

---

---

## INTERÉS CLÍNICO

El programa para el pesquiasaje neonatal y tratamiento de Hiperfenilalaninemias (HFA) (1) comenzó en 1961 con la determinación de la concentración de fenilalanina (Phe) en sangre seca sobre papel de filtro con la Prueba de Inhibición Bacteriana de Guthrie (2). De esta forma, se hizo posible detectar los recién nacidos con Fenilcetonuria, con una incidencia de 1/16 000 al año (3).

Esta enfermedad es producida por la disminución o deficiencia de la actividad del complejo enzimático hidroxilasa de Phe, lo que provoca la acumulación de Phe en sangre y orina, así como grave retardo mental (4,5).

La concentración de Phe en el recién nacido con Fenilcetonuria puede ser normal hasta el cuarto día de vida, pero aumenta con rapidez al comenzar la alimentación proteínica (1). Para evitar las anomalías clínicas es necesario el diagnóstico temprano (2,6-12) y la aplicación de una dieta deficitaria de Phe antes de la tercera o cuarta semana de vida, con la cantidad suficiente de este aminoácido para el crecimiento normal del niño (13,14).

## FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El UMTEST PKU es un ultramicroensayo fluorescente para la cuantificación de Phe en sangre seca sobre papel de filtro de recién nacidos a partir de las 48 ó 72 horas de edad, obtenida del talón.

La prueba se basa en la reacción de la Phe 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 Phe presente en la mezcla.

---



---

**CONTENIDO DEL ESTUCHE Y PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO**
**Código UMT 1201 (288 pruebas) y Código UMT 1301 (576 pruebas)**

<b>Contenido:</b>	<b>UMT 1201</b>	<b>UMT 1301</b>
Placa de 12 tiras x 8 pocillos	3	6
Tarjeta con Calibradores y Control en sangre seca	2 x 3 curvas	2 x 3 curvas
R1: Tampón Succinato	1 x 15 mL	1 x 15 mL
R2: Ninhidrina	3 x Liofilizado	3 x Liofilizado
R3: L-Leucil-L-Alanina	3 x Liofilizado	3 x Liofilizado
R4: Reactivo de Cobre	1 x 15 mL	1 x 15 mL

Los Calibradores y el Control han sido preparados con sangre humana con un valor de hematocrito del 55 % y dispensados sobre tarjetas de papel de filtro, el cual haya sido homologado por el Centro de InmunoEnsayo, para ser aplicado en tamizajes neonatales, utilizando el Sistema Ultramicroanalítico (SUMA).

Todos los reactivos contienen azida sódica como preservante.

Los Calibradores y el Control, fueron negativos a las pruebas de detección de HBsAg, anti-VIH 1+2, anti-VHC y Sífilis, no obstante deben ser manipulados como materiales potencialmente infecciosos.

**Preparación de las Soluciones de Trabajo:**

**R1:** Listo para el uso.

**R2:** Reconstituya con 2 mL de R1. Permita su completa disolución y mezcle.

**R3:** Reconstituya con 1 mL de R1. Permita su completa disolución, mezcle y añada el contenido al frasco R2. Homogeneice la solución.

**R4:** Listo para el uso.

---

## CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Todos los reactivos deben mantenerse de 2 a 8 °C. En estas condiciones serán estables en el envase original hasta la fecha de vencimiento. No se recomienda la conservación de los reactivos reconstituidos por un tiempo superior a los requerimientos de la prueba.

Las Tarjetas con Calibradores y Control en sangre seca, el Tampón Succinato y el Reactivo de Cobre, una vez abierto el envase y almacenados de 2 a 8 °C pueden ser utilizados por un período de 60 días. Los reactivos R2: Ninhidrina y R3: L-Leucil-L-Alanina, después de reconstituidos pueden ser dispensados en alícuotas, de esta forma son estables durante 15 días, si son almacenados sin mezclar a - 20 °C (evitando la congelación y descongelación).

## MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

- Agua destilada.
- Etanol al 70 % (v/v).
- Hipoclorito de sodio.
- Pipetas de precisión entre 10 y 5000 µL.
- Pipeta multicanal con puntas desechables para 10 µL.
- Incubadora de  $62 \pm 2$  °C.
- Placas o tubos para realizar la elución.

## PRECAUCIONES

- Manipule los Calibradores, el Control y las muestras como potencialmente infecciosos. Utilice guantes desechables. Los materiales utilizados deben colocarse en soluciones desinfectantes (Hipoclorito de sodio al 5 %) o esterilizarse en autoclave.
- Considere a los equipos y accesorios que han estado en contacto directo con la muestra como contaminados. Realice los procedimientos de limpieza que se recomiendan en los manuales de usuario correspondientes.
- Las muestras de sangre seca colectadas sobre papel de filtro el cual haya sido homologado por el Centro de InmunoEnsayo, para ser aplicado en tamizajes neonatales, utilizando el Sistema Ultramicroanalítico (SUMA), no deben permanecer fuera de la temperatura de almacenamiento orientada por más de una semana. Almacenadas entre 2 y 8 °C son estables durante cuatro meses (15).

- 
- Antes de comenzar a trabajar, verifique que todos los reactivos se encuentren a la temperatura de trabajo del laboratorio y que los reactivos R2 (Ninhidrina) y R3 (L-Leucil-L-Alanina), una vez preparados según las especificaciones, se encuentren completamente disueltos.
  - Verifique que las tiras de reacción estén niveladas en el soporte.
  - Utilice puntas limpias o nuevas para la reconstitución y trabajo con las soluciones y las muestras.
  - Garantice el adecuado control de la humedad en todos los pasos de la prueba. Las placas de reacción con las muestras y reactivos deben mantenerse en las cámaras húmedas para evitar su evaporación ya que esto puede alterar los resultados.
  - Verifique periódicamente la exactitud y precisión de las pipetas.
  - Cumpla las normas de manipulación de los equipos utilizados y verifique previamente su adecuado funcionamiento, tenga especial cuidado en las operaciones de pipeteo y lavado.
  - Si utiliza la multipipeta ERIZO para transferir los Calibradores, el Control y las muestras, debe lavar profusamente sus puntas para evitar la contaminación, al menos un lavado de cinco ciclos con agua destilada. Deseche esta después de cada lavado.
  - Evite la exposición a la luz de los frascos que contienen el reactivo R2: Ninhidrina.
  - Evite el contacto de la Ninhidrina con los ojos y la piel. El Reactivo de Cobre puede resultar nocivo por ingestión, así como provocar irritación en los ojos.
  - El juego de reactivos no debe emplearse después de la fecha de vencimiento.
  - Los reactivos del UMTTEST PKU de lotes diferentes no se deben intercambiar.

## PROCEDIMIENTO TÉCNICO

### 1.-Preparación de los Calibradores, el Control y las muestras.

Corte con un perforador para papel un disco de 3 mm de diámetro en la zona central de la mancha de sangre. Dépositelo en un recipiente apropiado y añádale 70  $\mu\text{L}$  de Etanol al 70 %. Incube durante 30 minutos a temperatura entre 20 – 25 °C en cámara húmeda. Homogeneice adecuadamente.

### 2.-Adición de la mezcla de reacción.

Añada 10  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción (R1+R2+R3) en cada pocillo de las tiras de reacción.

### 3.-Adición de los Calibradores, el Control y las muestras a las tiras de reacción.

Transfiera 10  $\mu\text{L}$  de los Calibradores, el Control y las muestras a las tiras de reacción que contienen ya la mezcla de reacción. Homogeneice adecuadamente.

Para la transferencia de los Calibradores, el Control y las muestras se seguirá el siguiente esquema de distribución:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	E	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75
B	A	E	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76
C	B	F	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77
D	B	F	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78
E	C	CB	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79
F	C	CB	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80
G	D	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81
H	D	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82

Estas son las concentraciones aproximadas que deben tener los calibradores y control del ensayo, en cada lote se determinan las concentraciones de los mismos.

Calibrador A:  $\leq 50$   $\mu\text{mol}$  de Fenilalanina/L de sangre total

Calibrador B: 85-115  $\mu\text{mol}$  de Fenilalanina/L de sangre total

Calibrador C: 255-345  $\mu\text{mol}$  de Fenilalanina/L de sangre total

Calibrador D: 510-690  $\mu\text{mol}$  de Fenilalanina/L de sangre total

Calibrador E: 1190-1610  $\mu\text{mol}$  de Fenilalanina/L de sangre total

Calibrador F: 2380-3220  $\mu\text{mol}$  de Fenilalanina/L de sangre total

Control CB (Control del ensayo): 800 – 1000  $\mu\text{mol}$  de Fenilalanina/L de sangre total

**Se recomienda evaluar las muestras por duplicado.**

---

Si utiliza el programa UMTEST PKU para la interpretación automática de los resultados, debe colocar en las posiciones 1 y 2 la primera muestra, en las posiciones 3 y 4 la segunda y así sucesivamente.

**4.-Incubación.**

Incube las tiras de reacción durante una hora a  $62 \pm 2$  °C en cámara húmeda metálica previamente equilibrada a esa temperatura.

**5.-Adición del Reactivo de Cobre.**

Añada 10  $\mu$ L del Reactivo de Cobre en cada pocillo de las tiras de reacción. Homogeneice.

**6.-Incubación.**

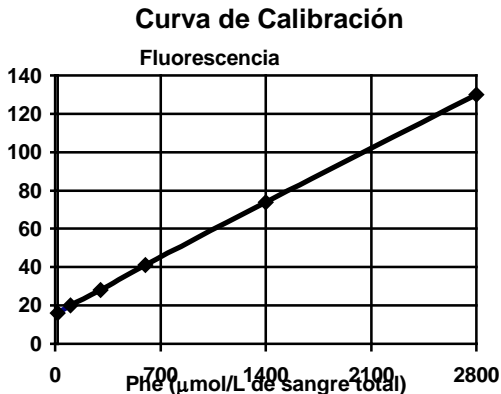
Incube en cámara húmeda a temperatura entre 20 – 25 °C de 5 a 15 minutos.

**7.-Lectura.**

Realice la lectura de la intensidad de la fluorescencia emitida en cada determinación utilizando un lector de la serie SUMA.

**PROCEDIMIENTO DE CÁLCULO**

Los valores de fluorescencia de las muestras de concentración desconocida se interpolan en un gráfico de fluorescencia contra la concentración de Phe correspondiente a la Curva de Calibración, obteniéndose los resultados en  $\mu$ mol de Phe/L de sangre total y en mg de Phe/dL de sangre total.



La validación, interpretación e impresión de los resultados, son realizadas automáticamente por el programa UMTEST PKU. Si no dispone del mismo los resultados obtenidos se determinan comparando los valores de concentración de Phe calculada con el valor de referencia.

### CONTROL DE CALIDAD

I. La curva de calibración debe cumplir las siguientes condiciones:

La media de los dos valores de fluorescencia para cada calibrador deben proporcionar un incremento en fluorescencia proporcional a su concentración, siguiendo un patrón similar al ejemplificado, los valores discordantes son eliminados automáticamente por el programa.

II. El valor de concentración calculado para el control debe encontrarse en el intervalo establecido para el ensayo.

III. Rechaza los resultados de las muestras analizadas en duplicado si el valor de fluorescencia de uno de los duplicados es mayor o igual al nivel de corte y el otro duplicado presenta un valor menor.

## INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Teniendo en cuenta los diferentes factores genéticos y ambientales que actúan sobre poblaciones de diferentes localizaciones geográficas, la práctica internacional recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

Generalmente se acepta como valor límite 240  $\mu\text{mol}$  de Phe/L de sangre total. Las muestras que presentan una concentración igual o superior son consideradas como elevadas.

Factor de conversión más usado:

$\mu\text{mol/L} = 60, 54 \times \text{mg/dL}$

## CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DEL ENSAYO

### 1. PRECISION.

La precisión del método se calculó evaluando muestras comprendidas en tres niveles de concentraciones de Phe: alto, medio y bajo.

**Precisión del UMTEST PKU**

Phe ( $\mu\text{mol/L}$ sangre total)	Intraensayo (n=10)		Interensayo (n=10)	
	DS	CV (%)	DS	CV (%)
<b>400,0</b>	<b>25,6</b>	<b>6,4</b>	<b>27,2</b>	<b>6,8</b>
<b>1089,4</b>	<b>66,5</b>	<b>6,1</b>	<b>74,1</b>	<b>6,8</b>
<b>1622,3</b>	<b>84,4</b>	<b>5,2</b>	<b>87,6</b>	<b>5,4</b>

DS: Desviación Estándar

CV: Coeficiente de Variación

### 2. EXACTITUD.

El porcentaje de recuperación obtenido al añadir diferentes cantidades de Phe a tres muestras de sangre de concentración conocida antes de ser colectadas sobre papel de filtro fue mayor del 90 %.

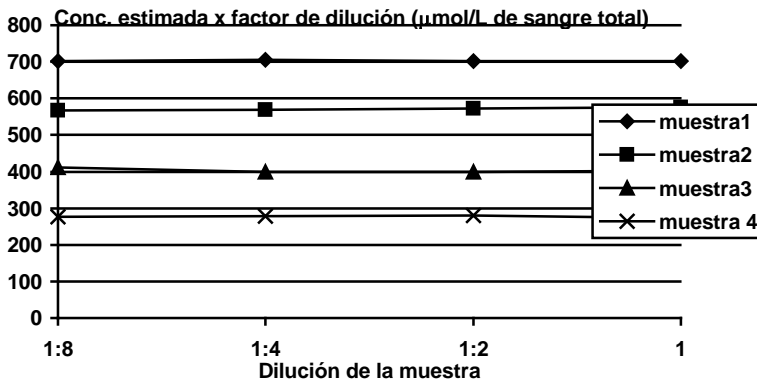


### Recuperación del UMTEST PKU

Muestras	Valor Esperado Phe ( $\mu\text{mol/L}$ de sangre total)	Valor Obtenido Phe ( $\mu\text{mol/L}$ de sangre total)	Recuperación (%)
1	181,6	173,1	95,3
2	423,8	407,4	96,1
3	726,5	733,1	100,9

Se realizaron diluciones seriadas a muestras de sangre con diferentes concentraciones de Phe antes de que fueran colectadas sobre papel de filtro. Las concentraciones calculadas después de la corrección con el factor de dilución fue de  $\pm 5,4\%$  de la concentración original en la muestra pura.

### Paralelismo del UMTEST PKU



---

### 3. DETECTABILIDAD.

La concentración mínima detectable fue de 30  $\mu\text{mol}$  de Phe/L de sangre total. Se definió como la concentración calculada para una fluorescencia equivalente al Calibrador A + 2 DE.

### 4. ESPECIFICIDAD.

La evaluación de la especificidad se realizó mediante el estudio de las posibles reacciones cruzadas con diferentes aminoácidos a concentraciones de 300, 600, 1200 y 2400  $\mu\text{mol/L}$ . El estudio no mostró reacción detectable con los siguientes aminoácidos:

- Treonina
- Lisina
- Leucina
- Tirosina
- Ácido aspártico
- Valina
- Arginina

En el caso de la Metionina, se detectó 1,75 % de actividad a una concentración de 1200  $\mu\text{mol/L}$ .

### BIBLIOGRAFÍA

- 1.-Harrison, T.R.: Trastornos hereditarios del metabolismo de los aminoácidos. En: Principios de Medicina Interna 1967, 1989.
- 2.-Guthrie, R., Susi, A.: A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. Pediatrics 32:338, 1963.
- 3.-Galjaard, H.: Conferencias sobre Genética Humana, Habana 1993.
- 4.-Matalon, R., Michals, K.: Phenylketonuria: Screening, treatment and maternal PKU. Clin. Biochem. 24:337, 1991.
- 5.-Zaldívar, C., Hernández, G.: Errores innatos del metabolismo de los aminoácidos. En: Temas de Bioquímica Clínica 61, 1987.
- 6.-McCaman, M.W., Robins, E.: Fluorometric method for the determination of phenylalanine in serum. J. Lab. Clin. Med. 59:885, 1962.
- 7.-Zu, Y. et al.: Rapid automated quantitation of isoleucine, leucine, tyrosine and phenylalanine from dried blood filter paper specimens. Clin. Chim. Acta 203:191, 1991.

---

8.-Guerasimova, N.S. et al.: Phenylketonuria screening in Moscow using a microplate fluorometric method. Screening 1:27, 1992.

9.-Yamaguchi, A. et al.: Microassay system for newborn screening for phenylketonuria, maple syrup urine disease, homocystinuria, histidinemia and galactosemia with use of a fluorometric microplate reader. Screening 1:49, 1992.

10.-Naruse, H. et al.: A method of PKU screening using phenylalanine dehydrogenase and microplate system. Screening 1:63, 1992.

11.-Chace, D.H. et al.: Rapid diagnosis of phenylketonuria by quantitative analysis for phenylalanine and tyrosine in neonatal blood spots by tandem mass spectrometry. Clin. Chem. 39:66, 1993.

12.-Eisensmith, R.C. et al.: A simple, rapid, and highly informative PCR-based procedure for prenatal diagnosis and carrier screening of phenylketonuria. Prenatal Diagn. 14:12, 1994.

13.-Acosta, P.B., Wenz, E.: Nutrition in phenylketonuria. En: Phenylketonuria and some other inborn errors of aminoacid metabolism. Georg. Thieme Verlag, Stuttgart, 1971.

14.-Sanjurjo, P.: Efectos nutricionales secundarios de la dieta PKU. Prevención de enfermedades metabólicas congénitas 5:13, 1992.

15.-Elves, L.H., Loeber, J.G., The need for standardized bloodspot TSH-calibrators in congenital hypothyroidism screening. Early Human Development 45: 179-190, 1996.

Edición: No. 2

Octubre 16, 2012

UMTEST PKU

Códigos UMT 1201 y UMT 1301 (para la utilización de ponches de 3 mm).

Centro de InmunoEnsayo. Calle 134 y Ave. 25, Apdo. Postal 6653, La Habana, CUBA. Teléfono: 208-2929, Fax: (537) 208-6514.