

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**IMPLEMENTACIÓN DE TAMIZAJE NEONATAL PARA FENILCETONURIA EN
GUATEMALA. ESTUDIO PILOTO**



Darwin Ulises Álvarez Enríquez

Diego Alejandro Orozco Barrios

Beatriz Eunice Bautista Orozco

Fulvia Stefany Argueta Zepeda

QUÍMICOS BIÓLOGOS

Guatemala, Octubre del 2014

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**IMPLEMENTACIÓN DE TAMIZAJE NEONATAL PARA FENILCETONURIA EN
GUATEMALA. ESTUDIO PILOTO**

SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN



PRESENTADO POR:

Darwin Ulises Álvarez Enríquez

Diego Alejandro Orozco Barrios

Beatriz Eunice Bautista Orozco

Fulvia Stefany Argueta Zepeda

PARA OPTAR AL TÍTULO DE:

QUÍMICOS BIÓLOGOS

Guatemala, Octubre del 2014

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Por bendecirnos y permitirnos concluir esta etapa de nuestra vida y hacer realidad este sueño tan anhelado.

A NUESTROS PADRES

Por su amor incondicional, en apoyo y comprensión que nos han brindado desde siempre.

A UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

Por darnos la oportunidad de estudiar y ser profesionales egresados de esta gloriosa alma mater.

A FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

Por abrirnos las puertas de sus aulas para estudiar tan importante carrera al servicio de la salud.

A Lic. KARLA LANGE y PhD VIVIAN MATTA

Por su dedicación, quienes con sus conocimientos, experiencia, paciencia y motivación han logrado que podamos finalizar nuestros estudios con éxito.

MSc. ALBA MARINA DE GARCIA y Lic. CLAUDIO GÁLVEZ, MSc. MARIA EUGENIA PAREDES

Por el apoyo brindado en el transcurso de esta investigación.

Al Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, al Laboratorio Microbiológico de Referencia - LAMIR-, y al Instituto para la Investigación Científica y la Educación acerca de las Enfermedades Genéticas y Metabólicas Humanas –INVEGEM- por su tiempo y ayuda en la utilización de instalaciones y equipo. A los Hospitales Nacionales de San Marcos, Coatepeque y al centro de atención de Obras Sociales del Santo Hermano Pedro de Antigua Guatemala por permitir la utilización de sus instalaciones para la toma de muestra.

ÍNDICE

| DESCRIPCIÓN | PÁGINAS |
|---|---------|
| I. ÁMBITO DE INVESTIGACIÓN | 1 |
| II. RESUMEN | 2 |
| III. ANTECEDENTES | 4 |
| A. Fenilcetonuria | 4 |
| B. Hiperfenilalaninemias y manifestaciones clínicas | 5 |
| C. Diagnóstico | 8 |
| D. Control de calidad | 12 |
| E. Tratamiento | 13 |
| F. Epidemiología | 14 |
| G. Historia | 15 |
| H. Tamizaje Neonatal | 17 |
| IV. JUSTIFICACIÓN | 19 |
| V. OBJETIVOS | 20 |
| VI. MATERIALES Y MÉTODOS | 21 |
| VII. RESULTADOS | 30 |
| VIII. DISCUSIÓN | 35 |
| IX. CONCLUSIONES | 41 |
| X. RECOMENDACIONES | 42 |
| XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 43 |
| XII. ANEXOS | 48 |

I. ÁMBITO DE INVESTIGACIÓN

El tamizaje neonatal es una estrategia de prevención en la manifestación de enfermedades sin características clínicas al nacimiento, pero que, de no ser tratadas tempranamente pueden ocasionar retraso mental, complicaciones graves o muerte prematura.

La fenilcetonuria es uno de los errores congénitos más comunes en el metabolismo de los aminoácidos, debido a una carencia o deficiencia de la enzima fenilalanina hidroxilasa (FAH) o, más raramente, de su cofactor tetrahidrobiopterina (BH₄). El diagnóstico debe ser precoz estableciendo programas de cribado metabólico para poder detectarlo. El cribado o seguimiento se realiza entre las 48 horas y los 10 primeros días de nacimiento para detectar los errores innatos del metabolismo (Berg, 2008).

En los Hospitales Nacionales de Guatemala no se ha implementado el tamizaje neonatal para errores innatos del metabolismo, es por ello que se trabajará en colaboración con el Instituto para la Investigación Científica y la Educación acerca de las Enfermedades Genéticas y Metabólicas Humanas –INVEGEM- y se aplicará el método colorimétrico para la detección de los niveles de L-fenilalanina en recién nacidos.

II. RESUMEN

La fenilcetonuria es uno de los errores congénitos más comunes en el metabolismo de los aminoácidos, se debe a una carencia o deficiencia de la enzima fenilalanina hidroxilasa (FAH) o, más raramente, de su cofactor tetrahidrobiopterina (BH4). La L-fenilalanina se acumula en todos los líquidos corporales debido a que no pueden transformarse en tirosina, en consecuencia las concentraciones típicas de L-fenilalanina en sangre son al menos 20 veces superiores a las normales, por lo que casi todos los individuos con fenilcetonuria no tratados sufren un grave retraso mental. (Berg, 2008)

En Guatemala, en las últimas décadas se han realizado varios estudios para la determinación de fenilcetonuria, sin embargo no existe una ley a nivel nacional que regule el tamizaje de fenilcetonuria en recién nacidos, por lo que no se conoce la prevalencia o incidencia en el país.

El objetivo de este estudio fue implementar el tamizaje neonatal para fenilcetonuria cuantificando L-fenilalanina por medio del método colorimétrico en las instalaciones del INVEGEM. Las muestras utilizadas son de 73 recién nacidos atendidos en el Hospital Nacional de San Marcos, 48 recién nacidos atendidos en el Hospital Nacional de Coatepeque, Quetzaltenango, 37 pacientes con retraso mental del centro de atención de Obras Sociales del Santo Hermano Pedro en Antigua Guatemala, y 74 muestras que ingresaron al INVEGEM referidas de diferentes hospitales de la ciudad capital y del interior del país, con solicitud para hiperplasia adrenal congénita, hipotiroidismo, fibrosis quística y/o deficiencia de biotinidasa.

Las muestras que tuvieron valores por encima de 6 mg/dL después de correrlas por duplicado, con el método enzimático colorimétrico fueron confirmadas con un método de diferente principio (fluorimétrico) en un laboratorio de referencia en Argentina. Al confirmarse los resultados todos fueron negativos.

Para la validez de los resultados, se utilizaron controles de calidad proporcionados por los programas de tamizaje neonatal del Centro de Control y Prevención de Enfermedades, CDC por sus siglas en inglés (Center for Disease Control and Prevention). Los cuales evidenciaron una tendencia de los resultados a tener concentraciones por encima de su

valor real, a lo cual se puede adjudicar los resultados falsos positivos obtenidos en este estudio.

En conclusión, no se logró la implementación del método en el área de enfermedades metabólicas del INVEGEM, debido que no se logró estandarizar el método enzimático colorimétrico para tamizaje neonatal de fenilcetonuria. Para mejorar la eficiencia de la elución de las muestras se recomienda utilizar bomba de vacío Manifold.

III. ANTECEDENTES

A. Fenilcetonuria

1. Definición

La fenilcetonuria es uno de los errores congénitos más comunes en el metabolismo de los aminoácidos, se debe a una carencia o deficiencia de la enzima fenilalanina hidroxilasa (FAH) o, más raramente, de su cofactor tetrahidrobiopterina (BH4). La L-fenilalanina se acumula en todos los líquidos corporales debido a que no pueden transformarse en tirosina, en consecuencia las concentraciones típicas de L-fenilalanina en sangre son al menos 20 veces superiores a las normales, por lo que casi todos los individuos con fenilcetonuria no tratados sufren un grave retraso mental. (Berg, 2008)

La 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 anormalidad radica en el factor lábil, que es la enzima que en realidad cataliza la hidroxilación. Cuando la hidroxilasa es deficiente, se usan vías alternativas para metabolizar la L-fenilalanina, en la primera vía la L-fenilalanina es convertida por trasmutación en ácido fenilpirúvico y éste a su vez es reducido a ácido feniláctico. En la segunda vía la L-fenilalanina es descarboxilada a ácido fenilacético que por conjugación origina la fenilcetilglutamina. Finalmente, la L-fenilalanina y estos productos metabólicos se acumulan en los líquidos del organismo. Estos aunque son metabolitos normales, pueden existir en cantidades anormales. (VanSprosen, 1996; Escaf, 2003)

La hidroxilación de la L-fenilalanina a tirosina es un proceso metabólico mediado por la FAH, la cual requiere para su normal funcionamiento de la BH4 como cofactor. A pesar de que para la transformación de este aminoácido a tirosina, es necesario solamente la enzima FAH, la formación y reducción del cofactor se produce por complejas reacciones bioquímicas, donde se involucran varias enzimas, las que conducen de 1 a 3% de las hiperfenilalaninemias reportadas. (Martínez, 2006)

El gen de la FAH está localizado en la posición q22-q24.1 del cromosoma 12. El gen de la FAH consiste en 13 exones pero es en el exón 7 donde se encuentran la mayoría de las mutaciones que están relacionadas con las hiperfenilalaninemias. La fenilcetonuria surge cuando ambos alelos están mutados. Las dos mutaciones pueden ocurrir en cualquiera de los exones, en las uniones de empalme de los intrones intermedios, o tal vez en otras áreas no identificadas del gen, tales como en la región promotora. La hipótesis más aceptada es que esta región altamente conservada, confiere funciones esenciales para la hidroxilación de la FAH y cualquier variación en el dominio codificado por este exón, altera la función de la enzima produciéndose la elevación de la L-fenilalanina. Diversas son las mutaciones que se han relacionado con la deficiencia de FAH, donde la sustitución de un aminoácido por otro es de las más frecuentemente encontradas. (Martínez, 2006)

La fenilcetonuria se hereda cuando los dos padres transmiten un gen que codifica la fenilcetonuria a su bebé, debido a que es una enfermedad genética de tipo recesiva. Cuando uno de los padres tiene el gen de la fenilcetonuria pero no padece la enfermedad, se dice que es “portador” de la misma. Un portador tiene un gen normal y un gen de fenilcetonuria en cada célula. La salud de los portadores no sufre efecto alguno por la presencia de este gen. (Blau, Van Spransen, & Levy, 2010)

Cuando ambos padres son portadores, la probabilidad de que ambos transfieran el gen de la fenilcetonuria a su bebé es de una en cuatro (25%). Dos de cada cuatro bebés heredan el gen de la fenilcetonuria de uno de sus padres y el gen normal del otro, convirtiéndolos en un portador como sus padres. También hay una probabilidad de una en cuatro de que cada uno de ellos le transfiera un gen normal y de que el niño no tenga la enfermedad ni sea portador. Estas probabilidades son iguales durante todos los embarazos. (Blau et al., 2010)

B. Hiperfenilalaninemias y manifestaciones clínicas

1. Definición

Las hiperfenilalaninemias (HFA) son errores innatos del metabolismo (EIM), autosómicos recesivos que se caracterizan por la incapacidad de metabolizar adecuadamente la L-fenilalanina (FA). Comprenden varias condiciones que se diferencian entre sí, tanto clínica

como bioquímicamente, siendo la fenilcetonuria clásica la entidad más común. (Martínez, 2006)

2. Clasificación de las hiperfenilalaninemias y manifestaciones clínicas

Este grupo de enfermedades genéticas del metabolismo de la L-fenilalanina se clasifican de acuerdo a la combinación de los siguientes factores: el nivel de L-fenilalanina en suero, tolerancia a la ingesta de este aminoácido, actividad residual de la enzima y la mutación que la origina. (Guthrie, 1963; Martínez, 2006)

a. HFA transitoria

Se produce secundaria a la inmadurez hepática que conlleva a la síntesis de la enzima fenilalanina hidroxilasa (FAH) funcionalmente deficiente de manera transitoria. También se han reportado casos por drogas (trimetoprim) o patología renal, observándose niveles de FA en suero entre 4 y 10 mg/dL que tienden a normalizarse, disminuyendo hasta valores entre 2-4 mg/dl en el transcurso de los primeros seis meses (los cuales se encuentran entre los valores normales para neonatos) no presenta manifestaciones clínicas por lo que de manera general no requiere tratamiento. Los niveles de tirosina son normales y se detecta una actividad de la enzima de aproximadamente 50% menor de lo normal. Se observa generalmente en los recién nacidos prematuros y/o con ictericia, sin traducción genética en la mayoría de los casos, excepto en la que se produce por déficit de la enzima carbamifosfato dehidratasa. (Guthrie, 1963; Martínez, 2006)

b. HFA persistente o benigna

Se presenta con niveles en suero de FA que pueden ir desde 4 hasta 19 mg/dL. Tiene una actividad enzimática entre 3 y 50% y toleran ingestas de FA por encima de los 50 mg/kg/d. Las cifras de tirosina suelen estar normales. Según estudios que se han realizado en Cuba, Argentina y España, para evaluar el grado de retraso mental en los casos de hiperfenilalaninemia 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. (Scriver, 1989; Céspedes, 2002; Martínez, 2006)

c. Fenilcetonuria o FC clásica

Se presenta con niveles de FA por encima de 20 mg/dL y tirosina menor de 1,8 mg/dL (normal o baja). La actividad enzimática está por debajo de 5 o 6% y toleran ingestas del aminoácido inferiores a 20mg/kg/d. (Guthrie, 1963; Martínez, 2006)

Los pacientes que no son tratados o son diagnosticados tardíamente desarrollan una enfermedad neurológica precoz, caracterizada por un retraso mental y en ocasiones con convulsiones. La mayoría 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. Es característico, el olor a paja mojada en la orina, debido a la eliminación de ácido fenilacético, como vía alternativa para la metabolización de las altas concentraciones de L-fenilalanina. (Ruiz, 2004)

En los niños mayores, pueden producirse cuadros psicóticos de tipo autista, síndrome de West, convulsiones generalizadas, eczema facial y presentan hiperactividad. Son personas con tendencia a ser destructores, provocándose auto-lesiones y pasando por fases de hiperexcitación. El deterioro intelectual es progresivo, así como las alteraciones neurológicas en los pacientes que no siguen el tratamiento. (Ruiz, 2004)

d. FC atípica

Los niveles de FA encontrados generalmente están entre 10 y 20mg/dL con un cuadro clínico variable es mucho menos severo que la forma clásica. Generalmente son más tolerantes a la ingestión de FA. (Guthrie, 1963; Martínez, 2006)

e. FC maligna

Se debe a defectos en las enzimas relacionadas con el cofactor alterado THB y BH4, es por ello que a pesar que los niveles altos de FA sean tratados nutricionalmente, no se produce respuesta a dicho tratamiento, desarrollando daño neurológico precoz y severo con

características semejantes a la FC clásica. Los niveles de FA pueden ser variables y van desde 4 hasta 40 mg/dL. (Guthrie, 1963; Martínez, 2006)

C. Diagnóstico

El diagnóstico debe ser precoz estableciendo programas estatales de cribado metabólico para poder detectarlo. No se puede esperar a detectar síntomas convencionales puesto que las afecciones neurológicas son irreversibles. El cribado o seguimiento se realiza entre las 48 horas y los 10 primeros días de nacimiento para detectar los errores innatos del metabolismo. Los valores normales para L-fenilalanina en sangre pueden ser menores o iguales a 4 mg/dL en muestras que han sido obtenidas en un lapso de 48 horas de vida del neonato y menor o igual a 2mg/dL en muestras que han sido obtenidas en menos de 48 horas. Se pueden distinguir varios subgrupos de fenilcetonuria según la concentración de L-fenilalanina en la sangre. (Céspedes, Santisteban, Rojas, & Ortiz, 1984)

Para el diagnóstico de la fenilcetonuria hay que realizar un análisis cualitativo o de preferencia cuantitativo de la concentración de L-fenilalanina en la sangre. Entre los métodos para su cuantificación se encuentran los siguientes:

1. Colorimétrico

El método colorimétrico se basa en la utilización de la enzima fenilalanina deshidrogenasa la cual cataliza la desaminación oxidativa, dependiente del NAD, de la fenilalanina a fenilpiruvato y amoníaco. El NADH producido se determina colorimétricamente mediante un sistema de detección de aceptor de electrones tetrazólico/intermedio. (Skoog, 2000; Guzetta, 2007)

Debido a su formato, la prueba es de fácil automatización, por lo que se presta a la clasificación masiva. Las ventajas sobre la prueba de Guthrie son la total cuantificación, velocidad y falta de interferencias por antibióticos. La ventaja que tiene sobre el método fluorimétrico es la falta de interferencias por componentes endógenos de la muestra fluorescente, lo que reduce el número de resultados positivos falsos.

En Guatemala, el método utilizado para realizar el tamizaje neonatal es el método de DELFIA el cual presenta la ventaja sobre la prueba de Guthrie de ser un inmunoensayo

fluorimétrico y ser un método automatizado que permite la obtención de resultados en un menor tiempo y un diagnóstico más rápido de la enfermedad. Sin embargo, todo resultado positivo debe ser confirmado con la metodología estándar (prueba de Guthrie). (Del Olmo, 2008)

2. 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, debido a que tiene una sensibilidad y especificidad del 99% siendo una técnica que es lineal entre 2-20 mg/dL (Cornejo, Manríquez, & Colombo, 2003). El principio del método se basa en la inhibición del crecimiento de *Bacillus subtilis*, utilizando una muestra con una concentración mínima de fenilalanina libre en un agar base con esporas de *Bacillus subtilis*. Posteriormente se agrega un inhibidor (β -2-tienilalanina), con el fin de evitar el crecimiento de este microorganismo. La acción del inhibidor es bloqueada por la presencia de fenilalanina permitiendo así el crecimiento de *Bacillus subtilis* en el área alrededor del papel filtro con la muestra de sangre que contiene L-fenilalanina. El tamaño y la densidad de la zona de crecimiento dependen directamente de la cantidad de L-fenilalanina presente en la muestra (Hertzberg, Hinton, Therrell, & Shapira, 2011).

Esta prueba no se realiza de rutina en los laboratorios del país, a pesar que estudios realizados en 1995 en el Hospital General San Juan de Dios por Chuy establecieron que la prueba de Guthrie es una prueba rápida, sencilla, sensible y exacta; lo cual la hace adecuada como prueba de tamizaje neonatal (Chuy, 1995).

Entre las desventajas de esta técnica es que es un método semi cuantitativo y por lo tanto en muchos laboratorios ha sido reemplazada por otras técnicas como la fluorometría y técnicas inmuno-enzimáticas debido a que estos son cuantitativos. Entre las ventajas se menciona que la recolección de las muestras en papel filtro requiere de poca muestra, el que es fácil de transportar, por lo tanto hay una mayor seguridad en la manipulación, una alta especificidad y sensibilidad. (Céspedes, 2002; Hertzberg, 2011)

Actualmente en los países de Norteamérica, Europa (España y Francia) y Latinoamérica (Cuba y Costa Rica) con un sistema de salud avanzado es obligatorio practicar los

exámenes de laboratorio para fenilcetonuria a todo recién nacido utilizando este método. (Parral, 2003; Serrano, 2006; Barrera, & Rodríguez, 2006)

3. Cloruro férrico

El principio de esta prueba se basa en la detección de ácido fenilpirúvico en una muestra de orina neonatal. Se utiliza una tira de papel impregnada con cloruro férrico la que se sumerge en la muestra y ésta al reaccionar con el ácido fenilpirúvico da como resultado una coloración verde. Esta reacción fue muy utilizada durante 25 años en Europa y Estados Unidos para la detección de la enfermedad sin embargo, 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 de baja estabilidad, necesitando una concentración elevada para su detección, la cual ya es tóxica para el organismo. Esta prueba resulta útil en la mayoría de países para el diagnóstico de la fenilcetonuria clásica una vez establecida la presencia de una hiperfenilalaninemia. En cambio, no puede ser utilizada para el examen selectivo de la enfermedad. 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 0.2mg/mL. (Barrera et al., 2006; Parral, 2003; Chuy, 1995; Bradford, 1998)

4. Espectroscopía por resonancia magnética

Se puede medir la fenilalanina en el tejido cerebral por medio de la espectroscopía por resonancia magnética (MRI), este método utiliza un programa especial para medir la concentración de ciertas moléculas en el cerebro. Las moléculas de fenilalanina dan ondas específicas, produciendo un patrón de espectroscopía que es detectable con gran exactitud. La prueba de cribado, a través de esta técnica, tiene una sensibilidad y una especificidad cercanas a 99%. (Pereda, Calcáneo, Enríquez, Badillo, & Soler, 2008)

En el 2003, Counsell publica una detallada descripción sobre la tecnología para evaluar las imágenes de bebés prematuros y remarca la seguridad de la resonancia magnética por no ser invasiva ni ionizante, y la destaca como una herramienta particularmente útil para la evaluación de diferentes patologías. La espectroscopia por resonancia magnética ha permitido la detección simultánea de múltiples marcadores metabólicos incluyendo la

fenilcetonuria. Esta metodología se ha aplicado principalmente en Europa, donde España ha logrado los avances más significativos para tamizaje neonatal. En Guatemala no se tiene información sobre estudios realizados por espectroscopia por resonancia magnética. (Skoog, 2000; Oreiro, 2007; Hertzberg et al., 2011)

5. Espectrometría de masas

La espectrometría de masas en tándem (MS/MS) permite el análisis de múltiples compuestos para la identificación de diversas enfermedades en una pequeña cantidad de sangre del talón del recién nacido, razón por la cual su obtención carece de riesgos y ofrece una mayor eficiencia y menor costo de la prueba. Esta técnica de medición se basa en la producción de iones a partir de compuestos neutros y la observación de la subsiguiente descomposición de esos iones. Estos iones descompuestos (fragmentos que también poseen carga) se mueven rápidamente y son clasificados de acuerdo a su relación masa/carga del ion. El espectrómetro de masas además de clasificar los fragmentos también mide la cantidad de ellos que se forman. (Therrel et al., 2001)

Una de las múltiples ventajas de esta metodología es que no se requieren separaciones cromatográficas previas, que consumen tiempo debido a que la separación y el reconocimiento de concentraciones en el análisis ocurren de modo simultáneo en el mismo instrumento; además, el límite de detección es hasta de 1 nmol/ml de sangre. (Torres et al., 2008)

6. Fluorimetría

a. 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 (DELFIA, 2005).

b. UMTEST PKU (SUMA)

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 (Chace, 2001).

D. Control de calidad

Independientemente de la metodología a utilizar es importante evaluar el desempeño y la calidad, por medio de controles de calidad internos y externos que son proporcionados por entidades que realizan y han validado la metodología. Este procedimiento supervisa la calidad del proceso analítico y el rendimiento del personal que realiza la prueba con el objetivo de obtener un resultado confiable. (Therrel, 1993)

Una de las instituciones que realiza programas de calidad es el Centro de Control y Prevención de Enfermedades, CDC por sus siglas en inglés (Center for Disease Control and Prevention) de Atlanta. Que tiene como misión promover la salud y la calidad de vida por medio de la prevención y controlando enfermedades y discapacidades. (CDC, 2012)

El CDC cuenta con un programa de control de calidad tanto interno como externo llamado *Newborn Screeaning Quality Assurance Program* (Programa de Garantía de Calidad del Tamizaje Neonatal). El programa de control de calidad interno se basa en el envío de estándares de trabajo con diferentes concentraciones del analito en estudio que se encuentran dentro y fuera del valor anormal establecido. Para el control de calidad externo el CDC proporciona cada 4 o 6 meses muestras desconocidas, publicando los resultados posteriormente. (Torres et al., 2008)

E. Tratamiento

La fenilalanina es un aminoácido esencial e indispensable como nutriente. Se encuentra en los alimentos en una concentración aproximada del 4 – 6% del contenido proteico de los mismos; 1g de proteínas naturales contiene 5% de fenilalanina (50 mg de fenilalanina). Todo paciente con fenilalaninemia mayor a 6 mg/dl deberá llevar una alimentación limitada en proteínas naturales, para limitar el contenido de ingesta en fenilalanina, suplementada con aminoácidos esenciales exentos de fenilalanina y enriquecidos en tirosina, con aporte de nutrientes adecuados a la edad. (López, 1998)

Los pacientes que padecen 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 deben eliminar de su dieta. Se permiten alimentos bajos en proteínas, como fruta, verdura y algunos cereales en cantidades controladas junto con alimentos preparados especialmente, los cuales poseen contenido bajo o nulo de fenilalanina. Los requerimientos de energía en fenilalanina pueden diferir en pacientes PKU con respecto a la población normal e incluso entre ellos mismos.

Existe una variación de tolerancia en la ingesta de fenilalanina relacionada con una ingesta espontánea del niño, la velocidad de crecimiento y las enfermedades que aparecen durante el curso de la fenilcetonuria como infecciones, alergias, etc. Estas enfermedades intercurrentes hacen que se aumente los niveles de fenilalanina y durante estos episodios deben ingerirse en menor cantidad. Para lograr un tratamiento eficaz se deben seguir las siguientes aproximaciones en cuanto a la dieta para cada edad. (Dalmau & Genovés, 1995)

- De 0 - 3 meses de edad: 50 - 35 mg de fenilalanina/kg/día = 1,0 - 0,7 g de proteínas naturales/kg/día en forma de leche materna o de fórmula adaptada a las proteínas de alto valor biológico (PAVB), que proporcionan la fenilalanina.
- De 3 - 6 meses de edad: 35- 28 mg de fenilalanina/kg/día.
- De 6 - 12 meses de edad: alrededor de 28 mg de fenilalanina/kg/día en los fenotipos severos y moderados (5 – 6 g de PAVB/día), los benignos suelen tolerar a esta edad entre 8 y 9 g de PAVB/día equivalentes a 40 – 50 mg de fenilalanina/kg/día.

- De 1 año - 5 años: los pacientes con fenotipo severo toleran un máximo de 6 g de PAVB/día, equivalentes a 300 mg de fenilalanina/día.

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. (Dalmau, 1995)

F. Epidemiología

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2008 el 4% de muertes antes de los 5 años de edad, se debía a anomalías congénitas y de éste, el 16% corresponde a Latinoamérica. Según este informe, en Guatemala el 5% de las causas de mortalidad general corresponden a las diferentes anomalías congénitas. (Organización Mundial de la Salud, 2010)

La prevalencia de fenilcetonuria varía extensamente alrededor del mundo. En Europa la prevalencia es 1 por 10.000 nacidos vivos, pero en algunas áreas de Europa es tan alta como en Turquía y en el norte de Irlanda, siendo de 1 por cada 4.000 nacimientos debido a que la consanguinidad entre la población es muy alta. En España se describe una prevalencia de fenilcetonuria de 1 en 12.700 nacidos vivos, considerándose como una enfermedad rara o de baja prevalencia, además de ser incapacitante crónica. (Giovannini, Verduci, Salvatici, Fiori, & Riva, 2007; Peña, 2006)

En Francia es de 1 caso por cada 17.124 nacimientos, con un promedio de 44 nuevos casos por año. Finlandia tiene la tasa de prevalencia más baja en Europa con 1 caso por cada 100.000 habitantes. (Abadie et al., 2010; Blau et al., 2010)

En Estados Unidos, la prevalencia es de 1 caso por 15.000. En Latinoamérica varía desde 1 por 50.000 hasta 1 por 25.000 nacimientos, siendo generalmente alta en el Sur de Latinoamérica más que en otros lugares de la región, como en Argentina donde la prevalencia es de 1 por 8.000. En la población cubana, la incidencia de este defecto es de 1 por 50.000 recién nacidos vivos y en México la prevalencia estimada es de 1 por 20.000. Los rangos de prevalencia en Asia varían desde 1 por 15.000 hasta 1 por 100.500

nacimientos en regiones de China, 1 por 200.000 habitantes en Tailandia y cerca de 1 por cada 70.000 en Japón. África presenta la más baja prevalencia de fenilcetonuria alrededor del mundo. (Blau et al., 2010; Cornejo, Manríquez, & Colombo, 2003)

La cifra de incidencia de fenilcetonuria con retraso mental varía ampliamente, desde 0% en Canadá a 2.7% en Inglaterra. En un estudio hecho en California en grupos de niños retardados, la incidencia de fenilcetonuria fue de 1 por cada 750 nacidos. En Costa Rica también se realizó un estudio en centros de educación especial donde se muestrearon a 1686 niños, obteniendo 2 casos positivos de fenilcetonuria. (Céspedes, Santistebán, Rojas, & Ortiz, 1984)

En el 2006 se evaluaron 90 personas con retraso mental que asisten a dos centros de cuidado especial en la ciudad de Guatemala. Se procesaron las muestras en el departamento de Medicina Nuclear del Hospital General San Juan de Dios. Se estableció la incidencia de enfermedades metabólicas como fenilcetonuria, galactosemia e hipotiroidismo congénito la cual fue de 1.11%, 0% y 4.44% respectivamente. (Serrano, 2006)

El tamizaje neonatal es un procedimiento que no se practica en todos los centros asistenciales de nuestro país; únicamente lo realizan el Hospital Roosevelt y el Hospital General San Juan de Dios (HGSJD). Sumando los datos de ambos centros, se llega a la conclusión que se le realiza este procedimiento al 0.3% de la población guatemalteca aproximadamente. Este programa para el diagnóstico de fenilcetonuria estuvo en vigencia en el HGSJD desde el año 2005 hasta enero del 2012 y durante ese lapso de tiempo, no se identificó ningún caso positivo; únicamente se detectaron 4 casos “positivos falsos”, los cuales en la prueba confirmatoria fueron negativos. Es importante mencionar que este tipo de examen no fue constante y continuo debido a la baja cobertura del programa de tamizaje, la falta de recursos del mismo y otros factores que impidieron poder realizar este examen a toda la población. (A. Domínguez, comunicación personal, 16 enero, 2013)

G. Historia

La historia del tamizaje neonatal para identificar errores del metabolismo inició con las ideas de Garrol en 1902, quien señaló la posibilidad de la herencia de defectos químicos

específicos en el metabolismo. En 1934 se buscó identificar la primera enfermedad en forma temprana durante la infancia, iniciando con el diagnóstico de fenilcetonuria, anomalía detectada inicialmente a través de tamizaje de la orina utilizando cloruro férrico. (Serrano, 2006)

En 1961, el Dr. Robert Guthrie desarrolló la prueba de tamizaje mediante la recolección de gotas de sangre en papel filtro para la detección de fenilcetonuria. La prueba se basa en ensayo de inhibición bacteriana, utilizando un antimetabolito o un inhibidor análogo de la fenilalanina. Posteriormente, el mismo principio fue empleado para identificar otras anomalías del metabolismo de histidina y aminoácidos como: metionina, lecitina y tirosina. En el año 1963, Guthrie y Susi reportaron los resultados del diagnóstico de errores congénitos del metabolismo en la etapa perinatal con el uso de un método rápido, que se podría utilizar como prueba de tamizaje. A raíz de estos hallazgos, tomó interés la implementación de las pruebas de tamizaje neonatal. En ese mismo año en los Estados Unidos se inició el uso de la prueba de tamizaje neonatal para la determinación de fenilcetonuria. (Serrano, 2006)

En Guatemala, varias instituciones públicas tienen programas de medicina preventiva, entre ellas el HGSJD, cuyo departamento de Medicina Nuclear llevó a cabo el tamizaje neonatal para hipotiroidismo congénito desde 1991 hasta marzo de 2005. El objetivo fue detectar la enfermedad oportunamente para el inicio inmediato del tratamiento y evitar daños irreversibles e incluso la muerte del neonato. En agosto del año 2005, se traslada este programa al área de tamizaje neonatal del laboratorio clínico de dicho hospital y se implementó el programa para: hipotiroidismo congénito, hiperplasia adrenal congénita, galactosemia y fenilcetonuria; atendiendo únicamente a los neonatos que nacen en el nosocomio. (Duarte, Velásquez, Coronado & Soto, 2011)

El laboratorio de Medicina Nuclear del Hospital Roosevelt en agosto del 2004 implementó el programa de tamizaje neonatal para la detección de hipotiroidismo congénito de los neonatos nacidos en dicho nosocomio y se utilizaron muestras de sangre obtenidas del talón. A la fecha tiene una cobertura del 70 % de neonatos tamizados dentro de dicho nosocomio. (Duarte et al., 2011)

H. Tamizaje Neonatal

La fenilcetonuria es el prototipo de enfermedad genética para la cual los tamizajes masivos en recién nacidos están justificados. Los siguientes argumentos así lo demuestran (Martínez, 2006):

- Frecuencia: En la actualidad, no cabe duda que dentro de las enfermedades metabólicas, la fenilcetonuria es uno de los desórdenes más comunes en algunas poblaciones.
- Tratamiento: Es efectivo si se comienza precozmente, y por tanto evita la aparición de retraso mental severo.
- Prueba específica para diagnóstico oportuno: Puede realizarse varios días después del nacimiento, en una muestra de sangre en papel de filtro obtenida con facilidad por punción en el talón del recién nacido. Los resultados generalmente se obtienen de forma rápida.
- Relación costo/beneficio: el tamizaje neonatal de fenilcetonuria es positivo para la sociedad, teniendo en cuenta que la administración temprana de una dieta restringida en fenilalanina evita las consecuencias adversas de la hiperfenilalaninemia persistente sobre el sistema nervioso en desarrollo. Se eliminan así todos los gastos innecesarios por repetidos estudios y consultas a diferentes especialistas al carecer del diagnóstico causal y, fundamentalmente, cambia profundamente la calidad de vida del niño y su familia. (Benítez, San Julián, & Rodríguez, 2001; Lyon, & Adams 1996)

En la mayoría de los países desarrollados, los niños son tamizados para el diagnóstico temprano de hiperfenilalaninemias mediante la medición de la concentración de fenilalanina en sangre durante el período neonatal, por medio de técnicas microbiológicas y fluorimétricas. La mayoría de estos programas han usado un valor de corte entre los 2 y 4 mg/dL como un indicador positivo a la prueba de Guthrie. El valor de corte considerado para la población cubana es de 3 mg/dL. Los resultados obtenidos en Cuba desde el año de 1986 con el programa nacional de prevención de hiperfenilalaninemias, han contribuido considerablemente a disminuir la aparición de retraso mental severo en la población cubana

por esta causa, así como establecer estrategias de control y tratamiento a estos pacientes, encaminados a garantizar una mejor calidad de vida a los mismos. (Martínez, 2006)

Para que los resultados de la determinación de fenilcetonuria sean fiables, la muestra debe ser tomada entre las 48 a las 72 horas de vida del recién nacido. Motivo por el cual el HGSJD suspendió la realización de esta prueba, ya que las muestras eran recolectadas antes de las 24 horas, período que regularmente las madres y el recién nacido están en el hospital. (A. Domínguez, comunicación personal, 16 enero, 2013)

En el Hospital Roosevelt, no se ha implementado la prueba de fenilcetonuria debido a que el presupuesto no es suficiente para cubrir la compra de los reactivos necesarios, por ello solo realizan tamizaje neonatal para hipertiroidismo congénito. (A. Sacoj, comunicación personal, 16 enero, 2013)

IV. JUSTIFICACIÓN

La fenilcetonuria es un trastorno autosómico recesivo que afecta el metabolismo de los aminoácidos provocando diferentes signos y síntomas a largo plazo dentro de los que se encuentran el retraso mental grave e irreversible y retraso psicomotor. Pueden producirse cuadros sicóticos de tipo autista, síndrome de West, convulsiones generalizadas y eczema facial. Los niños con FC 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. (Berg, 2008)

En Guatemala son pocos los estudios enfocados a esta enfermedad y a esto se le añade que los programas destinados al tamizaje neonatal son de baja cobertura, por lo que no se extienden a toda la república. Debido a esto, la frecuencia de fenilcetonuria en el país no se conoce, de manera que es de interés realizar estudios de tamizaje neonatal en el interior del país para conocer la frecuencia y prevenir las manifestaciones clínicas. De esta forma los niños podrán tener un desarrollo normal del sistema nervioso. Sin mencionar que tanto la familia como la sociedad evitarán gastos económicos y de insumos innecesarios en un futuro ya que la inversión en el costo de prevención es mucho menor al costo del mantenimiento de la enfermedad. (Duarte et al., 2011)

En este estudio se pretende implementar la metodología colorimétrica de punto final, en el área de enfermedades metabólicas del Instituto para la Investigación Científica y la Educación acerca de las Enfermedades Genéticas y Metabólicas Humanas –INVEGEM-. Con el objetivo de realizar un estudio piloto sobre fenilcetonuria en hospitales nacionales y centros de atención a pacientes con retardo mental en Guatemala, como parte de un programa de tamizaje neonatal que abarca otras patologías. Además se determinará los valores promedio para la población guatemalteca evaluada.

V. OBJETIVOS

A. General

Implementar el tamizaje neonatal para fenilcetonuria cuantificando L-fenilalanina por un método colorimétrico.

B. Específicos

1. Determinar la validez de los resultados obtenidos por el método colorimétrico por medio de controles de calidad proporcionados por el programa de control de calidad externo del CDC.
2. Determinar el valor promedio de L-fenilalanina en los recién nacidos y en pacientes con retraso mental procedentes de instituciones que participan en el programa de tamizaje neonatal en la población estudiada.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo y muestra

1. Universo de trabajo

Recién nacidos atendidos en instituciones que participan en el programa de tamizaje neonatal: Hospitales Nacionales de los departamentos de San Marcos y Quetzaltenango, pacientes con retraso mental del centro de atención de Obras Sociales del Santo Hermano Pedro en Antigua Guatemala en quienes se quería descartar fenilcetonuria como causa de retardo, y muestras para tamizaje de hiperplasia adrenal congénita, hipotiroidismo y/o deficiencia de biotinidasa que ingresaron al INVEGEM en el periodo de enero hasta abril del año 2014.

2. Muestra

73 Recién nacidos atendidos en el Hospital Nacional de San Marcos, 48 recién nacidos atendidos en el Hospital Nacional de Coatepeque, Quetzaltenango, 37 pacientes con retraso mental del centro de atención de Obras Sociales del Santo Hermano Pedro en Antigua Guatemala y 74 muestras que ingresaron a INVEGEM referidas de diferentes hospitales de la ciudad capital y del interior del país. Para cada uno de ellos se solicitó un consentimiento informado del padre o responsable antes de la toma de muestra.

3. Criterios de inclusión

- Haber lactado como mínimo en las primeras 48 horas de vida.
- No tener diagnóstico previo de fenilcetonuria.

4. Criterios de exclusión

Recién nacidos con transfusiones sanguíneas

B. Recursos

1. Humanos

a. Investigadores

Br. Beatriz Bautista Orozco

Br. Darwin Álvarez Enríquez

Br. Diego Orozco Barrios

Br. Stefany Argueta Zepeda

b. Asesoras

Licda. Karla Lange

PhD. Vivian Matta

c. Asesor estadístico

Lic. Luis de León

d. Revisor

Lic. Claudio Gálvez

e. Colaboradores

Dra. Claudia Carranza

Dr. Luis Álvarez

2. Recursos Institucionales

- a. Departamento de Citohistología Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Unidad de Inmunodiagnóstico del Laboratorio Microbiológico de Referencia -LAMIR-.

b. Laboratorio del Instituto para la Investigación Científica y la Educación acerca de las Enfermedades Genéticas y Metabólicas Humanas –INVEGEM-.

3. Materiales

a. Equipo

Espectrofotómetro para Elisa de marca GLOMAX MULTI

Incubadora a 37°C

Pipetas automáticas multicanal para dispensar de 5-50 µL.

Pipeta automática de 10-100µL y 100-1000 µL

Agitador automático de microplacas

Congelador a - 20 grados °C

b. Materiales de laboratorio

Microplacas con 96 pozos

Portaplacas

Selladores de microplacas

Pipetas serológicas

Pipetas pasteur

Puntas para pipetas automáticas (10-100 µL) y (100-1000 µL)

Papel parafilm

Lancetas automáticas

Tarjetas de papel filtro Schleicher & Schuell 903 (S&S # 903).

c. Reactivos

Etanol al 70%

Agua destilada

Ácido Tricloroacético al 3%

Kit Quantase™ Neonatal Phenylalanine Screening de marca BioRad® el cual incluye los siguientes reactivos:

- Reactivo enzimático (azida de sodio al 0,1%)
- Reactivo colorante (Sal tetrazólica al 1%)
- Elución tamponada (Ácido tricloroacético al 3%)
- Estándares de manchas de sangre humana completa, con diferentes concentraciones de L-fenilalanina sobre papel filtro 903, que contiene el Kit Quantase™ Neonatal Phenylalanine Screening de marca Bio-Rad (s0: 0 mg/dL, s1: 1,09 mg/dL, s2: 4,32 mg/dL, s3: 8,4 y s4: 18.45 mg/dL).
- Controles internos de manchas de sangre humana completa, con concentraciones de L-fenilalanina en papel filtro 903, que contiene el Kit Quantase™ Neonatal Phenylalanine Screening de marca Bio-Rad (A: 3.07-5.20 mg/dL y B: 8.94-15.45 mg/dL).

Controles de calidad interno y externo del *Newborn Screening Quality Assurance Program* del CDC:

- Controles internos del *Proficiency Testing Program* (Programa de Pruebas de Aptitud) que pertenece al *Newborn Screening Quality Assurance Program*, con valores de concentración conocido de L-fenilalanina (13.21 = 0.0 mg/dL ,13.22 = 100.0 mg/dL, 13.23 = 200.0 mg/dL ,13.24 = 300.0 mg/dL)
- Controles externos del *Quality Control Program* (Programa de Control de Calidad) que pertenece al *Newborn Screening Quality Assurance Program*, con valores de concentración desconocido de fenilalanina los cuales tienen los siguientes códigos: 13.25, 13.26, 13.27, 13.28.

C. Metodología

1. Recolección de las muestras

Las muestras fueron tomadas por los seminaristas a recién nacidos atendidos en Hospitales Nacionales de 2 departamentos: San Marcos y Quetzaltenango, además muestras de recién nacidos con solicitud para diagnóstico de hiperplasia adrenal congénita, fibrosis quística, hipotiroidismo y/o deficiencia de biotinidasa que ingresaron al INVEGEM y pacientes con retraso mental de 5 a 12 años de edad del Centro de Obras Sociales del Santo Hermano Pedro de Antigua Guatemala del departamento de Sacatepéquez, para descartar fenilcetonuria como causa de retraso mental. A cada padre de familia y/o encargado se les proporcionó una boleta de recolección de datos para recién nacidos, una boleta de recolección de datos para niños con retraso mental y un consentimiento informado, según el formato usado en el INVEGEM como parte del programa de tamizaje que realizan para hipotiroidismo congénito, fibrosis quística, hiperplasia adrenal congénita y deficiencia de biotinidasa (Anexo 1-3).

- a. Procedimiento de toma de muestra de recién nacidos
 - i. Se entregó al padre de familia el consentimiento informado y se le explicó brevemente en qué consistía el estudio y la forma en que se tomaría la muestra.
 - ii. Se llenó la hoja de recolección de datos del neonato.
 - iii. Se recostó al recién nacido sobre una camilla.
 - iv. Se tomó el pie y se limpió el área del talón con un algodón con alcohol al 70 %.
 - v. Se pinchó con una lanceta el talón y se descartó la primera gota.
 - vi. Se dejó caer 1 gota sobre el área de papel filtro S&S No. 903 de manera que se dispersara uniformemente, la mancha de sangre no debía tener un diámetro menor de 1/2 de pulgada. Se aseguró que la muestra de sangre tuviera una apariencia uniforme en ambos lados del papel filtro (Anexo 4).
 - vii. Se colocó un algodón sobre el área pinchada para detener el sangrado.

b. Procedimiento de toma de muestra de pacientes con retraso mental

- i. Se entregó al padre de familia el consentimiento informado y se le explicó brevemente en qué consistía el estudio y la forma en que se tomaría la muestra.
- ii. Se llenó la hoja de recolección de datos del paciente.
- iii. Se tomó el dedo anular y se limpió el área con un algodón con alcohol al 70 %.
- iv. Se pinchó con una lanceta la parte lateral del dedo y se descartó la primera gota.
- v. Se dejó caer una gota sobre el área de papel filtro de manera que se dispersará uniformemente, la mancha de sangre no debía tener un diámetro menor de 1/2 de pulgada. Se aseguró que la muestra de sangre tuviera una apariencia uniforme en ambos lados del papel filtro (Anexo 4).
- vi. Se colocó un algodón de nuevo sobre el área pinchada para detener el sangrado.

c. Almacenamiento de las muestras

Se almacenó cada una de las muestras en bolsas herméticas con desecante e identificó con la información del paciente; las muestras fueron transportadas en hieleras al laboratorio y se almacenaron en congelador a -20°C .

2. Determinación de fenilalanina por el método colorimétrico

Es un método de punto final y se basa en la utilización de la enzima fenilalanina deshidrogenasa, la cual cataliza la desaminación oxidativa, dependiente del NAD, de la L-fenilalanina a fenilpiruvato y amoníaco. El NADH producido se determina colorimétricamente mediante un sistema de detección de aceptor de electrones, el tetrazólico/intermedio. La absorbancia se lee por medio de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570/600 nm (longitud de onda dual) y las concentraciones se calculan en base a una curva de calibración previamente realizada utilizando estándares con L-fenilalanina de 0 mg/dL, 1,09 mg/dL, 4,32 mg/dL, 8,4 mg/dL y 18.45 mg/dL (Skoog, 2000; Guzetta, 2007).

Las ventajas sobre la prueba de Guthrie son la total cuantificación, velocidad y falta de interferencias por antibióticos. La ventaja que tiene sobre el método fluorimétrico es que no

contiene interferencias por componentes endógenos de la muestra fluorescente, lo que reduce el número de resultados falsos positivos (Ohshima, Sugimoto, & Soda, 1988).

a. Procedimiento del método

i. Elución

Se cortaron con el sacabocados discos de 1/8" (3.2 mm) de diámetro de los estándares s1-s4 (0, 1.09, 4.32, 8.4 y 18.45 md/dL) y los controles A (3.07-5.20 m/dL) y B (8.94-15.45 mg/dL) del kit Quantase™ Neonatal Phenylalanine Screening, y se colocaron en los pocillos de la microplaca. Para el estándar s0, se cortó un disco de papel blanco simple en una zona sin mancha de la ficha del estándar s1. Se cortaron los discos que llevaban las muestras del paciente y transfirieron a los pocillos individuales restantes y se anotó su posición en la microplaca.

Se transfirieron 55 µl de elución tamponada (Ácido Tricloroacético al 3%) diluida a cada pocillo y se agitó la microplaca suavemente. Se examinó visualmente la microplaca para asegurar de que cada disco de papel estuviera sumergido totalmente en la elución tamponada.

Se incubó la microplaca durante 30 minutos a temperatura ambiente (18-25° C) en un agitador de microplacas, con agitación moderada.

ii. Transferencia de la muestra y prueba

Se transfirieron 50 µl de eluido de cada muestra a un nuevo pocillo.

Se transfirieron 100 µl de reactivo enzimático de trabajo a cada pocillo de la micromicroplaca. Se incubó la microplaca a temperatura ambiente (18-25°C) durante 30 minutos en un agitador de microplacas, con agitación moderada.

iii. Generación de color

Se agregaron 100 µl de reactivo colorante a cada pocillo y aseguró de que no se produjeran burbujas en los pocillos durante la adición. Se incubó la microplaca a

temperatura ambiente (18-25°C) en un agitador de microplacas, con agitación moderada, durante 2 minutos.

Se leyó la absorbancia de cada pocillo con el espectrofotómetro a 570/600 nm (longitud de onda dual) de 2 a 5 minutos después de la adición de reactivo colorante.

b. Curva de Calibración

Para cada corrida se elaboró la curva estándar en el programa Excell 2007 con un gráfico de la absorbancia a 570/600 nm de los estándares s0-s4 en el eje vertical ("y") frente a la concentración de L-Fenilalanina de los Estándares en el eje horizontal ("x"). Se agregó una "línea de tendencia" para obtener el valor de R^2 y la ecuación de la recta.

c. Cálculo de concentraciones de L-fenilalanina

Las concentraciones de los controles y las muestras de los pacientes se determinaron por regresión lineal utilizando la ecuación de la recta de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$y = mx + b$$

donde,

y = absorbancia de controles o muestras m= pendiente de la curva estándar

b = absorbancia de intercepción

D. Control de Calidad

Se analizaron los controles de calidad proporcionados por el CDC que incluyeron 4 controles internos con valores de concentración conocido de L-fenilalanina (13.25 = 0.0 mg/dL ,13.26 = 100.0 mg/dL, 13.27 = 200.0 mg/dL ,13.28 = 300.0 mg/dL) y 4 controles externos con valores de concentración desconocido de L-fenilalanina los cuales tuvieron los siguientes códigos: 13.21, 13.22, 13.23, 13.24. Los resultados se enviaron al CDC vía electrónica, quien analizó los datos en conjunto con los resultados de los datos de otros laboratorios que participaron en el programa. El CDC reportó los resultados conforme al método utilizado por cada laboratorio utilizando medidas de tendencia central (media, mediana, moda, valor mínimo y valor máximo). Estos controles sirvieron para validar los resultados de las concentraciones de L-fenilalanina en las muestras de pacientes analizadas.

E. Diseño de Investigación

Por medio de estadística descriptiva, se utilizaron medidas de tendencia central y dispersión (media, mediana, moda, valor mínimo, valor máximo y desviación estándar) se determinaron los valores promedio de L-fenilalanina en los recién nacidos y en pacientes con retraso mental de la población estudiada para descartar fenilcetonuria como causa principal de retraso. Se elaboraron cuadros de coincidencia para determinar la validez de resultados con el programa de control de calidad interno (*Proficiency Testing Program*) y externo (*Quality Control Program*) del *Newborn Screening Quality Assurance Program* del CDC.

Se creó una base de datos en el programa SPSS 17.0, por sus siglas en inglés (Statistics Data Editor) con el número de muestras recolectadas durante dos meses, en 2 hospitales nacionales, muestras que ingresaron a INVEGEM y muestras del Centro de Obras Sociales del Santo Hermano Pedro de Antigua Guatemala, departamento de Sacatepéquez.

VII. RESULTADOS

La muestra estudiada de recién nacidos estuvo conformada por 195 neonatos de los cuales el 58.50% (114) fue del género masculino y el 41.50% (81) del género femenino. Durante el estudio se encontró una mayor cantidad de niños (64.62%, 126) con un peso mayor a 6 libras, lo cual evidencia un peso normal al momento del nacimiento. El 2.56% (5) fue de casos gemelares, el 44.62% (87) de las madres se encontró en edades de 19 a 35 años, en las cuales no existe mayor riesgo de producirse una malformación fetal asociado a la edad.

En cuanto a la edad gestacional, el 56.41% (110) nació a término lo cual evita mayores riesgos de que los bebés tengan complicaciones al nacimiento y en su desarrollo. Del total de neonatos al 58.97% (115) se le tomó la muestra después de las 48 horas de nacimiento, lo cual es importante porque han recibido mayor tiempo de lactancia lo que disminuye los resultados falsos negativos; habiendo 76 niños (38.97%) con menos de 48 horas de nacidos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Características generales de la población en estudio de pacientes recién nacidos n= 195.

| Variables | | San Marcos | % | Quetzaltenango | % | INVEGEM | % | TOTAL n | % |
|----------------------|------------|---------------|-------|----------------|-------|---------|-------|------------|------------|
| Género | Femenino | 31 | 42.47 | 19 | 39.58 | 31 | 41.89 | 81 | 41.50 |
| | Masculino | 42 | 57.53 | 29 | 60.42 | 43 | 58.11 | 114 | 58.50 |
| Peso en Libras | <6 | 9 | 12.33 | 3 | 6.25 | 11 | 14.86 | 23 | 11.79 |
| | 6-9 | 64 | 87.67 | 44 | 91.67 | 18 | 24.32 | 126 | 64.62 |
| | >10 | 0 | 0 | 1 | 2.08 | 2 | 2.70 | 3 | 1.54 |
| | ND | 0 | 0 | 0 | 0 | 43 | 58.11 | 43 | 22.05 |
| Edad Gestacional | Prematuros | 18 | 24.66 | 9 | 18.75 | 26 | 35.14 | 53 | 27.18 |
| | A término | 55 | 75.34 | 39 | 81.25 | 16 | 21.62 | 110 | 56.41 |
| | ND | 0 | 0 | 0 | 0 | 32 | 43.24 | 32 | 16.41 |
| Gemelar | Sí | 2 | 2.74 | 1 | 2.08 | 2 | 2.70 | 5 | 2.56 |
| | No | 71 | 97.26 | 47 | 97.92 | 72 | 97.30 | 190 | 97.44 |
| | ND | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.00 |
| Edad de la madre | <19 | 12 | 16.44 | 15 | 31.25 | ND | 0 | 27 | 13.85 |
| | 19-35 | 56 | 76.71 | 31 | 64.58 | ND | 0 | 87 | 44.62 |
| | >35 | 5 | 6.85 | 2 | 4.17 | ND | 0 | 7 | 3.59 |
| | ND | 0 | 0 | 0 | 0 | 74 | 100 | 74 | 37.95 |
| Edad del paciente | <48 horas | 51 | 69.86 | 15 | 21.25 | 10 | 13.51 | 76 | 38.97 |
| | >48 horas | 22 | 30.14 | 33 | 68.75 | 60 | 81.08 | 115 | 58.97 |
| | ND | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 5.41 | 4 | 2.05 |
| TOTAL (n) | | 73 | 100 | 48 | 100 | 74 | 100 | 195 | 100 |

Fuente: Datos obtenidos de fichas epidemiológicas. ND: No se cuenta con los datos

De las muestras evaluadas en el Hospital Nacional de San Marcos 1 (1.3%) de los 73 (100%) recién nacidos tuvo una concentración de L-fenilalanina mayor a 6 mg/dL con el método enzimático colorimétrico. De igual manera 1 (2.0%) de los 48 (100%) recién nacidos evaluados del Hospital Nacional de Coatepeque tuvo una concentración mayor de L-fenilalanina a 6 mg/dL, siendo en ambos casos niños nacidos a término. En el INVEGEM, de los 74 (100%) recién nacidos evaluados todas las concentraciones de L-fenilalanina fueron menores a 6 mg/dL (Cuadro 2).

Cuadro 2. Concentración de L-fenilalanina en sangre según edad gestación estratificada por departamentos en pacientes recién nacidos n=195

| Concentraciones en mg/dL | San Marcos | | | | Quetzaltenango | | | | INVEGEM | | | | Total | % |
|-----------------------------|------------|-------------|----------|------------|----------------|-------------|----------|------------|-----------|------------|----------|----------|------------|------------|
| | <6 | % | >6 | % | <6 | % | >6 | % | <6 | % | >6 | % | | |
| Edad Gestacional | | | | | | | | | | | | | | |
| Prematuros | 14 | 19.2 | 0 | 0 | 9 | 18.8 | 0 | 0.0 | 20 | 27.0 | 0 | 0 | 43 | 33 |
| A término | 41 | 56.2 | 1 | 1.3 | 30 | 62.5 | 1 | 2.5 | 13 | 17.6 | 0 | 0 | 88 | 67 |
| Indetectables* | 17 | 23.3 | 0 | 0 | 8 | 16.7 | 0 | 0 | 41 | 55.4 | 0 | 0 | 66 | |
| Total | 72 | 98.7 | 1 | 1.3 | 47 | 98.0 | 1 | 2.0 | 74 | 100 | 0 | 0 | 195 | 100 |

Fuente: Datos experimentales obtenidos por el método enzimático colorimétrico y encuesta epidemiológica. Prematuro: nacido antes de las 37 semanas de gestación; A término: nacido entre la semana 37 y 42 de gestación; *resultados que se encuentran por debajo del límite de detección.

Con respecto a los pacientes del Hospital de Obras Sociales del Santo Hermano Pedro se evaluaron tres variables género, edad y concentración de L-fenilalanina, solo 1 (2.7%) de los 37 (100%) pacientes, de género femenino y 15 años de edad tuvo una concentración mayor a 6 mg/dL con el método enzimático colorimétrico (Cuadro 3).

Cuadro 3. Principales características y concentración de L- fenilalanina en pacientes del Hospital de obras sociales del Santo Hermano Pedro. n=37

Fuente: Datos Experimentales obtenidos por el método enzimático colorimétrico y por información obtenida por

| Variables | | Sacatepéquez | % |
|---|---------------------------|--------------|------------|
| Género | Femenino | 18 | 49 |
| | Masculino | 17 | 46 |
| | ND* | 2 | 5 |
| TOTAL | | 37 | 100 |
| Edad del paciente⁺⁺ | <10 | 12 | 33 |
| | 10 – 30 | 22 | 59 |
| | >31 | 1 | 3 |
| | ND | 2 | 5 |
| TOTAL | | 37 | 100 |
| Concentración en mg/dL de L-fenilalanina | <6 | 27 | 73 |
| | >6 | 1 | 2.7 |
| | Indetectable ⁺ | 9 | 24.3 |
| TOTAL | | 37 | 100 |

INVEGEM *ND: No se cuenta con los datos, +: Concentración menor al límite de detección. ++: Años

Se detectaron 3 resultados positivos en 195 muestras con concentraciones mayores a 6 mg/dL de L-fenilalanina (Cuadro 4) por el método enzimático colorimétrico, sin embargo al confirmarlas por fluorometría todas las muestras fueron negativas.

Cuadro 4. Pacientes con concentraciones mayores a 6 mg/dL de L-fenilalanina y su confirmación con el método fluorimétrico n=3

| Paciente | Concentraciones de L-fenilalanina en mg/dL | |
|----------|--|----------------------|
| | Método Enzimático-Colorimétrico | Método Fluorimétrico |
| HNSM | 7.8 | 1.8 |
| HNC | 6.9 | 1.9 |
| HOSHP | 13.8 | 1.0 |

Fuente: Datos experimentales. HNSM: Hospital Nacional de San Marcos; HNC: Hospital Nacional de Coatepeque, Quetzaltenango; HOSHP: Hospital de Obras Sociales del Santo Hermano Pedro, Sacatepéquez.

Se determinó la concentración promedio de L-fenilalanina en las poblaciones en estudio, evaluando las medidas de tendencia central de las 129 (62.2%) muestras detectables (Cuadro 5).

Cuadro 5. Medidas de tendencia central de las concentraciones de L-fenilalanina en sangre de las poblaciones en estudio. n=129*

| Medidas de tendencia central | San Marcos | Quetzaltenango | INVEGEM | Sacatepéquez |
|------------------------------|------------|----------------|---------|--------------|
| Media | 1.49 | 2.44 | 1.14 | 1.81 |
| Mediana | 0.87 | 2.33 | 1.45 | 1.89 |
| Moda | 0.15 | 0.06 | 0.60 | 3.21 |
| Mínima | 0.02 | 0.06 | 0.04 | 0.03 |

| | | | | |
|--------|-----|-----|------|------|
| Máxima | 7.8 | 6.9 | 5.22 | 13.8 |
|--------|-----|-----|------|------|

Fuente: Datos Experimentales obtenidos por el método enzimático colorimétrico. *66 datos faltantes que son muestras indetectables.

En el cuadro 6 se muestran los resultados de concentraciones de L-fenilalanina obtenidos por el método enzimático colorimétrico de los controles del *Quality Control Program* (Programa de Control de Calidad) del CDC, con sus respectivas desviaciones estándar y los resultados obtenidos por el CDC con el mismo método, con límites de confianza al 95%, para validación de resultados y estandarización del método. De igual manera se observan los resultados de L-fenilalanina de los controles del *Proficiency Testing Program* (Programa de Pruebas de Aptitud) obtenidos en este estudio, con sus respectivas desviaciones estándar y los resultados obtenidos por los 35 laboratorios restantes que participaron en el mismo programa en el año 2014 utilizando el método enzimático colorimétrico, para el control del desempeño interno y validación de las corridas.

Según los resultados que se muestran en el cuadro 6 no fue posible la validación de las corridas y por lo tanto no se logró la estandarización del método enzimático colorimétrico impidiendo la implementación del método en el INVEGEM, debido a que se presentó una tendencia a obtener resultados por encima del límite de confianza y desviaciones estándar elevadas.

Cuadro 6. Validación de los resultados por medio de controles externos e internos del *Newborn Screening Quality Assurance Program* del CDC.

| Valores obtenidos con los controles del <i>Quality Control Program</i> (Programa de Control de Calidad) | | | | |
|---|--|---------------------|--|--|
| LOTE | Media de resultados obtenida en cinco repeticiones ($\mu\text{mol/L}$) | Desviación estándar | Media QC del CDC ($\mu\text{mol/L}$) | Límites de confianza al 95% |
| 1325 | 99.05 | 20 | 64.8 | 57.4 – 72.1 |
| 1326 | 197.65 | 42 | 156.2 | 137.2 – 175.2 |
| 1327 | 462.372 | 30 | 260.9 | 230.0 – 291.9 |
| 1328 | 394.764 | 41 | 337.5 | 302.9 – 372.2 |
| Valores Obtenidos con los controles del <i>Proficiency Testing Program</i> (Programa de Prueba de Aptitud) n=36* | | | | |
| LOTE | Media de resultados obtenida en tres repeticiones ($\mu\text{mol/L}$) | Desviación estándar | *Media de laboratorios participantes ($\mu\text{mol/L}$) | Valores teóricos según el <i>Proficiency Testing Program</i> ($\mu\text{mol/L}$) |

| | | | | |
|------|--------|----|--------|--------|
| 1321 | 86.21 | 39 | 86.10 | 100.00 |
| 1322 | 325.74 | 52 | 221.18 | 200.00 |
| 1323 | 363.11 | 56 | 330.85 | 300.00 |
| 1324 | 412.04 | 68 | 440.06 | 400.00 |

Fuente: Datos experimentales. QC: control de calidad, *Laboratorios participantes que utilizan el método enzimático colorimétrico para la determinación de L-fenilalanina en sangre.

VIII. DISCUSION

El objetivo de este estudio fue implementar el tamizaje neonatal para fenilcetonuria cuantificando L-fenilalanina por un método enzimático colorimétrico, el cual tiene una sensibilidad de 0,2 mg/dL con linealidad hasta 20 mg/dL. El método utilizado según estudios realizados por el proveedor no presenta ninguna interferencia por parte de antibióticos conocidos, metabolitos y productos no antibióticos (Giovannini, Verducci, Salvatici, Fiori, & Riva, 2007).

Según un estudio realizado a nivel latinoamericano, para tamizar hiperfenilalaninemias, se utiliza mayormente el ensayo de fluorimetría, el cual se establece con un punto de corte de 2,0 mg/dL y en segundo lugar se utiliza el método enzimático colorimétrico con un punto de corte de 4 mg/dL por su menor sensibilidad. (Borrajo, 2012)

Es importante destacar que el punto de corte se establece dependiendo de la metodología utilizada y el país en estudio, algunos autores recomiendan disminuir los niveles de corte para muestras colectadas antes de las 48 horas de vida de los neonatos con el fin de eliminar los resultados falsos negativos, sin embargo, al disminuir los niveles de corte puede resultar en un incremento significativo en el número de resultados falsos positivos. Con el empleo de técnicas más sensibles y la determinación simultánea de L-fenilalanina y tirosina se puede detectar a los recién nacidos afectados antes de las 24 horas de vida, sin que aumente el número de falsos positivos. En esta investigación se escogió el punto de corte según lo establecido en la metodología con base en los puntos de corte utilizados en países latinoamericanos (Costa Rica, México, Argentina y Uruguay) con población similar a la guatemalteca, siendo este de 4 mg/dL. (Baloy, Castells, Frometa, Gonzales, & Marrero, 2004)

En Guatemala y Panamá la incidencia de fenilcetonuria en recién nacidos es de 0 según el estudio “Panorama epidemiológico de la fenilcetonuria (PKU) en Latinoamérica” del Dr. J. C. Borrajo. Sin embargo, en el caso de niños con retraso mental en Guatemala se reporta una frecuencia de 1.11% (Serrano, 2006). El país con mayor incidencia es Brasil con 1:12000 con una cobertura del 85 a 90%. Esta incidencia en Guatemala es influenciada por la carencia de programas legislados para tamizaje neonatal, sin embargo Panamá si cuenta con este programa (con una cobertura del 30%) y aun así su incidencia es cero. De manera que se puede argumentar bajo este hecho que puede existir una incidencia baja en Guatemala. Costa Rica y Uruguay tiene la mayor cobertura con un 98.3% y 99.5% respectivamente y con una incidencia de 1:50,000 y 1:20,000. (Borrajo, 2012)

Desde el 2005 Guatemala ha implementado un programa de tamizaje que incluye esta patología, solamente en una institución del sector público (Hospital Nacional San Juan de Dios). Lamentablemente, este programa es irregular debido al egreso de las madres antes de las 48 horas después del parto, lo cual impide que se puedan evaluar a los niños con la técnica utilizada, ya que uno de los criterios de exclusión es una lactancia mínima de 48 horas y por otro lado al pobre presupuesto brindado por las autoridades competentes. (A. Domínguez, comunicación personal, 16 enero, 2013)

En el cuadro 2 se puede observar que en los departamentos de San Marcos y Quetzaltenango se obtuvieron dos casos positivos con el método enzimático colorimétrico, que se confirmaron como falsos positivos por medio de un método de diferente principio (fluorimetría) al enviar las muestras a un laboratorio de referencia en Argentina (cuadro 4); en el caso de INVEGEM no se encontraron muestras de pacientes por encima del valor de referencia (6 mg/dL). En el Centro de Obras Sociales del Santo Hermano Pedro de Antigua Guatemala, donde se atienden a niños y adultos con retraso mental, el objetivo primordial fue determinar si el retraso mental era causado por concentraciones elevadas de L-fenilalanina. En el cuadro 3 se puede observar que se encontró un caso positivo, que al confirmarse se determinó como falso positivo, demostrando que la causa de retraso mental no se relaciona con fenilcetonuria.

Es importante destacar que solo se confirmaron las muestras con concentraciones por encima de 6 mg/dL a pesar de tener un punto de corte de 4 mg/dL. Este criterio se

estableció debido a que en estudios previos se ha demostrado que los pacientes entre 4 - 6 mg/dL durante las primeras 48 horas de vida, tienden a bajar sus concentraciones durante los próximos días debido a la maduración tardía de enzimas requeridas para el metabolismo de aminoácidos. Otro criterio para confirmar únicamente las muestras con concentraciones mayores a 6 mg/dL fue que en base a los controles externos e internos utilizados (como se explica más adelante), los resultados tuvieron una tendencia a presentar concentraciones por encima de su valor real, incrementando así la probabilidad de obtener resultados falsos positivos e impidiendo la estandarización del método. (Borrajo, 2012; Montoya, & Satizábal, 2007)

En el cuadro 4 se observan tres resultados con concentraciones mayores a 6 md/dL obtenidos con el método enzimático colorimétrico (después de analizar las muestras por duplicado), el cual tiene una sensibilidad analítica de 0.20 mg/dL y una especificidad de 100 % (desviación estándar: 5.33 %). Debido a la falta de estandarización del método los resultados se confirmaron tomando nuevas muestras a los pacientes y mandándolas a analizar a un laboratorio de referencia en Argentina por el método fluorimétrico que es considerado de alta especificidad, sensibilidad y con poca probabilidad de interferencia, con el cual se obtuvieron concentraciones menores a 2 mg/dL; por lo que se concluye que ninguna de las 195 muestras analizadas es positiva para fenilcetonuria. Estas muestras falsas positivas, como se indicó anteriormente, se pueden explicar debido a la tendencia a obtener resultados con concentraciones elevadas.

El peso al nacer es el determinante más importante de las posibilidades que un recién nacido experimente un crecimiento y desarrollo óptimo, es por esto que, la tasa de bajo peso al nacer (recién nacido con cifras inferiores a 2.500 g de peso) se considera como un mal indicador general de salud, siendo una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad infantil y perinatal. Se considera que la mortalidad en el primer año de vida es 14 veces mayor en los recién nacidos con bajo peso, que los niños que nacen con un peso normal (Cornejo, Cabello, Colombo, Flores, & Raimann, 2007).

La repercusión negativa del bajo peso al nacer se puede extender hasta llegar a la edad adulta, experimentando así retraso mental, problemas de aprendizaje, parálisis cerebral, pérdida de la vista y la audición; alteraciones del sistema inmunológico y mayor incidencia

de enfermedades relacionadas al metabolismo, pueden también tener dificultades en su adaptación al medio o diferentes impedimentos físicos y mentales. El porcentaje de bajo peso al nacer fue de 12.33, 6.25 y 14.86 (%) en los Hospitales Nacionales de San Marcos, Quetzaltenango e INVEGEM respectivamente (cuadro 1), al no haber casos positivos en el estudio no se pudo determinar su relación con los niveles de L-fenilalanina en sangre (Cornejo et al., 2007)

La edad de las madres jóvenes (menor a 19 años de edad) y adultas-mayores (mayor a 35 años de edad) se asocia generalmente a alteraciones preexistentes, las cuales se les identifican como grupo de riesgo. En este período de tiempo aparecen enfermedades como la prematuridad, hipertensión arterial crónica, fibroma uterino. En los niños de estas madres se presentan malformaciones congénitas y alteraciones genéticas y metabólicas como la fenilcetonuria, entre otras, que afectan sensiblemente la morbi-mortalidad materno infantil. Estas mujeres cursan un embarazo donde se observa mayor frecuencia de afectaciones médicas obstétricas que favorecen las complicaciones en el parto y aumentan las intervenciones quirúrgicas, registrándose un incremento en muertes fetales y recién nacidos de bajo peso (Baloy et al., 2004; Blau et al., 2010).

De acuerdo con los datos obtenidos de la población estudiada el 13.85% de las madres son menores de 19 años y un 3.59% es mayor a 35 años de edad pero al no existir casos positivos no se puede establecer una relación entre las variables: edad de la madre y edad gestacional con fenilcetonuria.

En el cuadro 5 se puede observar que los niveles de L-fenilalanina encontrados en los grupos estudiados son semejantes entre sí y concordantes con los niveles reportados en países latinoamericanos con una media 1 - 2.5 mg/dL (Borrajo, 2012; Montoya et al., 2007; Céspedes, 2002), sin embargo los controles utilizados demostraron que los resultados de nuestra población tienen concentraciones más elevadas debido a errores sistemáticos, por lo que se espera que la media real de la población se encuentre por debajo de los valores reportados.

El control de calidad es una de las bases en las que se fundamenta la validación de resultados de cualquier metodología, existiendo validaciones inter-laboratorios que son

programas estadísticos de control de calidad que permiten a los laboratorios participantes evaluar su desempeño en la realización de los métodos de prueba dentro de sus propios laboratorios y la validación por medio de muestras de referencia que son proporcionados por organizaciones y en la cual se demuestra que el método provee resultados exactos y precisos comparados con los que proporciona las muestras de referencia.

Para la validación de los resultados obtenidos por el método enzimático colorimétrico se procesaron controles de calidad interno y externo participando en el *Newborn Screening Quality Assurance Program* del CDC, en los subprogramas *Proficiency Testing Program* y *Quality Control Program* los cuales están destinados al control del desempeño interno y el control de calidad de tamizaje neonatal, respectivamente.

De acuerdo al cuadro 7 al comparar los resultados de los lotes 1321 al 1324 con los valores teóricos según el *Proficiency Testing Program* y la media de los resultados de los laboratorios participantes, los resultados de los lotes 1321 y 1324 son aceptables a diferencia de los lotes 1322 y 1323 que tuvieron resultados con una diferencia mayor a 50 $\mu\text{mol/L}$ en comparación con los valores teóricos. También se observa que la desviación estándar entre las repeticiones es alta lo que indica que en los resultados hay un error que pudo deberse a la falta de calibración de las pipetas utilizadas, la falta de la bomba de flujo necesaria para desarrollar el método en condiciones óptimas y el error humano. Esto en conjunto repercute en el desempeño de la implementación del método, así como en la calidad de los resultados obtenidos.

En el cuadro 6 se observa la comparación de los resultados de los lotes 1325 al 1328 con los resultados brindados por el *Quality Control Program* del CDC. Todos los lotes (1325-1328) evaluados muestran una tendencia a caer por encima del límite de confianza superior, lo que permite deducir que todos los resultados obtenidos tienen concentraciones por encima de su valor real. De igual manera se observan que las desviaciones estándar son muy elevadas lo que indica una dispersión significativa en los resultados entre cada repetición por lo que no se logró estandarizar el método colorimétrico, esto debido a la falta de calibración y equipo mencionado anteriormente.

No se implementó el método enzimático colorimétrico en el área de enfermedades metabólicas del INVEGEM, sin embargo, con base en los dos programas de control de calidad a los que se sometieron los resultados se concluye que se debe contar con todo el equipo exigido por el método (que no se utilizó en este estudio) y se debe hacer un control de calidad y calibración del equipo utilizado, con el fin de estandarizar el método, mejorar el desempeño, perfeccionar la técnica y evitar errores sistemáticos. Se recomienda continuar participando en los subprogramas de control de calidad del *Newborn Screening Quality Assurance Program* en conjunto con los controles normales y patológicos del kit utilizados, para mejorar el desempeño del método, permitir validar los resultados y obtener mejoras continuas en la calidad de los mismos.

IX. CONCLUSIONES

- A. No se logró la implementación del método enzimático colorimétrico, debido que el desempeño y validación no permitió su estandarización de acuerdo con los resultados obtenidos del programa de control de calidad del CDC.

- B. Debido a que no se pudo implementar el método, no se determinó la validez de los resultados obtenidos, como también el valor promedio de L-fenilalanina en la población estudiada.

X. RECOMENDACIONES

- A. Se recomienda adquirir la bomba de flujo necesaria para la técnica del método enzimático colorimétrico con el fin de evitar errores sistemáticos.
- B. Seguir participando en el *Newborn Screening Quality Assurance Program*.
- C. Realizar estudios sobre la determinación de fenilcetonuria con el fin de recolectar datos que a largo puedan ser utilizados para establecer la incidencia y prevalencia en la población guatemalteca.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abadie, V., Berthelot, J., Feillet, F., Maurin, N., Mercier, A., Helene, O., Loic, P., (2010). Neonatal screening and long-term follow up of phenylketonuria: the French database. *Early Human Development*. Francia. 65(2): 149-158.
- Barrera, L.& Rodríguez, F. (2006) Fenilcetonuria aspectos generales. Instituto de errores innatos del metabolismo. Facultad de Ciencias, Universidad Javeriana. Colombia. Recuperado de http://www.javeriana.edu.co/ieim/cartillas/fenilcetonuria_2.htm
- Baloy, A., Castells, E., Frometa, A., Gonzales, E. & Marrero, N. (2004). Influencia de la edad en los resultados del cribado neonatal: De hipotiroidismo congénito, fenilcetonuria y galactosemia. *Revista Mexicana Patología Clínica*. 51(4):220-225
- Benítez, V., San Julián, E. y Rodríguez, M. (2001). Fenilcetonuria: a propósito de dos pacientes. *Archivos Pediátricos Uruguay*. 4(72): 293-297.
- Berg, J., Stryer, L. y Tymoczko, J. (2008). *Bioquímica*. España: Editoriales Reverte. 6ta. Edición. Pp. 672-674
- Blau, N., Van Spransen, J., Levy, H. (2010). Fenilcetonuria. *The Lancet*. Estados Unidos. 372(5): 1417-1428.
- Borrajo, G. (2012). Panorama epidemiológico de la fenilcetonuria (PKU) en Latinoamérica. *Act Pediatr*. México. 33(6): 279-286
- California State Department of Health. (1963). Phenylketonuria, and Guthrie inhibition assay screening procedure. *Journal Pediatrics*; 32: 344-346.
- Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC). USA. Recuperado de: <http://www.cdc.gov/labstandards/pdf/nsqap-summaryreport-2012pdf>
- Céspedes, C., Santistebán, I., Rojas, E., Ortiz, D. (1984). Detección de fenilcetonuria y otros errores congénitos del metabolismo en centros de educación especial de Costa Rica. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*. 5(1):17-23.
- Céspedes, C. (2002) 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).

- Cornejo, E.(2003). Abordaje nutricional del paciente fenilcetonúrico o con hiperfenilalaninemia desde el período de lactancia hasta la alimentación completa. *Revista Médica Chile*. Chile. 131(11):1280-1287.
- Cornejo, V., Cabello, J.F., Colombo, M., Flores, A. & Raimann, B. (2007). Evolución clínica de niños con niveles plasmáticos de L-fenilalanina entre 2.1 y 6.0 mg/dl en el período neonatal. *Revista Chilena de nutrición*. 34(3):2-14.
- Chace, D. (2001) What is mass spectrometry? The importance of communicating the concept of mass spectrometry to professionals, media and the consumer. *American Society for Mass Spectrometry*. 23(1): 456-460
- Chuy, S. (1995). Producción, optimización, validación e implementación de la prueba de Guthrie para la detección de L-fenilalanina sanguínea. (Tesis de Licenciatura)Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. Pp. 29-32
- CULTIMED (2003) *Manual básico de microbiología*. Pancreac Química S. A. Cuarta Edición. España. Pp. 4 - 19
- Dalmau, J & Genovés, I. (1995). *Tratamiento nutricional de la fenilcetonuria e hiperfenilalaninemias*. España. Editorial Reverte. Pp. 123-145
- DELFA (2005) *Manual técnico*. Neonatal Phenylalanine kit. Pp. 4-10
- Del Olmo, A. (2008). *Comparación de dos métodos cuantitativos para determinación de fenilcetonuria en neonatos en el hospital General San Juan de Dios* (Tesis de licenciatura). Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. Pp. 8-10
- Duarte, A., Velásquez, D., Coronado, C., Soto, C. (2011). Evaluación del funcionamiento del área de tamizaje neonatal del Hospital San Juan de Dios. (Tesis de Licenciatura) Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. Pp. 1-2
- Escaf, M. (2003). Fenilcetonuria e hiperfenilalaninemia en recién nacidos. *Salud Uninorte*, Universidad del Norte, Colombia. 1(017) 36-39.
- Franklin, M. & Clark, A. (1981). Simple, inexpensive, and rapid way to produce *Bacillus subtilis* spores for the Guthrie Bioassay.*Journal of Clinical Microbiology*. 14(1): 113-115.
- Giovannini, M., Verduci, E., Salvatici, E., Fiori, L. & Riva E. (2007). Phenylketonuria: dietary and therapeutic challenges. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 1(30): 145-152

- Guthrie, R & Susi, A. (1963). A simple phenylalanine method for detecting Phenylketonuria in large populations of newborn infants. *The Journal of Pediatrics*. 32: 338-343.
- González I. (2005). Importancia del conocimiento de la enfermedad Fenilcetonuria y su tratamiento, en los pacientes y sus familias (Tesis de Ciencias de la Salud). Argentina: Universidad de Belgranos. Pp. 12-20
- Guzzetta, A. (2007). What this mass spectrometry. *Stanford University Publications*. Estados Unidos. 15(2): 144-148.
- Hertzberg, V., Hinton, C., Therrell, B., Shapira, S. (2011). Prevalence Rates of Newborn Screening Disorders in Relation to Screening Practices in the United States. *The Journal of Pediatrics*. USA. 1(159): 555-60.
- López C. (1998) Fenilcetonúricos: contiene L-fenilalanina. Consejo Latinoamericano de Información Alimentaria. México. 7(15): 195 - 201.
- Lyon, G. & Adams R. (1996). Techniques for the detection of here dietary metabolic disorders. Boston: The Chemical Rubber. Pp 236.
- Manual of BBL products and Laboratory Procedures*. (1988). Sixth Edition. Power DA, McCuen PJ, eds. Becton Dickinson Microbiology Systems. Pp. 344
- Martínez, L. (2006). Las Hiperfenilalaninemias. Habana: Editorial Clínicas médicas. Primera Edición. Pp. 10-15
- Montoya, J., Satizábal, M. (2007). Caracterización bioquímica y genética de hiperfenilalaninemias en la ciudad de Cali. Colombia 1(28): 38-45
- Oreiro, V. (2007). Resonancia nuclear magnética en el período neonatal y predicción de la evolución del neuro-desarrollo en recién nacidos prematura. *Archivo Argentino de Pediatría*. 105(3): 195-196
- Organización Mundial de la Salud (OMS), (1968). Investigación de las aberraciones congénitas del metabolismo. Serie de Informes técnicos No. 401. Suiza.
- Organización Mundial de la Salud (OMS), (2010). Estadísticas Sanitarias mundiales del 2010. Suiza. Serie de Informes Estadísticos 978.
- Ohshima, T., Sugimoto, H., & Soda, K. (1988). Selective enzymatic determination of L-phenylalanine and phenylpyruvate. *Analytical Letters*. *Genamics Journal Seek* 21:2205-2215.

- Parral, C. (2003) Tamizaje Neonatal. Boletín Girasol.Costa Rica. Recuperado de <http://www.vinv.ucr.ac.cr/girasol-ediciones/archivo/girasol22/presaludfar.htm>
- Pereda, L., Calcáneo, J., Enríquez, R., Badillo, E., Soler, E. (2008). Diagnosis of phenylketonuria by newborn screening. *Medigrafic Artemisa on line*. México. 65. 296-291
- Peña, A. (2006). *Errores congénitos del metabolismo en los RN: guía de diagnóstico del recién nacido*. Hospital San Juan de Dios la Serena, Servicio de Neonatología. Chile. Recuperado de http://www.prematuros.cl/webfebrero06/guissereena/errores_congenitos_metabolismo.htm
- Ruiz, M., Sánchez, F. y Dalmau, S. (2004). Tratamiento nutricional de los errores innatos del metabolismo.España. Editorial Ergón. Pp. 104-175
- Scriver, C. & Clow, C. (1980). Phenylketonuria; Epitome of human biochemical genetics. *The New England journal of Medicine*. 303(24): 1395-1399.
- Scriver C.& Kaufman, S. (2001).The hyperphenylalaninemias. The metabolic basis of inherited disease. McGraw-Hill, Nueva York. Pp.1667-1724
- Serrano, C. (2006). Determinación de la frecuencia de fenilcetonuria, galactosemia e hipotiroidismo congénito, en personas con retraso mental que asisten a dos Centros de Cuidados Especiales en la Ciudad de Guatemala (Tesis de Licenciatura). Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala.Pp. 5-12
- Skoog, Holler & Nieman. (2000) Introducción al estudio de la fluorescencia. Principios de Análisis Instrumental. México: Editorial Mc Graw Hill. Pp. 156-187
- Torres, M. S., Martínez, L. F., Esmer, C. E., González, R., Ruiz, C., Sánchez, A., et al. (2008).Tamiz metabólico neonatal por espectrometría de masas en tándem: dos años de experiencia en Nuevo León. *Salud Pública Mexican*. México 3(50):1
- Therrell, B. (1993). Laboratory methods for neonatal screening. Washington, D.C.: *American Public Health Association*. Pp. 47- 62
- Therrel, B., Becker, W., Chace, D., Cunningham, G., Grady, G., Hoffman, G. Mann, M., Muenzaer, J., Mulvihill, J. & Panny, S. (2001).Using tándem mmas espectrometry for metabolic disease screening amnong newborns. Center for disease control prevention.

- VanSprosen, F., VanDijk, & T. Smith, G. (1996). Large daily fluctuations in tyrosine in treated patients with phenylketonuria (PKU). *The American Journal of Clinical Nutrition*. 64,916-921.
- Velázquez A. (1998) El nuevo tamiz neonatal: una revolución en la pediatría preventiva. *Revista Hospital Médico Infantil Mexicano*. 55 (6): 311-313

XII. ANEXOS

Anexo No.1 Boleta para recolección de datos para recién nacidos

| | | | |
|---|--------------------|----------------|--------------------------------|
| No. _____ | | | |
| Fecha: _____ Hora: _____ | | | |
| TAMIZAJE NEONATAL PARA FENILCETONURIA | | | |
| Institución: _____ | | | |
| Municipio/Depto.: _____ | | | |
| DATOS DE LA MADRE | | | |
| Nombre: _____ | Edad: _____ | | |
| Número de Identificación: _____ | Enfermedad: _____ | | |
| Dirección: _____ | Teléfono(s): _____ | | |
| DATOS DEL RECIÉN NACIDO | | | |
| Masculino | Femenino | Peso _____ gr. | Edad Gestacional _____ Semanas |
| Fecha de nacimiento dd _____ mm _____ aa _____ Hora _____ : _____ | | | |
| Complicaciones: SI _____ NO _____ | | | |
| Cual: _____ | | | |

Anexo No. 2 Boletas de recolección de datos para pacientes con retraso mental

No. _____
Fecha: _____ Hora: _____

TAMIZAJE PARA FENILCETONURIA

Institución: _____
Municipio/Depto.: _____

DATOS DEL PADRE Y/O ENCARGADO

Nombre: _____ Edad: _____
Número de Identificación: _____ Enfermedad: _____
Dirección: _____ Teléfono(s): _____

DATOS DEL PACIENTE

Masculino Femenino Peso _____ gr. Grado de retraso mental _____
Fecha de nacimiento dd _____ mm _____ aa _____ Hora _____ : _____ Coeficiente intelectual _____
Complicaciones: SI _____ NO _____
Cual: _____

Anexo No. 3 Hoja de Consentimiento Informado

Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ciencias Química y Farmacia
Escuela de Química Biológica



Institución _____

Nombre y Firma del encargado _____

IMPLEMENTACIÓN DEL METODO COLORIMETRICO PARA LA DETERMINACIÓN DE FENILCETONURIA EN GUATEMALA. ESTUDIO PILOTO

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Hago constar que he sido informado de manera clara y sencilla sobre el proyecto de tamizaje neonatal para fenilcetonuria que se llevara a cabo durante el período de enero a febrero del año 2014, para lo cual se me explicó que:

1. La fenilcetonuria es un trastorno del metabolismo en el cual el cuerpo no metaboliza adecuadamente un aminoácido, L-fenilalanina, por la deficiencia o ausencia de una enzima.
2. La acumulación de L-fenilalanina resulta tóxica para el sistema nervioso central, ocasionando retraso mental y psicomotor severo entre otros síntomas.
3. Esta enfermedad puede controlarse con un diagnóstico temprano y oportuno, y un tratamiento adecuado.
4. El objetivo del estudio es determinar la presencia de fenilcetonuria en estos pacientes, con propósito de evitar complicaciones provocadas por la presencia de la enfermedad.
5. Para la realización de la prueba se tomarán tres gotas de sangre del talón del paciente, utilizando lanceta y papel filtro.
6. Por la realización de la prueba no se me pagará ni se me cobrará nada, tampoco se le pagará el tratamiento a mi hijo; únicamente será referido a un especialista (Genetista Pediatra) para su evaluación e inicio de tratamiento.

Por lo anterior, estoy conforme con la información que se me ha dado y ofrezco la autorización voluntaria para que a mi hijo(a) _____ de _____ de edad le sea realizada la prueba.

Nombre del padre _____

Nombre de la madre _____

Firma de autorización de
padre, madre o encargado.

Guatemala, _____ de 2013

Anexo No. 4

Figura No. 1 Toma correcta de muestra



Vela, M. (2010). *Optimización del programa de tamiz neonatal en Yucatán*. Sociedad Mexicana de Errores Innatos del Metabolismo y Tamiz Neonatal. México.

Figura No. 2 Toma incorrecta de muestra



Vela, M. (2010). *Optimización del programa de tamiz neonatal en Yucatán*. Sociedad Mexicana de Errores Innatos del Metabolismo y Tamiz Neonatal. México.

Las muestras serán inaceptables por las siguientes razones:

1. Cuando se impregnen varias gotas una sobre otra.
2. Cuando las gotas no tienen los círculos impresos.
3. Cuando se encuentren contaminadas, por ejemplo mezcla con alcohol.