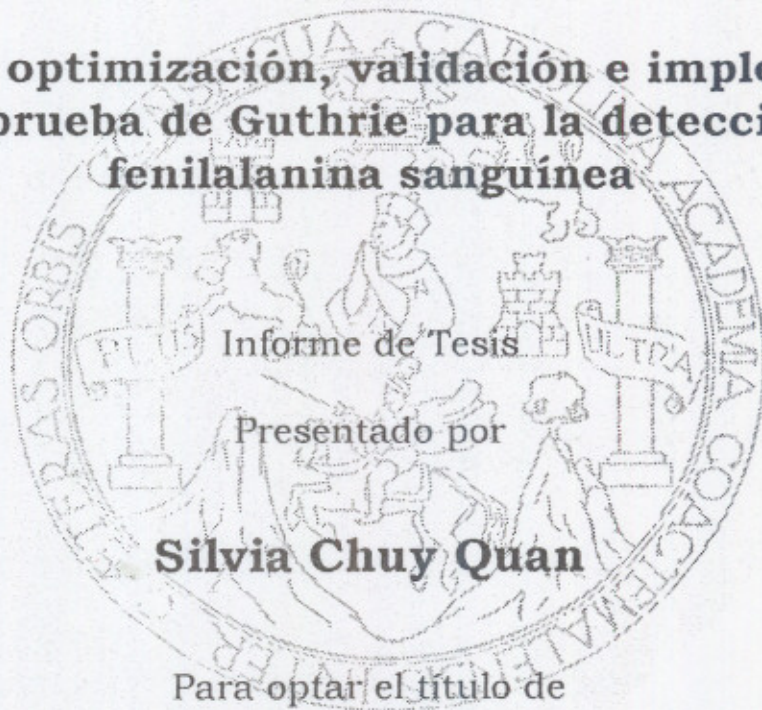


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

**Producción, optimización, validación e implementación
de la prueba de Guthrie para la detección de
fenilalanina sanguínea**



Informe de Tesis

Presentado por

Silvia Chuy Quan

Para optar el título de

Químico Biologo

Guatemala, enero de 1,995

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

Producción, optimización, validación e implementación
de la prueba de Guthrie para la detección de
fenilalanina sanguínea



Presentado por
Silvia Chuy Q'uan

Para optar el título de

Químico Biólogo

Guatemala, enero de 1995

PROYECTO DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
BIBLIOTECA CENTRAL

DL
06
†(1625)

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

- DECANO: Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar
- SECRETARIO: Licda. Eleonora Gaytán
- VOCAL I: Lic. Miguel Angel Herrera
- VOCAL II: Lic. Gerardo Leonel Arroyo Catalán
- VOCAL III: Lic. Miguel Orlando Garza Sagastume
- VOCAL IV: Br. Jorge Luis Galindo Arévalo
- VOCAL V: Br. Edgar Antonio García del Pozo

21
00
(1025)

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

- DECANO: Lic. Jorge Rodolfo Pérez Rojas
- SECRETARIO: Licda. Eleonora Gayán
- VOCAL I: Lic. Miguel Ángel Herrera
- VOCAL II: Lic. Gerardo Leonel Arroyo Castañón
- VOCAL III: Lic. Miguel Orlando Garza Esquivel
- VOCAL IV: Sr. Jorge Luis Galindo Arévalo
- VOCAL V: Sr. Edgar Antonio García del Pozo

DEDICATORIA

- A DIOS Por ser mi guía y mi luz en todo momento
- MIS PADRES Juan Francisco Chuy
Marta Elena Quan de Chuy (QEPD)
Por todo su incondicional apoyo y amor
- A MI ABUELITA Dora de Chuy (QEPD)
Por todo su amor y sus sabias enseñanzas
- A MIS HERMANOS Leticia, Juan Oscar y Edwin
Por su gran cariño y amistad
- A MIS TIOS Y PRIMOS Especialmente a las familias Quan Chan y
Chuy Chan
Por todo su apoyo
- A MIS COMPAÑEROS En especial a: Miriam Rivera, Rachel
Lam, Patricia Torres e Ingrid Tabarini
- A MIS CATEDRATICOS Que fueron mis mentores y son mis amigos
- A LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación no se hubiera podido realizar sin la valiosa colaboración y apoyo de mi asesora, Licenciada Carolina Richter de Penados; y de los Doctores Robert Guthrie y Keneth Pass, del Hospital de Buffalo, Nueva York.

Deseo agradecer a: las licenciadas Patricia Torres, Rachel Lam e Irma Juárez (por su ayuda en el estudio de reproducibilidad); a la licenciada Alba Marina Valdés de Garcia (por todo su apoyo y colaboración durante la investigación); al licenciado Federico Nave por su valiosa ayuda; a la licenciada Cecilia Sánchez por toda su colaboración; y, a Luis Arévalo, María Elena Ramirez, Julio César Maas, Margarita Boloix, German López y Carlos Pineda por su colaboración durante la fase experimental de esta investigación.

Agradezco el apoyo institucional de los Departamentos de Bioquímica y Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala; el Departamento de Medicina Nuclear del Hospital General San Juan de Dios; y un especial agradecimiento al Hospital de Buffalo, Nueva York por la donación de la cepa bacteriana, el inhibidor y los estándares de fenilalanina.

También deseo agradecer la colaboración y paciencia de mis primos Silvia, Mónica y Carlos Alberto; y de Lucy Santis, Lesbia Corzo y Maritza Melchor.

INDICE

		Página
1.	RESUMEN	1
2.	INTRODUCCION	3
3.	ANTECEDENTES	
3.1	Generalidades de Enfermedades Metabólicas	5
3.1.1	Transtornos en el metabolismo enzimático	5
3.1.2	Influencia genética en los desórdenes metabólicos	6
3.1.3	Signos y síntomas asociados con enfermedad metabólica	8
3.2	Aminoacidopatías	8
3.2.1	Generalidades	8
3.2.2	Definición	9
3.2.3	Manifestaciones clínicas	10
3.2.4	Clasificación	10
3.2.5	Métodos de laboratorio para el diagnóstico de desórdenes de aminoácidos	14
3.3	Fenilcetonuria	16
3.3.1	Generalidades	16
3.3.2	Metabolismo normal de la fenilalanina y tirosina	17
3.3.3	Patogenia de la fenilcetonuria	17
3.3.4	Incidencia	20
3.3.5	Manifestaciones clínicas	21
3.3.6	Variantes de hiperfenilalaninemia	24
3.3.7	Pruebas para detectar hiperfenilalaninemia	25
3.3.8	Tratamiento	33
4.	JUSTIFICACIONES	36

5.	OBJETIVOS		37
6.	HIPOTESIS		38
7.	MATERIALES Y METODOS		39
	7.1	Universo de trabajo	39
	7.2	Recursos	39
	7.3	Procedimiento	42
	7.4	Diseño experimental	47
8.	RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS		51
9.	CONCLUSIONES		70
10.	RECOMENDACIONES		71
11.	REFERENCIAS		72
12.	ANEXOS		76

1. RESUMEN

La fenilcetonuria, una enfermedad metabólica heredada, se caracteriza por el aumento de la concentración de fenilalanina sanguínea y acumulación de otros metabolitos que pueden afectar al sistema nervioso central. El pronto diagnóstico de esta patología, permite que el paciente sea tratado con una dieta baja en fenilalanina, logrando prevenir así, cualquier daño neurológico irreversible. (1-12)

El objetivo de esta investigación consistió en la producción, optimización y validación de la prueba de inhibición bacteriana de Guthrie, la cual es una prueba empleada en distintos países para la detección temprana de la fenilcetonuria. La hipótesis evaluada fue que la prueba de inhibición bacteriana de Guthrie es una prueba de tamizaje rápida y sencilla para la detección del aumento de la fenilalanina sanguínea, la cual puede ser implementada, como prueba rutinaria en el Hospital General San Juan de Dios. Para llevar a cabo este trabajo, se realizó la producción local de el medio de cultivo de Demain modificado, la solución de beta-2-tienilalanina (inhibidor), la suspensión de esporas de *B. subtilis* ATCC 6633 (inóculo) y la preparación de estándares de fenilalanina sanguínea. Luego, se procedió a determinar las condiciones óptimas para la realización de la prueba. Además, se realizó la validación mediante pruebas estadísticas, llevando a cabo un estudio *in vitro* con muestras de concentración conocida.

Se determinó que la prueba de Guthrie no es repetitiva, aunque sí es sensible, lineal, exacta y reproducible. Esto

significa que los resultados de una misma muestra no siempre presentará el mismo valor, aunque los resultados de esa misma muestra no variarán significativamente si es analizada por distintas personas y en diferentes días. De acuerdo a estos parámetros estadísticos, la prueba de Guthrie es adecuada para ser empleada en el tamizaje neonatal, debido a que es una metodología que permite determinar la ausencia o presencia de un aumento en la concentración de fenilalanina sanguínea, de una manera sencilla y rápida.

Sin embargo, tomando en cuenta los escasos recursos económicos destinados al Hospital General San Juan de Dios y que existen otras necesidades prioritarias de Salud Pública, no es recomendable implementar la prueba para el tamizaje neonatal, pero sí sería conveniente tenerla como una prueba presuntiva para la determinación de fenilalanina sanguínea en pacientes pediátricos en los que se sospeche que padecen de fenilcetonuria u otra forma de hiperfenilalaninemia. La implementación de una prueba como ésta, aunque no se emplee de rutina, es importante debido a que permite realizar un diagnóstico presuntivo, el cual de ser confirmado con pruebas específicas, prevendría el daño neurológico irreversible que podría provocar una fenilcetonuria no tratada.

2. INTRODUCCION

La fenilcetonuria es una de las primeras enfermedades metabólicas heredadas que fueron descritas. Los primeros estudios acerca de esta enfermedad se llevaron a cabo en la década de los treinta. La fenilcetonuria es heredada por un rasgo recesivo autosómico que causa deficiencia de la fenilalanina hidroxilasa, enzima hepática que normalmente transforma la fenilalanina en tirosina. La fenilalanina es un aminoácido esencial para el crecimiento y el balance de nitrógeno. (1-11)

Debido a la deficiencia de la enzima fenilalanina hidroxilasa, es activada una vía metabólica de la fenilalanina que normalmente es utilizada muy raramente. En esta vía, la fenilalanina sufre la transaminación con alfa-cetoglutarato y forma fenilpiruvato. Esta última sustancia no es metabolizada posteriormente, por lo que se acumula, junto a la fenilalanina en la sangre y el tejido, y es excretada en la orina. La resultante acumulación de dicha fenilalanina, ácido fenilpirúvico y otros metabolitos alteran el desarrollo normal de las células del sistema nervioso central. (1-7,10)

Es esencial realizar el diagnóstico de fenilcetonuria en las primeras semanas de vida, debido a que la administración de una dieta baja en contenido de fenilalanina puede prevenir cualquier daño neurológico o retraso mental, los cuales son irreversibles si no son detectados a tiempo. (1-7,10,12)

Existen diversos tipos de pruebas para la detección de fenilalanina sanguínea, dentro de las cuales está la prueba de inhibición bacteriana propuesta por Guthrie y Susi (1963). Este

es un método rápido y sencillo para realizar el tamizaje de un gran número de infantes, detectando la elevación de fenilalanina sanguínea, asociada con la fenilcetonuria. (13)

En este trabajo de investigación se llevó a cabo la producción, optimización, y validación de la prueba de Guthrie para la detección de la elevación de la fenilalanina sanguínea, la cual según los resultados obtenidos, puede ser empleada como una prueba de diagnóstico presuntivo para la detección del aumento de fenilalanina sanguínea en el Hospital General San Juan de Dios.

3. ANTECEDENTES

3.1. Generalidades de Enfermedades Metabólicas Heredadas

3.1.1 Transtornos en el metabolismo enzimático

Los trastornos en el metabolismo se clasifican así, cuando el mecanismo patógeno fundamental se relaciona con una transformación o proceso químico. Muchas enfermedades del metabolismo se producen por una anomalía enzimática o de otras proteínas específicas. Si esta anomalía se atribuye a una causa genética subyacente, se le llama "error innato del metabolismo".

(1-5)

La ausencia de la actividad enzimática específica puede dar lugar a una o más de las siguientes consecuencias: pueden acumularse sustancias precursoras que, si son tóxicas, pueden producir una disfunción específica; si el producto final no es elaborado y si es una sustancia esencial para la vida, el resultado puede ser letal; y, debido a la deficiencia de la enzima involucrada en la ruta metabólica normal, se puede manifestar o utilizar con mayor intensidad otra vía metabólica menor, y como consecuencia de ello se pueden acumular metabolitos normales o pueden excretarse éstos en cantidades inusuales. Los defectos en el metabolismo intermediario resultan en la interrupción del proceso normal y produce un aumento en la excreción urinaria de un metabolito normal o anormal. (2,3,6,7)

3.1.2 Influencia genética en los desórdenes metabólicos

3.1.2.1 Patogenia de enfermedades metabólicas hereditarias

La etiología de un error congénito del metabolismo es un gen mutante. En este tipo de trastornos, una codificación genética específica, en la secuencia de aminoácidos de alguna enzima involucrada en el metabolismo ha sufrido una mutación. Como consecuencia de ello, la enzima sintetizada a partir del gen alterado es defectuosa. Esto se debe a que contiene un aminoácido erróneo en alguna posición crítica en la cadena polipeptídica o ha perdido o ganado residuos aminoacídicos. La alteración en la estructura del ácido desoxirribonucleico produce un trastorno en la estructura y en la función de la célula y el órgano. Un bloqueo bioquímico dado puede ser determinado por diferentes sucesos genéticos. Generalmente, la enzima que llevaría a cabo la reacción bloqueada está ausente o ha perdido su capacidad funcional total o parcialmente. Si la enzima primaria requiere de un cofactor (el cual por lo general es un derivado vitamínico) o un activador, y si existe un bloqueo en la formación del cofactor o activador, esto podría causar también la disminución o la ausencia de actividad de la enzima primaria. Estos bloqueos secundarios dependen de la actividad de otras enzimas que a su vez, se encuentran bajo control genético. En algunos de estos trastornos, ciertos grupos de nervios no se desarrollan adecuadamente, y como consecuencia de ello, se produce retraso mental. (1-7)

3.1.2.2 Interacción entre factores genéticos y ambientales

Los procesos metabólicos se controlan por dos mecanismos integrados: los genes, que delimitan la capacidad de cualquier célula dada, y el ambiente, que determina la forma en que se expresarán estos genes. De ésto, se deduce que todos los trastornos metabólicos se producen por una alteración en la interacción entre estos dos factores. Ejemplos de esta interacción son: obesidad en la diabetes sacarina, ingestión de proteínas que contienen fenilalanina en la fenilcetonuria o ingestión de leche en la lactosemia. Si no existiera la presencia de los factores ambientales, estos trastornos no se manifestarían. (1,5,7)

3.1.2.3 Estudios genéticos

El estudio genético es la investigación de una población de personas que presentan ciertos genotipos que se sabe coinciden o predisponen a una enfermedad en el individuo y sus descendientes. Dentro del contexto del estudio de las enfermedades hereditarias, tiene dos aplicaciones: la identificación oportuna de un paciente de alto riesgo con una enfermedad que puede tratarse antes de que se inicien los síntomas clínicos, y la identificación de las parejas de alto riesgo que pueden beneficiarse con una orientación genética apropiada. El ejemplo típico de la primera aplicación es la fenilcetonuria, enfermedad relativamente común (aproximadamente de 1:10,000 en caucásicos) con serias consecuencias clínicas (retraso mental intenso). (1,2,5,7)

En Estados Unidos y Europa, el programa de estudio genético ha producido un gran ahorro humano y económico, y se ha extendido

al estudio de otras enfermedades tratables como galactosemia, hipotiroidismo y homocistinuria. (2,5,8)

3.1.3 Signos y síntomas asociados con enfermedad metabólica

Existe un alto índice de sospecha de enfermedad metabólica, cuando se presenta una o la combinación de los siguientes signos y síntomas:

3.1.3.1 En el período neonatal:

Falta de crecimiento, desórdenes convulsivos, hipertonicidad, letargo, vómitos, diarrea, hepatomegalia, deshidratación, acidosis metabólica, hipoglicemia o hiperglicemia, hiperamonemia, neutropenia y trombocitopenia. (7-9)

3.1.3.2 En niños mayores:

Desórdenes convulsivos, retraso en el desarrollo o deterioro en el desarrollo (mental, motor o físico), anomalías hematológicas, problemas en el comportamiento, desórdenes en el sistema nervioso central, defectos en el habla, hepatomegalia, esplenomegalia, defectos renales, cálculos renales, ceguera, cataratas, lentes dislocados, atrofia ocular, infecciones recurrentes y fiebre de origen desconocido. (7-9)

3.2. Aminoacidopatías

3.2.1 Generalidades

Los polipéptidos y las proteínas son polímeros de veinte

diferentes aminoácidos. Nueve de ellos son conocidos como aminoácidos esenciales, los cuales no pueden ser sintetizados por el cuerpo humano y deben de obtenerse de la dieta. Los otros se forman de manera endógena por una variedad de rearrreglos químicos. La mayoría de los aminoácidos del ser humano se encuentran formando las proteínas, aunque existen pequeñas, pero críticas cantidades de aminoácidos libres intracelulares los cuales están en equilibrio con las reservas extracelulares del plasma, líquido cefalorraquídeo, lumen intestinal y riñón. (2-5)

Además de ser "bloques de construcción", algunos aminoácidos tienen otras funciones como neurotransmisores (glicina y ácido gamma-aminobutírico) o ser precursores de hormonas, coenzimas, pigmentos, purinas o pirimidinas (fenilalanina, tirosina, triptófano y glicina). Cada uno de estos aminoácidos tiene una vía degradativa única y complicada por la que se usan sus componentes de nitrógeno y carbono para la síntesis de otros aminoácidos, carbohidratos y lípidos. (2-5)

3.2.2 Definición

Las aminoacidopatías están constituidas por desórdenes en el metabolismo de los aminoácidos. Estas enfermedades son raras, genéticamente determinadas y usualmente son heredadas por un rasgo autosómico recesivo. Se han descrito más de 50 defectos de este tipo. Sus efectos clínicos se manifiestan como una enfermedad aguda en el niño, caracterizado por desarrollo mental alterado y/o retraso en el crecimiento. (1,2,5,7,8)

Entre las aminoacidopatías abunda la heterogeneidad bioquímica

alaninemia, tres variedades de homocistinuria, y cinco tipos de acidemia metilmalónica, las cuales son variedades de interés químico y clínico. (5,9)

3.2.3 Manifestaciones clínicas

En más de la mitad de los trastornos se produce alteración del sistema nervioso central, en forma de retraso del desarrollo, convulsiones, alteraciones de la sensibilidad, o modificaciones de conducta. En muchos trastornos de los intermediarios del ciclo de la urea, se produce vómito inducido por las proteínas, alteración neurológica e hiperamonemia. Con el tiempo, estos trastornos conducen a la afección focal de tejidos y órganos, tales como enfermedades hepáticas, insuficiencia renal, anormalidades cutáneas o lesiones oculares. (5,9)

3.2.4 Clasificación

Los trastornos hereditarios del catabolismo de los aminoácidos se denominan por el compuesto que se acumula en mayor concentración en la sangre ("-emias") o la orina ("-urias"). Para muchas de las enfermedades, el aminoácido principal se encuentra aumentado, pero para otras se acumulan los productos de las vías catabólicas. El proceso que se lleve a cabo dependerá del sitio del bloqueo enzimático, de la reversibilidad de las reacciones proximales a la lesión y de la existencia de vías alternativas de "desvío" metabólico. (2,3,5,8,9)

Las aminoacidopatías que se deben a desórdenes hereditarios del metabolismo se dividen en los grupos: desórdenes del sistema

de fenilalanina y tirosina, de transulfuración, del ciclo de urea de Krebs-Hanseleit, de los aminoácidos de cadena ramificada y de los inminoácidos. (11)

A continuación se describirá cada uno de estos grupos y se presentarán solamente algunos de los transtornos de cada grupo.

3.2.4.1 Sistema de la fenilalanina y tirosina

3.2.4.1.1 Fenilcetonuria

La fenilcetonuria es el desorden metabólico de los aminoácidos mejor conocido (1-11); ésta será descrita posteriormente con mayor detalle en esta investigación.

3.2.4.1.2 Tirosinemia

La tirosinemia hereditaria, la cual se debe a una deficiencia en la enzima ácido p-hidroxifenilpirúvico oxidasa, puede expresarse tanto en forma aguda como crónica. Ambas formas son consecuencia de un defecto genético homocigoto. En la forma aguda, la muerte ocurre por fallo renal en los primeros seis meses de vida. En los que padecen de la forma crónica, se desarrolla cirrosis hepática y síndrome renal de Fanconi. El tratamiento de la tirosinemia con una dieta baja en tirosina y su precursor, fenilalanina, ha producido resultados buenos y rápidos en ciertos pacientes. (11)

3.2.4.2 Aminoácidos con azufre

En este grupo existe un desorden en el proceso de transulfuración en el cual el sulfuro de la metionina ingerida es

transferido a la cisteína. (11)

La homocistinuria es representativa de este grupo de trastornos. En esta enfermedad, heredada por un rasgo autosómico recesivo, se ha encontrado una baja actividad de la enzima hepática cistationina sintetasa. Para el manejo dietético de esta enfermedad se han probado dietas bajas en metionina suplementadas con cisteína. Esta dieta implica la ausencia de un aminoácido esencial para el crecimiento y desarrollo, además de que, según la teoría, podría causar una mayor disminución de la actividad enzimática que en sí no es adecuada. (11)

3.2.4.3 Aminoácidos de cadena ramificada

3.2.4.3.1 Enfermedad urinaria de "miel de maple"

Esta enfermedad fue llamada así, debido al olor característico de la orina de los niños que no pueden eliminar los derivados cetoácídicos de los aminoácidos valina, isoleucina y leucina. La acumulación de estos cetoácidos y sus aminoácidos de cadena ramificada correspondientes se debe a la deficiencia en el metabolismo oxidativo de éstos. Para el tratamiento se utilizó inicialmente una mezcla de aminoácidos sintéticos, seguidos por la adición de alimentos bajos en proteínas. (11)

3.2.4.3.2 Hipervalinemia

Esta es una enfermedad que se debe a una deficiencia específica de la enzima valina transaminasa. Se ha encontrado que existe una mejora marcada cuando se sigue una dieta baja en

valina. Aunque no se ha probado que sea hereditario, es lógico asumir que la hipervalinemia es otro desorden recesivo raro. (11)

3.2.4.4 Desórdenes en el ciclo de la urea

El ciclo de la urea, consiste en un mecanismo regenerativo para la remoción del amoníaco, que se produce a partir del metabolismo de proteínas. Debido a que este sistema regenerador es cíclico, la falla en cierto punto de éste puede resultar sólo en una acumulación moderada de los sustratos. Esta enfermedad se manifiesta por intolerancia a las proteínas, síntomas neurológicos episódicos e hiperamonemia. (11)

3.2.4.5 Inminoácidos

3.2.4.5.1 Hiperprolinemia

La hiperprolinemia es una enfermedad rara que se hereda por rasgos recesivos. En este trastorno existe una acumulación de prolina en la sangre; la hidroxiprolina y glicina se encuentran en la orina debido a una inhibición competitiva en la reabsorción tubular renal. Se puede manifestar en este trastorno: sordera, nefropatía, o enfermedad del sistema nervioso central. (11)

3.2.4.5.2 Hidroxiprolinemia

La adición del grupo hidroxilo a la prolina para formar hidroxiprolina ocurre solamente después de que se ha incorporado a cadenas peptídicas. Por lo tanto, la hidroxiprolina libre que esté presente en la sangre sería un producto excretorio, ya sea que provenga de la dieta o del metabolismo endógeno del colágeno.

que provenga de la dieta o del metabolismo endógeno del colágeno. Este trastorno parece ser benigno debido a que no causa efectos clínicos y es consecuencia de un defecto hereditario en un sistema enzimático no esencial. (11)

3.2.5 Métodos de laboratorio para el diagnóstico de desórdenes de aminoácidos

El estudio de los trastornos del metabolismo de aminoácidos, ha desempeñado un papel muy importante en la elucidación de las vías por las cuales son metabolizadas ciertas sustancias, como los aminoácidos, en el ser humano normal (2-4).

Durante el ayuno, el plasma contiene más de 20 aminoácidos diferentes, cuyas concentraciones oscilan entre el rango de 10 o más de 400 micromoles por litro, dependiendo del tipo de aminoácido y del estado nutricional del individuo. Los aminoácidos son excretados en la orina en cantidades que van de 10 a 3,000 micromoles en 24 horas. En general, mientras exista un mayor nivel plasmático, se excretaría una mayor cantidad en orina, pero la proporción de ésta será diferente para cada aminoácido. (14)

En las aminoacidopatías, las cantidades de aminoácidos que se encuentran en orina pueden encontrarse de 10 a 20 veces mayores que lo normal y esto permite que sean detectados en forma relativamente simple sin la necesidad de cuantificación exacta (14).

3.2.5.1 Ensayos microbiológicos

Se han desarrollado ensayos que utilizan una cepa mutante bacteriana en los cuales el grado de crecimiento es alterado

específicamente, por la presencia de una cantidad anormal de un aminoácido u otra sustancia a ser medida. Este ensayo es frecuentemente llamado prueba de Guthrie, la cual es ampliamente utilizada en el tamizaje de la población, para detectar hiperfenilalaninemias. Una desventaja de este tipo de ensayos es que solamente un aminoácido puede ser medido en cada sistema de ensayo. (8,10,13,14)

3.2.5.2 Métodos cualitativos

Los métodos usados en la separación de aminoácidos en fluidos biológicos son: cromatografía uni o bidimensional en papel, electroforesis o separación bidimensional (el cual implica una combinación de cromatografía y electroforesis) (8,14).

Estos métodos son rápidos, simples y baratos y permiten que se procesen varias muestras a la vez. La desventaja es que son pruebas semicuantitativas y la identificación de los aminoácidos es sólo tentativa. (8)

3.2.5.3 Métodos cuantitativos

La metodología empleada ampliamente en la determinación de aminoácidos, involucra la separación con una columna de intercambio catiónico, seguida por el desarrollo de color con ninhidrina y la medición fotométrica, a 570 nm para la mayoría de aminoácidos (aminas primarias) y a 440 nm para la prolina e hidroxiprolina (aminas secundarias). (8,14).

Diferentes métodos analíticos emplean sistemas de solución buffer, en columnas simples o dobles. Las ventajas de este tipo de métodos son que no se deben preparar extensivamente las mues-

tras, la resolución es excelente y tiene buena precisión. Las desventajas incluyen tiempos de corrida largos (4 a 6 horas por muestra para obtener una buena separación en un líquido biológico) y el empleo de equipo complejo y caro. (8)

3.2.5.4 Determinación de ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos son solubles en agua y son sustancias ninhidrina negativo. Son frecuentemente intermediarios metabólicos y algunos resultan del catabolismo de los aminoácidos. Los ácidos orgánicos tienen un umbral bastante bajo, y la excreción urinaria puede ser el reflejo más sensible de su presencia. Entre las metodologías empleadas para la determinación de ácidos orgánicos se encuentra el tamizaje cromatográfico gas-líquido y la cromatografía gaseosa-espectrofotométrica de masa. (8)

3.3. Fenilcetonuria

3.3.1 Generalidades

La fenilcetonuria es una enfermedad metabólica heredada por un rasgo autosómico recesivo. En este trastorno existe una deficiencia en la enzima hepática, fenilalanina hidroxilasa la cual normalmente convierte a la fenilalanina en tirosina. (1-15)

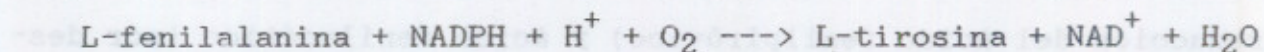
Esta enfermedad fue descrita por primera vez por Folling en 1934. Anteriormente se le conocía como "imbecillitas phenylpyruvica", "Enfermedad de Folling" y "oligofrenia fenilpirúvica". El término fenilcetonuria fue introducido por primera vez por Penrose y Quastel y se le denominó así debido a la presencia

elevada en orina de una fenilcetona y fenilpiruvato. (3,9)

3.3.2 Metabolismo normal de la fenilalanina y tirosina

La fenilalanina es un aminoácido esencial para el crecimiento y el balance de nitrógeno en el humano. Debido a que no puede ser sintetizado en el cuerpo, debe ser obtenido de la dieta. (2-4,10)

La enzima hepática fenilalanina hidroxilasa o fenilalanina-4-monooxigenasa cataliza la hidroxilación de la fenilalanina a tirosina (1-11,15-17). Esta enzima inserta uno de los dos átomos de una molécula de oxígeno a la fenilalanina para formar el grupo hidroxilo de la tirosina; el otro átomo de oxígeno es reducido a agua por el NADH también requerido para la reacción (2):



La tirosina formada por la hidroxilación de la fenilalanina sufre de una reacción oxidativa en la cual se produce escisión del anillo de la tirosina para formar compuestos del ciclo del ácido cítrico. Esta reacción se lleva a cabo principalmente en el hígado, aunque también se produce en una menor proporción en el riñón. De esta manera, la tirosina es eliminada como un compuesto aromático. La cantidad de tirosina que es metabolizada por otros órganos, como la piel (para formar melanina), glándulas adrenales (para formar epinefrina) y tiroides (para formar tiroxina) es mínima. (2-4,9)

3.3.3 Patogenia de la fenilcetonuria

Como se mencionó anteriormente, en la fenilcetonuria existe un defecto en la enzima fenilalanina hidroxilasa, que cataliza la hidroxilación de la fenilalanina a tirosina (1-11). En esta

hidroxilación de la fenilalanina a tirosina (1-11). En esta reacción, se requiere de una coenzima o cofactor, la tetrahidrobiopterina, que en raras ocasiones puede ser defectuosa y puede ser una causa secundaria de la presencia de altas concentraciones de fenilalanina en sangre (3,13,15-17).

Cuando la fenilalanina hidroxilasa es genéticamente defectuosa, es activada una segunda vía del metabolismo de la fenilalanina que normalmente es poco utilizada. En esta vía menor, la fenilalanina sufre de transaminación con alfa-cetoglutarato para producir fenilpiruvato. A partir de esta vía catabólica se producen otros compuestos como lo son: ácido fenilpirúvico (por desaminación de la fenilalanina), ácido fenil-láctico (por reducción del ácido fenilpirúvico) y ácido fenilacético (por descarboxilación y oxidación del ácido fenilpirúvico). Además, el fenilacetato en el hígado se conjuga con glutamina y es excretado en orina como el conjugado fenilacetilglutamina. (2-4,6-9,16)

Los metabolitos de la vía catabólica que se mencionan en el párrafo anterior no se metabolizan posteriormente por lo que se acumulan, junto a la fenilalanina, en la sangre y otros tejidos o son excretados en la orina (2,3,6,9). El exceso de fenilpiruvato en la sangre, en etapas tempranas en la vida del recién nacido, puede causar efectos bioquímicos dañinos en el cerebro debido a que en esta fase es que se produce un crecimiento cerebral más acelerado (2,18,19).

Actualmente no se conoce con certeza la causa del daño en el desarrollo del cerebro y del retraso mental en los fenilcetonúricos, pero se han planteado varias teorías acerca del mecanismo que podría producir estos trastornos. Se ha encontrado que el

fenilpiruvato es un inhibidor poderoso de la enzima piruvato translocasa mitocondrial. En niños fenilcetonúricos no tratados se han encontrado niveles séricos de fenilpiruvato 0.1 a 0.5 mM. Estos valores son mayores que la cantidad mínima para reducir drásticamente la cantidad de piruvato necesario en la mitocondria cerebral, y consecuencia de ello, reducir el adenosíntrifosfato (ATP) que la mitocondria puede generar. Por lo tanto, se puede producir un daño mental por interrupción de la mielinización esencial para el desarrollo cerebral normal. (15,18)

Además, se ha sugerido que ciertos metabolitos de la fenilalanina como el ácido fenilpirúvico y ácido fenilacético son directamente tóxicos al cerebro, o inhiben a la enzima ácido glutámico descarboxilasa, con la resultante disminución en la producción del transmisor sináptico inhibitorio, ácido gamma-aminobutírico. El defecto en la síntesis de serotonina, que resulta en bajas concentraciones de esta sustancia en el cerebro, se ha sugerido como una posible explicación del retraso mental en la fenilcetonuria. (19)

Otras teorías más populares se basan en las observaciones de que las altas concentraciones de fenilalanina, causan un defecto en el transporte de tirosina, 5-hidroxitriptófano y varios aminoácidos esenciales hacia las células cerebrales. Las consecuencias de este trastorno, podrían incluir la deficiencia probable de transmisores sinápticos centrales como norepinefrina y dopamina, deficiencia en la serotonina, o la falla en la síntesis de ciertas proteínas que son críticas para el funcionamiento normal del cerebro. Se han hallado evidencias neuropatológicas de alteraciones en la mielina del cerebro de fenilcetonúricos, lo cual

podría implicar que el defecto mental se debe a posibles anomalías en la síntesis de proteolípidos estructurales. (17,19)

Otra teoría sugiere que una deficiencia crónica en la glutamina, puede ser un factor que influya en el retraso mental que presentan los fenilcetonúricos que no son tratados. Esta deficiencia durante el período de crecimiento cerebral activo en el hombre, puede causar una gran variedad de efectos dañinos. Esto se debe a que la glutamina es utilizada, a través de la transferencia de un átomo de nitrógeno de la amida, en la síntesis de un grupo importante de compuestos, incluyendo purinas, nucleótido difosfopiridina y D-fosfato-6-glutamina. Se sabe que la glutamina es normalmente absorbida por el tracto gastrointestinal, como uno de los constituyentes aminoacídicos de las proteínas alimenticias. Además de ser formada a partir del ácido glutámico por la enzima glutamina sintetasa. Las concentraciones de glutamina en plasma y tejidos de fenilcetonúricos pueden estar disminuídos, debido a la pérdida crónica de fenilacetilglutamina a través de los riñones, por absorción disminuída de glutamina en el tracto gastrointestinal o por algún otro mecanismo. (19)

3.3.4 Incidencia

Existen muchos datos en cuanto a la incidencia de fenilcetonuria en la población general de recién nacidos los cuales son: 1:10,000 (2), 1:12,000 (8), 1:15,000 (6), 1:20,000 (3) y 1:25,000 (15).

De acuerdo a ciertos estudios, la fenilcetonuria es más común

en familias de ascendencia irlandesa cuya incidencia es de 1:4,500 (8,20), o mediterránea (9,20). En cambio, se ha encontrado que es poco frecuente en los judíos con una incidencia de 1:19,000, y en la raza negra (8,20).

Debido a que la fenilcetonuria es una enfermedad autosómica recesiva, un hermano de un paciente fenilcetonúrico tiene una probabilidad del 25% de padecer el mismo transtorno (6,12).

3.3.5 Manifestaciones clínicas

3.3.5.1 En el desarrollo

Las etapas de desarrollo, ésto es, el tiempo en que el niño se sienta, camina y habla, usualmente se retrasan, aunque a veces se alcanzan a la edad apropiada. Para los que no pueden caminar, el control de esfínteres está ausente. El crecimiento de la dentadura generalmente se retrasa. No se han encontrado otras anormalidades en el desarrollo. (9)

3.3.5.2 Tamaño, forma y peso del cuerpo

Los niños con fenilcetonuria generalmente tienen alturas y pesos por debajo del promedio para la edad correspondiente. Un hallazgo que se encuentra frecuentemente es la microcefalia. Una configuración típica del cráneo de estos enfermos es la observación de un maxilar prominente, y como consecuencia de ello existen mayores espacios interdientales. (8,9)

3.3.5.3 Postura y forma de caminar

Se ha descrito que los fenilcetonúricos presentan una postura

encorvada o una forma "tropezada" de caminar. En pacientes con retraso mental severo se observa una posición de sentado típico llamado "Schneidersitz". (9)

3.3.5.4 Lesiones cutáneas

En algunos pacientes se observa durante la infancia "eczema". Además, se observa frecuentemente, la presencia de una piel seca y áspera. Algunas de estas manifestaciones cutáneas pueden ser atribuídas a condiciones no higiénicas o a que la piel es de color más claro y es más sensible que lo normal. (6-9)

3.3.5.5 Pigmentación

Los fenilcetonúricos se caracterizan por la deficiencia de pigmentación, manifestándose en los pacientes, como pelo de color más claro y ojos azules, si se compara con sus familiares que no padecen de la enfermedad. (9)

3.3.5.6 Del sistema nervioso central

La gran mayoría de los pacientes muestran una serie de cambios neurológicos típicos, que van a depender del grado de defecto mental. (9)

3.3.5.6.1 Epilepsia

En algunos de los pacientes se pueden presentar convulsiones. La incidencia de dichas convulsiones es mayor y los ataques son más severos en los pacientes con mayor defecto mental. (6,8,9)

3.3.5.6.2 Electroencefalograma

La mayoría de los pacientes con fenilcetonuria tiene patrones electroencefalográficos anormales, independientemente de si presentan o no convulsiones. Estas anomalías sugieren de que existe un daño severo en la porción media del cerebro. (6,9)

3.3.5.6.3 Conducta

Los fenilcetonúricos se mueven espasmódicamente, siendo inquietos y miedosos. La conducta de estos enfermos es variable debido a que pueden ser tímidos, ansiosos, muy inquietos, e incluso, en pocos casos, pueden llegar a padecer de episodios destructivos y psicóticos. La hiperactividad, irritabilidad y la falta de control en su temperamento son las principales razones por las cuales estos pacientes son institucionalizados. (6,9)

3.3.5.6.4 Movimientos corporales

En la mayoría de pacientes se observa un incremento en el tono muscular. Esta actitud no relajada puede ser responsable de la postura y forma de caminar de estos pacientes. (8,9)

Dos tercios de los pacientes presentan reflejos tendinales anormalmente enérgicos. Incluso, el movimiento clónico que se produce, puede persistir en algunos de los enfermos. (8,9)

Se ha descrito que algunos fenilcetonúricos presentan movimientos agitados repetitivos los cuales son voluntarios y no tienen ningún propósito. Estos movimientos se dan ya sea en una parte o en todo el cuerpo y pueden llegar a tardar horas. (9)

3.3.5.7 De la fenilcetonuria materna

La fenilcetonuria materna produce efectos complejos en el feto, los cuales se manifiestan en el recién nacido como retraso mental, microcefalia, enfermedad cardíaca congénita y bajo peso al nacer. Estas manifestaciones se presentarán en los hijos de mujeres que padecen de fenilcetonuria clásica que no se encuentren bajo tratamiento. (11,21)

3.3.6 Variantes de hiperfenilalaninemia

Además de la fenilcetonuria clásica, que ha sido la patología que se ha descrito ampliamente en las secciones anteriores, existen otras condiciones que producen hiperfenilalaninemia. Se han descrito, hasta la fecha, tres variantes de hiperfenilalaninemia en los cuales están identificados componentes del sistema de la fenilalanina hidroxilasa (fenilcetonuria clásica), deficiencia tisular de la enzima dihidropteridina reductasa (DHPR) o deficiencia de la síntesis de biopterina (con una consecuente deficiencia de biopterina). Se estima que del total de casos de hiperfenilalaninemia, las variantes distintas a la fenilcetonuria clásica, forman el 10%. En el caso de estas variantes, existe deterioro neurológico aunque se administre una dieta baja en fenilalanina. Este deterioro se debe aparentemente a que el cofactor, tetrahidropterina es necesario para la síntesis de serotonina, catecolaminas, epinefrina y norepinefrina. Se ha descrito que para estos casos de deficiencia en DHPR o biopterina, además de la dieta restrictiva en fenilalanina, se debe de administrar carbidopa, L-3,4-dihidroxifenilalanina y 5-dihidroxitriptófano, lo cual se ha demostrado que es parcialmente

efectivo como tratamiento. (9,11,16,17,22)

3.3.7 Pruebas de laboratorio para la detección de hiperfenilalaninemia

Es esencial realizar el diagnóstico de fenilcetonuria en las primeras semanas de vida, debido a que la administración de una dieta baja en contenido de fenilalanina puede prevenir cualquier daño neurológico o retraso mental, los cuales son irreversibles si no son detectados a tiempo. (1-4,6,10,12)

La determinación de fenilalanina sérica se utiliza con frecuencia para confirmar el diagnóstico de fenilcetonuria y para realizar un seguimiento en los niveles sanguíneos de este aminoácido, en personas que se encuentran bajo tratamiento para este trastorno. (6,14)

Se han descrito varias técnicas para el diagnóstico de fenilcetonuria, las cuales son descritas a continuación.

3.3.7.1 Prueba del cloruro férrico

Una de las pruebas utilizadas para determinar la presencia de metabolitos de la fenilalanina es la prueba de cloruro férrico, la cual consiste en la adición de varias gotas de cloruro férrico al 5%, a 5 mililitros de orina fresca del recién nacido. Inicialmente produce la precipitación de fosfatos pero, a medida que se le agrega mayor cantidad de la solución férrica a una muestra positiva, aparece luego de 2 a 3 minutos, un color verde olivo que desaparece lentamente en el transcurso de una o dos horas. A pesar de que esta prueba es rápida y sencilla, a veces puede dar

resultados negativos en pacientes con fenilcetonuria que tienen una concentración de ácido fenilpirúvico menor de 0.2 miligramos por mililitro. Un color similar se produce en orinas que contienen un metabolito de la clorpromazina y a veces también en orinas que contienen bilis. (3,9)

Actualmente, se utilizan tiras de papel estabilizadas, impregnadas con cloruro férrico (Phenistix, Ames Co.), las cuales son sensibles y convenientes para realizar pruebas cualitativas. (9)

3.3.7.2 Método espectrofotométrico enzimático

Este fue descrito por La Du y Michael. Este método consiste en el análisis de L-fenilalanina presente en 0.1 ml de suero en el cual no se requiere desproteínización. Esta prueba emplea la oxidasa para L-aminoácidos de veneno de serpiente, la cual oxida a la fenilalanina a ácido fenilpirúvico. En presencia de los iones arsenato y borato, el cetoácido resultante es rápidamente convertido en un complejo enol-borato que tiene una alta absorción de luz ultravioleta. Luego, la catalasa proveniente de hígado de res, es agregada para proteger al cetoácido del peróxido formado en la desaminación oxidativa de la oxidasa para L-aminoácidos. (23,24)

Esta prueba es rápida, específica y precisa cuando los niveles séricos de fenilalanina son elevados. Esta prueba tiene utilidad como prueba confirmatoria en el diagnóstico, cuando se sospecha de fenilcetonuria y para la evaluación de la efectividad de una dieta baja en fenilalanina. Actualmente, no se utiliza esta prueba debido a que se han desarrollado otros métodos me-

jores. (6,23)

3.3.7.3 Cromatografía en columna de intercambio iónico

Actualmente, es el método más fidedigno para la medición de fenilalanina debido a que es muy exacto y preciso. Esta técnica es la base de los analizadores automatizados de aminoácidos. Las resinas de intercambio iónico son copolímeros sulfonados de estireno, que forman redes altamente entrecruzadas que tienen afinidad tanto a la porción iónica como no iónica del aminoácido. Los aminoácidos son eluidos de la resina utilizando soluciones tampón a diferentes pH y fuerza iónica, además de temperaturas en aumento a lo largo de la columna. El efluente de la columna es mezclado con reactivo ninhidrina y es calentado por 10 a 20 minutos a 100 grados centígrados. El color azul desarrollado se mide fotométricamente, y su absorbancia se lee a una longitud de onda de 570 nm. (6,8)

Este procedimiento, el cual mide todos los aminoácidos de una muestra (de suero, plasma, orina u otro fluido biológico) requiere de 4 a 24 horas. Además, es una prueba cara debido al costo de los reactivos y del equipo. (6,8)

3.3.7.4 Cromatografía de gas

Este procedimiento es utilizado para la separación de aminoácidos en mezclas fisiológicas, incluyendo la fenilalanina. La resolución de la mezcla por esta técnica depende de la distribución de los componentes entre la fase gaseosa y la fase estacionaria sólida, o líquida contenida en la columna de

separación. Las sustancias son identificadas por sus tiempos de retención característicos. (6,8)

A pesar de que este método es bastante sensible, requiere de un corto tiempo de análisis y es relativamente más barato que el analizador de aminoácidos. Existen problemas en la preparación previa de la muestra ya que se requiere de una separación preliminar de los aminoácidos de otras sustancias que pueden reaccionar con los reactivos (6,8).

3.3.7.5 Método fluorométrico

Es el método descrito por McCaman y Robins, el cual es utilizado como prueba de rutina en algunos laboratorios debido a que es simple, sensible y es relativamente barato. El procedimiento se basa en la fluorescencia producida, cuando la fenilalanina se condensa con la ninhidrina en presencia de el dipéptido L-leucil-L-alanina. Esta reacción se lleva a cabo a un pH de 5.9. El compuesto fluorescente se estabiliza por la adición de el reactivo tartrato de cobre alcalino. La fluorescencia es medida a una longitud de onda de 489 a 515 nanómetros. (6,24)

A pesar de que este método es menos exacto que los resultados obtenidos con un analizador de aminoácidos, tiene la ventaja de que se puede analizar un gran número de muestras rápidamente con un grado de precisión aceptable. La desventaja es que la reacción de aminoácidos distintos a la fenilalanina, puede producir una fluorescencia no específica, lo cual resulta en la sobreestimación de la concentración de fenilalanina de muestras provenientes de pacientes normales. (6)

3.3.7.6 Sondas de ácido desoxirribonucleico

Actualmente se ha logrado clonar el gen que codifica a la enzima fenilalanina hidroxilasa, el cual ha sido incorporado a la técnica de sondas de ADN para el diagnóstico prenatal de la fenilcetonuria. (3)

3.3.7.7 Prueba de inhibición microbiológica de Guthrie

Esta prueba fue descrita por Guthrie y Susi (13) en 1963. Actualmente se utiliza muy comúnmente como una prueba semicuantitativa para la medición de niveles de fenilalanina sanguínea, especialmente en los programas de tamizaje neonatal. (6,10,14,25-28).

3.3.7.7.1 Principio

La prueba de Guthrie se basa en el hecho de que el crecimiento de las esporas de una cepa mutante de Bacillus subtilis (ATCC 6051 o ATCC 6633), en un medio de cultivo mínimo (de Demain modificado) es inhibido por el antimetabolito de la fenilalanina, la beta-2-tienilalanina. Esta contrarresta el efecto de la mínima cantidad de fenilalanina sanguínea presente en pacientes normales y ordinariamente, no producirá crecimiento de la bacteria luego de la incubación. (13,14,28-30)

Para realizar la prueba, se colocan pequeños discos de papel filtro impregnados con la sangre del paciente, sobre la superficie del medio de cultivo que tiene las esporas de la cepa mutante. Si la concentración de fenilalanina en la sangre se encuentra suficientemente elevada, el aminoácido, que se difunde del disco al medio de cultivo será suficiente para contrarrestar

del disco al medio de cultivo será suficiente para contrarrestar el efecto antagonista de la beta-2-tienilalanina, y se producirá un halo de crecimiento alrededor del disco. La rápida proliferación de la bacteria indica los niveles de la fenilalanina sanguínea. (13,14,28-30)

En esta prueba la muestra también puede ser orina, la cual es impregnada en discos de papel filtro (13).

3.3.7.7.2 Obtención de la muestra en recién nacidos

Este tipo de muestra consiste en una pequeña cantidad de sangre fresca, que se obtiene por punción del talón del pie del niño, la cual es aplicada inmediatamente en tres áreas de un pedazo de papel filtro Schleicher & Schuell No. 903. Estas manchas de sangre, que se secan a temperatura ambiente, deberán de tener un diámetro aproximado de 3/8 de pulgada. Las muestras de sangre deben de estar impregnadas uniformemente en el papel filtro. (13,28,30)

Es importante que en el momento de la toma de muestra se rotule la muestra con los siguientes datos: nombre del paciente, fecha de obtención de la muestra, fecha de nacimiento, fecha en que tomó su primer alimento el paciente y el tipo de alimentación que tomó (leche materna, fórmula o ambos). (30)

3.3.7.7.3 Interpretación de los resultados

Luego de que se ha incubado la caja de petri con el agar, las esporas y los discos impregnados con sangre, a 37 grados centígrados durante un período de 16 a 18 horas, se mide el crecimiento alrededor de los discos que contienen los estándares. Estos

se comparan con los halos de crecimiento que pudieran formarse alrededor de los discos que contienen las muestras desconocidas (o de los pacientes). La concentración de fenilalanina de la muestra desconocida corresponderá a la concentración del estándar cuyo halo tenga un diámetro de crecimiento similar. (13,14,28-31)

Para realizar una determinación más cuantitativa, se dibuja una curva de calibración en papel semilogarítmico, en la cual se grafica en el eje de las ordenadas (en escala logarítmica) el valor de la concentración de los estándares de fenilalanina y en el de las abscisas el diámetro de crecimiento que corresponde a cada concentración. Se dibuja una línea recta que intersekte los puntos de la curva. Se plotea el dato del halo de crecimiento de la muestra desconocida en esta curva y se determina su concentración. (28)

3.3.7.7.4 Valores de referencia

Varios autores han tomado el valor de 4 miligramos de fenilalanina por 100 ml de sangre como el valor crítico o punto de corte en la prueba de Guthrie. Según esto, los pacientes que presenten un valor menor que 4 mg/dl de fenilalanina sanguínea no presentan hiperfenilalaninemia; en cambio, a los pacientes con valores mayores al mencionado, se les deberán realizar otras pruebas, a fin de confirmar el diagnóstico de fenilcetonuria. (13,14,28-30)

Por otra parte, otros autores han cuestionado si el valor crítico mencionado es el adecuado, debido a que, en el caso del tamizaje neonatal, es más importante tener un mayor grado de sensibilidad que una alta especificidad. Esto permite que se

detecten todas las variantes de hiperfenilalaninemia que serán descritos posteriormente. Para ello, se ha propuesto el uso de un valor crítico de 2 mg/dl de fenilalanina sanguínea. El uso de este valor como punto de corte de la prueba, reducirá el número de falsos positivos. (32-35)

3.3.7.7.5 Condiciones que pueden producir falsos positivos en la prueba de Guthrie

Estas condiciones incluyen: que el paciente presente hepatopatía, tirosinemia o galactosemia; por el retraso en el apareamiento de la enzima fenilalanina hidroxilasa (quizás en algunos heterocigotos); o en lactantes, que sin tener fenilcetonuria, presentan en la fase temprana, cifras altas de fenilalanina que han pasado a través de la placenta, cuando la madre es fenilcetonúrica. (10,30)

3.3.7.7.6 Condiciones que pueden producir falsos negativos en la prueba de Guthrie

A pesar de que las pruebas de tamizaje neonatal para la detección de aumento de fenilalanina en sangre de pacientes son realizados con gran cuidado, ocasionalmente se han producido falsos negativos, cuyas consecuencias incluyen el retraso mental del paciente, estrés familiar e incluso se han llegado a producir demandas judiciales. (36)

Se ha sugerido que la posibilidad de que se den falsos negativos, se debe principalmente a errores en el laboratorio, lo cual es poco probable debido a que en centros donde se realizan

los programas de tamizaje neonatal que tienen control de calidad muy estricto, estos casos son casi inexistentes (27,37).

Existen estudios en los que se evalúa la edad del recién nacido a la cual se les debe de realizar la toma de muestra para detectar hiperfenilalaninemias, ya que se ha descrito la posibilidad de que para que se dé el aumento en la concentración de la fenilalanina sanguínea en los fenilcetonúricos, el paciente debió de alimentarse previamente con leche materna o fórmula, al menos por 24 a 48 horas. (19,25,37,38)

Otro estudio del metabolismo de la fenilalanina en el neonato, muestra que en niños normales y probablemente los heterocigotos disminuyen sus niveles de fenilalanina con la edad, mientras que los fenilcetonúricos o hiperfenilalaninémicos incrementan en forma variable sus concentraciones de fenilalanina sanguínea con la edad (39). Por esta razón, los autores recomiendan que la prueba se realice al menos a los cuatro días de vida, aumentando la probabilidad de que se realice el diagnóstico de fenilcetonuria (12,20,25,38-40). Con respecto a esto existe el inconveniente de que muchos de los recién nacidos salen del hospital antes de que tengan esta edad (12), por lo que se ha sugerido que se disminuya el valor crítico de la prueba a 2 mg/dl de fenilalanina, lo cual aumentaría la sensibilidad de la determinación (32-38). Otros autores han demostrado que la toma de muestra antes de las 72 horas de vida presenta un 10% de falsos negativos (41).

3.3.8 Tratamiento

Es muy importante realizar un diagnóstico temprano de la fenilcetonuria, ésto es, en las primeras semanas de vida, debido a que la administración de una dieta restrictiva baja en fenilalanina puede prevenir o atenuar cualquier daño neurológico o retraso mental. Si no se hace con prontitud el diagnóstico, los daños que puedan ser ocasionados en el niño serán irreversibles. (1-10,42-45)

En este caso, la dieta profiláctica no corrige el defecto genético subyacente, razón por la cual la persona fenilcetonúrica transmitirá este gen recesivo a sus hijos. Con la dieta, esta persona con defecto del fenotipo será controlado por influencias ambientales, pero su genotipo no será alterado. (10)

En la dieta de los fenilcetonúricos se debe evitar la ingesta de comida rica en fenilalanina. Debido a que todas las proteínas naturales contienen aproximadamente 4% de fenilalanina, es imposible satisfacer los requerimientos protéicos sin exceder los requerimientos de fenilalanina. La composición de la dieta debe de ser controlada cuidadosamente, aunque la fenilalanina no debe de ser omitida de la dieta debido a que es un aminoácido esencial. Por lo tanto, la dieta deberá contener suficiente fenilalanina, como para permitir que exista un crecimiento y desarrollo normal. (3-5,9).

Las proteínas bajas en fenilalanina como la caseína de la leche es hidrolizada y la fenilalanina es removida por absorción (2-4,9,10). Además, en la actualidad existen muchas mezclas de

aminoácidos con bajas concentraciones de fenilalanina o libres de ella (42). Al suplementar esta última fórmula con una pequeña cantidad de alimentos que por naturaleza son bajos en fenilalanina, como frutas, vegetales y ciertos cereales, se logra que el paciente tenga un crecimiento normal (5).

Al instituirse la dieta baja en fenilalanina, la concentración sanguínea de este aminoácido en el fenilcetonúrico disminuye, y se observa una normalización de la respuesta postprandial de la leucina, tirosina y valina (43).

Algunos médicos sugieren que la dieta baja en fenilalanina puede ser terminada cuando el niño entra a la edad escolar, mientras que otros sugieren que debe de continuarse hasta la adolescencia, e incluso han llegado a sugerir que la dieta se continúe de por vida (44).

Cuando el tratamiento bajo en fenilalanina es administrado por personas con experiencia, se pueden evitar ciertas secuelas como desnutrición severa, síndromes de deficiencia e incluso la muerte (45).

aminocidos con bajas concentraciones de fenilalanina o libres de
ella (43). Al suplementar esta dieta formula con una pequena
cantidad de alimentos que por naturaleza son bajos en
fenilalanina, como frutas, vegetales y ciertos cereales, se logra
que el paciente tenga un crecimiento normal (5).

Al instituirse la dieta baja en fenilalanina, la concentra-
cion sanguinea de este aminoacido en el fenilacetato disminuye
y se observa una normalizacion de la respuesta postprandial
de la fenilalanina, tiroxina y valina (43).

Algunos medicos sugieren que la dieta baja en fenilalanina
puede ser terminada cuando el niño entra a la edad escolar,
mientras que otros sugieren que debe de continuarse hasta la
adolescencia, e incluso han llegado a sugerir que la dieta se
continue de por vida (44).

Cuando el tratamiento bajo en fenilalanina es administrado
por personas con experiencia, se pueden evitar ciertas secuelas
como desnutricion severa, sindrome de deficiencia e incluso la
muerte (45).

4. JUSTIFICACIONES

La fenilcetonuria debe de ser diagnosticada lo antes posible y el tratamiento debe de iniciarse en las primeras semanas luego del nacimiento; de otra manera, se desarrolla retraso mental irreversible. Muchos fenilcetonúricos que no son tratados mueren antes de los 25 años, mientras que otros necesitan de cuidado institucional de por vida, a un costo humano y social muy elevado. Si esta enfermedad es detectada temprano en la infancia y el niño es sometido a una dieta cuidadosamente controlada durante sus primeros seis años de vida, éste podrá desarrollarse como un adulto normal. (1-10,42-45)

Existen distintas pruebas para la detección de fenilalanina sanguínea, como el propuesto por La Du (22,23) y el fluorométrico propuesto por McCaman y Robins (6,24), los cuales son relativamente complicados. En cambio, la prueba de inhibición bacteriana de Guthrie, es un método rápido y sencillo (6,10,12,13,25-29). Al llevar a cabo la prueba de Guthrie, la producción local de los materiales y la optimización de los ensayos, disminuye significativamente los costos (29), permitiendo la implementación de la prueba de Guthrie en el Hospital General San Juan de Dios.

4. JUSTIFICACIONES

La fenilcetonuria debe de ser diagnosticada lo antes posible y el tratamiento debe de iniciarse en las primeras semanas luego del nacimiento; de otra manera, se desarrolla retraso mental irreversible. Muchos fenilcetonúricos que no son tratados mueren antes de los 25 años, mientras que otros necesitan de cuidado institucional de por vida, a un costo humano y social muy elevado. Si esta enfermedad es detectada temprano en la infancia y el niño es sometido a una dieta cuidadosamente controlada durante sus primeros seis años de vida, éste podrá desarrollarse como un adulto normal. (1-10,42-45)

Existen distintas pruebas para la detección de fenilalanina sanguínea, como el propuesto por la Dra (22,23) y el fluorométrico propuesto por McCann y Robin (8,24), los cuales son relativamente complicados. En cambio, la prueba de inhibición bacteriana de Guthrie, es un método rápido y sencillo. (8,10,12,13,25-28). Al llevar a cabo la prueba de Guthrie, la producción local de los materiales y la optimización de los ensayos, disminuye significativamente los costos (29), permitiendo la implementación de la prueba de Guthrie en el Hospital General San Juan de Dios.

5. OBJETIVOS

- 5.1. Producción y optimización de un sistema para la detección de fenilalanina sanguínea (Prueba de Guthrie).
- 5.2. Validación del sistema mediante pruebas estadísticas.
- 5.3. Determinación de las condiciones de muestreo, ventajas y desventajas de la prueba, a fin de que ésta sea implementada como prueba de rutina en el Hospital General San Juan de Dios.
- 5.4. Disponer, en el Hospital General San Juan de Dios, de una prueba de tamizaje neonatal para el diagnóstico de fenilcetonuria, como prevención del retraso mental.

5. OBJETIVOS

- 5.1. Producción y optimización de un sistema para la detección de lesiones cerebrales (Prueba de Gálvez).
- 5.2. Validación del sistema mediante pruebas estadísticas.
- 5.3. Determinación de las condiciones de muestra, ventajas y desventajas de la prueba, a fin de que ésta sea implementada como prueba de rutina en el Hospital General San Juan de Dios.
- 5.4. Disponer, en el Hospital General San Juan de Dios, de una prueba de tamizaje neonatal para el diagnóstico de lesiones cerebrales, como prevención del retraso mental.

6. HIPOTESIS

La prueba de inhibición bacteriana de Guthrie es una prueba de tamizaje rápida y sencilla para la detección del aumento de la fenilalanina sanguínea, la cual puede ser implementada, como prueba rutinaria en el Hospital General San Juan de Dios.

6. HIPOTESIS

La prueba de inhibición bacteriana de Guthrie es una prueba de tamizaje rápida y sencilla para la detección del aumento de la fenilalanina sanguínea. La cual puede ser implementada, como prueba rutinaria en el Hospital General San Juan de Dios.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 Universo de trabajo

Reactivos nacionales producidos en el Hospital General San Juan de Dios, para la prueba de Guthrie.

7.2. Recursos

7.2.1 Humanos:

Br. Silvia Chuy Quan, estudiante de Química Biológica

Licda. Carolina Richter de Penados, asesor

Licenciadas Rachel Lam, Sandra Patricia Torres e Irma Juárez, colaboradoras

7.2.2 Físicos:

Laboratorios de Bioquímica y Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala

7.2.3 Materiales:

7.2.3.1 Cristalería:

Tubos de ensayo con tapadera de rosca

Viales pequeños con tapadera de rosca

Erlenmeyer de 250 mililitros

Botellas de 8 onzas con tapón de rosca

Botellas de 250 mililitros con tapón de rosca

Pipetas serológicas

Probeta de 1 litro

Balón aforado de 10 mililitros

7.2.3.2 Instrumentos y equipo:

Sacabocados de 1/4 de pulgada
Pinzas de metal
Asa bacteriológica
Pipeta automática de 100 y 300 ul
Autoclave
Incubadora a 35-37 grados centígrados
Centrífuga para tubos de ensayo
Centrífuga para separar plasma y eritrocitos
Espectrofotómetro
Congelador a -20 grados centígrados
Estufa
Balanza analítica
Desecador
Extractor de plasma
Equipo para filtración Millipore
Potenciómetro
Baño de maría de 55 a 80 grados centígrados

7.2.3.3 Reactivos:

L-fenilalanina
Beta-2-tienilalanina
Cloruro de sodio
Agua destilada
Carbón activado neutro
Dextrán sulfato
Dextrosa
Fosfato monobásico de potasio

Fosfato dibásico de potasio

Cloruro de amonio

Nitrato de amonio

Sulfato de sodio

L-ácido glutámico

L-asparagina

L-alanina

Sulfato de magnesio heptahidratado

Cloruro de magnesio tetrahidratado

Cloruro férrico hexahidratado

Cloruro de calcio

7.2.3.4 Medios de cultivo:

Agar esculina

Agar-agar purificado

Agar y caldo infusión de corazón y cerebro (BHI)

7.2.3.5 Otros:

Cepa de Bacillus subtilis ATCC 6633

Papel filtro Schleicher & Schuell No.903

Sangre humana completa, tipo O Rh positivo (de Banco de Sangre)

Filtros Millipore

Cajas de petri descartables de 125 x 25 mm.

Paquetes de material desecante

Papel filtro Whatman

Jeringa de plástico de 20 ml.

Perlas de vidrio

7.3. Procedimiento

7.3.1 Preparación del medio de cultivo (16,31,46)

La fórmula del medio de Demain modificado se encuentra en la tabla No. 1. Se disolvieron los componentes, en las cantidades mostradas en esta tabla, en 1000 mililitros de agua destilada. El pH debió de ser de 6.8 a 7.0. Se dispensaron 50 ml de la solución anterior a cada una de las botellas de 4 onzas y se esterilizaron por autoclaveado.

7.3.2 Preparación del inóculo (47)

A partir de una suspensión de esporas de Bacillus subtilis ATCC 6633, de la casa comercial BBL, se inoculó la superficie de tubos con agar BHI (infusión de corazón y cerebro). Se incubó el cultivo por 24 horas, a 37°C. Luego se reinoculó en tubos conteniendo caldo BHI y se incubaron otras 24 horas. De allí se tomó una alícuota para inocular masivamente la superficie de tubos inclinados con agar esculina (cuya fórmula se encuentra en el cuadro No. 2 de Anexos). Se dejaron incubar a 37°C, durante 24 a 48 horas, o hasta observar microscópicamente la presencia de esporas.

Después de la incubación, las esporas fueron raspadas y lavadas de la superficie del agar utilizando agua destilada estéril. Estas esporas fueron lavadas tres veces, centrifugando entre cada lavada y descartando el sobrenadante. Las esporas lavadas se suspendieron en 1 a 1.5 mililitros de agua destilada estéril y se calentaron en un baño de agua con una temperatura de 70 a 80°C. Se emplearon 2 ó 3 gotas de estas esporas para

reinocularlas en tubos inclinados de agar esculina. Se incubaron de 1 a 2 días hasta que hubiera una máxima esporulación. Luego, se lavó la superficie de cada tubo inclinado con 1 mililitro de agua destilada estéril y se raspó el crecimiento bacteriano con un asa bacteriológica. Esta suspensión se depositó en un erlenmeyer estéril que contenía perlas de vidrio en su interior. Este recipiente se colocó en un baño de agua a 80°C, durante 15 minutos, agitando vigorosamente para emulsificar la capa de esporas. Después, se colocó esta suspensión de esporas en tubos estériles con tapa de rosca, los cuales se centrifugaron a 4000 rpm por 20 minutos. Se descartó el sobrenadante y se lavaron las esporas tres veces con agua destilada estéril, centrifugando entre cada lavada y descartando el sobrenadante cada vez.

La suspensión final de esporas se hace con agua destilada a una densidad óptica de 1.0, medido a una longitud de onda de 550 nanómetros, en un espectrofotómetro. Se dispensaron alícuotas de esta suspensión final en viales pequeños con tapadera de rosca y se guardaron a -20 grados centígrados.

Al momento de uso, se descongeló un vial que contenía la suspensión final y se toman 75 microlitros de ésta, empleando una micropipeta con puntas estériles, los cuales se mezclaron con los 50 mililitros del medio de Demain y los 75 microlitros del inhibidor. La porción de suspensión de esporas que no fue empleada, se guardó de nuevo en el congelador.

7.3.3 Preparación del inhibidor (16,31)

Se preparó una solución de beta-2-tienilalanina 0.01 M. Se

pipetaron 300 microlitros de ésta en viales pequeños con tapadera de rosca y se congelaron hasta el momento de su uso. Para utilizar el inhibidor, se descongeló el frasco que lo contenía y se introdujo en él 1 ó 2 mililitros del medio de cultivo de Demain para luego unirlo al resto del agar y las esporas. Esto da una concentración final de 1.5×10^{-5} M del inhibidor.

7.3.4 Preparación de los estándares de trabajo (48)

Se obtuvo sangre del Banco de Sangre, tipo O Rh positivo, HIV negativo, Hepatitis negativo. A ésta se le separaron los eritrocitos del plasma. Estos se procesaron de la siguiente manera:

7.3.4.1 Plasma

Se preparó una jeringa de plástico de 20 ml como se muestra en la figura No. 1 de Anexos. Se filtró el plasma a través de ésta para remover la fenilalanina endógena. Este plasma tratado se mezcló con 30 miligramos de dextrán sulfato por decilitro durante 30 minutos y luego se centrifugó. Luego, el plasma tratado se esterilizó por filtración a través de filtros Millipore con una porosidad de 0.45 micrómetros. El plasma estéril se almacenó en el congelador (-20 grados centigrados).

7.3.4.2 Eritrocitos

Para lavar la preparación de eritrocitos se insertó una aguja, de un equipo de transferencia de plasma unido a una bolsa de solución salina (NaCl 9 g/L), a la bolsa conteniendo los eritrocitos. Se agregaron 200 ml de solución salina a la bolsa

con eritrocitos. Luego de mezclar el contenido, se removió la solución salina por centrifugación. Se repitió el lavado salino, y después se transfirieron las células lavadas a botellas de 250 ml. Estas fueron centrifugadas. La capa de leucocitos se removió. Luego se volvieron a lavar otras nueve veces los eritrocitos empleando solución salina estéril, centrifugando entre cada lavado y descartando el sobrenadante. Las células se transfirieron a una probeta graduada de 1 litro, para determinar su volumen.

7.3.4.3 Manchas de sangre secas impregnadas en papel filtro

Se combinaron los eritrocitos lavados con el plasma tratado con carbón activado para producir una mezcla de sangre completa con un hematocrito de 55%. La sangre completa fue congelada por dos días a -20 grados centígrados para hemolizarla. Luego, se le agregaron a una serie de alícuotas de la sangre cantidades de L-fenilalanina para tener concentraciones finales de 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 20 miligramos por decilitro de sangre. Con una micropipeta, se impregnó el papel filtro Schleicher & Schuell No. 903, hasta obtener manchas de sangre de entre $3/8$ y $1/2$ pulgada de diámetro. Después de que se secaron, estas manchas impregnadas se guardaron en una bolsa sellada conteniendo paquetes de material desecante, a una temperatura de 2 a 5 grados centígrados. Estos estándares debieron de ser autoclaveados junto con las muestras desconocidas antes de que se obtengan los discos de sangre utilizando el sacabocado de 6 milímetros de diámetro.

7.3.5 Preparación de las muestras desconocidas (26,31)

Se impregnó en papel filtro Schleicher & Schuell No. 903 la muestra de sangre a la cual se le deseó detectar la concentración de fenilalanina. La mancha de sangre no debió de tener un diámetro menor de 3/8 de pulgada. Se debió de asegurar de que la muestra de sangre tuviera una apariencia uniforme en ambos lados del papel filtro.

Antes de realizar la prueba, se debió de numerar con lápiz cada papel filtro impregnado con sangre. Estos se colocaron en una gradilla para tubos de ensayo y se autoclavearon de la siguiente manera: se permitió que el agua de la autoclave llegara a ebullición; se llenó el autoclave con las muestras y se selló inmediatamente. Se autoclaveó durante 3 minutos y se sacaron las muestras inmediatamente luego de que la presión hubiera bajado a cero. Luego del autoclaveado, se obtuvieron discos de 1/4 de pulgada de diámetro del centro de las manchas de sangre, utilizando un sacabocado. Este tratamiento es efectivo para prevenir la difusión de la hemoglobina sin afectar el nivel de fenilalanina.

7.3.6 Realización de la prueba de Guthrie (26,31)

Luego de combinar el medio de cultivo (Demain modificado), la beta-2-tienilalanina y la suspensión de esporas, se mezclaron bien y se vertieron en una caja de petri de petri 150 x 25 mm. Después de que el agar se solidificara, el recipiente se colocó sobre un pedazo de cartulina donde se dibujaron las posiciones en las que debían de colocarse las muestras desconocidas y los

estándares de trabajo (ver Figura No. 2 de Anexos).

Utilizando unas pinzas, se colocó los estándares y las muestras desconocidas en sus posiciones respectivas. El recipiente con agar se colocó en una incubadora con una temperatura de 35 a 37 grados centígrados, durante un período de 16 a 18 horas.

Se midieron las zonas de crecimiento alrededor de los discos de estándares de trabajo y se compararon con las que presentaban las muestras desconocidas. Se realizó una gráfica en la cual, en el eje de las ordenadas se colocaron los logaritmos de la concentración de los estándares (miligramos por decilitro) y en el de las abscisas, el diámetro de crecimiento (en milímetros). Se realizó una regresión lineal con los datos y se despejó la fórmula para obtener la concentración de las muestras "desconocidas".

7.4. Diseño Experimental

Para determinar si los estándares que fueron producidos a nivel nacional eran equivalentes a los estándares extranjeros, al ser sometidos a las mismas condiciones, en la prueba de Guthrie, se realizó un estudio en el cual se aplicó un diseño pareado. En éste se utilizó un número por grupo (n_j) de muestras de 24, dado un nivel alfa de 0.05 y un nivel beta de 0.1. Luego, a los datos obtenidos para cada par se les aplicó una prueba de t de Student para diferencias pareadas.

Para validar la prueba de Guthrie que se produjo y optimizó en este trabajo de investigación, se realizó un estudio *in vitro*

en el cual las muestras a ser utilizadas consistieron en alícuotas de sangre a las cuales se le añadió concentraciones conocidas de L-fenilalanina. Para determinar los distintos parámetros se utilizaron las pruebas específicas que se detallan a continuación.

7.4.1 Repetitibilidad

Se realizó 10 veces el análisis de una muestra de sangre con una cantidad conocida de fenilalanina añadida. A los datos obtenidos se les calculó la media, desviación y estándar coeficiente de variación.

7.4.2 Reproducibilidad

Se realizó el análisis de muestras de sangre con 4 distintas concentraciones de fenilalanina añadida. Las variables que se estudiaron fueron: experimentadores, tiempo en que se realiza la prueba, y concentración de fenilalanina añadida. Para llevar a cabo este estudio, se utilizó el esquema de un diseño cuadrado latino (cuadro No. 2 de Anexos).

La respuesta que se midió fue el diámetro de los halos de crecimiento alrededor de los discos impregnados con sangre. Luego, estos datos se analizaron a través de un análisis de varianza.

7.4.3 Linealidad

Se realizó el análisis de 37 conjuntos de estándares de distintas concentraciones y se obtuvo la curva de regresión lineal del logaritmo de la concentración versus diámetro de

crecimiento en milímetros. Luego, se utilizó una prueba de t, en donde la hipótesis nula es que el intercepto de la recta en la ordenada (a) es igual a cero y que la pendiente (b) es igual a 1.

También se realizó un perfil de precisión para los distintos rangos de concentración de fenilalanina. Se calculó la media, desviación estándar y coeficiente de variación de los datos de cada concentración.

7.4.4 Concentración mínima detectable (CMD)

Se analizaron por lo menos diez veces la sangre impregnada en papel filtro (blanco) a la cual no se le ha añadido fenilalanina.

(47)

Además, se calculó el límite de cuantificación a través del análisis de muestras con concentraciones conocidas del analito, estableciéndose el nivel mínimo al cual éste puede ser cuantificado (47).

7.4.5 Exactitud:

Se realizaron 30 determinaciones de fenilalanina sanguínea siguiendo el siguiente esquema: 6 repeticiones de cada una de las muestras conteniendo 0.75, 1.75 y 5 mg/dl; 4 repeticiones de una muestra con 12 mg/dl y 8 repeticiones de una muestra con 20 mg/dl. Las muestras de sangre utilizadas en esta parte del estudio consistieron en muestras libres de fenilalanina a las cuales se les agregó cantidades conocidas de este aminoácido.

Para calcular el porcentaje de recuperación aproximado, se utilizó la siguiente fórmula: % de recuperación = cantidad encontrada / cantidad agregada x 100.

Además, a los datos que se obtuvieron en este estudio se les calculó la media, desviación estándar, coeficiente de variación e intervalo de confianza del 95% para la media.

7.4.6 Sensibilidad

Utilizando los datos que se obtuvieron a partir del estudio del inciso anterior, se realizó el cálculo de la ecuación de regresión lineal, en la cual en el eje de las ordenadas (y) estuvo la concentración de fenilalanina detectada, mientras que en el eje (x) estuvo la concentración de fenilalanina que fue agregada. Se realizó una prueba de t de Student para determinar si se rechazaban las siguientes hipótesis nulas: $a = 0$ y $b = 1$.

8. RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

8.1 Producción a nivel local de los reactivos para la prueba de Guthrie

8.1.1 Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo de Demain modificado se preparó empleando los mismos componentes que los de la prueba descrita por Guthrie y Susi (13), pero se modificaron las cantidades de sales y agar, según lo descrito por el Manual de Productos y Procedimientos de BBL. De acuerdo a Newman y Starr, es preferible el empleo de un medio de cultivo que no contenga el inhibidor, beta-2-tienilalanina en su formulación, debido a que tiene la ventaja de que la concentración de éste podrá ser controlada y modificada si fuera necesario. (29)

El medio de cultivo de Demain producido fue un agar transparente y levemente amarillento, el cual permitió que se observara adecuadamente el crecimiento bacteriano alrededor de los discos impregnados con las muestras.

Debido a que el medio de Demain, sin adición del inhibidor posee componentes que lo hacen un medio de cultivo con los mínimos requerimientos para el desarrollo bacteriano, no se produce el crecimiento de este tipo de microorganismos. Sin embargo, este medio de cultivo, sin la adición del inhibidor, permite la esporulación de Bacillus subtilis ATCC 6633.

El autoclaveo previo a la adición del inóculo y del inhibidor, y el almacenamiento del medio de cultivo de Demain son

aspectos importantes, ya que este medio de cultivo, aunque se le ha adicionado el inhibidor y las esporas de B. subtilis, permite el crecimiento de hongos saprófitos del ambiente (por ejemplo, Aspergillus sp). Se observó que algunas colonias de estos hongos llegaron incluso a presentar halos de crecimiento del B. subtilis ATCC 6633 alrededor de ellas.

8.1.2 Preparación del inóculo

La metodología empleada para la producción de esporas del B. subtilis ATCC 6633 en agar esculina (47) produjo un volumen de suspensión de esporas, en un tiempo relativamente corto, de 1 a 2 días. Esto último es cierto si se toma en consideración que el método empleando agar papa dextrosa (PDA) descrito originalmente (13,16,31) necesita un tiempo de incubación mayor, de hasta una semana, para la producción de dichas esporas, comparado con las 24 a 48 horas necesarias si se utiliza el agar esculina. Este método asegura que el inóculo empleado en la prueba de Guthrie contenga solamente esporas (ya que existe un tratamiento con calor en el cual se eliminan las células vegetativas) y que la suspensión de éstas sea homogénea (debido a que se emplean perlas de vidrio para emulsificar la "capa" de bacterias, la cual es adherente y difícil de romper). (47)

Debido a que el B. subtilis utiliza la esculina en el medio de cultivo, las colonias de esta bacteria adquieren una coloración negra y, por tanto, las esporas también son de este color. La suspensión de inóculo que se emplea finalmente para la prueba de Guthrie tiene un aspecto turbio y es de color grisáceo,

pero al adicionársele al medio de cultivo de Demain, se mezcla adecuadamente y no produce color o turbidez que pueda interferir con la prueba. Esto se debe al volumen tan pequeño de la suspensión que es empleado.

8.1.3 Producción del inhibidor

Este consistió en preparar una solución acuosa de 0.01 M de beta-2-tienilalanina, el cual es una antagonista de la fenilalanina. Para determinar la proporción adecuada del inhibidor necesaria para llevar a cabo la prueba de Guthrie se realizó un estudio en el cual se utilizaron distintas cantidades en microlitros, de la solución de inhibidor. Se determinó que la proporción de 300 microlitros para 200 mililitros de medio de cultivo, descrita en la prueba original (13,16,31), era la adecuada. Se observó que si se adicionaban cantidades muy pequeñas del inhibidor, éste no producía un efecto antagonista, por lo que se presentaba un crecimiento de *B. subtilis* sobre todo el medio de cultivo, y no se limitaba a crecer solamente alrededor de los discos impregnados con las muestras y estándares. En cambio, el uso de mayores concentraciones del inhibidor produjeron una inhibición completa del crecimiento bacteriano, debido a que las concentraciones de fenilalanina analizadas no lograban contrarrestar el efecto antagonista de la beta-2-tienilalanina.

8.1.4 Preparación de los estándares de trabajo y las muestras para el estudio in vitro

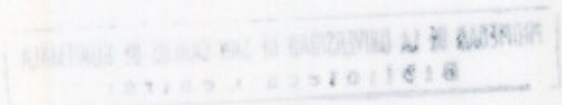
Se empleó sangre obtenida del Banco de Sangre del Hospital

General San Juan de Dios, al cual se le realizaron las pruebas de HIV, Hepatitis B y VDRL, las cuales dieron un resultado negativo. El plasma y los eritrocitos fueron tratados separadamente. El plasma se filtró empleando un sistema que contenía carbón activado y tierra de diatomeas para remover la fenilalanina endógena. Luego se empleó dextrán sulfato para delipidarlo. Por último, se filtró a través de membranas Millipore, para esterilizarlo. (48) Los eritrocitos fueron lavados con solución salina estéril para eliminar cualquier sustancia interferente.

Se preparó una sangre completa con un hematocrito de 55% empleando el plasma y los eritrocitos tratados. Se hemolizó esta sangre y se procedió a adicionarle cantidades de fenilalanina en solución acuosa para obtener concentraciones finales conocidas.

La primera vez que se intentó preparar los estándares, se emplearon proporciones muy grandes de la solución acuosa de fenilalanina con respecto a la cantidad de sangre. Los estándares preparados de esta manera fueron analizados empleando la prueba de Guthrie y se determinó que no producían halos de crecimiento alrededor de los discos de papel filtro en los cuales fueron impregnados. Esto se puede deber a que la muestra pudo difundirse más fácilmente por efecto cromatográfico del papel filtro en la cual fue impregnada, debido a que la proporción tan grande de fenilalanina acuosa (1:2) hacía que la muestra de sangre estuviera muy diluída.

Por lo tanto, se procedió a la preparación de nuevos estándares empleando proporciones mucho menores de la fenilalanina acuosa (volumen en microlitros) comparado a una



mayor cantidad de sangre (volumen en microlitros). Estos estándares fueron sometidos a la prueba de Guthrie, dando resultados satisfactorios. Las muestras con concentraciones conocidas empleadas para el estudio in vitro de validación de la prueba de Guthrie fueron preparados de esta misma forma.

8.2 Optimización de la prueba de Guthrie

Luego de la producción de los reactivos necesarios para realizar la prueba de Guthrie, se procedió a optimizar la metodología.

En primer lugar, se determinó la cantidad de agar (50 mililitros), suspensión de inóculo (75 microlitros) y de inhibidor (75 microlitros) que eran necesarios para preparar el medio de cultivo si se emplea una caja de petri de 125 x 25 mm. Según la experiencia obtenida en esta investigación, el medio de cultivo con la adición del inóculo e inhibidor deberá de ser preparado hasta el momento del uso, debido a que es susceptible a ser contaminado por hongos saprófitos del ambiente. Estos contaminantes, incluso pueden crecer aunque el medio de cultivo con inhibidor e inóculo sea guardado dentro de una bolsa plástica sellada dentro de la refrigeradora. En cambio, el medio de cultivo de Demain estéril (sin adicionarle inhibidor o inóculo), dispensado en frascos, se puede guardar adecuadamente en refrigeración, por unas tres o cuatro semanas.

En segundo lugar, se determinó si el procedimiento previo a la colocación de los discos impregnados con las muestras decrito por la literatura era el adecuado. Para ello, se hizo un estudio

en el cual se analizaron muestras con y sin autoclaveo. Se observó que los halos de crecimiento alrededor de los discos sin autoclaveo eran irregulares, comparados a los de los discos autoclaveados, además que en los primeros se observó la difusión de la hemoglobina contenida en las muestras. Esto último dificulta la lectura de los resultados. La importancia del autoclaveo, según Newman y Starr, es que, además de eliminar la difusión de la hemoglobina (al coagular las proteínas), este tratamiento destruye ciertas sustancias, como los antibióticos, los cuales pueden producir inhibición parcial o total del crecimiento del B. subtilis presente en el medio de cultivo. (29)

De acuerdo a lo observado en esta investigación, el autoclaveo de las muestras y estándares representa uno de los puntos críticos de la prueba de Guthrie. Esto se debe a que un tiempo de autoclaveo prolongado puede producir una disminución en la concentración de fenilalanina sanguínea presente. Las condiciones de autoclaveo adecuadas son un tiempo de 3 minutos a 15 libras de presión, con una temperatura de 121 grados Celsius. Las muestras deben de ser retiradas inmediatamente luego de que el autoclaveo baje a 0 libras de presión, de lo contrario, las muestras se humedecen mucho y pueden diluir la fenilalanina presente. Antes de obtener los discos a ser empleados en la prueba, se debe de asegurar que las muestras se hayan secado completamente. (29)

Otro punto importante a ser considerado durante el procedimiento que se realiza para llevar a cabo la prueba de

Guthrie es la identificación de la muestra, debido a que luego de que se han obtenido los discos impregnados con las muestras, éstas no podrán ser identificadas, excepto por la posición que tengan en la caja de agar. Durante esta investigación no se presentó este tipo de problemas, porque los estándares y las muestras analizadas eran pocos, pero si se realiza esta prueba a una mayor escala, se debe de tener mucho cuidado en el manejo de las muestras. Para no confundir las muestras se puede utilizar una hoja de papel con cuadros que se identifican con el número correspondiente a ésta, sobre la cual se colocan los discos respectivos.

En la obtención de los discos impregandos con muestras o estándares empleando el sacabocado, es importante tomar en cuenta que se debe de sacar el disco del centro de la muestra debido a que en las orillas de la mancha de sangre, la concentración del metabolito a ser analizado puede sufrir un efecto de difusión en el papel filtro. (50)

Luego de que ya se tiene el medio de cultivo y los discos con las muestras y estándares, se procede a realizar la prueba de Guthrie propiamente dicha. Es importante colocar adecuadamente los discos sobre las posiciones establecidas en una cartulina que se coloca debajo de la caja de petri. Esta misma guía sirve para identificar las muestras durante el momento del reporte de los resultados. Una vez colocados los discos se procede a incubar la caja de petri que los contiene. El tiempo de incubación es crítico ya que se ha establecido que el tiempo adecuado es de 16 a 18 horas. (16,29,31)

8.3 Determinación de equivalencia entre estándares extranjeros y nacionales

Para llevar a cabo esta determinación se empleó una prueba de t de Student para diferencias pareadas, comparando 24 estándares producidos a nivel local con sus homólogos producidos en el extranjero (Hospital de Buffalo, Nueva York). Los resultados obtenidos se encuentran en la tabla No. 1 de los Anexos. De acuerdo a esto, se puede concluir que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos de estándares ($p > 0.05$).

Por lo tanto, se emplearon los estándares producidos a nivel nacional para realizar el estudio de los parámetros estadísticos para la validación de la prueba de Guthrie que se describen a continuación.

8.4 Validación de la prueba

8.4.1 Repetibilidad

Para realizar esta prueba se empleó una muestra de sangre a la cual se le añadió fenilalanina para obtener una concentración final de 5 miligramos por decilitro. Se analizó esta muestra empleando la prueba de Guthrie, repitiendo dicho análisis 10 veces. Los datos obtenidos se resumen en la tabla No. 2 de Anexos.

A partir de ellos se calculó una media de 4.935 mg/dl, una desviación estándar de 1.035 y un coeficiente de variación de 20.98%. A pesar de que el valor de la media se aproximó a la

cantidad añadida, la desviación estándar (la cual excedió de 1 mg/dl de fenilalanina) y el coeficiente de variación (el cual debió de ser idealmente menor a 10%) indican que la prueba de Guthrie no es repetitiva, o sea que el analizar una muestra varias veces, el resultado no será el mismo cada vez.

Para evaluar esta parámetro también se realizó un perfil de precisión empleando los datos de la tabla No. 3. Los resultados de dicho perfil se pueden observar en la tabla No. 4. A partir de esta última tabla se construyó la gráfica No. 1. Estos datos indican que existe una mayor precisión a concentraciones de fenilalanina muy bajas o muy elevadas. En cambio, a concentraciones intermedias, donde se encuentra la concentración empleada para el estudio de repetibilidad, existe una mayor imprecisión. Esta variación a distintas concentraciones se puede deber a que para la medición de los halos de crecimiento se emplea la escala de milímetros, y en este caso, la variación de 1 milímetro influye de una manera notable en el cálculo de las concentraciones de fenilalanina presentes en las muestras.

8.4.2 Reproducibilidad

Este parámetro se evaluó de acuerdo al diseño de cuadrado latino presentado en el cuadro No. 3 del Anexo. Los resultados obtenidos se pueden observar en la tabla No. 5

La concentración de fenilalanina añadida (en miligramos por decilitro) de las distintas dosis fueron A=3, B=5, C=0.75 y D=12. Con estos datos se realizó un análisis de varianza con el cual se evaluó la reproducibilidad de la prueba de Guthrie. No hubo

una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$), entre los experimentadores y los días en los cuales se llevó a cabo la prueba. Lo único que sí presentó una diferencia significativa fue el tratamiento ($p < 0.05$), o sea, las concentraciones de fenilalanina sanguínea, lo cual es obvio. Por lo tanto, se puede concluir que la prueba de Guthrie es reproducible.

Esta conclusión parece no coincidir con los datos de la tabla No. 5 ya que las concentraciones obtenidas tienen algunos datos dispersos. Durante la realización de este análisis, se presentaron diversos factores que pudieron influir en dichos resultados. Entre ellos se encuentra que los experimentadores pudieron haber dejado incubando las cajas de petri con las muestras durante distintos períodos de tiempo, lo cual pudo influir en el grado de crecimiento, ya que el crecimiento bacteriano es logarítmico y no lineal. Otro factor que pudo influir de alguna manera es un error de lectura, ya que se empleó la escala de milímetros, la cual, como ya se mencionó anteriormente, con la diferencia de 1 milímetro, se produce una gran variación en el cálculo de las concentraciones.

8.4.3 Linealidad

Este parámetro se evaluó empleando los resultados de 37 conjuntos de estándares. En cada uno de estos conjuntos se analizaron las 7 concentraciones que se emplean de rutina para construir la curva de calibración; esto es, 2, 3, 4, 6, 8, 12 y 20 mg/dl de fenilalanina en sangre. En la tabla No. 6 de Anexos se puede observar, en forma resumida, los diámetros del halo de

crecimiento correspondientes a cada uno de los estándares que fueron empleados en esta investigación.

A partir de todos los datos de los 37 conjuntos de estándares analizados se realizó una regresión lineal simple, en el cual la abscisa correspondió al diámetro del halo de crecimiento (en milímetros) y la ordenada al logaritmo de la concentración (en miligramos por decilitro de fenilalanina). La ecuación de la recta fue: $y = 15.287x + 7.599$ (ver gráfica No. 2 de Anexos). Los coeficientes de correlación y de determinación fueron 0.834 y 0.695, respectivamente. Estos últimos datos indican que existe cierto grado de linealidad en la recta calculada. En cambio, si se observan los datos de la tabla No. 7, donde se analiza individualmente cada grupo de 7 estándares y se les realiza una regresión lineal a cada uno de ellos, los coeficientes de correlación y de determinación, en su mayoría son mayores de 0.90, lo cual indica que existe una mejor relación lineal entre las variables. Esto justifica el empleo de un grupo de estándares distinto en cada caja de petri en donde se coloquen las muestras a ser analizadas. Según Newman y Starr, el grosor del medio de cultivo y la difusión de fenilalanina previo a la incubación son factores que pueden afectar el tamaño del halo de crecimiento. Por ello, si se emplea un conjunto de estándares en cada recipiente donde se realiza el análisis, se minimizará la influencia de dichos factores. (29)

Como parte del estudio de linealidad, se realizó un análisis de varianza empleando los datos de los 37 conjuntos de estándares, concluyéndose que las variables "x" (logaritmo de la

concentración) y "y" (diámetro del halo de crecimiento) si se comportan linealmente ($p = 0.0001$). Esto indica que es recomendable realizar los cálculos de la curva de calibración si se desea conocer las concentraciones de las muestras. En la prueba de rutina para el tamizaje neonatal sólo se comparan visualmente los halos de crecimiento de las muestras con los estándares para obtener una concentración estimada. Esto se debe a que, a nivel hospitalario o regional, se procesa una gran cantidad de muestras diariamente. (13,29.30)

También se realizó una prueba de t de Student empleando los datos de la tabla No. 3 de Anexos para determinar si el intercepto de la recta en la ordenada (a) es igual a cero y si la pendiente (b) es igual a uno. La ecuación de la recta calculada fue: $y = 12.67x + 8.21$. Los coeficientes de correlación y de determinación obtenidos fueron 0.9939 y 0.9877. La prueba de t, lleva a la conclusión que la pendiente es distinta a uno y el intercepto en la ordenada es diferente a cero ($p < 0.025$).

El intercepto de la ordenada distinto a cero indica la presencia de un "fondo" en la prueba. Dicho "fondo" se debe a que el disco en el cual se impregna la muestra de sangre a ser analizada posee un diámetro de seis milímetros, por lo que el menor valor de diámetro de crecimiento que puede reportarse es 6. Si una muestra posee un halo de crecimiento menor a este valor, no se podrá determinar su concentración mediante la prueba de Guthrie.

Los datos de coeficiente de correlación y de determinación

de este estudio indican que existe una estrecha relación entre las variables estudiadas ($p < 0.05$).

8.4.4 Concentración mínima detectable

Se analizaron 10 muestras de sangre tratada según el procedimiento del inciso 7.3.4, a la cual no se le añadió fenilalanina. Ninguna de las muestras produjo crecimiento bacteriano.

Por lo tanto, para determinar el límite de cuantificación de la prueba de Guthrie, se analizaron muestras con concentraciones conocidas, las cuales fueron diluídas seriadamente. Según los resultados obtenidos, la concentración mínima detectable, fue de 0.75 mg/dl. A esta concentración no se observó un halo de crecimiento medible en milímetros alrededor del disco, sino se observó a través del medio de cultivo un crecimiento bacteriano debajo del área que ocupaba el disco impregnado con la muestra, lo cual se tomó como un halo de crecimiento equivalente a 6 milímetros de diámetro. A una concentración de 1.25 mg/dl se pudo observar y medir el halo de crecimiento alrededor del disco.

8.4.5 Exactitud

Para llevar a cabo esta prueba se empleó una muestra de sangre libre de fenilalanina a la cual se le añadieron distintas concentraciones conocidas de este aminoácido.

Se calculó la concentración de fenilalanina a partir de los datos de la tabla No. 3 de Anexos, los cuales se resumen en la tabla No. 8.

A partir de cada uno de los 30 datos se calculó el

porcentaje de recuperación. La media del porcentaje de recuperación fue de 99.81%, la desviación estándar con un intervalo de confianza del 95% fue de 18.09%, y el coeficiente de variación fue de 18.12%. Estos datos indican que el método es exacto, ya que la media del porcentaje de recuperación está muy cercana al 100%. La desviación estándar de los porcentajes de recuperación obtenidos posee un valor relativamente elevado, los cuales indican que existe cierta variabilidad en los resultados. Debido a que la prueba de Guthrie es semicuantitativa, además de ser una combinación de una prueba bioquímica y microbiológica, no se ha establecido el valor de coeficiente de variación adecuado para este tipo de pruebas. Sin embargo, debido a que esta prueba se emplea como prueba presuntiva (de tamizaje) y no como una prueba diagnóstica confirmatoria, el coeficiente de variación de los porcentajes de recuperación se puede considerar como aceptable. Por lo tanto, se concluye que la prueba de Guthrie es exacta.

Además, se realizó un perfil de precisión empleando los datos de coeficiente de variación de los porcentajes de recuperación versus la concentración de fenilalanina sanguínea. En este perfil de precisión (gráfica No. 3 de Anexos) se observa que existe variabilidad en los porcentajes de recuperación de las distintas concentraciones.

8.4.6 Sensibilidad

Empleando los datos de la tabla No. 3 de Anexos y las curvas de calibración correspondientes, se calcularon las concen-

traciones de fenilalanina que fueron detectados por la prueba de Guthrie. Además, se realizó el cálculo de la ecuación de regresión lineal, siendo la variable "y", la concentración de fenilalanina detectada, y la variable "x", la concentración de fenilalanina agregada. La ecuación calculada fue: $y = 0.9377x + 0.2477$ (gráfica No. 4 de Anexos). Los coeficientes de correlación y de determinación fueron 0.9855 y 0.9925, respectivamente.

Para evaluar la sensibilidad del método, se realizó una prueba de t de Student para determinar si en la curva de regresión lineal calculada, el intercepto en el eje de las ordenadas (a) era igual a cero y si la pendiente (b) era igual a uno. De acuerdo a la t de Student calculada, se concluye que $a=0$ y $b=1$.

Por lo tanto, como el intercepto del eje de las ordenadas es igual a cero y la pendiente es igual a uno, se concluye que la prueba de Guthrie es sensible.

En una prueba de tamizaje neonatal, la sensibilidad es crítica, mientras que la especificidad es de menor importancia. Esto se debe a que, a pesar de que existe mayor posibilidad de obtener resultados falsos positivos, en el caso del diagnóstico temprano de la fenilcetonuria es importante detectar los posibles casos antes de que se produzca un daño irreversible. De acuerdo a la literatura, el "valor crítico" recomendado internacionalmente para determinar si un paciente es un probable fenilcetonúrico es de 4 mg/dl de fenilalanina sanguínea. Sin embargo, de acuerdo a varios estudios, el uso de dicho valor

puede implicar que algunos pacientes con desórdenes en el metabolismo de fenilalanina no sean detectados. Por lo tanto, estos investigadores han propuesto que se utilice un "valor crítico" de 2 o 3 mg/dl, lo cual permitiría la detección de los casos que, de otra manera, serían falsos negativos. (32-35)

8.4.7 Interpretación de la validación

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación, la prueba de Guthrie no es repetitiva, mientras que sí es reproducible, exacta y sensible, además de poseer un comportamiento lineal. Esto significa que una misma muestra analizada varias veces con la prueba de Guthrie, no siempre presentará el mismo valor. La reproducibilidad del método indica que los resultados de una misma muestra analizada por distintas personas y en distintos días no variarán significativamente.

De acuerdo a Clemens y colaboradores, en las pruebas de tamizaje neonatal, es muy importante que una prueba tenga una buena sensibilidad, aunque su especificidad sea inferior. Esto se debe a que el objetivo primordial de este tipo de pruebas es el de contar con una metodología que permita determinar si un paciente presenta o no cierta condición (en el caso de este estudio, nivel de fenilalanina sanguínea) asociada a una patología. Por lo tanto, de acuerdo a los resultados obtenidos, la prueba de Guthrie sí llena este requisito y es adecuada para el tamizaje neonatal. (32)

8.5 Ventajas y desventajas de la implementación de la prueba de Guthrie en el programa de tamizaje neonatal del Hospital General San Juan de Dios

Como se mencionó anteriormente, la prueba de Guthrie es una prueba que, por los distintos aspectos evaluados en esta y otras investigaciones, se ha determinado que es adecuada para el tamizaje neonatal.

Dentro de las ventajas de la implementación de esta prueba en el Hospital General se encuentra que, actualmente, éste cuenta con un programa de tamizaje neonatal para el estudio de hipotiroidismo y las muestras que se emplean también son manchas de sangre impregnadas en papel filtro. Además, el Hospital también cuenta con el equipo necesario para llevar a cabo la prueba (autoclave e incubadora), aunque éste no se encuentra en el laboratorio donde se llevan a cabo las otras pruebas de tamizaje neonatal. Otra de las ventajas, es que debido a la realización de esta investigación, ya se cuenta con la cepa de B. Subtilis ATCC 6633 y cierta cantidad de la beta-2-tienilalanina, los cuales fueron donados por el Hospital de Buffalo, Nueva York. Además, como parte de este trabajo se produjo un lote de estándares de fenilalanina en sangre; también se cuenta con un lote de estándares donados por el Hospital de Buffalo. También se debe de tomar en cuenta que, actualmente, el Hospital no posee ninguna otra prueba que pueda ser empleada para detectar los niveles de fenilalanina sanguínea.

Dentro de las desventajas de la implementación de la prueba se encuentra que, para que el aumento de fenilalanina sanguínea

en recién nacidos se manifieste, estos deberán de haber ingerido proteínas por lo menos durante tres o cuatro días previos a la obtención de la muestra. Por lo general, los niños sanos que nacen en el Hospital, son dados de alta a las 48 horas de haber nacido. Si las muestras son obtenidas previo a la salida del recién nacido del Hospital, existe el riesgo de que la fenilalanina no haya alcanzado los niveles sanguíneos elevados por falta de ingesta de fenilalanina de las proteínas. (12,20,25-27,36). Para la implementación de la prueba, se deberá de contar con personal calificado que se dedique completamente a la realización de la prueba, desde la toma de la muestra hasta la lectura de los resultados y su posterior interpretación.

De acuerdo a Buist (51), la realización de pruebas de tamizaje neonatal son ineficientes y caras en los laboratorios donde se analiza un pequeño número de muestras de este tipo. Según su estudio, es óptimo que un laboratorio maneje al menos de 50,000 a 200,000 muestras de tamizaje neonatal anuales. Según otros estudios, la centralización o regionalización del tamizaje neonatal permite que disminuyan los costos de la prueba y además se podría llevar a cabo un mejor control de calidad. (20,29,33)

Además, se debe de tomar en cuenta que, como la prueba de Guthrie es sólo presuntiva, si un paciente es sospechoso de padecer algún desorden del metabolismo de la fenilalanina, es necesario realizarle alguna de las pruebas confirmatorias que fueron descritas anteriormente. Esto implica el uso de equipo especial, con el cual el Hospital General San Juan de Dios no una institución que sí posea dicho equipo.

El precio comercial de la prueba de Guthrie es de aproximadamente US\$0.77 por cada muestra, mientras que si se preparan los reactivos a nivel local tiene un costo aproximado de US\$0.40. Por lo tanto, de acuerdo a lo descrito por Newman y Starr (29), el precio por prueba se reduce si se producen los propios reactivos. Pero dicha producción implica tiempo y esfuerzo de personas que estén capacitadas para realizar esa función.

Actualmente, los recursos económicos destinados al Hospital General San Juan de Dios son muy escasos y existen necesidades de Salud Pública prioritarios. Por lo tanto, no es posible implementar la prueba de Guthrie, como prueba rutinaria en el tamizaje neonatal en dicho Hospital, pero sí podría ser empleada como una prueba presuntiva para la determinación de fenilalanina sanguínea en pacientes pediátricos en los que se sospeche que padecen de fenilcetonuria u otra forma de hiperfenilalaninemia.

9. CONCLUSIONES

- 9.1 La prueba de Guthrie es una prueba rápida, sencilla, sensible, exacta y reproducible la cual la hace adecuada como prueba de tamizaje neonatal.
- 9.2 Este ensayo microbiológico no es repetitivo.
- 9.3 La relación entre el logaritmo de la concentración de fenilalanina sanguínea y el diámetro del halo de crecimiento alrededor de los discos impregnados con la muestra, es lineal entre las concentraciones de 2 a 20 mg/dl. Esto permite que la prueba de Guthrie pueda realizarse de una manera semicuantitativa.
- 9.4 La prueba de inhibición bacteriana de Guthrie es una prueba que puede ser empleada para el diagnóstico presuntivo temprano del aumento de fenilalanina sanguínea lo cual permitiría la prevención de retraso mental en pacientes fenilcetonúricos o alguna otra variante de hiperfenilalaninemia, debido a que se cuentan con los reactivos y el equipo necesarios para llevar a cabo dicha prueba en el Hospital General San Juan de Dios.

10. RECOMENDACIONES

- 10.1 Realizar un estudio para conocer la epidemiología de los niveles de fenilalanina sanguínea en la población guatemalteca.

- 10.2 La prueba de Guthrie puede ser empleada para el diagnóstico presuntivo de otros desórdenes de aminoácidos como metionina, leucina y tirosina, por lo que se recomienda su estudio.

11. REFERENCIAS

- (1) Wyngaarden JB, Smith LL. Cecil: Tratado de Medicina Interna. 17a. ed. 2 volúmenes. Colchero F, trad. México D.F.: Interamericana, 1986. 2620 + XCV.
- (2) Lehninger AL. Principles of Biochemistry. New York: Worth Publishers, Inc., 1987. xxiv + 1011 pp.
- (3) Stryer L. Biochemistry. 3a. ed. New York: W.H. Freeman & Co., 1988. xiii + 1089 pp.
- (4) Martin DW, Mayes PA, Rodwell VW. Bioquímica de Harper. 9a. ed. Carsolio MR, trad. México, D.F.: El Manual Moderno, 1984. 660 pp.
- (5) Petersdorf RG. et.al. Harrison: Principios de Medicina Interna. 6a. ed. 2 volúmenes. de Forunier CA, trad. México, D.F.: McGraw-Hill, 1986. XIX + 3088 pp.
- (6) Kaplan LA, Pesce AJ. Clinical Chemistry. Teory, analysis and correlation. Missouri: The C.V. Mosby Co., 1984. 1476 pp.
- (7) Behrman RE, Vaughan VC. Nelson: Tratado de Pediatría. 12a. ed. 2 volúmenes. Barrionuevo JL, trad. México, D.F.: Nueva Editorial Interamericana, 1987. XXIV + 1971 pp.
- (8) Gornall GA. Applied Biochemistry of Clinical Disorders. New York: Harper & Row Publishers Inc., 1980.
- (9) Stranbury JB, Wyngaarden JB, Freduckson DS. The Metabolic Basis of Inherited Disease. 2nd. ed. New York: McGraw Hill Co., 1966. 1434 pp.
- (10) Hamilton HK, Rose MB. Diagnóstico Clínico. Blengio JR, trad. México D.F.: Nueva Editorial Interamericana, 1985. XLVIII + 1189.
- (11) Frimpter GW. Aminoacidurias due to inherited disorders of metabolism. (II parts) N Eng J Med. 1973; 289(16): 835-841, 895-901.
- (12) McCabe ERB. et.al. Newborn screening for phenylketonuria: predictive validity as a function of age. Pediatrics 1983; 72(3):390-397.
- (13) Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. Pediatrics 1963; 32:338-343.
- (14) Toro G, Ackermann PG. Practical Clinical Chemistry. Boston: Boston: Little Brown and Co., 1975.

- (15) Montgomery R. et.al. Biochemistry: A Case Oriented Approach. 2nd. ed. St. Louis: The C.V. Mosby Co., 1977. xviii + 769 pp.
- (16) Scriver CR, Clow CL. Phenylketonuria: Epitome of human biochemical genetics. (2nd of 2 parts) N Engl J Med 1980; 303(24):1395-1399.
- (17) Kaufman S. Differential diagnosis of variant forms of hyperphenilalaninemia. Pediatrics 1980 65(4):840-841.
- (18) Thompson SJ. et.al. Neurological deterioration in young adults with phenylketonuria. Lancet 1990; 336:602-605.
- (19) Perry TL. et.al. Glutamine depletion in phenylketonuria. N Engl J Med 1970; 282(14):761-766.
- (20) Holtzman NA, Meedk AG, Mellits ED. Neonatal screening for phenylketonuria: I. Effectiveness. JAMA 1974; 229(6):667-670.
- (21) Waisbren SE, Levy HL. Effects of untreated maternal hyperphenylalaninemia on the fetus: Further study of families identified by roturine cord blood screening. J Pediatr. 1990; 55(3):491-496.
- (22) O'Flynn ME. et.al. The diagnosis of phenylketonuria. Am J Dis Child 1980; 134:769-774.
- (23) La Du BN, Michel PJ. An enzymatic spectrophotometric method for the determination of phenylalanine in blood. J Lab Clin Med 1960; 55(3):491-496.
- (24) Henry RJ. Clinical Chemistry: Principles and Techniques. London: Hoeber, 1966. 1128 pp.
- (25) Meryash DL. et.al. Prospective study of early neonatal screening for phenylketonuria. N Engl J Med 1981; 4(5):294-296.
- (26) Massachusetts Department of Health. Newborn screening for metabolic disorders. N Engl J Med 1980;288(4):1299-1300.
- (27) Koch R, Gross E. Accuracy of newborn screening programs for phenylketonuria. J Pediatr 1981; 98(2):267-269.
- (28) Merck. Clinical Laboratory. 11th ed. Darnstadt: E. Merck, 1974. 644 pp.
- (29) Newman RL, Starr KJT. Technology of a regional Guthrie service. J Clin Pathol 1971; 24:564-575.

- (30) Lynch MJ. et.al. Métodos de Laboratorio. 2 volúmenes. Folch R, trad. México, D.F.: Nueva Editorial Interamericana, 1988. 1522 pp.
- (31) California State Department of Health. Phenylketonuria, and Guthrie inhibition assay screening procedure. Pediatrics 1963;32:344-346.
- (32) Clemens PC. et.al. Newborn screening for hyperphenylalaninemia on day 5: Is 240 umol/liter the most appropriate cut-off level? Prevent med 1990; 19: 54-60
- (33) Berry Hk, Porter LJ. Newborn screening for phenylketonuria. Pediatrics 1982; 70(3): 506-507.
- (34) Weiner DL. et.al. False positive rate in neonatal phenylketonuria (PKU) screening using a 2 mg/dl phenylalanine (PA) cutoff. Am J Genet 1981; 32:284.
- (35) Holtzman NA McCabe ERB, Cunningham GC. Screening for phenylketonuria. N Engl J Med 1982; 304(21):1300.
- (36) Holtzman RN. et.al. Descriptive epidemiology of missed cases of phenylketonuria and congenital hypothyroidism. Pediatrics 1986; 78(4):553-558.
- (37) Sepe ST, Levy LH, Nount FW. An evaluation of routine followup blood screening of infants for phenylketonuria. N Engl J Med 1979; 300(11):606-609.
- (38) Holtzman NA, Mellitis D, Kallman CH. Neonatal screening for phenylketonuria: II. Age dependence of initial phenylalanine in infants with PKU. Pediatrics 1974; 53(3): 353-357.
- (39) Schneider AJ. Newborn phenylalanine/tyrosine metabolism. Am J Dis Child 1983; 137;427-432.
- (40) Dontaville VK, Cunningham GC. Effect of feeding on screening for PKU in infants. Pediatrics 1973; 51(3): 531-537.
- (41) Hsia YE. Followup screening for phenylketonuria. N Engl J Med 1980; 301(10):553.
- (42) Gerdes AM. et.al. Plasma amino acids in term neonates and infants with phenylketonuria before and after institution of the diet. Acta Paediatr Scand 1990;79: 64-68.
- (43) Gerdes AM. et.al. Plasma amino acids in phenylketonuric children treated either with phenylalanine-free amino acids or a protein hydrolysate. Acta Paediatr Scand 1990; 79:69-72.

- (44) Wolf-Novak LC. et.al. Aspartame ingestion with or without carbohydrate in phenylketonuric and normal subjects: effect on plasma concentration of amino acids, glucose and insulin. *Metabolism* 1990; 79:69-72.
- (45) Hudson FP, Mordaunt VL, Leahy I. Evaluation of treatment begun in the first three months of life in 184 cases of phenylketonuria. *Arch Dis in Child* 1970; 45(5): 5-12.
- (46) Manual of BBL Products and Laboratory Procedures. Sixth edition. Power DA, McCuen PJ, eds. Becton Dickinson Microbiology Systems, 1988. p. 344
- (47) Franklin ML, Clark WA. Simple, inexpensive, and rapid way to produce Bacillus subtilis spores for the Guthrie Bioassay. *J Clin Microbiol* 1981; 14(1):113-115.
- (48) Spierto FW. et.al. Phenylalanine analyses of blood-spot control materials: Preparation of samples and evaluation of interlaboratory performance. *Clin Chem* 1985; 31(2):235-238.
- (49) The United States Pharmacopeia. XXII ed. USA: Mack Printing Co., 1990. pp. 1710-1712.
- (50) Bachman C, Colombo JP. Quality Control Trial in Screening Laboratory (En: Bickel H, Guthrie R, Hammersen G, eds. Neonatal Screening for Inborn Errors of Metabolism. Berlin: Spinger, 1980. p. 295-298)
- (51) Buist NRM, Laboratory aspects of newborn screening form metabolic disorders. *Lab med* 1988; 19(3):145-150.

12. ANEXOS

Cuadro No. 1

Composición del medio de cultivo de Demain modificado
para la germinación de Bacillus subtilis

Sustancia	Gramos/litro
Dextrosa	5.0
K ₂ HPO ₄	15.0
KH ₂ PO ₄	5.0
NH ₄ Cl	2.5
NH ₄ NO ₃	0.5
Na ₂ SO ₄	0.5
Acido glutámico	0.5
Asparagina	0.5
L-alanina	0.25
MgSO ₄ -7H ₂ O	0.05
MnCl ₂ -4H ₂ O	0.005
FeCl ₃ -6H ₂ O	0.005
CaCl ₂	0.0025
Agar	13.5

Fuente: Manual of BBL Productos and Laboratory Procedures (46)

Cuadro No. 1

Composición del medio de cultivo de Lentin edulis

Cuadro No. 2

Formulación del agar esculina

Sustancia	Cantidad
Esculina	1.0 gramo
Citrato férrico	0.5 gramos
Agar base	40.0 gramos
Agua destilada	1000 mililitros

Nota: Se disuelven los compuestos por calentamiento.
 Se ajusta el pH a 7.0 y se dispensan en tubos.
 Se autoclavean e inclinan los tubos.

Cuadro No. 3

CUADRO LATINO PARA EL ESTUDIO DE REPRODUCIBILIDAD

Fuente de Variación 1

	E ₁	E ₂	E ₃	E ₄
D ₁	A	B	C	D
D ₂	B	C	D	A
D ₃	C	D	A	B
D ₄	D	A	B	C

Donde: A a D, correponden a las concentraciones de fenilalanina, 1 a 4, respectivamente.

E_n = número del experimentador; n = 1 a 4

D_n = día en que se realiza la prueba; n = 1 a 4

Tabla No. 1
 Datos obtenidos para la comparación de estándares
 locales con estándares extranjeros

Concentración de fenilalanina (mg/dl)	Halos de crecimiento (milímetros)	
	Estándar local	Estándar extranjero
2	8	10
2	9	9
2	11	12
2	8	9
3	13	13
3	10	12
3	12	13
3	12	13
4	14	15
4	13	14
4	14	15
4	13	13
6	16	16
6	18	19
6	17	16
8	17	18
8	20	19
8	20	20
12	20	20
12	24	21
12	22	22
20	24	23
20	27	25
20	25	27

Tabla No. 2
 Concentraciones de fenilalanina de una muestra
 analizada para el estudio de repetibilidad

Concentración agregada (mg/dl)	Concentración encontrada (mg/dl)
5	4.68
5	3.94
5	5.68
5	3.90
5	5.99
5	6.49
5	5.80
5	4.88
5	3.32
5	4.67
Media	4.94
Desviación estándar	1.04
Coeficiente de variación	20.98%

Tabla No. 3
 Concentraciones de fenilalanina obtenidas para
 la determinación de exactitud y sensibilidad

Concentración agregada (mg/dl)	Concentración detectada (mg/dl)
0.75	0.72
0.75	0.72
0.75	0.89
0.75	0.89
0.75	0.84
0.75	0.84
1.75	1.05
1.75	1.04
1.75	2.12
1.75	1.79
1.75	2.19
1.75	2.19
5.00	5.68
5.00	3.90
5.00	5.99
5.00	4.24
5.00	4.68
5.00	3.94
12.00	11.96
12.00	11.96
12.00	14.22
12.00	14.22
20.00	21.15
20.00	17.52
20.00	21.15
20.00	17.52
20.00	18.55
20.00	18.55
20.00	18.55
20.00	18.55
20.00	15.62

Tabla No. 4
 Concentraciones de fenilalanina añadidas y calculadas
 para el estudio de recuperación de la prueba de Guthrie

Concentración real o añadida (mg/dl)	Concentración experimental o calculada (mg/dl)		
	Promedio	Desviación estándar	C.V.(%)
0.75	0.82 ±	0.07	0.08
1.75	1.73 ±	0.50	29.30
5.00	4.74 ±	0.82	17.33
12.00	13.09 ±	1.13	8.63
20.00	18.58 ±	1.74	9.37

Tabla No. 5
 Concentraciones de distintas dosis de fenilalanina
 sanguínea hallados por cuatro experimentadores que realizaron
 la prueba de Guthrie en distintos días

Dosis	Concentración de fenilalanina (mg/dl) hallados por el experimentador:			
	1	2	3	4
A	4.87	3.68	2.17	2.34
B	11.30	4.88	3.32	4.67
C	0.19	0.31	0.16	0.08
D	18.51	12.61	7.22	13.01

Resultados del estudio de linealidad: curvas de calibración de 37 conjuntos de estándares de fenilalanina

Tabla No. 6
 Datos promedio de 37 conjuntos de estándares de fenilalanina

Dosis Concentración de fenilalanina (mg/dl)	Medida del halo de crecimiento (mm)	
	Promedio	Desviación estándar
2	12.28	± 3.41
3	14.86	± 3.30
4	16.70	± 3.16
6	19.38	± 3.19
8	21.24	± 3.44
12	23.81	± 2.98
20	27.57	± 3.20

* Pendiente (b) e intercepto (a) de la curva de regresión lineal: $y = bx + a$

r_1 = coeficiente de correlación
 r_2 = coeficiente de determinación

FIGURA No.1
SISTEMA DE FILTRACION DE PLASMA PARA LA ELIMINACION
DE SUSTANCIAS ENDOGENAS

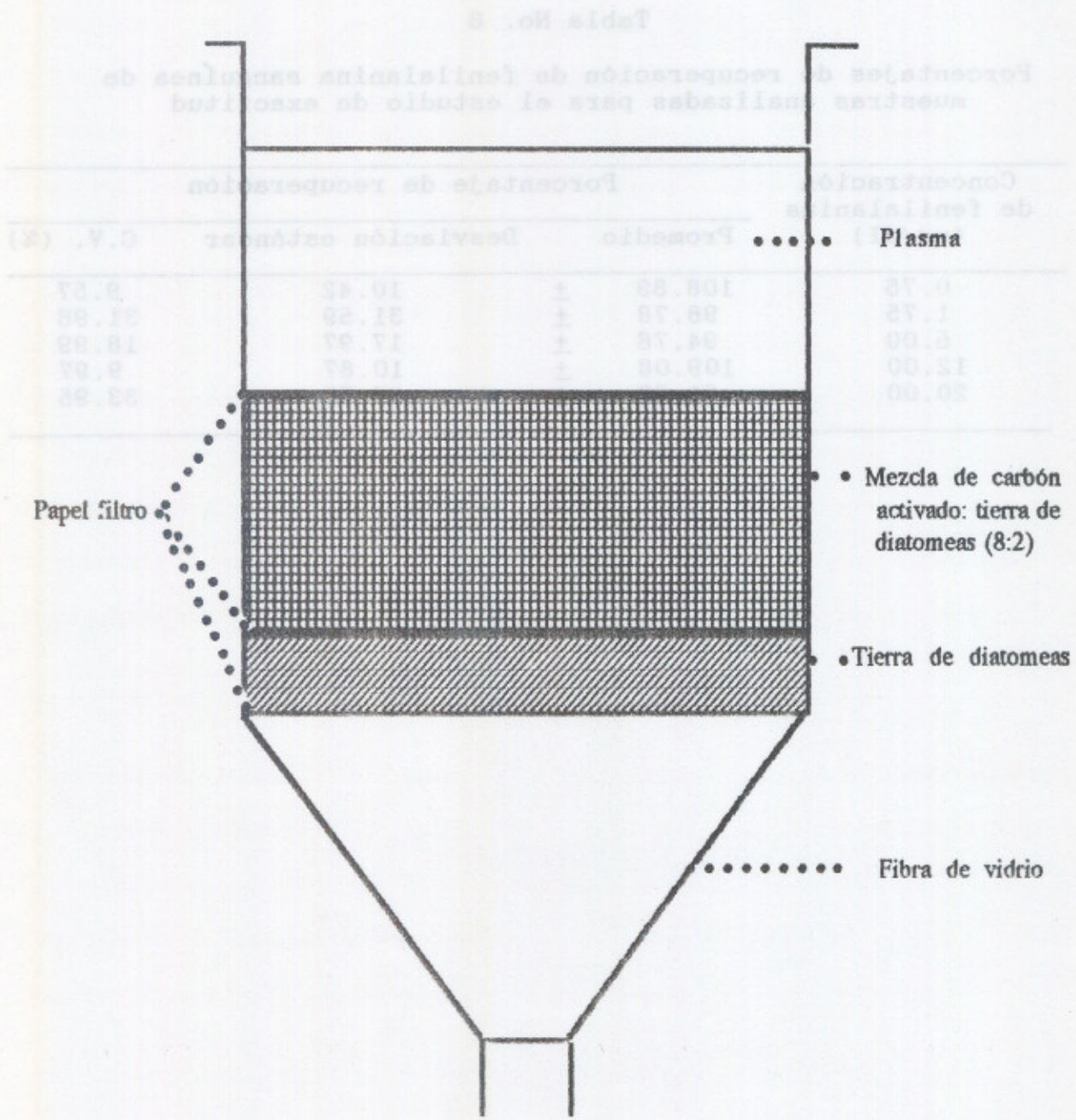


Figura No. 2
 Esquema de las Posiciones donde se colocan
 estándares y muestras desconocidas para la prueba de Guthrie

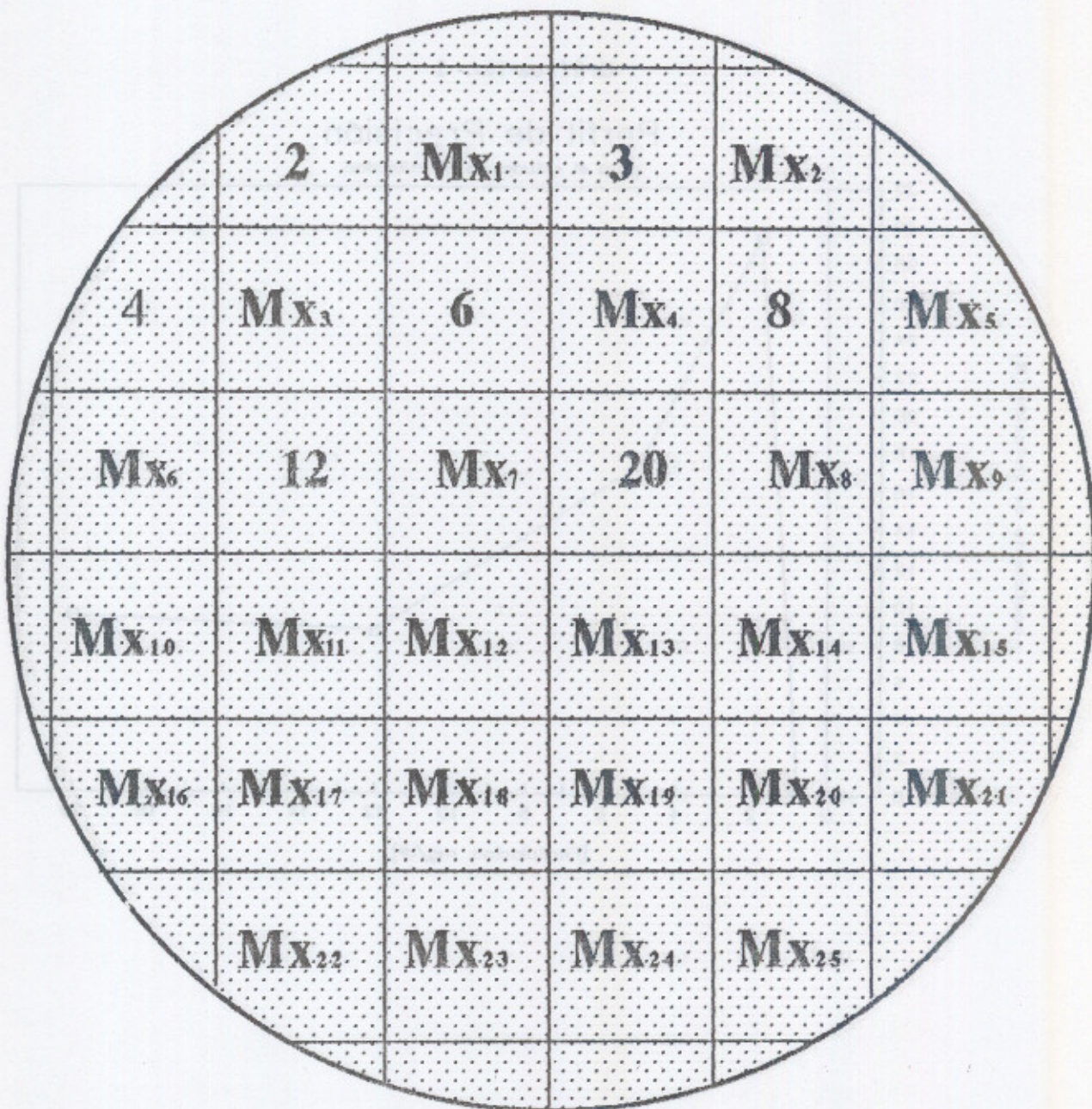
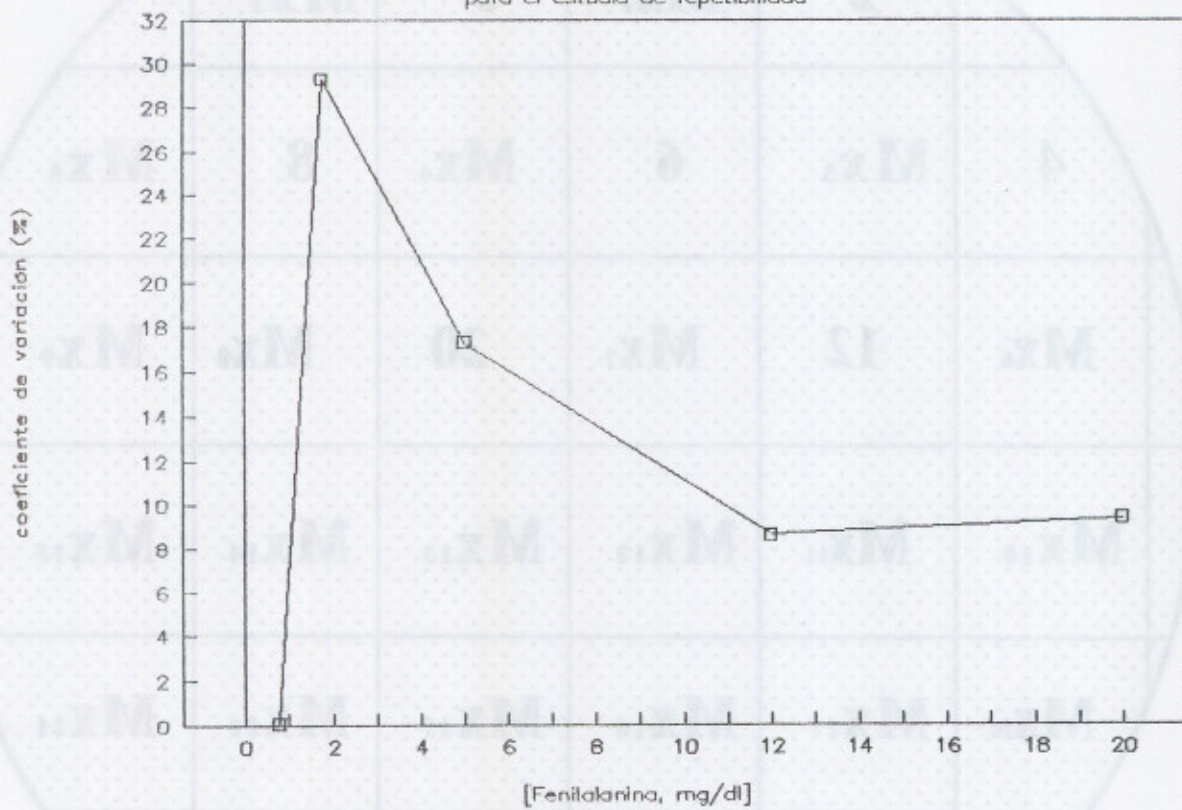


Figura No. 2
Esquema de las Posiciones donde se colocan
estándares y muestras desconocidas para la prueba de Galbraith

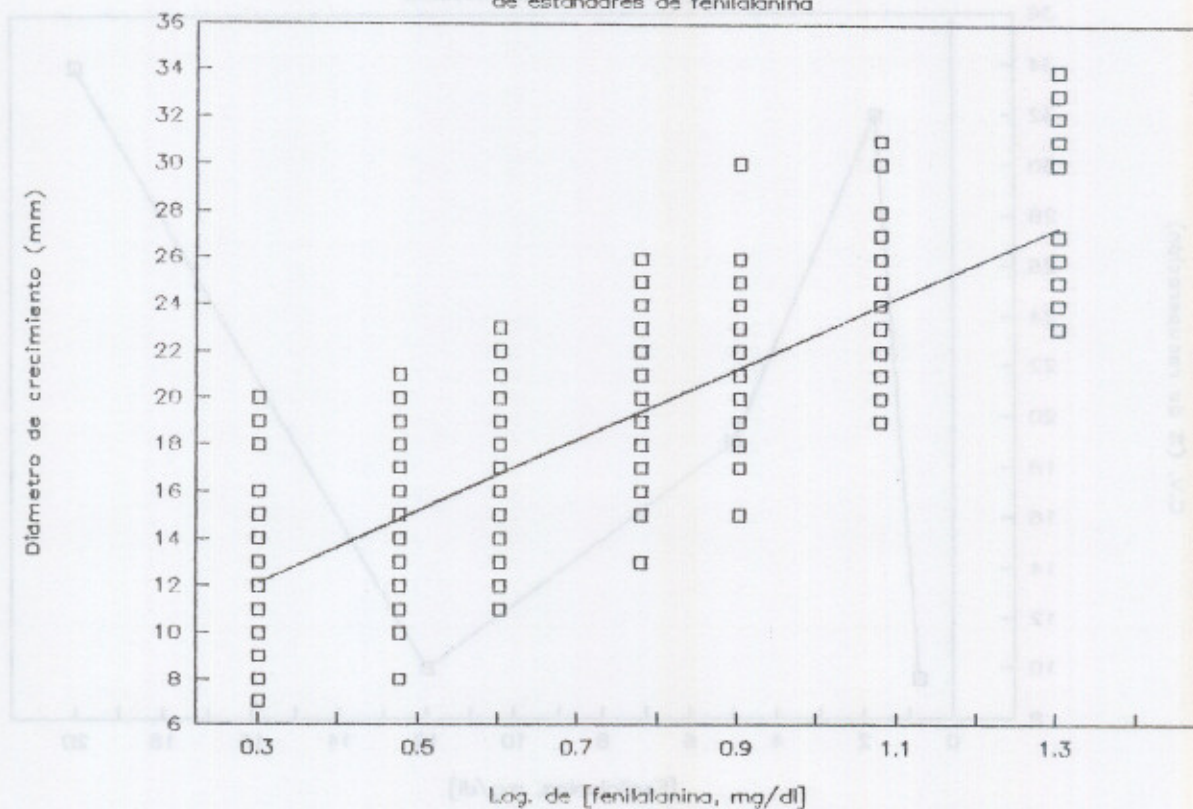
Gráfica No. 1

Perfil de Precisión
para el estudio de repetibilidad



Gráfica No. 2

Gráfica de la Curva de Regresión Lineal
de estándares de fenilalanina



$$Y = 15.287X + 7.599$$

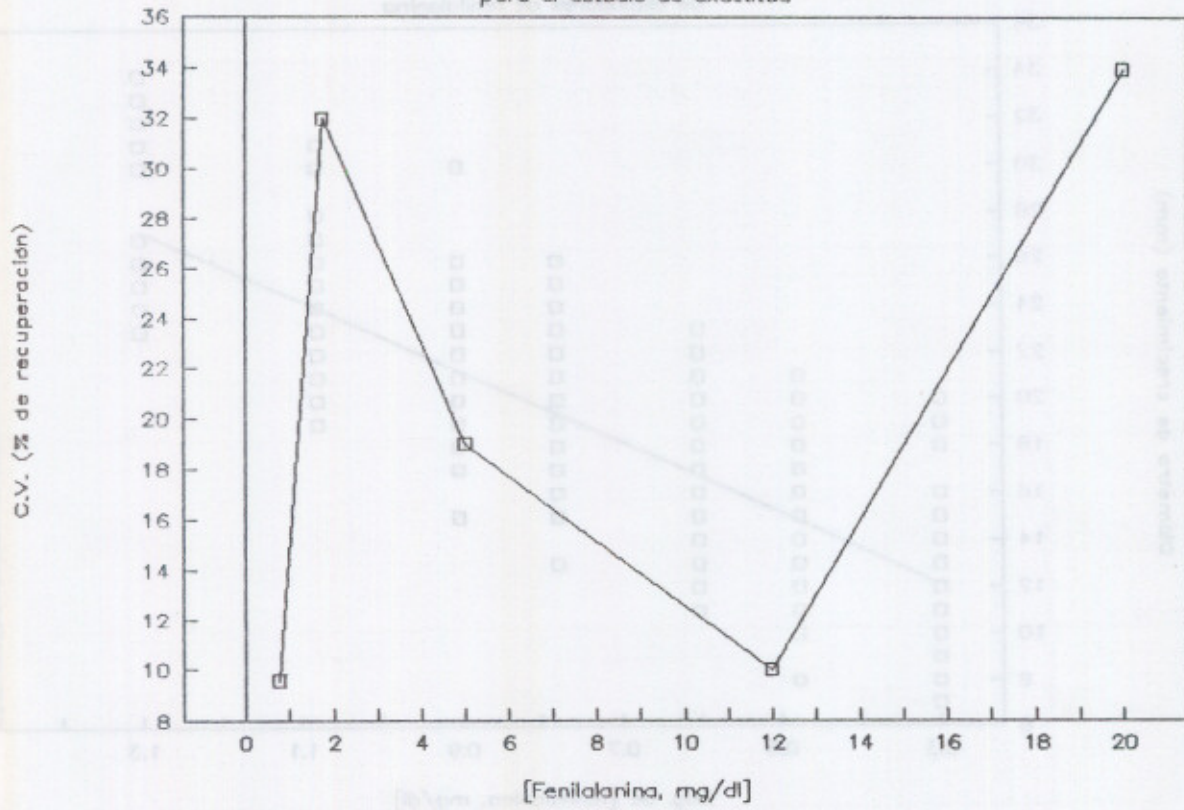
$$r = 0.834$$

$$r^2 = 0.695$$

Gráfica No. 3

Perfil de Precisión

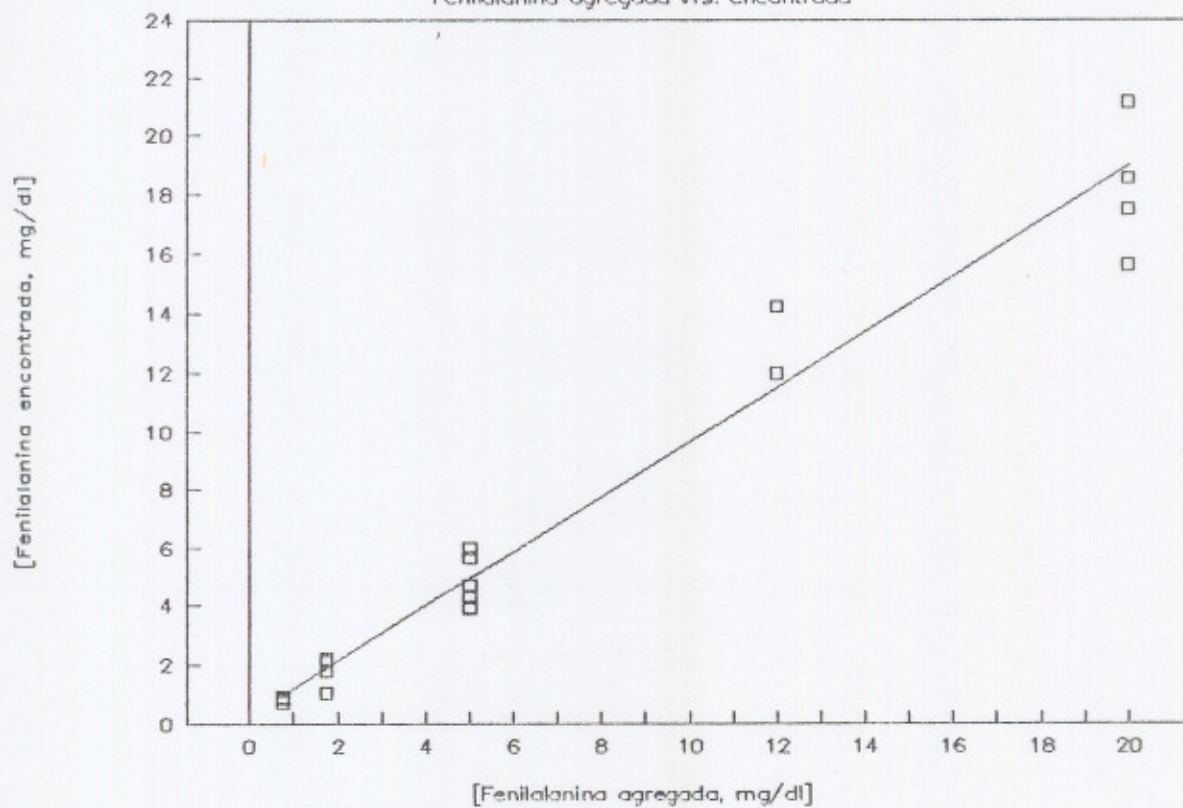
para el estudio de exactitud



Gráfica No. 4

Regresión Lineal: Datos de Sensibilidad

Fenilalanina agregada vrs. encontrada



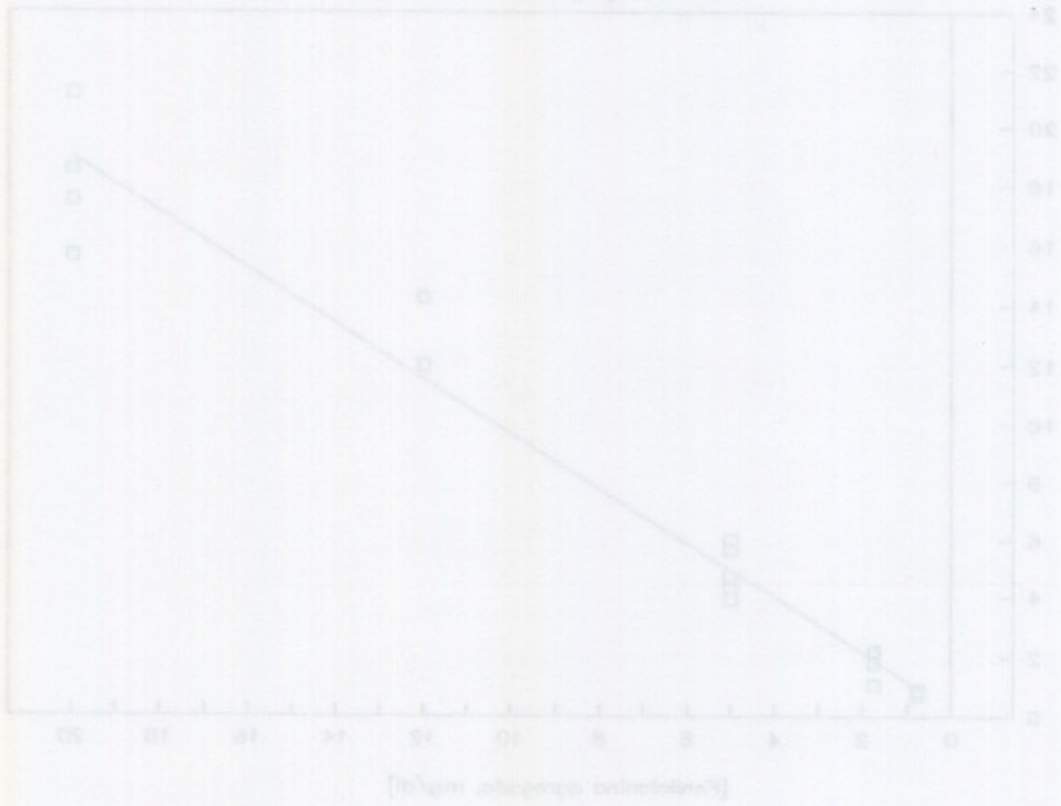
$$Y = 0.9377X + 0.2477$$

$$r = 0.9855$$

$$r^2 = 0.9925$$

Regresión Lineal: Datos de Sensibilidad

Concentración de agente vs. respuesta

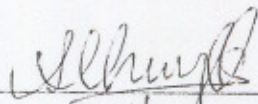


Concentración de agente (mg/l)

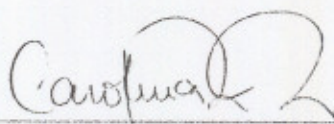
$$Y = 0.937X + 0.2417$$

$$r = 0.9825$$

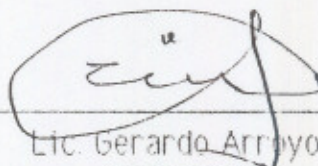
$$r^2 = 0.9652$$



Silvia Chuy Quan
TESISTA



Licda. Carolina Richter de Penados
ASESOR



Lic. Gerardo Arriyo
DIRECTOR



Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar
DECANO

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

[Handwritten signature]

ESTRATÉGIA DE GESTÃO
TESISTA

[Handwritten signature]

Líder Carolina Richter de Penabaz
ASSESSOR

[Handwritten signature]

DR. PEDRO ALVARO
DIRECTOR

[Handwritten signature]

Dr. Jorge Roberto Pérez López
DECANO