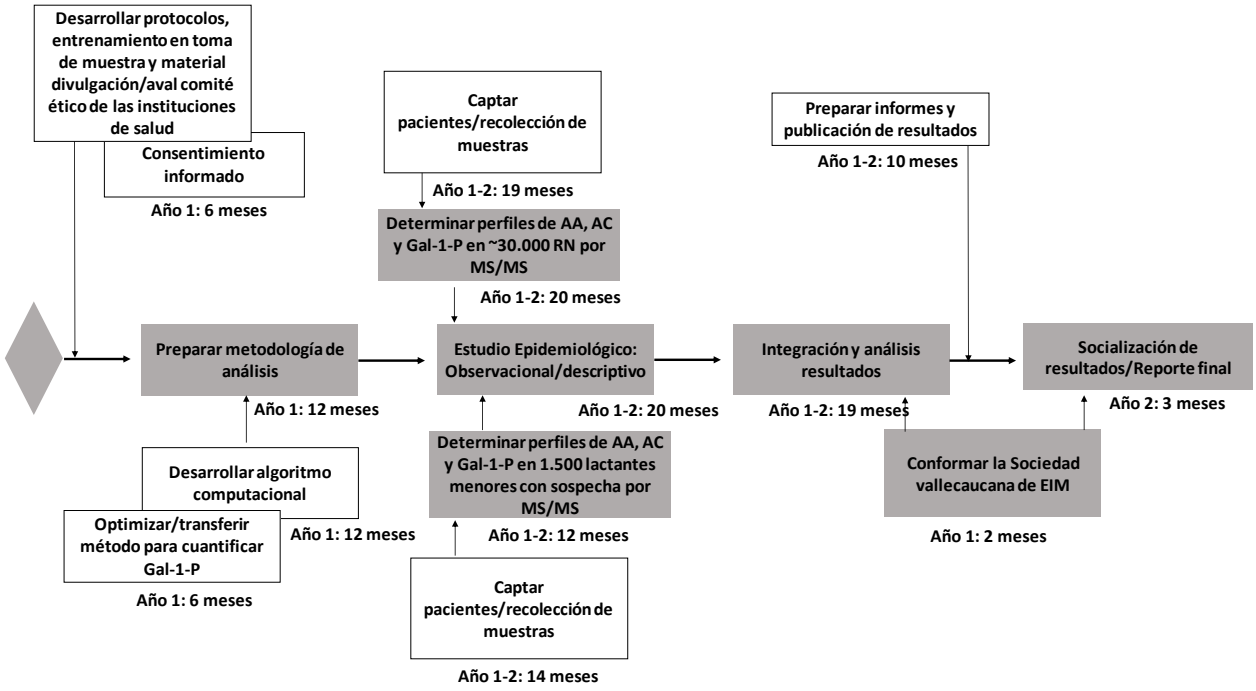
Uso de la Información y Publicaciones Derivadas del Estudio: Los resultados de este estudio son confidenciales y se publicarán únicamente después de la autorización de los IPs y de las instituciones financiadoras. Se anticipa que los resultados se presentarán a la

comunidad científica por medio de presentaciones orales en congresos, presentación de informes a las autoridades de salud departamentales y publicaciones en revistas científicas.

Impacto ambiental: Consideramos que este proyecto no tiene efecto ambiental. Todas las secciones de los laboratorios del Centro Internacional de Vacunas y Asoclinic han recibido instrucciones y adaptaciones específicas sobre las regulaciones, tanto del gobierno Colombiano como de otras instituciones internacionales como el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH), sobre el manejo y disposición de los desechos químicos y biológicos.

Este estudio no requiere de la aprobación de licencias especiales, sin embargo, las entidades involucradas se encuentran cobijadas bajo las normas del estado colombiano para su normal funcionamiento.

8. CRONOGRAMA



9. PLAN OPERATIVO

PLAN OPERATIVO											
Objetivo	**Actividades**	**Programación**								**Responsables**	**Meta**
		3	**6**	**9**	**12**	**15**	**18**	**21**	**24**		
Específico #1: Determinar la prevalencia de los EIM en la población de recién nacidos del Valle del Cauca	Desarrollar protocolos para aval del comité de ética, entrenamiento en la toma de muestra de personal de enfermería y preparación de material de divulgación para la comunidad médica y comunidad en general.									CIV/unidades de pediatría	Cubrir un tamaño total de 30.000 RN tamizados para EIM, que permitan determinar la prevalencia de estas enfermedades en el Departamento.
	Transferir y optimizar la metodología para cuantificar galactosa-1-fosfato de equipo a equipo									CIV	
	Captar muestras (~30.000 RN)									ASOCLINIC/ INSALPA/Entidades de salud participantes/SSD	
	Determinar perfiles de AA, AC y Gal-1-P en ~30.000 RN por MS/MS									CIV/ASOCLINIC	
	Analizar lo resultados y determinar la prevalencia de los EIM. Vincular un (1) estudiante de maestría en epidemiología o estadística									CIV/ASOCLINIC/ INSALPA	
	Escritura de una publicación científica con los resultados de la tamización de ~30.000 RN y divulgar información en conferencias									CIV/ASOCLINIC/ INSALPA	
Específico #2: Determinar los perfiles metabólicos de aminoácidos, acilcarnitinas y galactosa-1-fosfato en una población con sospecha del Valle del Cauca	Evaluar lactante menores: captar muestras de los casos con sospecha de EIM (1.500 lactantes menores)									CIV/ASOCLINIC/ INSALPA/unidades de pediatría	Cubrir un tamaño total de 1.500 RN lactante menores con sospecha tamizados para EIM, de manera que se pueda diagnosticar eficientemente y tempranamente estas enfermedades en una población con altos riesgos de presentarlas
	Determinar perfiles de AA, AC y Gal-1-P en ~1.500 lactantes menores por MS/MS									CIV/ASOCLINIC	
	Analizar los resultados, remitir y hacer seguimiento de casos positivos de EIM										
	Escritura de la publicación de los resultados del tamizaje de 1500 lactantes menores con sospecha de presentar un EIM									CIV/ASOCLINIC/ INSALPA/unidades de pediatría	

PLAN OPERATIVO											
Objetivo	**Actividades**	**Programación**								**Responsables**	**Meta**
		3	**6**	**9**	**12**	**15**	**18**	**21**	**24**		
Específico # 3: Desarrollar un algoritmo computacional que permita integrar la información de los marcadores producidos por el MS/MS para el diagnóstico de EIM	Desarrollar el módulo de carga de datos, procesamiento y presentación del algoritmo. Vincular un (1) estudiante de maestría en ingeniería en sistemas									CIV	Lograr crear el algoritmo computacional para la optimización de análisis de resultados de EIM
	Validar el algoritmo y realizar pruebas de seguridad									CIV	
Específico #4: Conformar un equipo de trabajo multidisciplinario para el estudio de los EIM y otras Enfermedades Huérfanas.	Constituir la Sociedad vallecaucana de enfermedades huérfanas y documentar los estatutos que regirán la sociedad									ASOCLINIC/ INSALPA/Entidades de salud participantes/SSD	Lograr conformar la Sociedad Vallecaucana de EIM, incluyendo autoridades de salud departamentales, personal de salud de las entidades aseguradoras del departamento, asociaciones de pacientes y la academia
	Realizar reuniones para el seguimiento a pacientes detectados con un EIM. Recibir asesoría internacional sobre seguimiento a pacientes y constitución de red de diagnóstico.									ASOCLINIC/ INSALPA/Entidades de salud participantes/SSD	
	Realizar capacitaciones de estudiantes de postgrado en tamizaje y diagnóstico de EIM									ASOCLINIC/ INSALPA/Entidades de salud participantes/SSD	
	Presentar los datos de prevalencia y divulgación de los informes									ASOCLINIC/ INSALPA/Entidades de salud participantes/SSD	

10. RESULTADOS/PRODUCTOS ESPERADOS

El desarrollo exitoso de esta propuesta permitirá estimar la prevalencia real de los EIM a través del tamizaje de una población general de RN y lactantes menores con sospecha de los mismos en la región del Valle del Cauca. A pesar que por la baja prevalencia de casos positivos para estas patologías raras no será posible avanzar estudios adicionales, la determinación de su prevalencia representa un importante avance epidemiológico para el Departamento y para el país, debido al desconocimiento que se tiene actualmente sobre estas alteraciones.

De otro lado, para el proceso de análisis de los datos será necesario el desarrollo de un algoritmo analítico, producto de gran valor como desarrollo informático de alta especificidad. Dicho algoritmo se pondrá a disposición de la comunidad científica interesada en el análisis de EIM, y en este sentido representar un importante valor agregado del proyecto y el potencial desarrollo de un proyecto nacional. Un cuarto producto será el establecimiento del grupo multidisciplinario que no solo será de gran valor para el análisis científico de los casos, sino como soporte a las actividades de entrenamiento y la constitución de la Sociedad Vallecaucana de Enfermedades Huérfanas, que favorecerá el contacto de los pacientes y sus asociaciones con la clínica. Este equipo será un producto de gran valor para facilitar el acceso a terapias complementarias, rehabilitación y ayuda psicológica, la posibilidad de poner en contacto a las familias de una misma patología, sentido comunitario y apoyo mutuo.

El proyecto permitirá no solo expandir el conocimiento actual sobre los EIM, conllevando además a la capacitación de nuevos profesionales de salud en el tema, sino que representará un apoyo a las autoridades de salud del país. Los resultados serán puestos a disposición de la comunidad a través de informes de resultados dirigidos a las autoridades de salud, publicaciones científicas nacionales o internacionales y participación en tres eventos científicos.

Finalmente, el proyecto contribuirá a viabilizar la implementación de un programa de TNA inicialmente en el Departamento del Valle del Cauca y posteriormente en todo el país, superando el rezago que tiene el país actualmente en materia de diagnóstico y tratamiento efectivo para estas alteraciones comparado con los países industrializados y algunos más avanzados de América Latina.

Generación de conocimiento y/o nuevos desarrollos tecnológicos

Resultados esperados	Indicador	Beneficiario
• Prevalencia de EIM en la población de RN y lactantes menores con sospecha del Valle del Cauca	• Informes de investigación (4)	• Comunidad científica nacional e internacional
• Algoritmo computacional para la optimización de análisis de resultados	• Un (1) algoritmo computacional	• Comunidad científica nacional

Fortalecimiento de la comunidad científica

Resultados esperados	Indicador	Beneficiario
• Vinculación de estudiantes de postgrado	• Dos (2) estudiantes de maestría	Comunidad científica nacional

Apropiación social del conocimiento

Resultados esperados	Meta	Beneficiario
• Ponencias en congresos	• Tres (3) ponencias al menos una internacionales	• Comunidad científica nacional e internacional, autoridades de salud y población en general
• Artículos científicos en revistas indexadas	• Dos (2) publicaciones en revistas nacionales o internacionales en revistas indexadas en cuartiles 1, 2 o 3 de SCOPUS.	
• Capacitaciones realizadas	• 15 capacitaciones a estudiantes de postgrado.	
• Transferencia, Socialización de los resultados al INS	• Se reportarán los casos positivos en la ficha técnica del SIVIGILA (Enfermedades Huérfanas).	
• Informes presentados	• Cuatro (4) informes presentados	

11. EVALUACIÓN DE RIESGOS

Objetivo	Riesgos	Nivel de Riesgo			Análisis y Conclusión
		A	M	B	
Específico 1: Determinar la prevalencia de los EIM en la población de recién nacidos del Valle del Cauca	Inconvenientes en la captación de las 30.000 muestras de RN propuestas.				• Mediante la generación del convenio con la SSDV del Valle del Cauca, se podrán captar muestras en todos los municipios del Valle, dándole carácter priorizado al TNA en el Departamento.
	Incorrecta toma de muestra				• Se realizarán actividades de capacitación a enfermeras y auxiliares sobre toma de muestra, control de calidad, registro almacenamiento y transporte, en los diferentes centros asistenciales.
	Perdida de sujetos a los cuales se les toma muestra				• Se tendrán auxiliares de enfermería debidamente capacitadas en cada una de las clínicas de estudio, que se encargarán de dar la debida información a los voluntarios y explicar acerca de la importancia del estudio y la necesidad de seguimiento y un contacto estricto.
	Avería de los equipos críticos en el proceso de análisis.				• Todos los equipos críticos del proceso de análisis para Tamizaje metabólico que se encuentran actualmente en el CIV, cuenta con licencias de mantenimientos renovadas, además dentro de las políticas del grupo se encuentra la programación de mantenimiento preventivos anuales. • En el caso del MS/MS se cuenta con una licencia de mantenimiento y contrato de aseguramiento de piezas anual, con respuesta priorizada por parte del proveedor.
Específico 2: Determinar los perfiles metabólicos de aminoácidos, acilcarnitinas y galactosa-1-fosfato en una población con sospecha del Valle del Cauca*	Una incorrecta discriminación de los casos con sospecha de presentar un EIM.				• Debido al cuadro clínico inespecífico de los EIM, en las salas de urgencia de pediatría la frecuencia de casos de lactantes menores con sospecha es alta, sin embargo se debe hacer un seguimiento exhaustivo de la evolución de los pacientes y análisis minucioso de los hallazgos de laboratorio, para disminuir el margen de error en la clasificación como población con sospecha. • El CIV, junto con un comité de médicos con amplia experiencia en el diagnóstico de EIM, definió unos criterios de inclusión para la clasificación de población con sospechosa de EIM, basados en la sintomatología predominante en casos positivos de estas enfermedades. El CIV, cuenta con la asesoría de la Dra. Yolanda Cifuentes especialista en EIM, además del

					Director del laboratorio de metabolopatías del Complejo Hospital Universitario de Santiago, el Dr. José Cocho.
Específico 3: Desarrollar un algoritmo computacional que permita integrar la información de los marcadores producidos por el MS/MS para el diagnóstico de EIM	Un incorrecto funcionamiento del algoritmo a la hora de agrupar y clasificar los resultados (Validación).				• El proceso de desarrollo del algoritmo, como herramienta de apoyo para el diagnóstico de los EIM se realizará mediante un proceso planificado, reduciendo este riesgo con el uso e integración de personal técnico con experiencia en el diseño de estas herramientas. • El CIV cuenta con una red de apoyo internacional para el diseño de herramientas computacionales y manejos de datos, que sin ninguna duda ayudarán en el proceso de ejecución del presente objetivo.
Específico 4: Conformar un equipo de trabajo multidisciplinario para el estudio de los EIM y otras Enfermedades Huérfanas	No se logré conformar el equipo de trabajo adecuado para realizar un análisis y socialización adecuada de los resultados obtenidos en el proyecto.				• En la actualidad el proyecto cuenta con personal médico colaborador, muy comprometido con la articulación de sus actividades dentro del estudio, que viven las falencias en las políticas de salud pública para darle seguimiento a este problema que necesita promoción y prevención. • Este riesgo se ve ampliamente mitigado por la participación activa de personal administrativo de la SSDV y de las instituciones de salud participantes, encargados de los problemas de salud del Departamento. • Se debe realizar un seguimiento junto con la SSDV de las actividades del presente objetivo durante la ejecución del proyecto.

* Los riesgos correspondientes al objetico específico 1 respecto a generación de resultados falsos negativos y positivos, y la avería de los equipos críticos en el proceso de análisis, también hacen parte de la evaluación de riesgos del objetivo específico 2, teniendo el mismo análisis y conclusión. (A: alto, M: medio y B: bajo).

12. SEGUIMIENTO Y EVOLUCIÓN: INDICADORES

Objetivo General: Estudiar la prevalencia de los EIM dependientes de aminoácidos, acilcarnitinas y galactosa-1-fosfato por espectrometría de masas en tándem en recién nacidos y lactantes menores del Valle del Cauca.		
Producto: RN y lactantes menores tamizados por MS/MS		
Indicadores de producto	**2017**	**2018**
No. de RN y lactantes menores tamizados para EIM	15.750	15.750
Indicadores de gestión		
Metodologías diseñadas	1	0
Mecanismos de coordinación interinstitucional, intersectorial e interterritorial	1	
Conferencias en investigación en salud	0	3
Estudiantes vinculados al proyecto	2	0

Objetivo Específico # 1: Determinar la prevalencia de los EIM en la población de recién nacidos del Valle del Cauca.		
Producto: RN tamizados para EIM		
Indicadores de producto	**2017**	**2018**
No. de población (RN) atendidos	15.000	15.000
No. de publicaciones en revistan indexadas nacionales o internacionales	0	1

Objetivo Específico # 2: Determinar los perfiles metabólicos de aminoácidos, acilcarnitinas y galactosa-1-fosfato en una población con sospecha del Valle del Cauca.		
Producto: Lactantes menores con sospecha tamizados para EIM		
Indicadores de producto	**2017**	**2018**
No. de población (Lactantes menores) atendidos	750	750
No. de publicaciones en revistan indexadas nacionales o internacionales	0	1

Objetivo Específico # 3: Desarrollar un algoritmo computacional que permita integrar la información de los marcadores producidos por el MS/MS para el diagnóstico de EIM.		
Producto: Algoritmo computacional para la optimización de análisis de resultados de EIM		
Indicadores de producto	**2017**	**2018**
Soluciones tecnológicas diseñadas	1	0

Objetivo Específico # 4: Conformar un equipo de trabajo multidisciplinario para el estudio de los EIM y otras Enfermedades Huérfanas.		
Producto: Conformar la sociedad Vallecaucana de Enfermedades Huérfanas		
Indicadores de producto	**2017**	**2018**
Capacitaciones a estudiantes de postgrado y especialistas	0	15
No de informes presentados	2	2

13. IMPACTOS

Impacto 1. Regional	**Año de medición**
Descripción	
1. Fortalecimiento regional en la estructura del diagnóstico oportuno de EIM	2do año de ejecución
2. Establecimiento del Tamizaje neonatal ampliado por MS/MS en la región, como una técnica efectiva en el apoyo al diagnóstico de EIM	2do año de ejecución
3. Mejoramiento en la organización y estudio de los EIM, mediante la creación por primera vez en el Departamento de una sociedad Vallecaucana de metabolopatías	2do año de ejecución
Impacto 2. Políticas públicas	**Año de medición**
Descripción	
1. Producir conocimiento útil en cuanto a la prevalencia de EIM, que permita conocer el problema de salud pública actual, integrando los resultados a las estadísticas y normativas regionales y nacionales	2do año de ejecución
Impacto 3. Productividad y competitividad	**Año de medición**
Descripción	
1. Desarrollar e implementar una estrategia para el diagnóstico temprano de EIM	2do año de ejecución
2. Sentar las bases para la futura creación de un programa regional de TNA por espectrometría de masas	2do año de ejecución
3. Creación de herramientas computacionales, que junto con la versatilidad de la MS/MS, optimice el proceso de análisis de resultados	2do año de ejecución
4. Fortalecimiento de las áreas de pediatría y neonatología de las entidades de salud regionales en el diagnóstico de EIM	2do año de ejecución
Impacto 4. Sector salud	**Año de medición**
Descripción	
1. Aplicación de nuevas herramientas de apoyo al diagnóstico de EIM, que permita reducir los índices de discapacidad y muerte relacionados con estas alteraciones	2do año de ejecución
2. Disminuir el impacto socio-económico que tienen los EIM en la población	2do año de ejecución
Impacto 5. Nacional	**Año de medición**
Descripción	
1. Instauración del TNA por espectrometría de masas en tándem por primera vez en el país	2do año de ejecución

14. GRUPO DE COLABORADORES

Fundación Centro Internacional de Vacunas: La Fundación CIV es una fundación privada sin ánimo de lucro, creada en el año 1999 en Cali, con el apoyo del Programa Especial de Enfermedades Tropicales de la OMD (TDR/OMS). Desde su creación el CIV ha venido desarrollando investigación cooperativa con centros de investigación líderes en el mundo en temas relacionados con el desarrollo de vacunas, estudios epidemiológicos en malaria y otras enfermedades como dengue. Inmediatamente, después de su creación (2001), el CIV recibió financiación del Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas de los Estados Unidos (NIAID/NIH) para establecer en Cali, un Centro de Investigación en Medicina Tropical (Tropical Medicine Research Center, TMRC) (Grant # AI 49486-01). El TMRC se desarrolló durante un periodo de cinco (5) años en colaboración con múltiples instituciones científicas de los Estados Unidos, Europa y América Latina y Colombia. Este programa fortaleció tanto la capacidad científica de CIV medida por el número de investigadores vinculados, el número de estudiantes formados y la publicación de sus trabajos en revistas de alcance internacional (ver Vol. 73 Suplemento Especial No 5, Am. J. Trop. Med & Hyg, 2005, dedicado exclusivamente a CIV). En este contexto, en el 2002, el CIV logró la aprobación por parte del Centro Fogarty Internacional (FIC/NIH) de la financiación para un programa internacional para el entrenamiento en Colombia de investigadores nacionales y extranjeros (Estados Unidos y América Latina) (Internacional Malaria Research Training Program/IMRTP; Contrato # TW 005885-01) por un periodo de cuatro (4) años (2002-2006). Posteriormente, en el año 2007 el CIV fue seleccionado por el TDR/OMS (TDR/WHO, Contrato # AD/AP 0700209) para el establecimiento en Colombia de un programa internacional de entrenamiento en buenas prácticas clínicas (BPL) (GLP Latin American Training Office - GLP/ALTO).

En el 2008, el CIV lideró el establecimiento del Consorcio Caucaseco para la Investigación Científica en Cali que agrupó a varios Centros de Investigación, el cual participó en el 2009 en una convocatoria internacional del NIAID/NIH para el establecimiento de uno de 10 Centros de Excelencia Internacional de Investigación en Malaria (ICEMRs). CIV fue seleccionado y durante los últimos seis años ha trabajado en cooperación con centros de investigación y gobiernos de Guatemala, Honduras, Panamá, Ecuador, Perú y Colombia en la estructuración del Centro Latino Americano de Investigación en Malaria (CLAIM) que se coordina desde Colombia. El CLAIM involucra grupos de investigación de las principales universidades públicas del país: Universidad del Valle, U. Nacional y U. de Antioquia, universidades con menor desarrollo como la U. de Córdoba, a organizaciones privadas como y la Fundación Santa-Fe de Bogotá, y al Ministerio de la Protección Social, incluido el Instituto Nacional de Salud (INS), con los cuales desarrolla actualmente proyectos de epidemiología en Chocó, Córdoba, Nariño y Valle. El dinámico desarrollo del CIV a lo largo

de los últimos 15 años y en particular con el impulso brindado por el CLAIM en los últimos seis años, generan un sólido escenario para el desarrollo de la presente propuesta. La valiosa infraestructura de laboratorio y su importante red de cooperación científica nacional e internacional, han facilitado el establecimiento de las condiciones para el estudio de EIM en Colombia. Aprovechando la disponibilidad de la tecnología de MS/MS financiada inicialmente por el MSP y con el apoyo de Asoclinic Inmunología Ltda (Cali) y la asesoría del Laboratorio de Referencia en Desórdenes Metabólicos (LRDM) del Complejo Hospital Universitario de Santiago de Compostela (España), CIV ha logrado en una fase piloto, determinar los valores normales de numerosos analitos críticos para el TNA en 1000 recién nacidos sin sospecha de presentar alguna alteración en la ciudad de Cali. El LRDM cuenta con un método implementado y validado para la realización de **TNA** por MS/MS, que ha sido transferido a Cali a través del intercambio de investigadores y tecnología entre los dos Centros.

El Centro cuenta con la dirección científica de la doctora Myriam Arévalo R. (Ph.D.) fundadora del CIV quien además se desempeña como profesora (profesor Emérito) de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle (Cali) quien posee un gran liderazgo y posee un importante record de publicaciones (~130) en revistas científicas de alto impacto.

Asoclinic Inmunología Ltda.: Asoclinic es un laboratorio especializado en pruebas inmunológicas, biología molecular y análisis de pruebas toxicológicas, pionero en brindar servicios de análisis de diagnóstico clínico de alta complejidad. Establecido en Bogotá en 1981, y trasladado a Cali en 1987, fue el primer laboratorio en el suroccidente colombiano en ofrecer pruebas de recuento linfocitario por Citometría de Flujo y carga viral por biología molecular para el seguimiento del tratamiento de pacientes con VIH, además del diagnóstico molecular de otras enfermedades infecciosas como herpes, hepatitis, citomegalovirus, malaria, tuberculosis y el diagnóstico temprano de progresión de cáncer de cérvix mediante la detección del virus del Papiloma Humano (VPH) de alto riesgo. De 1999 hasta el 2001, en asociación con la Fundación Clínica Valle del Lili (FCVL), estableció el laboratorio de inmuno-genética para dar apoyo al programa de trasplante de riñón y médula ósea para pacientes leucémicos en la FCVL, siendo para el 2005 un laboratorio de referencia en pruebas de histocompatibilidad ofreciendo servicios de tipificación HLA a los programas de trasplantes del Centro de Diagnóstico DIME y el Centro Médico Imbanaco de Cali, con lineamientos de la Asociación Americana de Histocompatibilidad e Inmuno-genética (ASHI) y asesoría permanente de 2 centros internacionales como el Dept. of Pathology Emory University Hospital en Atlanta (GA) en los Estados Unidos (Dr.H. M. Gebel Ph.D., D (ABHI) y R. Bray) y el Servei inmunología, CDB, H. Clínica de Barcelona (España) (DR. J. Martorell). En la misma época estableció el Laboratorio de Investigación Clínica y Molecular (LICM) que desde entonces ha venido desarrollando investigación aplicada al área clínica.

Asoclinic ha contado con el apoyo de Colciencias para la realización de proyectos relacionados con:

- Polimorfismo de los receptores FC IIA, IIIA y IIIB en pacientes colombianos con síndrome de Sjögren primario, Número de Contrato: 473-2004 Código: 6124-04-16477.
- Anemia y malaria: Papel de la destrucción de eritrocitos y bloqueo medular en el modelo *Aotus lemurinus griseimembra*, Número de contrato: 255-2005 Código: 2304-13-17756.
- Neoplasias de células precursoras linfoides en pacientes pediátricos de Cali: Diferencia en los niveles de expresión del Gen WT1 según factores de pronóstico de supervivencia (leucemia), Número de contrato: 522-2002 Código 4359-04-13130.
- Monitoring of Imatinib Concentrations: A study to compare the clinical usefulnes of "Routine" versus "Rescue" Therapeuthic Drug Monitoring (TDM) in the treatment of Chronic Myeloid Leukemia (CML).
- Cinética de la recuperación inmunológica de niños trasplantados con células madre hematopoyéticas.

La organización tiene procesos concisos y muy bien estructurados, contando con políticas documentadas que promueven el mejoramiento continuo, haciendo que la innovación sea parte integral de los procesos de calidad. Actualmente, se encuentra acreditada y certificada por el IDEAM en la norma 17025 de 2005, resolución 3184 de 2014 y en la norma ISO 9001 hasta el 2010, pero se continúa trabajando de conformidad con esta norma y la ISO 15189 para laboratorios clínicos. En su plan estratégico de desarrollo **Asoclinic** cuenta con una matriz de acción en la que claramente se evidencian responsabilidades, metas, responsables, cronograma y presupuesto, donde uno de los objetivos principales es el establecimiento de un laboratorio de referencia en pruebas clínicas especializadas y ambientales, tanto en el mercado nacional como el internacional.

El proyecto se proponen utilizar la estrecha interacción del Consorcio Caucaseco al cual se encuentran asociados el CIV, Asoclinic e INSALPA con el Instituto Nacional de Salud (INS) en Bogotá, para brindar toda la información recolectada en el presente proyecto, a las estadísticas nacionales y conjuntamente con el INS trabajar en la fase posterior de extensión de este programa a todo el país.

Fundación Instituto de Salud del Pacífico (INSALPA): Con más de 20 años de presencia en la Costa Pacífica INSALPA se constituye legalmente en una fundación sin ánimo de lucro en el año 2014 con sedes en Buenaventura, Tumaco y Quibdó. Actualmente, la fundación

apoya los proyectos en marcha de Caucaseco como CLAIM (NIH) y la Red ETV (Colciencias), que le han permitido diversificar su portafolio de investigaciones y servicios a las comunidades del litoral Pacífico. INSALPA concentra esfuerzos inicialmente en patologías como malaria, tuberculosis y dengue reconocidas como causas primarias de morbi-mortalidad en la región, con una meta a corto plazo de incorporar patologías crónicas como la hipertensión arterial, diabetes, obesidad y la desnutrición. Su sede principal se encuentra establecida en Buenaventura donde ha venido suministrando valiosa información a los programas de control de la malaria a las Secretarias de Salud Departamental y más recientemente a la Secretaria de Salud Distrital. Esta sede al igual que las de Tumaco y Quibdó ha sido esenciales para los estudios de población llevados a cabo en el contexto del proyecto CLAIM del consorcio Caucaseco así como del programa de Red de ETV apoyado por Colciencias. Esta experiencia le permitirá a INSALPA contribuir en el reclutamiento, y toma de muestras de madres que pueden acceder fácilmente a las instalaciones de INSALPA, así como en el seguimiento y contacto con padres de familia en Buenaventura y reporte de casos a Sivigila. Adicionalmente contribuirá con el entrenamiento de profesionales, técnicos y comunidad de la Costa Pacífica con el fin de llevar a las comunidades alternativas que mejoren la calidad de vida y les permitan acceder de forma oportuna a diagnósticos de importancia para las mismas.

Roles de las entidades proponentes en la formulación y ejecución del proyecto-compromisos

1. Formulación técnico-científica del proyecto y ejecución de aspectos relacionados con el Diseño del estudio epidemiológico de los EIM usando MS/MS, lo cual deriva en el Procesamiento y estudio de los perfiles de AA, AC y Gal-1-P de las muestras captadas, Optimización y transferencia de la tecnología para la cuantificación de Gal-1-P, Desarrollo del algoritmo computacional, y análisis de resultados de prevalencia.
2. Participación en la determinación de los criterios de inclusión de población en riesgo de presentar un EIM.
3. Colaborar junto con las unidades de pediatría en la escritura de protocolos y gestión de aval por parte de los respectivos comités de ética para el inicio del estudio.
4. Participación en la conformación de la Sociedad Vallecaucana de Enfermedades Huérfanas, siendo el proponente de la formación de la misma.
5. Escritura de los análisis de resultados, informes y publicaciones científicas.
6. Realización de las capacitaciones del personal en salud y ciencias básicas, en cuanto a la aplicación de la MS/MS como técnica de diagnóstico y tratamiento temprano, tratamiento de las muestras biológicas y diseños de estudios epidemiológicos.
7. Coordinadores logísticos del proyecto.

Hospitales del Valle (Colaboradores/Beneficiarios del estudio)

Hospital Universitario del Valle Evaristo García (HUV): Constituye el principal hospital de la red pública del suroccidente colombiano, con una colaboración activa con la Universidad del Valle en la formación y capacitación de profesionales con altas competencias en el área de salud. El Hospital abrió sus puertas al público en 1956, y desde entonces se ha caracterizado por tener un carácter docente y asistencial, lo que le permite tener talento humano comprometido con la salud del Valle del Cauca. El hospital cuenta con un área de pediatría que tiene como objetivo principal brindar atención preventiva, terapéutica y de rehabilitación a los niños del Valle del Cauca, quienes en cabeza del médico pediatra Javier Torres Muñoz conforman el grupo de investigación certificado por Colciencias que lleva como nombre "Grupo de investigación en neonatología, salud infantil y desarrollo" (COL0117159), en donde se adelantan estudios sobre los factores de riesgo asociados al desarrollo de asfixia perinatal en neonatos, los cuales entran en el cuadro clínico de los EIM.

Hospital Raúl Orejuela Bueno: El Hospital fue creado desde 1995 por el acuerdo No 37 del mismo año y se encuentra localizado en la sede del anterior hospital san Vicente de Paul. Desde entonces, viene realizando atención en salud de alta calidad a la población de Palmira bajo el lema "salud con amor y excelencia", contando con servicios especializados en el área de cardiología, oncología y pediatría, entre otras. En 2015 el área de pediatría, y con el apoyo del Secretario de Salud Municipal de Palmira el Dr. Alejandro Solo Nieto, el hospital adelantó una campaña donde se comenzó a realizar Tamizaje Neonatal para determinar la prevalencia de enfermedades metabólicas como galactosemias, Fenilcetonuria y Deficiencia de la biotinidasa en los RN de Palmira, con la colaboración del Dr. José María Satizábal.

Fundación Hospital San José de Buga: Es una institución sin ánimo de lucro y de origen privado, dedicada a la prestación de servicios de salud de alta calidad, constituyéndose como una de las principales instituciones de salud que cubre a gran parte de la población del norte del Valle del Cauca. Dentro de las políticas de la institución, se encuentra la búsqueda de herramientas que influyan en mejorar la salud de los pacientes del Departamento, tomando esto como punto de partida, en las áreas de neonatología y pediatría se viene trabajando por la salud de los niños del norte del Valle, mostrando por el personal a cargo de estas áreas, el neonatólogo Luis Alfonso Mendoza y el pediatra Carlos Fernando Toro, una seria preocupación por la carencia de información en cuanto a los EIM y su diagnóstico, expresando su deseo de conformar con el CIV un grupo de trabajo para apoyar en este fin.

Hospital Luis Ablanque de la Plata: Es una de las principales instituciones de salud de Buenaventura, comprometida con velar por la calidad de vida de los pacientes de este municipio, mediante la búsqueda continua de herramientas de diagnóstico. El Hospital cuenta con un seguimiento de pacientes en las áreas de pediatría y neonatología, donde se atienden la mayoría de los nacimientos del municipio, lo cual es de gran importancia para el cumplimiento de los objetivos del presente estudio.

Roles de las entidades de salud participantes en la formulación y ejecución del proyecto-compromisos

1. Determinación de los criterios de inclusión de población en riesgo de presentar un EIM por parte de las áreas de pediatría. Seguimiento e inclusión de pacientes con sospecha de presentar un EIM, diligenciamiento de las historias clínicas donde se especifique los síntomas, signos y hallazgos de laboratorio que conllevan a la inclusión de pacientes.
2. Captación y toma de muestra de recién nacidos en las áreas de pediatría, después de la explicación a los padres sobre los alcances del estudio y diligenciamiento del CI. Almacenamiento de las muestras, embalaje y envío a las instalaciones del CIV, de acuerdo a los cronogramas que se estipulen con la aprobación del proyecto por los comités de ética.
3. Participación en la conformación de la Sociedad Vallecaucana de Enfermedades Huérfanas.
4. Participar en la escritura de los análisis de resultados, informes y publicaciones científicas.
5. Realización de las capacitaciones del personal en salud, en cuanto al diagnóstico de EIM, evaluación de sospecha de presentar alteraciones metabólicas y tratamiento de muestras biológicas.

Gobernación Valle del Cauca: La Secretaría de Salud del Valle, ha venido colaborando en los programas que adelanta el Consorcio Caucaseco en el Litoral Pacífico y recientemente lideró un programa regional que involucra los Departamentos del Valle y del Cauca, para el fortalecimiento de las actividades de control de la malaria con recursos del Sistema General de Regalías. La experiencia ganada en el campo de las ETV debe ser explotada para avanzar en otras patologías de interés para la comunidad del Departamento como los EIM planteados en este proyecto. En cabeza de la Dra. María Cristina Lesmes (Secretaria de Salud del Departamento) y a través de la Unidad de Saneamiento tienen el firme propósito de la creación de nuevas estrategias y herramientas que brinden apoyo a la clínica en el diagnóstico de enfermedades metabólicas, que permitan dimensionar el problema desde el punto de vista de salud pública.

15. TIPO DE CONCERTACIÓN

Se establecerán convenios de cooperación científica con cada una de las entidades participantes donde se especifican las responsabilidades de cada entidad con referencia específica a los objetivos del proyecto, así como los derechos de utilización, usufructo de los diferentes productos del estudio, y la coautoría científica de las publicaciones derivadas del estudio. Como entidad ejecutora se propone a INFIVALLE, entidad que se encargará de recibir los recursos del Sistema General de Regalías y realizará de manera eficiente los desembolsos correspondientes a cada año de ejecución del proyecto, las actividades técnicas y científicas serán coordinadas desde el CIV.

16. REFERENCIAS

1. Baric I, Fumic K, Hoffmann GF (2001) Inborn errors of metabolism at the turn of the millennium. Croat Med J 42: 379-383.
2. Das SK (2013) Inborn errors of metabolism: challenges and management. Indian J Clin Biochem 28: 311.
3. Raghuveer TS, Garg U, Graf WD (2006) Inborn errors of metabolism in infancy and early childhood: an update. Am fam physician 73: 1981-1990.
4. Weber SL, Segal S, Packman W (2012) Inborn errors of metabolism: psychosocial challenges and proposed family systems model of intervention. Mol Genet Metab 105: 537-541.
5. Arn P, Valle D, Brusilow S (1988) Inborn errors of metabolism: not rare, not hopeless. Contemp Pediatr 5: 47-63.
6. Wannmacher C, Wajner M, Giugliani R, Giuglini E, Costa M, et al. (1982) Detection of Metabolic Disorders among high risk patients. Brasil, Genet V: 187-194.
7. De Bernal M, Caldas M, Bonilla RD, Chamorro GA, Matallana A (2003) Tamización para hipotiroidismo congénito en Cali y constitución de un centro piloto de referencia para la identificación temprana de la enfermedad. Colombia Médica 34: 40-46.
8. Minsalud-COLCIENCIAS (2013) Guía de práctica clínica. Detección de anomalías congénitas en el recién nacido Guía No 3 Disponible en: http://gpcminsaludgovco/Documents/Guias-PDF-Recursos/Anomalias%20congenitas/GPC_Prof_Sal_ACpdf.
9. FECOER Ley 1392 de 2010. Disponible en: http://www.fecoer.org/download/Ley_1392.pdf.
10. MinSalud (2012) Plan Decenal de Salud Pública PDSP, 2012-2021. Disponible en: www.valledelcaucagovco/salud/publicacionesphp?id=24086.
11. Mateus H Prevalencia de Enfermedades Huérfanas en Colombia. Ministerio de Salud y Protección Social.
12. Barrera LA (2009) Estudios bioquímicos de los errores innatos del metabolismo en Colombia, durante dos décadas. Rev Aca Colomb cienc 33: 377-394.
13. MinSalud (2014) Situación de Salud en Colombia. Indicadores básicos 2014 http://www.minsalud.gov.co.
14. Wilson J, Jungner G (1968) Principles and practice of screening for disease. . WHO Public health papers 34.
15. Jensen UG, Brandt NJ, Christensen E, Skovby F, Nørgaard-Pedersen B, et al. (2001) Neonatal screening for galactosemia by quantitative analysis of hexose monophosphates using tandem mass spectrometry: a retrospective study. Clin Chem 47: 1364-1372.
16. Chace DH, Kalas TA, Naylor EW (2003) Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns. Clin Chem 49: 1797-1817.
17. Villegas JB, Obando FS (2008) La carga de la enfermedad genética en Colombia, 1996-2025. Univ Méd 49: 12-28.

18. Colombo M, Cornejo V, Raimann E (2003) Bases moleculares de las enfermedades genéticas. In: Universitaria E, editor. Errores innatos en el metabolismo del niño 2a ed. Chile. pp. 650.
19. Walkley SU (2009) Pathogenic cascades in lysosomal disease—why so complex? J Inherit Metab Dis 32: 181-189.
20. Saudubray J-M, Van den Berghe G, Walter JH (2011) Inborn metabolic diseases: diagnosis and treatment: Springer Science & Business Media.
21. Applegarth DA, Toone JR (2000) Incidence of inborn errors of metabolism in British Columbia, 1969–1996. Pediatrics 105: e10-e10.
22. Wilcox WR (1995) Inbon errors of metabolism. Disponible en: http://www.wwilcox@mailgate.csmc.edu.
23. Soliz A (1997) Inbon errors of metabolism Miami Children Hospital. Neonatology on the Web.
24. Baldellou A, López-Pisón J, Rebage V, Salazar M, García Silva M (1998) Errores congénitos del metabolismo de presentación precoz: formas de presentación y posibilidades terapéuticas. An Esp Pediatr: 20-24.
25. Guthrie R, Susi A (1963) A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. Pediatrics 32: 338-343.
26. Millington DS, Roe CR, Maltby DA (1984) Application of high resolution fast atom bombardment and constant B/E ratio linked scanning to the identification and analysis of acylcarnitines in metabolic disease. Biomed Mass Spectrom 11: 236-241.
27. Millington DS, Norwood DL, Kodo N, Roe CR, Inouet F (1989) Application of fast atom bombardment with tandem mass spectrometry and liquid chromatography/mass spectrometry to the analysis of acylcarnitines in human urine, blood, and tissue. Anal Biochem 180: 331-339.
28. Chace DH, Sherwin JE, Hillman SL, Lorey F, Cunningham GC (1998) Use of phenylalanine-to-tyrosine ratio determined by tandem mass spectrometry to improve newborn screening for phenylketonuria of early discharge specimens collected in the first 24 hours. Clin Chem 44: 2405-2409.
29. Hernández DC (2010) Tamizaje neonatal por espectrometría de masas en tándem: actualización. Rev Panam Salud Publica 27: 309-317.
30. Borrajo GJC (2007) Newborn screening in Latin America at the beginning of the 21st century. J Inherit Metab Dis 30: 466-481.
31. Torres-Sepúlveda MdR, Martínez-de Villarreal LE, Esmer C, González-Alanís R, Ruiz-Herrera C, et al. (2008) Tamiz metabólico neonatal por espectrometría de masas en tándem: dos años de experiencia en Nuevo León, México. Salud pública Méx 50: 200-206.
32. Cleary M, Green A (2005) Developmental delay: when to suspect and how to investigate for an inborn error of metabolism. Arch Dis Child 90: 1128-1132.
33. Coelho J, Wajner M, Burin M, Vargas C, Giugliani R (1997) Selective screening of 10,000 high-risk Brazilian patients for the detection of inborn errors of metabolism. Eur J Pediatr 156: 650-654.
34. Carrillo J (1986) Detección de hipotiroidismo congénito en Colombia. Acta Ped Colomb 4: 31-38.

35. Bermúdez M, Arteaga C, Cifuentes Y, Espinosa E, Uribe A, et al. (2001) Hiperglicinemia no cetósica (HGNC) forma típica y atípica. Presentación de casos diagnosticados en Colombia. Pediatría 36: 123-126.
36. Cifuentes Y, Bermúdez M, Arteaga C (2007) Neonathal encefhalopathy something more that perinatal asphysia. Rev Fac Med 55: 126-134.
37. Cifuentes C, Arteaga D, Lonngi G, Quintero T, Bermúdez M (2010) Hiperamonemia neonatal causada por defectos del ciclo de la urea. Rev Fac Med 58: 316-323.
38. Cifuentes Cifuentes MY, Estrada Vizcaíno A, Romero C (2014) Galactosemia como causa de ictericia neonatal. Rev Fac Med 62: 287-292.
39. Cifuentes Y, Bermúdez M (2011) Aciduria piroglutámica en un neonato con anemia hemolítica. Rev Fac Med 48: 195-198.
40. Cifuentes Y, De la Hoz I, Bermúdez M, Arteaga C (2008) Acidemia orgánica (propiónica) en un neonato detectada por espectrometría de masas en tándem. Biomédica 28: 10-17.
41. Al-Shamsi A, Hertecant JL, Al-Hamad S, Souid A-K, Al-Jasmi F (2014) Mutation Spectrum and Birth Prevalence of Inborn Errors of Metabolism among Emiratis: A study from Tawam Hospital Metabolic Center, United Arab Emirates. Sultan Qaboos Univ Med J 14: e42-49.
42. Ali WAB, Balaha MH, Al Moghannum MS, Hashim I (2011) Risk factors and birth prevalence of birth defects and inborn errors of metabolism in Al Ahsa, Saudi Arabia. Pan Afr Med J 8.
43. DANE (2013) Estadistica vitales. Sistema estadístico nacional Disponible en: http://www.dane.gov.co/.
44. Arya R, Antonisamy B, Kumar S (2012) Sample size estimation in prevalence studies. Indian J Pediatr 79: 1482-1488.
45. Yolanda Cifuentes BM. Pediatría Diagnóstico y tratamiento. 2 ed. Bogotá DC: Librería Médica Celsus. 2003. pp. 259.

ANEXO 1. RANGOS NORMALES PARA ALGUNOS ANALITOS

Tabla A1. Rangos normales para los AA determinados por MS/MS en el CIV (1000 RN).

Clasificación	Analitos principales	Enfermedades asociadas	Rangos normales (μmol/L)
Aminoácidos	Alanina	Deficiencia deshidrogenasas de α-cetoácidos de cadena ramificada	96-342
	Arginina	Arginemia	6.8-53
	Citrulina	Citrulinemia tipo I y II, Acidemia arginosuccínica, Deficiencia de Carbamoilfosfato sintetasa, Deficiencia de Ornitidina transcarbamilasa	145-524
	Leucina	Enfermedad Orina con olor a jarabe de Arce	68-490
	Metionina	Arginemia, Homocistinuria y Hipermetioninemia	11-69
	Fenilalanina	Fenilcetonuria	20-120
	Succinilacetona	Tirosinemia tipo I	0.01-2.2
	Tirosina	Tirosinemia tipo II y III	45-200
	Valina	Enfermedad Orina con olor a jarabe de Arce	69-209

*El orden de los analitos corresponden al orden dado por el *Center for Disease Control and Prevention (CDC)*

Tabla A2. Rangos normales para algunas AC determinadas por MS/MS en el CIV (1000 RN).

Clasificación	Analitos principales	Enfermedades asociadas	Rangos normales (μmol/L)
Carnitinas	Carnitina libre (C0)	Defecto de captación de carnitina, Defecto de captación de carnitina Materno, Deficiencia de Carnitina palmitoiltransferasa I	13.3-72.2
	Acetilcarnitina (C2)	Defecto de captación de carnitina	8.6-39
	Propionilcarnitina (C3)	Acidemia Metilmalónica, Acidemia Propiónica	0.01-2.8
	Butirilcarnitina (C4)	Acidemia Formiminoglutámica, Isobutirilglicinuria, Acidemia Glutárica tipo II	0.01-0.64
	Malonilcarnitina (C3DC)	Acidemia Malónica	0.0-0.31
	Isovalerilcarnitina (C5)	2-Metilbuturilglicinuria, Acidemia Isovalérica, Deficiencia 2,4-Dienoil-CoA reductasa	0.01-0.48
	Hidroxibutirilcarnitina (C4OH)	Deficiencia de L-3-hidroxiacilCoA deshidrogenasa de cadena corta	0.01-0.45
	Glutarilcarnitina (C5DC)	Acidemia Glutárica tipo I y tipo II	0.01-0.24
	Hidroxiisovalerilcarnitina (C5OH)	Deficiencia de 3-Metilcrotonil-CoA carboxilasa, Acidemia 3-metilglutacónica, Acidemia 3-Hidroxi-3-metilglutárica, Deficiencia múltiple de carboxilasa, Deficiencia de β-cetotiolasa	0.01-0.43
	Hexanoilcarnitina (C6)	Deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa cadena media, Acidemia Glutárica tipo II	0.01-0.38
	Tiglilcarnitina (C5:1)	Acidemia 2-Metil-3-hidroxibutírica, Deficiencia de β-cetotiolasa	0.0-0.2
	Octanoilcarnitina (C8)	Deficiencia de acil-coA deshidrogenasa de cadena media (MCAD), MCAD (het), MCAD (mat)	0.01-0.35
	Decanoilcarnitina (C10)	MCAD (het), Acidemia Glutárica tipo II	0.01-0.4
	Dodecanoilcarnitina (C12)	Deficiencia de Carnitina palmitoiltransferasa II, Deficiencia de carnitinia-acilcarnitina Transcolasa, Deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena-muy larga	0.02-0.85
	Hidroxidodecanoilcarnitina (C12OH)	Deficiencia de L-3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de cadena larga, Deficiencia de proteína Trifuncional	0.01-0.23
	Miristoilcarnitina (C14)	Deficiencia de carnitinia-acilcarnitina Transcolasa, Deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa DE cadena-muy larga, Deficiencia de Carnitina palmitoiltransferasa II, Deficiencia 2,4-Dienoil-CoA reductasa	0.01-0.74
	Hidroxitetradecanoilcarnitina (C14OH)	Deficiencia L-3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de cadena larga	0.01-0.24

Continuación Tabla A2.

	Palmitoilcarnitina (C16)	Defecto de captación de carnitina, Defecto de captación de carnitina Materno, Deficiencia de Carnitina palmitoiltransferasa I,	0.52-5.71
	Hidroxipalmitoilcarnitina (C16OH)	Deficiencia de L-3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de cadena larga, Deficiencia de proteína Trifuncional	0.0-0.23
	Estearoilcarnitina (C18)	Defecto de captación de carnitina Materno, Deficiencia de Carnitina palmitoiltransferasa I, Deficiencia de Carnitina palmitoiltransferasa II, Deficiencia de carnitinia-acilcarnitina Transcolasa, Acidemia Glutárica Tipo I materna	0.24-1.81
	Hidroxiestearoilcarnitina (C18OH)	Deficiencia de L-3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de cadena larga	0.01-0.2

*El orden de los analitos corresponden al orden dado por el *Center for Disease Control and Prevention (CDC)*

ANEXO 2. ANÁLISIS DE PARTICIPANTES DEL ESTUDIO

GRUPO	DESCRIPCIÓN (Orden de Entidad)	EXPERIENCIA PREVIA	EXPECTATIVAS	INFLUENCIA	EFECTO EN EL PROYECTO	POSICIÓN	TIPO DECONTRIBUCIÓN
INFIVALLE	Otros	El Instituto Financiero para el Desarrollo del Valle del Cauca INFIVALLE, es un establecimiento público departamental, descentralizado, de fomento y desarrollo regional, adscrito a la Secretaría de Hacienda Departamental. Cuenta con personería jurídica, patrimonio propio y autonomía administrativa y presupuestal.	Determinar la prevalencia de EIM con el fin de prevenir consecuencias clínicas para los pacientes diagnosticados	Alta	+	Cooperante	Entidad ejecutora del proyecto
Centro Internacional de Vacunas	Otros	Aprovechando la disponibilidad del equipo MS/MS, desde hace ~4 años el CIV comenzó a trabajar en la estandarización de la metodología para el diagnóstico de EIM dependientes de aminoácidos (AA) y acilcarnitinas (AC), realizando un estudio piloto en el Valle del Cauca (Cali) y Chocó (Quibdó), donde se determinaron los valores normales de AA y AC en sangre de ~1.000 niños sanos entre 2 y 18 días de nacidos. Actualmente el CIV cuenta también con la metodología para determinar Galactosemia tipo I.	Determinar la prevalencia de EIM con el fin de prevenir consecuencias clínicas para los pacientes diagnosticados	Alta	+	Cooperante	Administración, coordinación y desarrollo de los proyectos de Investigación, manejo y análisis de datos
Asoclinic	Otros	Laboratorio especializado en pruebas inmunológicas, biología molecular y análisis de pruebas toxicológicas, pionero en brindar servicios de análisis de diagnóstico clínico de alta complejidad. Asoclinic cuenta con el personal capacitado y la infraestructura para la toma de muestra por punción de talón del programa de TNA del CIV.	Determinar la prevalencia de EIM con el fin de prevenir consecuencias clínicas para los pacientes diagnosticados	Alta	+	Cooperante	Desarrollo de pruebas especializadas
Fundación Instituto de Salud del Pacífico	Otros	Instituto especializado con sede principal en Buenaventura, con más de 20 años de presencia en la Costa Pacífica y Litoral Pacífico, con experiencia en el desarrollo y ejecución de proyectos poblacionales en el marco del proyecto CLAIM del Centro de Investigación Científica Caucaseco, así como del programa de Red de ETV apoyado por Colciencias.	Determinar la prevalencia de EIM con el fin de prevenir consecuencias clínicas para los pacientes diagnosticados	Alta	+	Cooperante	Coordinación de actividades con los pacientes
Gobernación Valle del Cauca	Departamental	La Gobernación del Valle del Cauca ha iniciado la cooperación con el CIV para el diagnóstico de pacientes con enfermedades huérfanas del Valle del Cauca, proyecto liderado por la Secretaria Departamental de Salud la Dra. María Cristina Lesmes. Actualmente la Gobernación viene impulsando la iniciativa de realizar un seguimiento de los pacientes que padecen este tipo de enfermedades y que son reportados por las instituciones de salud del Departamento.	Determinar la prevalencia de EIM con el fin de prevenir consecuencias clínicas para los pacientes diagnosticados	Media	+	Cooperante - Beneficiario	Coordinación y facilitación de actividades de control y vigilancia en los sitios de estudio
Hospital Universitario del Valle	Otros	El hospital cuenta con un área de pediatría que tiene como objetivo principal brindar atención preventiva, terapéutica y de rehabilitación a los niños del Valle del Cauca, manteniendo grupos de investigación conjuntamente con la Universidad del Valle en neonatología, salud infantil y desarrollo.	Determinar la prevalencia de EIM con el fin de prevenir consecuencias clínicas para los pacientes diagnosticados	Alta	+	Cooperante - Beneficiario	Coordinación de actividades con los pacientes, dentro de las que se incluyen captación de muestras, clasificación de población con sospecha de presentar un EIM y análisis clínico de resultados de TNA de los pacientes inscritos al estudio.
Fundación Hospital San Jose	Otros	Entidad prestadora de servicios de salud	Determinar la prevalencia de EIM con el fin de prevenir consecuencias clínicas para los pacientes diagnosticados	Alta	+	Cooperante - Beneficiario	Coordinación de actividades con los pacientes, dentro de las que se incluyen captación de muestras, clasificación de población con sospecha de presentar un EIM y análisis clínico de resultados de TNA de los pacientes inscritos al estudio.
Hospital Raul Orejuela Bueno	Otros	El hospital cuenta con un área de pediatría y neonatología, quienes, en el 2015, y con apoyo del Secretario de Salud Municipal de Palmira el Dr. Alejandro Solo Nieto, adelantó una campaña para realizar Tamizaje Neonatal para determinar la prevalencia de enfermedades metabólicas como galactosemias, Fenilcetonuria y Deficiencia de la biotinidasa en los RN de Palmira, con la colaboración del Dr. José María Satizábal.	Determinar la prevalencia de EIM con el fin de prevenir consecuencias clínicas para los pacientes diagnosticados	Alta	+	Cooperante - Beneficiario	Coordinación de actividades con los pacientes, dentro de las que se incluyen captación de muestras, clasificación de población con sospecha de presentar un EIM y análisis clínico de resultados de TNA de los pacientes inscritos al estudio.
Hospital Municipal Luis Ablanque de la Plata	Otros	Entidad prestadora de servicios de salud. El Hospital cuenta con un seguimiento de pacientes en las áreas de pediatría y neonatología, donde se atienden la mayoría de los nacimientos del municipio, lo cual es de gran importancia para el cumplimiento de los objetivos del presente estudio.	Determinar la prevalencia de EIM con el fin de prevenir consecuencias clínicas para los pacientes diagnosticados	Alta	+	Cooperante - Beneficiario	Coordinación de actividades con los pacientes, dentro de las que se incluyen captación de muestras, clasificación de población con sospecha de presentar un EIM y análisis clínico de resultados de TNA de los pacientes inscritos al estudio.