

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

**Comparación de dos métodos cuantitativos para determinación  
de Fenilcetonuria en neonatos en el Hospital General San Juan  
de Dios**

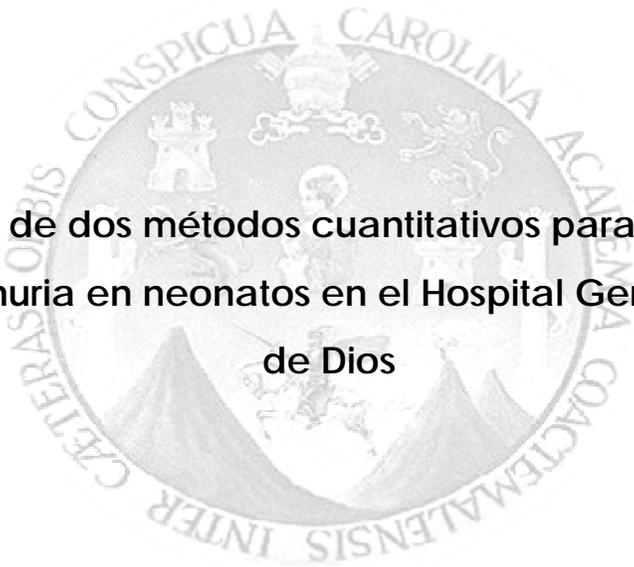
Ana Isabel Del Olmo Miranda

Químico Biólogo

Guatemala, septiembre de 2008.

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



**Comparación de dos métodos cuantitativos para determinación  
de Fenilcetonuria en neonatos en el Hospital General San Juan  
de Dios**

Informe de Tesis

Presentado por

Ana Isabel Del Olmo Miranda

Para optar al título de

Químico Biólogo

Guatemala, septiembre de 2008.

## INDICE

I. Resumen	1
II. Introducción	3
III. Antecedentes	6
A. Errores Congénitos del Metabolismo	
1. Definición	6
B. Fenilcetonuria	
1. Historia	8
2. Descripción de la enfermedad	9
3. Incidencia de la enfermedad	12
4. Manifestaciones clínicas	13
5. Diagnóstico de la Fenilcetonuria	14
6. Tratamiento	19
C. Programas de Tamizaje	20
IV. Justificación	23
V. Objetivos	24
VI. Hipótesis	25
VII. Materiales y Métodos	26
VIII. Resultados	31
IX. Discusión	35
X. Conclusiones	41
XI. Recomendaciones	42
XII. Referencias	43
XIII. Anexos	49

## I. Resumen

Los errores congénitos del metabolismo son genopatías, en donde, la mutación de un gen, como consecuencia de un defecto en la codificación del DNA, produce una anomalía de formación en una proteína enzimática necesaria para lograr el buen funcionamiento de una cadena metabólica (2).

La fenilcetonuria se clasifica como una genopatía siendo una enfermedad del metabolismo de la fenilalanina que es un aminoácido esencial. La fenilalanina cuando se acumula en sangre produce severos trastornos neuronales, ya que la fenilalanina es el precursor de neurotransmisores, como dopamina, epinefrina y norepinefrina (2, 12).

El objetivo del presente estudio fue comparar la precisión y reproducibilidad del método DELFIA contra la prueba de Guthrie, metodología estándar, para la determinación de fenilcetonuria en neonatos con el fin de implementar este método en el Hospital General San Juan de Dios.

Se compararon ambos métodos DELFIA y la prueba de Guthrie, con el fin de determinar su equivalencia, para lo que se utilizaron 10 muestras positivas y 7 muestras negativas de sangre de recién nacidos provenientes del Laboratorio de Tamizaje Neonatal del Hospital Nacional de Niños de Costa Rica. Las muestras se impregnaron en papel filtro, a las cuales se les determinó el contenido de

fenilalanina por ambos métodos, en el caso del método DELFIA el análisis se realizó por triplicado.

Se calculó el coeficiente de variación para cada una de las muestras analizadas por el método DELFIA y con ello se evidenció la imprecisión de este método al compararlo contra la prueba de Guthrie. También se comprobó que el método DELFIA tiene muy poca repetibilidad y con ello se demuestra que no hay concordancia entre las metodologías comparadas en este estudio.

La discordancia entre los resultados obtenidos en este estudio entre la prueba de Guthrie, metodología estándar, y el método DELFIA manifiesta la importancia de continuar haciendo estudios del método DELFIA antes de ser implementado en el Hospital General San Juan de Dios.

## II. Introducción

Los principios del tamizaje poblacional se desarrollaron en 1,968 por Wilson y Jungner como aplicación en estudios genéticos. En la cual se enfatiza la importancia de tener un buen método de tamizaje para salud pública permitiendo así la disponibilidad del tratamiento para prevenir enfermedades (1).

Wald determinó tres elementos del tamizaje: 1) La identificación de personas con alto riesgo para un desorden específico y así poder realizarles exámenes posteriores y tomar acciones preventivas. 2) Llegar a las poblaciones que no tienen atención médica para la enfermedad. 3) Seguimiento e intervención en beneficio de las personas tamizadas (1).

Los programas de tamizaje neonatal están destinados a la determinación de enfermedades genéticas de tipo metabólico, hormonal y hemoglobinopatías (1).

Las enfermedades genéticas metabólicas también denominadas Errores Congénitos del Metabolismo, se han definido como “un proceso heredado permanente dependiente de una anomalía enzimática primaria. En consecuencia, uno o más compuestos químicos pueden seguir una vía metabólica anormal y encontrarse en cantidades muy elevadas o muy

disminuidas". Como es el caso de la acumulación de fenilalanina en la fenilcetonuria (2).

La fenilcetonuria clásica consiste en la deficiencia de la enzima hepática fenilalanina hidroxilasa, que convierte la fenilalanina en tirosina. El fracaso del metabolismo tiene por consecuencia la acumulación de fenilalanina en sangre que produce lesión a nivel del sistema nervioso central, originando un grave trastorno del desarrollo mental en los niños afectados, dejando graves secuelas neurológicas y diferentes grados de discapacidad mental si no es detectada a tiempo y una menor producción de melanina, lo que produce una ausencia relativa de pigmento en piel y pelo (2).

Debido a que el trastorno no presenta síntomas en el momento del nacimiento, es necesario realizar un tamizaje neonatal para el diagnóstico precoz permitiendo instaurar inmediatamente el tratamiento, que consiste en una dieta pobre en fenilalanina (2).

La enfermedad es más común en la población caucásica, en la cual 1 de cada 50 individuos son portadores de la enfermedad (3). La incidencia mundial es de 1:49,176. En Guatemala, en el año de 1981 se reportaron 3 casos, en los departamentos de Chiquimula y Zacapa (4). En Costa Rica la incidencia es de 1:15,000 y en México es de 1:20,000 (5- 10).

El propósito de este trabajo fue la comparación de dos métodos. Para ello se utilizaron 10 muestras positivas y 7 muestras negativas de sangre de recién nacidos provenientes del Laboratorio de Tamizaje Neonatal del Hospital Nacional de Niños de Costa Rica, a las cuales se les realizó la prueba de Guthrie, metodología estándar, versus el método DELFIA.

La ventaja que presenta DELFIA sobre la prueba de Guthrie es que además de ser un inmunoensayo fluorométrico es un método automatizado que permite la obtención de resultados en un menor tiempo y un diagnóstico más rápido de la enfermedad en Guatemala.

### III. Antecedentes

#### A. Errores congénitos del metabolismo

##### 1. Definición

Los errores congénitos del metabolismo son genopatías, en donde, la mutación de un gen, como consecuencia de un defecto en la codificación del DNA, produce una anomalía de formación en una proteína enzimática necesaria para lograr el buen funcionamiento de una cadena metabólica, o más raramente de una proteína de transporte necesaria para la penetración de un sustrato al interior de una célula (2).

Estas anomalías son afecciones de herencia autosómica recesiva. Los padres heterocigotos tienen un aspecto normal pero sus hijos son homocigotos y presentan la enfermedad (11). La anomalía heredada es congénita, es decir, presente desde el nacimiento, permanente y definitiva (2).

Generalmente estas anomalías responden todas a un mismo modelo: una sustancia A es normalmente transformada en una sustancia B mediante la acción de un enzima. En el momento en que este enzima está ausente, entonces A no puede ser transformado en B. Por consiguiente A será transformado en una sustancia C. De este modo se pueden tener tres procesos:

- a) Un aumento del bloqueo producirá un defecto en B.
- b) Un aumento del bloqueo producirá un exceso de A.
- c) Una eliminación del metabolito C (2, 11).

El enfermo metabólico, puede definirse como un sujeto no adaptado a su entorno fisiológico habitual y que no tolera los excesos, como ocurre en la fenilcetonuria clásica. Se pueden observar todos los estados de gravedad clínicos posibles, en función de la importancia de la mutación, ya que el déficit enzimático puede ser parcial o total, y de las condiciones del medio (2).

El defecto enzimático, induce la acumulación anormal de metabolitos neurotóxicos, que se pueden traducir en un deterioro progresivo del sistema nervioso central, con consecuencias como es el retraso mental profundo, transformaciones fenotípicas, desnutrición crónica y/o la muerte (2).

Actualmente, la modificación de la mutación y la restauración de la actividad enzimática normal, no han sido logradas aún. Las tentativas terapéuticas buscan adaptar el entorno a las posibilidades del individuo enfermo. Los regímenes de exclusión constituyen, entre otras, un ejemplo de estas tentativas, que posibilita prevenir el daño neurológico permitiendo al niño desarrollarse normalmente (2).

## **B. Fenilcetonuria**

### **1. Historia**

En 1934 Fölling realizó la descripción de una enfermedad a la que denominó "Imbecillitas Phenylpyruvica" u "Oligofrenia Fenilpirúvica", también conocida como enfermedad de Fölling, que cursaba con un grave daño cerebral, en la que estaba implicada una sustancia que se originaba como producto del metabolismo de las proteínas, denominada Fenilalanina. Tres años más tarde, en 1937, Penrose y Quastel sugirieron que se denomine a ésta enfermedad Fenilcetonuria (PKU por sus siglas en inglés), nombre actual de la enfermedad (2).

En 1947, Jervis observó que cuando se administraba fenilalanina a individuos sanos, en éstos se producía un aumento de otra sustancia denominada Tirosina. Pero cuando administraba fenilalanina a individuos fenilcetonúricos, no presentaba tal elevación. Tras varios años de investigación, Jervis concluyó finalmente que en la enfermedad se producía una falla en la transformación de fenilalanina a tirosina. En 1953, Bickel publicó sus primeros trabajos, en los que demostraba la efectividad de una dieta especial restringida en fenilalanina (11). En 1961, Guthrie creó el método de inhibición bacteriana, para medir la fenilalanina en sangre. Finalmente, en 1983, Woo aisló e identificó, por primera vez el gen donde se dan las instrucciones para la síntesis de la enzima fenilalanina hidroxilasa, cuya deficiencia es la responsable de la enfermedad (2).

## 2. Descripción de la enfermedad

La fenilcetonuria es una enfermedad del metabolismo de los aminoácidos esenciales. Se incluye dentro de las denominadas "errores congénitos del metabolismo de los aminoácidos", son rasgos hereditarios que culminan en la ausencia o menor actividad de una enzima o cofactor específico. Es una enfermedad que se hereda por mecanismos autosómicos recesivos (2, 12).

La fenilalanina, es un aminoácido esencial, lo que significa que el organismo es incapaz de sintetizarlo y se debe incorporar a través de los alimentos. Cuando, debido a una enfermedad de orden genético, se acumula en sangre produce severos trastornos neuronales, ya que la fenilalanina es el precursor de neurotransmisores, como dopamina, epinefrina y norepinefrina (2, 12).

La fenilcetonuria se caracteriza por la deficiencia en la actividad de la enzima hepática fenilalanina hidroxilasa, secundaria a mutaciones en el ADN codificante de la enzima, expresado en el cromosoma 12q (región q22 – q24). Dicha enzima cataliza la reacción de hidroxilación de fenilalanina a tirosina que constituye un importante paso en el catabolismo de la fenilalanina (2, 12, 13).

La enzima fenilalanina hidroxilasa contiene dos fracciones proteicas distintas: una fracción lábil, existente sólo en el hígado, y otra estable, extensamente distribuida en los tejidos animales. En la fenilcetonuria, la anomalía radica en el factor lábil, que es la fracción de la enzima que en

realidad cataliza la hidroxilación. Cuando la hidroxilasa es deficiente, se usan vías alternativas para metabolizar la fenilalanina (2).

La fenilalanina es convertida por transmutación en ácido fenilpirúvico, que es reducido a ácido feniláctico, o forma, por descarboxilación, ácido fenilacético que, por conjugación, origina la feniacetilglutamina. Finalmente, la fenilalanina puede convertirse también en ácido alfa-hidroxifenilacético. En la fenilcetonuria, la fenilalanina y estos productos metabólicos se acumulan en los líquidos del organismo. Estos compuestos no son metabolitos anormales, sino metabolitos normales que se encuentran en cantidades anormales (2, 12, 14).

Dependiendo del grado de actividad residual de la enzima Fenilalanina Hidroxilasa, la enfermedad se manifiesta clínicamente de diversas formas pudiendo clasificarlas en:

a. Fenilcetonuria clásica: en la que la actividad residual de la enzima Fenilalanina Hidroxilasa es menor del 1 por ciento. Se manifiesta cuando los niveles de fenilalanina en sangre son mayores a 20 mg/100ml y hay un aumento de fenilcetonas en orina. Produce retraso mental progresivo intenso, que puede evitarse instaurando un tratamiento dietético temprano, que consiste en dietas con bajo contenido de fenilalanina y elevadas en tirosina para conservar los niveles de fenilalanina sérica entre 2 – 6 mg/100ml (2, 11-13).

b. Hiperfenilalaninemia moderada: en la que la actividad residual de la Fenilalanina Hidroxilasa se encuentra entre el 1 – 5 por ciento. Los pacientes que la padecen requieren la restricción dietética de fenilalanina (2, 11-13, 15).

c. Hiperfenilalaninemia benigna: en la que la actividad residual enzimática se encuentra por encima del 5 por ciento. Los signos que presenta son niveles de fenilalanina en sangre menores a 10 mg/100ml (2, 11-13).

Según estudios que se han realizado en Cuba, Argentina y España, para evaluar el grado de retraso mental en los casos de hiperfenilalaninemia moderada y benigna se ha encontrado que el coeficiente de inteligencia promedio en los niños evaluados es de 100.6 puntos, es decir que el grado de retraso mental no es tan severo como en el caso de la fenilcetonuria clásica (16-18).

En todas sus formas, se produce como consecuencia una acumulación en sangre de fenilalanina, hiperfenilalaninemia, que pasa a la orina junto con sus derivados ácidos fenilpirúvicos, fenilacético y fenil-láctico. Estos son tóxicos para el cerebro y además disminuyen los neurotransmisores procedentes de la tirosina. La consecuencia es un grave trastorno del desarrollo mental en los niños afectados, dejando graves secuelas neurológicas y diferentes grados de discapacidad mental si no es detectada a tiempo (2).

Existen otras formas clínicas, que representan el 1 por ciento de la totalidad de afectados con la enfermedad, no dependientes directamente de un déficit de Fenilalanina Hidroxilasa. Una de ellas, es debida al déficit de Dihidrobiopterina reductasa, enzima que cataliza la reacción de dihidrobiopterina a tetrahidrobiopterina, siendo éstos cofactores de la enzima Fenilalanina Hidroxilasa, encontrándose en el cromosoma 4p (región p15.1 – p16.1) y, la otra, debida a una alteración en la biosíntesis de tetrahidrobiopterina, como consecuencia de la alteración enzimática. Estas formas clínicas, requieren de una restricción dietética, así como de un aporte de los precursores de los cofactores (2).

### **3. Incidencia de la enfermedad**

La incidencia de esta enfermedad a nivel mundial es de 1:15,000. En países como Francia se han registrado de 50 a 60 casos anuales, manteniendo el valor de incidencia dentro del mismo rango (11). En Argentina se ha reportado una incidencia de 1:14,555 para fenilcetonuria clásica, de 1:11,944 para hiperfenilalaninemia moderada. Entre ambos tipos de Fenilcetonuria, la frecuencia es de un niño afectado cada 6,700 recién nacidos (Fundación de endocrinología infantil, 1998) y para la hiperfenilalaninemia benigna es de 1:19,000 (2).

En poblaciones como la costarricense la incidencia es de 1: 15,000 y en México la incidencia es de 1: 20,000 (6-10). La incidencia en Costa Rica es mayor debido a que tienen un menor porcentaje de población indígena. En Guatemala

no se han hecho estudios que indiquen la incidencia actual de la enfermedad pero en el año 1,981 se registraron 3 casos en Chiquimula y Zacapa (4).

#### **4. Manifestaciones clínicas**

Los pacientes que no son tratados o son diagnosticados tardíamente, tienen valores de fenilalanina en sangre superiores a 4 mg/dl , y desarrollan una enfermedad neurológica precoz, caracterizada por un retraso mental, en ocasiones con convulsiones, hiperactividad, circunferencia cefálica ligeramente reducida, eczema y registros en el electroencefalograma compatibles con hipsarritmia (12, 20).

La mayor parte de los individuos que padecen esta enfermedad, presentan hipopigmentación en ojos, piel y pelo, debido al bloqueo de la vía de formación de tirosina, que trae como consecuencia una disminución en la producción de melanina, pigmento responsable de la coloración. Los niveles de tirosina séricos también son muy importantes. En condiciones normales los niveles de tirosina pueden aumentar dentro de las primeras dos semanas de vida (generalmente en los prematuros que reciben una alta ingesta de proteínas). Aún así, los niveles de tirosina deben ser inferiores a 3mg/dl, por lo tanto deberían ser menores los niveles de fenilalanina (2, 12, 20).

El olor de la orina es característico, olor a paja húmeda, debido a la eliminación de ácido fenilacético, como vía alternativa para la metabolización de las altas concentraciones de fenilalanina (2, 11, 20).

En los niños mayores, la alteración es fundamentalmente conductual, y presentan hiperactividad. Son personas con tendencia a ser destructores, provocándose autolesiones y pasando por fases de hiperexcitación. El deterioro intelectual es progresivo, así como las alteraciones neurológicas en los pacientes que no siguen el tratamiento (2).

En aquellos pacientes que no cumplen con la dieta o que la abandonan precozmente, se observan alteraciones en el sistema nervioso central, es decir que sufren retraso mental severo con coeficiente intelectual menor de 50 (2, 4, 20). En una resonancia magnética nuclear las áreas desmielinizadas corresponden estas alteraciones, las cuales son reversibles al reiniciar el control dietético, no así el retraso mental (2).

## **5. Diagnóstico de la fenilcetonuria**

### **a. Obtención de muestra**

La metodología para la obtención de muestra de sangre se realiza mediante la "prueba del talón". La punción se realiza en los costados del talón del neonato, preferiblemente a las 48 horas después de su alimentación (leche

materna o fórmula). Se colocan 4 gotas de sangre, dentro de los espacios correspondientes cada uno de 3 mm de diámetro en papel filtro Schleicher & Schuell 903 (S&S # 903) para toma de muestras, aprobado por la FDA. Se deja secar a temperatura ambiente, preferiblemente durante 24 horas en ausencia de luz directa y de humedad, para luego cuantificar la concentración de fenilalanina por el método a elección del laboratorio. Los valores normales para fenilalanina en sangre pueden ser menores o iguales a 4 mg/dL (2, 5, 20).

## **b. Metodologías para la cuantificación de fenilalanina**

### **i. Prueba de Guthrie**

Este ha sido el método de diagnóstico utilizado desde hace mucho tiempo y sigue siendo la metodología estándar para la determinación de fenilcetonuria. El principio del método se basa en la inhibición del crecimiento de *Bacillus subtilis* (3, 4, 11).

A un medio de cultivo con *Bacillus subtilis* se le agrega un antagonista, la B-(2-thienyl)-alanina, la cual impide el crecimiento del bacilo; este efecto antagonista puede ser eliminado por la fenilalanina (3, 4, 11).

Se coloca un disco de papel filtro impregnado con sangre del paciente sobre el medio de cultivo que contiene al inhibidor. Normalmente el bacilo no crece, pero por el contrario si hay fenilalanina en la muestra analizada, el bacilo

crece y el tamaño o diámetro de la colonia indicará la cantidad de fenilalanina presente. La concentración de fenilalanina se determina comparando con muestras control que ya tienen concentraciones conocidas de fenilalanina (3, 4, 11).

Este examen no puede realizarse en niños que están recibiendo tratamiento antibiótico que inhiban el crecimiento del bacilo porque producen falsos negativos (22).

## ii. Cloruro férrico

El principio de esta prueba se basa en la detección de ácido fenilpirúvico en una muestra de orina neonatal (11, 12).

Una tira de papel impregnada con cloruro férrico se sumerge en la muestra y ésta al reaccionar con el ácido fenilpirúvico da como resultado una coloración verde. Esta reacción se dejó de utilizar como método de tamizaje por su poca sensibilidad, debido a que la aparición de ácido fenilpirúvico es relativamente tardía y necesita una concentración elevada para su detección, la cual ya es tóxica para el organismo (11, 12).

## iii. Fluorimetría

- DELFIA

El principio de este método se basa en la cuantificación de la fluorescencia de la ninhidrina. El procedimiento es una modificación del método fluorométrico publicado por McCaman y Robins en 1962. El ensayo se basa en el incremento de la fluorescencia de la reacción entre fenilalanina-ninhidrina. Se utiliza un buffer de succinato para optimizar la fluorescencia e incrementar la especificidad. El reactivo de cobre se utiliza para resaltar la reacción y hacer a un lado los interferentes. Este método mide la fenilalanina cuantitativamente en presencia de otros aminoácidos. La fluorescencia se mide utilizando una longitud de onda de 390 nm y una emisión de onda de 486 nm (3).

#### - UMTEST PKU (SUMA)

En Argentina, año 2001, se hizo un estudio comparativo entre esta metodología y la prueba de Guthrie. El método es un ultramicroensayo fluorescente UMTEST PKU (SUMA), que se basa en la reacción de la fenilalanina presente en la muestra con la ninhidrina, en condiciones óptimas de pH y temperatura, formando un complejo poco fluorescente. Con la adición de iones cobre, se produce la amplificación de la fluorescencia, aumentando su intensidad por la previa adición de L-leucil-L-alanina a la mezcla de reacción. La intensidad de la fluorescencia emitida es proporcional a la concentración de fenilalanina en la mezcla. El valor máximo aceptado es de 4 mg/dL (24).

#### iv. Espectrofotometría de Masas

La espectrofotometría de masas es una técnica analítica utilizada para identificar compuestos desconocidos, para cuantificar compuestos conocidos y para determinar la estructura y las propiedades químicas de las moléculas. La espectrofotometría de masas ha sido utilizada para detectar pequeñas moléculas desde los años '60, tales como comidas, venenos, criminología, sustancias presentes en el organismo o en el medio ambiente, fármacos, entre otras (25-27).

Un espectrómetro de masas tiene la capacidad de pesar átomos o moléculas electrónicamente, por esto se refiere a pesarlas en relación a su masa. Cada molécula tiene una masa única. Además de determinar el compuesto por su masa también se puede conocer la cantidad de este compuesto que está presente en la muestra que se está analizando (25-27).

Estudios sobre las aplicaciones de espectrofotometría de masas Tandem en el Tamizaje Neonatal empezaron a principios de los años '90 y se siguen utilizando hoy en día. Más de 20 desórdenes bioquímicos pueden ser detectados por esta metodología. Un espectrómetro de masas tandem está compuesto por 2 espectrómetros de masas en serie conectados. A esta cámara se le conoce como celda de colisión. Una muestra es clasificada y pesada en el primer espectrómetro de masas, y luego es dividido en piezas en la celda de colisión, en el segundo espectrómetro de masas una o varias piezas se vuelven a clasificar y a pesar (27).

Los compuestos de las muestras de sangre que se analizan para el tamizaje de enfermedades neonatales tienen características únicas y determinadas. Dentro de estos compuestos están los aminoácidos y los ácidos grasos (27).

## **6. Tratamiento**

### **a. Principales tipos de tratamientos dietéticos, según la alteración metabólica**

En función al bloqueo enzimático de la cadena metabólica implicada, se pueden distinguir al menos tres situaciones:

#### **i. Bloqueo enzimático sobre una vía catabólica de un sustrato no indispensable**

En éste caso el tratamiento consiste en suprimir, en forma completa, ese sustrato de la alimentación, por ejemplo, en el caso de la intolerancia de la fructosa en donde se debe suprimir la fructosa y la sacarosa. Esto no conlleva a ningún riesgo de producir una carencia nutricional, dado que se trata de nutrientes no esenciales que pueden ser reemplazados (2).

#### **ii. Bloqueo enzimático sobre una vía catabólica de un sustrato indispensable**

En éste caso, no es posible suprimir totalmente el aporte alimentario del o los sustratos en cuestión, ya que es factible producir un estado carencial. Se deberá instaurar un régimen controlado específicamente en ese o esos sustratos esenciales, cuyo aporte será reducido a las necesidades mínimas indispensables, para permitir un óptimo crecimiento y desarrollo del individuo afectado. Como es el caso de la fenilalanina, en la fenilcetonuria (2, 15).

Los pacientes que padecen de fenilcetonuria pueden controlarse con una dieta baja en fenilalanina. Todos los alimentos ricos en proteínas, como productos lácteos, huevos, pescado, carnes, pollo, legumbres y nueces se eliminan. Se permiten alimentos bajos en proteínas, como fruta, verdura y algunos cereales, en cantidades medidas, junto con alimentos preparados especialmente, con un contenido bajo o nulo de fenilalanina (ver anexo 1) (2). Los mayores beneficios se logran cuando la dieta se inicia en los primeros días de vida, aunque el tratamiento posterior seguirá ayudando a reducir la gravedad de los síntomas. Mantener niveles bajos de fenilalanina a través del control de la dieta mejora las habilidades motoras, el comportamiento y la función intelectual (3, 5, 28).

### iii. Bloqueo sobre una cadena metabólica general

La posibilidad de acción dietética, en este caso consiste en limitar globalmente el aporte proteico a la necesidad mínima compatible con un crecimiento normal. La indicación dietética y la elección de sus modalidades, varía según la naturaleza de la anomalía metabólica causal y el grado de déficit enzimático existente (2).

## C. Programas de Tamizaje

En Estados Unidos de América los programas de tamizaje neonatal empezaron a principios de los años 60 y actualmente se tamizan más de 30

enfermedades genéticas o innatas del metabolismo. Dentro de los métodos utilizados está la prueba de Guthrie o inhibición de crecimiento bacteriano, para la detección de fenilcetonuria, así como también ensayos fluorométricos y espectrofotometría de masas tandem (1).

En Cuba, desde 1,982 comenzó a desarrollarse el programa nacional de genética dirigido a detectar la fenilcetonuria. Desde que entró en vigor, son atendidos 27 niños procedentes de distintas provincias, de los cuales 15 fueron captados tempranamente (antes de los 4 meses de edad y ahora muestran resultados satisfactorios mientras que los restantes, aunque su captación fue tardía (nacieron antes de la aplicación del tamizaje), han mejorado ostensiblemente con el inicio del tratamiento. Actualmente es obligatorio someter a todos los recién nacidos a la prueba de Guthrie (29).

En Costa Rica se inició el programa nacional de tamizaje neonatal en 1990 en el Hospital Nacional de niños de la Caja costarricense del seguro social (CCSS) (23). A febrero de 2003, se ha realizado la prueba del talón a 750.803 neonatos, para una cobertura del 95.1% del total de recién nacidos del país. Se han detectado, confirmado y tratado por tamizaje neonatal a 275 niños, previniéndoles retardo mental y otras discapacidades e inclusive la muerte. De Marzo de 1,990 hasta Marzo de 2,003 se han detectado 19 casos de fenilcetonuria (20).

En Argentina la realización de tamizaje es obligatoria, se estima que el porcentaje de cobertura en la capital federal es de 99.6 por ciento, mientras que en la provincia de Buenos Aires es sólo del 63 por ciento (2).

Es importante observar que a los diez años deben reevaluarse para analizar la persistencia del tratamiento, para lo cual deben liberar la dieta por cierta cantidad de tiempo.

#### IV. Justificación

La fenilcetonuria (PKU) produce retraso psicomotor y deterioro intelectual, irreversibles en poco tiempo. Pueden producirse cuadros sicóticos de tipo autista, síndrome de West, convulsiones generalizadas y eczema facial. Los niños con PKU suelen ser de tez pálida, rubios y con un olor característico a paja mojada. Estos trastornos pueden prevenirse con un diagnóstico precoz y una dieta pobre en fenilalanina.

En Guatemala no existe un programa destinado al tamizaje neonatal de fenilcetonuria, necesario para prevenir los trastornos descritos anteriormente. Por esta razón se está implementando dicho programa en el Hospital General San Juan de Dios, mediante la utilización de un inmunoensayo fluorométrico, **DELFA**, el cual debe ser comparado con la metodología estándar, prueba de Guthrie, para determinar la concordancia entre las dos metodologías.

## V. Objetivos

### A. General

Comparar la prueba de Guthrie con el método de DELFIA PKU para la determinación de fenilcetonuria en neonatos.

### B. Específicos

1. Implementar la metodología DELFIA para la determinación de fenilcetonuria en neonatos que son atendidos en el Hospital General San Juan de Dios, mayores de 2 días de edad.

2. Determinar la equivalencia de resultados mediante un análisis descriptivo general de los resultados de las muestras positivas y negativas.

## **VI. Hipótesis**

Los valores de los resultados obtenidos por el método DELFIA utilizado para la determinación de fenilcetonuria en el Hospital General San Juan de Dios, serán equivalentes a los valores de los resultados de las muestras provenientes de Costa Rica (muestras control) analizadas por la prueba de Guthrie, metodología estándar para la determinación de fenilcetonuria.

## **VII. Materiales y Métodos**

### **1. Universo**

Muestras de sangre provenientes del Laboratorio de Tamizaje Neonatal, Hospital Nacional de Niños, Costa Rica, impregnadas en papel filtro.

### **2. Muestra**

- Diez muestras positivas, a diferente rango de concentración por el método de Guthrie (por triplicado, 30 muestras).
- Siete muestras negativas (por triplicado, 21 muestras).

#### **A. Recursos Humanos**

Tesista: Br. Ana Isabel Del Olmo Miranda

Asesora: QB. M. A Karla Odett Escobar

#### **B. Recursos Institucionales**

Hospital General San Juan de Dios

Laboratorio Clínico, área de Tamizaje Neonatal, Hospital General San Juan de Dios

Biblioteca de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

#### **C. Recursos Materiales**

##### **1. Equipo**

- Fluorómetro VICTOR™2D (1420-020)

- Perforador automático Wallac MultiPuncher™<sup>3</sup>
- Incubadora a 37°C
- Pipetas automáticas multicanal (8) para dispensar de 5-50 µL.
- Pipetas automáticas simples de 100 – 1000 µL.
- Agitador automático de placas

## 2. Material

- Tips (azules y amarillos) para pipetas automáticas
- Microplacas blancas
- Placas desechables, transparentes con 96 pozos de fondo en "V".
- Papel parafilm
- Etiquetas con código de barras
- Lancetas calibradas
- Tarjetas de papel filtro Schleicher & Schuell 903 (S&S # 903) para toma de muestras aprobadas por la FDA, diseñadas con la información requerida por la institución.

## 3. Reactivos

- Etanol al 70%
- Agua destilada
- Sulfato de Zinc al 25%® Perkin Elmer
- Reactivo de PKU® Perkin Elmer
- Reactivo de Cobre® Perkin Elmer
- Buffer para reconstitución de reactivos

- Seis calibradores con concentraciones conocidas de fenilalanina: A = 0.3 mg/dL; B = 1.5 mg/dL; C = 2.9 mg/dL; D = 5.7 mg/dL; E = 11.3 mg/dL; F = 17.1 mg/dL
- Controles con concentraciones de fenilalanina (alto = 5.2 mg/dL y normal = 1.3 mg/dL)

#### **D. Procedimiento Experimental**

Las muestras utilizadas para el estudio fueron proporcionadas por el Laboratorio de Tamizaje Neonatal, Hospital Nacional de Niños, Costa Rica gracias al convenio establecido con el laboratorio clínico del Hospital General San Juan de Dios.

##### **A. Análisis de las muestras**

###### **A. 1 Método DELFIA**

1. Se reconstituyó el reactivo de fenilcetonuria (PKU) mezclando 6.5 mL del buffer de PKU liofilizado con 20 mL de agua destilada. Se mezcló bien hasta disolver.
2. Se preparó la solución de extracción con 3 partes de sulfato de zinc y 2 partes de etanol al 70%.
3. Se perforaron los calibradores y controles desconocidos con el perforador automatizado de discos (diámetro de perforación: 3.2mm). Se utilizó una placa transparente con pozos de fondo en "V".

4. Se agregaron 15  $\mu\text{L}$  de la solución de extracción. Se golpeó la placa suavemente en la parte inferior sobre una superficie plana o con la yema de los dedos para mezclar.
5. Se incubó de 30-60 minutos a temperatura ambiente.
6. Se agregaron 40  $\mu\text{L}$  de agua destilada a cada pozo. Se golpeó la placa suavemente en la parte inferior sobre una superficie plana o con la yema de los dedos para mezclar.
7. Se transfirió a una placa blanca 25  $\mu\text{L}$  del contenido de los pozos iniciales.
8. Se agregaron 50  $\mu\text{L}$  del reactivo de PKU. Se golpeó la placa suavemente en la parte inferior sobre una superficie plana o con la yema de los dedos para mezclar.
9. Se incubó a 37°C por 3 horas.
10. Se agregaron 200  $\mu\text{L}$  del reactivo de cobre. Se golpeó la placa suavemente en la parte inferior sobre una superficie plana o con la yema de los dedos para mezclar.
11. Se incubó 45 minutos a temperatura ambiente.
12. Se elaboró la curva de calibración del método utilizando seis calibradores con concentraciones conocidas de fenilalanina: A = 0.3 mg/dL; B = 1.5 mg/dL; C = 2.9 mg/dL; D = 5.7 mg/dL; E = 11.3 mg/dL; F = 17.1 mg/dL.
13. Se midieron los niveles de fenilalanina de las muestras a 390 nm utilizando la curva de calibración. El cálculo de la concentración se realizó utilizando la ecuación lineal  $y = mx + b$ ; en donde "y" es la absorbancia, "m" es la

pendiente, "x" es la concentración del analito y "b" es el intercepto en el eje "y".

### **E. Análisis estadístico**

Para el análisis de los datos se utilizó:

- Análisis descriptivo general de los resultados de las muestras positivas y negativas.
- Cálculo de muestra: el número de muestras utilizadas se escogió por conveniencia, debido a que la incidencia de la enfermedad es muy baja (1:15,000) (11).

### VIII. Resultados

En el laboratorio clínico del Hospital General San Juan de Dios se utilizó el método DELFIA para procesar por triplicado 10 muestras de sangre de recién nacidos las que fueron proporcionadas por el Laboratorio de Tamizaje Neonatal del Hospital Nacional de Niños de Costa Rica y que fueron analizadas previamente por el método de Guthrie, metodología estándar para determinación de fenilcetonuria.

En la tabla 1, se muestra los valores obtenidos de las muestras negativas analizadas por la prueba de Guthrie y los resultados al analizar por triplicado con el método DELFIA.

Tabla 1 **Resultados negativos para fenilalanina por ambas metodologías**

No. Muestra	Método DELFIA mg/dL	Media por muestra DELFIA	Prueba de Guthrie mg/dL estándar de oro
1	Out*		
1	0.1		
1	Out*	0.1	<4
2	0,3		
2	Out*		
2	0,4	0.35	<4
3	Out*		
3	0.9		
3	Out*	0.9	<4
4	Out*		
4	Out*		
4	0.6	0.6	<4
5	Out*		
5	Out*		
5	Out*	Out*	<4
6	0.2		
6	0.0		
6	0.1	0.1	<4
7	Out*		
7	0.4		
7	0.2	0.3	<4

Prueba de Guthrie: Hospital Nacional de niños de Costa Rica

Fuente de datos: experimental

DELFI: muestras corridas en el HGSJD.

\*Out: fuera del rango mínimo de lectura

En la tabla 2, se muestra los valores obtenidos al analizar por triplicado las muestras de los 10 pacientes. Se observa también el valor del coeficiente de variación de cada una de las muestras analizadas

Tabla 2 **Resultados positivos para fenilalanina por ambas metodologías**

No. Muestra	Método DELFIA mg/dL	Media por Muestra DELFIA	Desviación Estándar SD	CV%	CV% TOTAL	Método de Guthrie mg/dL Estándar de Oro
1	8.6					
1	8.3					
1	7.8	8.2	0.33	4		10
2	9.7					
2	8.5					
2	9.1	9.1	0.49	5		7
3	6.8					
3	7.7					
3	6.4	7.0	0.54	8		5
4	8.6					
4	11.7					
4	9.3	9.9	1.33	13		12
5	11.2					
5	10.4					
5	9.2	10.3	0.82	8		10
6	10.0					
6	9.4					
6	6.9	8.8	1.34	15		7
7	3.2					
7	4.1					
7	3.2	3.5	0.42	12		6
8	3.9					
8	3.8					
8	3.9	3.9	0.05	1		15
9	11.1					
9	8.9					
9	8.5	9.5	1.14	12		10
10	14.3					
10	13.2					
10	10.3	12.6	1.69	13	<b>9.1</b>	20

CV: coeficiente de variación

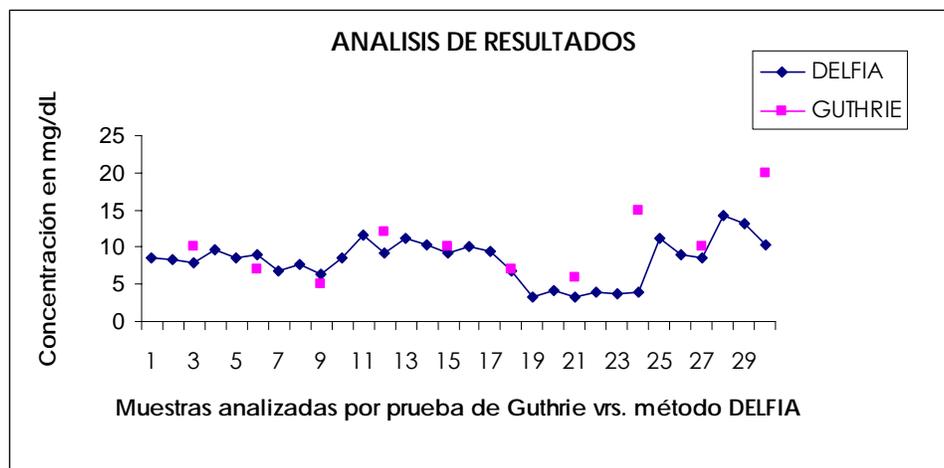
Fuente de datos: experimental

Prueba de Guthrie: Hospital Nacional de niños de Costa Rica

DELFA: muestras corridas en el HGSJD.

En la gráfica 1 se observa la diferencia entre los valores de los resultados de las muestras, analizadas por ambos métodos.

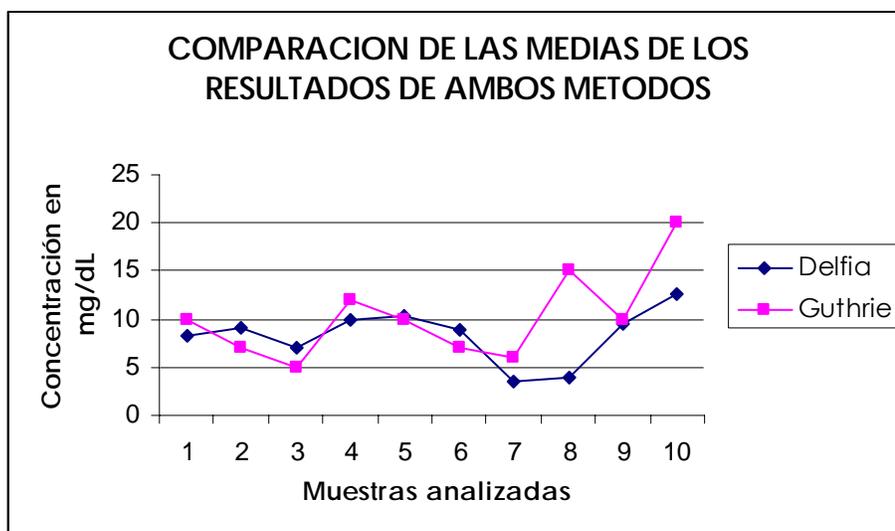
Gráfica 1



Fuente de datos: experimental, análisis estadístico

En la gráfica 2 se observa que ambos métodos no son equivalentes, ya que los valores de las medias de los resultados obtenidos en cada muestra por el método DELFIA no concuerdan con los valores de los resultados obtenidos por la prueba de Guthrie, a excepción de las muestras No. 5 y 9.

Gráfica 2



Fuente de datos: experimental, análisis estadístico

## IX. Discusión

En Guatemala no existe un programa destinado al tamizaje neonatal de fenilcetonuria, por ello se deseó implementar en el Hospital General San Juan de Dios una metodología que cuantifique los niveles de fenilalanina en sangre en neonatos de 48 horas de vida. Esto permitirá realizar un diagnóstico precoz de la enfermedad y así prevenir el retraso psicomotor y deterioro intelectual, que de no detectarse a tiempo podrían ocasionar daños irreversibles afectando así al desarrollo de la población guatemalteca. Por ello fue necesario comparar los métodos de Guthrie, que es el estándar de oro para determinar esta enfermedad, y DELFIA, que es el método que se quiere implementar en el Hospital General San Juan de Dios, con el fin de determinar la equivalencia entre ambos.

Durante el período de enero a mayo de 2006 en el Hospital General San Juan de Dios, se tamizó 3,192 niños de sala de postparto con 48 horas de vida que ya habían sido alimentados con leche materna para que de esta forma se pudiera evaluar el proceso metabólico del aminoácido fenilalanina. Se utilizó el método DELFIA para el análisis de las muestras, y no se encontró ningún caso positivo. Debido a que éste método no es equivalente a la prueba de Guthrie, los resultados obtenidos con este método no son cien por ciento certeros ya que se podría haber obtenido resultados falsos negativos y es por ello que habría que analizar las muestras con esta prueba. Todos los resultados están almacenados en los libros de registro del Laboratorio clínico, área de tamizaje neonatal.

Es importante mencionar que en Guatemala no existe ningún centro de asesoría o asociación para los pacientes fenilcetonúricos que oriente y ofrezca el tratamiento para esta enfermedad. Debe tomarse en cuenta que para poder implementar un programa de tamizaje neonatal se deben cumplir con ciertos criterios establecidos por la International Society for Neonatal Screening (Asociación Internacional para Tamizaje Neonatal). Un programa de tamizaje neonatal debe asegurar que la mayoría de los neonatos sean examinados y que se les de el seguimiento necesario (en este caso una dieta libre de fenilalanina) además, cada uno de los casos positivos que se encuentren, deben ser tratados de manera adecuada y equitativamente en el menor tiempo posible (36).

La prueba de Guthrie se basa en la inhibición del crecimiento de *Bacillus subtilis* ante la disminución del sustrato alimenticio (3, 4, 11, 21). Esta prueba por ser un método indirecto, necesita de mucha precisión y experiencia del personal a cargo para hacer las lecturas de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano que reflejan la concentración de fenilalanina presente en la sangre del paciente. En 1995 Silvia Chuy implementó la prueba de Guthrie para la determinación de fenilcetonuria en Guatemala. En la actualidad ya no se utiliza esta prueba debido a la falta de continuidad del programa de tamizaje de fenilcetonuria, lo que ocasionó la pérdida de la cepa de *Bacillus subtilis*.

El método DELFIA cuantifica la fluorescencia de la reacción producida entre fenilalanina-ninhidrina. Se utiliza un buffer de succinato de sodio y cobre al 0.05% para optimizar y aumentar la especificidad de la reacción reduciendo los interferentes (3). De acuerdo a la revisión de literatura, la ventaja que presenta esta metodología sobre la prueba de Guthrie, es que al ser un método automatizado permite la obtención de resultados en un menor tiempo, con una mejor precisión e interpretación de los mismos.

Se compararon ambos métodos, DELFIA y la prueba de Guthrie, con el fin de determinar su equivalencia, para lo que se utilizaron 10 muestras de sangre, positivas para fenilcetonuria, (cada una por triplicado) provenientes del Laboratorio de Tamizaje Neonatal, Hospital Nacional de Niños, Costa Rica, colocadas sobre papel filtro, a las cuales se les determinó el contenido de fenilalanina por ambos métodos. El análisis utilizando la prueba de Guthrie se realizó en Costa Rica y las muestras se corrieron sólo una vez, los resultados se enviaron a Guatemala. Y el análisis con el método DELFIA se realizó en Guatemala, por triplicado. El número de muestras utilizadas se escogió por conveniencia, debido a que la incidencia de la enfermedad es muy baja (1:15,000). Estas muestras provenían de casos positivos que se obtuvieron en Costa Rica y fueron utilizadas para comparar ambos métodos.

Existen muchas variables que interfieren al procesar las muestras en métodos semiautomatizados y automatizados, se esperaría que un método

automatizado aumente la precisión debido a la disminución de errores aleatorios. Pero en este caso no se puede concluir en esto ya que el método DELFIA fue impreciso al compararlo con la prueba de Guthrie, además la pequeña cantidad de muestras, 10 por triplicado, dificultó la posibilidad de obtener datos más explícitos de exactitud y precisión.

El tiempo que media entre el momento de colección de las muestras y su análisis en el laboratorio, las diferentes condiciones de temperatura a las cuales están sometidas las muestras durante su transporte y almacenamiento pueden comprometer los resultados analíticos de los diferentes métodos. La estabilidad de un analito es comúnmente tomada como el tiempo durante el cual ocurre un cambio del 10% de su concentración con respecto a su concentración original. Harvey y colaboradores realizaron estudios acerca de la estabilidad de la fenilalanina, galactosa y otros aminoácidos y encontraron que la fenilalanina en muestras de sangre en papel de filtro conservadas a temperatura ambiente, libre de humedad, alejada de luz directa, es estable por un período de tiempo de hasta 16 años (31).

En este estudio el almacenamiento de las muestras provenientes de Costa Rica, dentro del área de tamizaje neonatal de las instalaciones del laboratorio clínico del Hospital General San Juan de Dios fue a temperatura ambiente (25°C) y protegidas de la luz para evitar posibles cambios en las concentraciones de las muestras hasta el momento de su análisis. Estas muestras fueron recolectadas en

un período de tiempo de 16 años, desde la toma de muestra hasta su análisis por el método DELFIA.

De acuerdo al análisis de los resultados obtenidos en este estudio se puede decir que los métodos prueba de Guthrie y DELFIA no fueron equivalentes, debido a que se comparó un método cuantitativo DELFIA que se basa en una curva estándar, contra un método indirecto como lo es Guthrie que mide un halo de inhibición bacteriana.

Se calculó el coeficiente de variación a partir de la desviación estándar con cada una de las tres corridas de cada muestra por el método DELFIA y con ello se evidenció la imprecisión de este método comparado con la prueba de Guthrie (metodología estándar) con valores del 4% al 15% como se puede observar en la tabla 2.

La gráfica 1 muestra la diferencia entre los valores de los resultados de las muestras analizadas por ambos métodos.

Se compararon las medias de las tres mediciones de cada muestra analizadas con DELFIA versus los valores obtenidos con la prueba de Guthrie en las 10 muestras y con ello se observó que ambos métodos no son equivalentes, ya que en sólo 2 de los 10 casos los resultados coinciden, para los casos restantes se obtienen valores diferentes a los esperados por la prueba de Guthrie. (Gráfica 2)

Se determinó que dos de las diez muestras positivas por la prueba de Guthrie, con valores de 6 mg/dL y 15 mg/dL, dieron resultados más bajos al analizarlas por el método DELFIA con valores de 3.5 mg/dL y 3.9 mg/dL, respectivamente. Tomando en cuenta la diferencia en los puntos de corte de cada método, 3 mg/dL para el método DELFIA y 4 mg/dL para la prueba de Guthrie, ambas muestras deberían ser interpretadas como negativas según la prueba de Guthrie. La diferencia entre los resultados de las medias obtenidas fue estadísticamente significativa, con valores de -11.1 y -2.8, con ello se demostró que el método DELFIA no es equivalente a la prueba de Guthrie. Esta observación es muy importante a la hora de analizar muestras de pacientes ya que un error en la interpretación o en el cálculo de resultados puede impedir que se le de el tratamiento necesario al paciente.

En cuanto a los casos negativos, todos los resultados según ambas metodologías coincidieron en estar por debajo del punto de corte. Para la prueba de Guthrie los 7 resultados fueron menores de 4 mg/dL y para el método DELFIA menores de 3 mg/dL, esto puede observarse en la tabla 1.

## X. Conclusiones

1. Se realizó la comparación de los métodos DELFIA y Guthrie encontrando que no existe equivalencia entre ellos.
2. En base a los resultados no debería implementarse este método en el Hospital General San Juan de Dios.
3. Todas las muestras positivas con la prueba de Guthrie fueron positivas con el método DELFIA a pesar de la diferencia en el valor de punto de corte.

## XI. Recomendaciones

1. Realizar estudios con la población guatemalteca para obtener de datos epidemiológicos sobre la incidencia de fenilcetonuria en el país.
2. En el tamizaje neonatal los casos que se encuentren positivos para fenilcetonuria deben ser confirmados extrayendo una nueva muestra y apoyarse con el cuadro clínico del paciente. En caso se confirme el resultado, se iniciará el tratamiento y posterior seguimiento de los casos.
3. Buscar asesoría científica y colaboradores para poder brindar el tratamiento adecuado, que consiste en una dieta libre de fenilalanina o baja en fenilalanina, a todos los casos positivos.

## XII. Referencias

1. Guttmacher AE, Collins FS. Population Screening in the Age of Genomic Medicine. *N. Eng. J. Med.* 2003;348: 50-52
2. González IG. Importancia del conocimiento de la enfermedad Fenilcetonuria y su tratamiento, en los pacientes y sus familias. Argentina: Universidad de Belgrano (tesis de graduación, Facultad de Ciencias de la Salud), 2005. pp 12-19.
3. Doc. Tec. DELFIA, Neonatal Phenylalanine kit, 2005
4. Castañeda ME. Prevalencia de Fenilcetonuria y otras aminoacidurias en la población infantil guatemalteca. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia), 1981. pp 3-7 y 13-15.
5. Boletín Informativo sobre la Capacitación para la toma de muestra para Tamzaje Neonatal, Laboratorio de Tamizaje Neonatal, Hospital Nacional de Niños, Costa Rica. 2003.
6. De Céspedes C. *et. al.* *Revista de Biología Tropical.* Programa Nacional de Tamizaje Neonatal y de Alto Riesgo en Costa Rica. 2005;52(3):451-466.

7. Velásquez A. *et. al.* Tamiz Neonatal para hipotiroidismo congénito y fenilcetonuria. *Salud Pública México*. 1994;36(3):249-256.
8. Velásquez A. El nuevo tamiz neonatal: una revolución en la pediatría preventiva. *Bol Med Hosp Infant Méx*. 1998;55 (6): 311-313
9. López C M. Fenilcetonúricos...contiene fenilalanina Consejo Latinoamericano de Información Alimentaria. Méx. 1998;70715: 195 - 201.
10. Le Marec B. Les maladies héréditaires du métabolisme. Institut Mère-Enfant, annexe pédiatrique, Hôpital sud. France, Rennes. 2000
11. Serrano CE. Determinación de la frecuencia de fenilcetonuria, galactosemia e hipotiroidismo congénito, en personas con retraso mental que asisten a dos Centros de Cuidado Especial en la ciudad de Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia), 2006. pp 5-14.
12. Doc. Tec. Texas Newborn Screening Program: a Practitioner's Guide. Texas Department of Health, Newborn Screening Program, Bureau of Women and Children. Texas, 2004.

13. Cabeza Monroy L., Barbosa Urbanes M., Alvear Sedan C. Tirosinosis. Reporte de un caso. Departamento de Pediatría y Bioquímica, Universidad de Cartagena. Colombia, 2000. 7 Enero 2006
14. Muntau AC; *et. al.* Tetrahydrobiopterin as an alternative treatment for mild Phenylketonuria. N. Engl. J. Med. 2002;347: 2122-2132.
15. Gutiérrez E. *et. al.* Valoración clínica, psicológica y de laboratorio a niños con hiperfenilalaninemia benigna al nacimiento. Centro Nacional de Genética Médica, Instituto Superior de Ciencias Médicas de la Habana, La Habana, Cuba. 2002.
16. Scriver C. *et. al.* The hyperphenylalaninemias. The metabolic basis of inherited disease. McGraw-Hill, Nueva York. 1989. pp 495-546.
17. Marcos L. *et. al.* Revista Pediátrica Cubana. Evolución de los niveles séricos de fenilalanina en pacientes fenilcetonúricos cubanos. Cuba, 2005.
18. Céspedes C. *et. al.* Prevención de Retardo Mental y Otras Discapacidades para el Tamizaje Neonatal en Costa Rica. Asociación Costarricense para el Tamizaje y la Prevención de discapacidades en el niño (ASTA). Premio Reina Sofía 2002 de Prevención de Deficiencias.

19. Chuy S. Producción, optimización, validación e implementación de la prueba de Guthrie para la detección de fenilalanina sanguínea. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia), 1995. pp 3-7 y 13-15.
  
20. Rivas Camino M. *et. al.* Fenilcetonuria: Bases moleculares e implicaciones sociales. Instituto Superior de Ciencias Médicas Facultad de Medicina 2003. 7(2): 88-89.
  
21. Skoog, Holler, Nieman. Introducción al estudio de la fluorescencia. Principios de Análisis Instrumental. Editorial Mc Graw Hill. México, 2000. 23 Enero 2006
  
22. Manzanel, H.N. *et. al.* Análisis de datos de un grupo de pacientes para: establecer valores de referencia para TSH y T4 y comparación de dos métodos para PKU. Establecimiento Asistencial "Dr. Lucio Molas" Santa Rosa, La Pampa, República Argentina. 2001.
  
23. Chace D.H. *et. al.* What is mass spectrometry? The importance of communicating the concept of mass spectrometry to professionals, media and the consumer. American Society for Mass Spectrometry, 2001. 27 marzo de 2007
  
24. Guzzetta A. What is mass spectrometry?. The Samuel Roberts Noble Foundation, 2006. 27 marzo 2007

25. Chace DH. Tandem Mass Spectrometry and Newborn Screening. Save Babies Through Screening, 2006. 27 marzo 2007
26. Meyer F. Fenilcetonuria. Pharmacy & Health: Health Guide. 2006. 23 febrero 2007.
27. Parral, CA. Tamizaje Neonatal. Boletín Girasol, año 6, No.22, San José, Costa Rica. 2003.
28. Frómata A. *et. al.* Estudio comparativo de los tres papeles filtro en los ensayos UMELISA para el tamizaje neonatal de hipotiroidismo congénito y fenilcetonuria. Rev. Biomed. 2002;13:241-247.
29. American Academy of Pediatrics. New issues in newborn screening for phenylketonuria and congenital hypothyroidism. 1982;69:104-108.
30. Horwitz W. Evaluation of Analytical Methods Used for Regulation. J. Assoc. of. Anal. Chem. 1982; 65:3,525-530.
31. Miller JC., Miller JN. Statistic of analytical Chemistry. Jhon Wiley and Sons. 1988.

32. Garfield FM. Quality Assurance Principles for Analytical Laboratories. AOAC International. 1991.

33. ISNS General Guidelines for Neonatal Screening. International Society for Neonatal Screening. 23 noviembre 2007

### XIII. Anexos

#### Anexo 1 Ingesta mínima recomendada de fenilalanina y tirosina en pacientes con fenilcetonuria

EDAD	FENILALANINA (mg/Kg/día)	TIROSINA (mg/Kg/día)
0-3 meses	25-70	300-350
3-6 meses	20-45	300-350
6-9 meses	15-35	250-300
9-12 meses	10-35	250-300
1-4 años	200-400	1-72-3.00
4-7 años	210-450	2.25-3.50
11-19 años (mujeres)	250-700	3.45-5.00
11-19 años (hombres)	225-1,200	3.38-6.50

Fuente de datos: Adaptado de Bueno, M., 1999.

González IG. Importancia del conocimiento de la enfermedad Fenilcetonuria y su tratamiento, en los pacientes y sus familias. Argentina: Universidad de Belgrano (tesis de graduación, Facultad de Ciencias de la Salud), 2005. pp 12-19.

Anexo 2 Boleta de recolección de muestras (anverso)

MOORE DE CENTROAMERICA S. A. TEL: 254 - 2633 / FAX: 244 - 0259 -- 5567000151

**Programa de Tamizaje Neonatal Boleta de Recolección de la Muestra**  
**HOSPITAL GENERAL " SAN JUAN DE DIOS "**  
**Laboratorio Clínico**

Primer Apellido \_\_\_\_\_ Sexo M  F   
 Segundo Apellido \_\_\_\_\_ Parto Normal  Cesárea   
 Nombre del Niño \_\_\_\_\_ Peso al nacer \_\_\_\_\_  
 Lugar de Nacimiento \_\_\_\_\_  
 Fecha de Nacimiento \_\_\_\_\_ Semanas de Gestación \_\_\_\_\_ Año \_\_\_\_\_  
 Día \_\_\_\_\_ Mes \_\_\_\_\_ Año \_\_\_\_\_  
 Dirección Exacta \_\_\_\_\_  
 Nombre de la Madre \_\_\_\_\_  
 Médico Referente \_\_\_\_\_  
 Pruebas Solicitadas: TSH  PKU  17-OH Progesterona  Galactosa Total

Ha recibido alguna transfusión el niño  
 SI  NO   
 Teléfono de Domicilio \_\_\_\_\_  
 Teléfono Celular \_\_\_\_\_

INSTRUCCIONES AL DORSO

Original PNT

Codigo Centro \_\_\_\_\_ Muestra Inadecuada

MOORE

COT.#5567000151 PH JUN OP#529050022

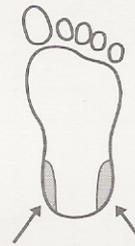
## Boleta de recolección de muestra (reverso)

### INSTRUCCIONES DE TOMA DE MUESTRA:

Anote toda la información en la boleta y proceda a tomar la muestra. Envíe la muestra **urgentemente** el mismo día.

### TOMA DE MUESTRA:

1. Tome la muestra de sangre **idealmente el 4º día de edad** (entre el 4º y 7º día). Retrase la toma de muestra únicamente en caso de transfusión sanguínea. De ser así tome la muestra 8 días después de finalizado ese procedimiento.
2. Para evitar contaminación no toque ninguna parte del papel de filtro, antes, durante o después de la recolección.
3. Mantenga el talón del niño en posición más baja con relación al corazón.
4. Frote los lados del talón para calentar el sitio de punción (la madre puede ayudar).
5. Limpie el área de punción con alcohol (sin yodo), deje secar el área.
6. Realice la punción en el área indicada (ver dibujo), con la lanceta proporcionada. Descarte la lanceta.
7. **Eliminar** suavemente el primer poco de sangre con otro algodón seco.
8. Aplicar presión suave (no "ordeñar") e intermitentemente con sus dedos permitiendo así un flujo libre y espontáneo de sangre.
9. **Esperar que se forme una gota grande de sangre**, colocándola sobre el papel filtro en el momento que se va a desprender, de esta manera deposite una gota de sangre en cada uno de los cuatro círculos de la tarjeta recolectora. Nunca superponer dos o más gotas de sangre. No colocar ninguna gota de sangre en la parte de atrás del papel filtro.
10. Una vez aplicada la gota, ésta debe verse del mismo tamaño por ambos lados del filtro.
11. En total deben ser cuatro gotas de sangre en cada muestra. La piel nunca debe hacer contacto con el papel filtro.
12. Deje secar la muestra a temperatura ambiente, en posición horizontal por espacio de 2 a 4 horas.
13. Envíe la muestra el mismo día con carácter de urgencia.



OBSERVACIONES: