

Kit de Triagem de Fenilcetonúria (PKU) (400/1000 testes)

Para a determinação quantitativa de L-fenilalanina em amostras de sangue seco de recém-nascidos humanos

*Para Uso em Diagnóstico In Vitro
Somente Para Uso Profissional*



400



5610-01



1000



5610-02



Enzolve Technologies Ltd.
Belfield Innovation Park,
University College Dublin,
Belfield, Dublin 4, Ireland.

Para informações técnicas (em inglês):

Telefone +353 1 716 3633

Fax +353 1 716 3632

E-mail info@enzolve.com

Uso Pretendido

O kit de triagem de fenilcetonúria da Enzolve é um teste colorimétrico baseado na atividade enzimática, desenvolvido para a determinação quantitativa da concentração de fenilalanina em amostras de sangue neonatal coletadas em papel de coleta de espécimen Whatman 903®.

O teste é apropriado para a triagem de recém-natos com PKU/hiperfenilalaninemia. Resultados elevados não são a confirmação do diagnóstico de PKU/hiperfenilalaninemia, mas indicam a urgência em realizar-se exames complementares para essas desordens em recém-natos com resultados positivos.

Introdução

Fenilcetonúria (PKU) é uma, de uma série de desordens hereditárias de hiperfenilalaninemia que podem ser identificadas na triagem neonatal e é a doença causada pela deficiência de uma enzima do metabolismo de aminoácidos mais comumente encontrada¹. A incidência mundial média de PKU é de 1:15.000 e varia de país para país, dependendo do arcabouço étnico da população¹. PKU é um defeito metabólico no qual os pacientes não produzem quantidades suficientes da enzima fenilalanina hidroxilase (E.C. 1.14.16.1), que catalisa a conversão de fenilalanina em tirosina. As altas concentrações de fenilalanina e seus metabólitos no sangue e outros fluidos dos recém-natos interferem com o desenvolvimento adequado do cérebro, resultando num progressivo retardo mental¹⁻³. Este processo pode ser prevenido pelo diagnóstico precoce e uma imediata dieta restringindo a ingestão de fenilalanina, já que a demora em estabelecer-se esse procedimento tem sido associada com um aumento na severidade do retardo¹⁻³.

Além do método enzimático, outros três métodos de triagem são atualmente utilizados no mundo para a determinação do nível de fenilalanina no sangue de neonatos. São eles: (1) o ensaio de inibição bacteriana de Guthrie (BIA)⁴; (2) o método de fluorescência através do uso de ninhidrina e (3) espectrometria de massas tandem (MS/MS)⁶. Os dois primeiros métodos podem sofrer interferência de antibióticos, resultando em falsos negativos e falsos positivos respectivamente para os métodos BIA e de fluorescência. Embora o método MS/MS seja completamente automatizado, possua alta sensibilidade e não sofra nenhuma interferência, requer equipamentos e controles internos muito caros, além de pessoal altamente treinado para sua operação.

O Kit de Triagem de Fenilcetonúria da Enzolve é um teste colorimétrico enzimático, com boa relação preço/qualidade para a determinação quantitativa dos níveis de fenilalanina em amostras de sangue neonatal secas a ser implementado em programas mundiais de triagem em massa de PKU. Este teste não é influenciado por outros aminoácidos e metabólitos comuns ou pela maioria dos antibióticos, reduzindo portanto a possibilidade de obtenção de resultados falsos (positivos e/ou negativos). O teste é rápido (aproximadamente 10 min), muito específico, possui incrível estabilidade e possibilidade de automação.

Princípio Teórico do Ensaio

O Kit de Triagem de PKU da Enzolve usa uma fenilalanina desidrogenase (PheDH) (E.C. 1.4.1.20) microbiana recombinante modificada para catalisar a deaminação oxidativa da fenilalanina sangüínea usando NAD⁺ como co-fator⁷⁻⁹.



O NADH formado é reconvertido em NAD⁺ pelo sistema de reação acoplado diaforase/tetrazoli (2), que previne a inibição da primeira reação pelo produto e empurra o equilíbrio da reação da desidrogenase (1) quase a 100% completa^{10,11}. O uso da diaforase modificada de forma única pela Enzolve permitiu a criação de um método colorimétrico simples, rápido, acurado e sensível em um único passo para a determinação de fenilalanina no sangue.

Componentes do Kit

Componente	Descrição	Quantidade	REF	Quantidade	REF
		400 testes	5610-01	1.000 testes	5610-02
Enzima Reagente	Fenilalanina Desidrogenase Bacteriana Recombinante (1,9-2,1 U/ml*) e Diaforase (3.8-4.2 U/ml*) em tampão com azida sódica como preservante	2 frascos 2 ml/frasco	5511-01	5 frascos 2 ml/frasco	5511-01
Tampão da Enzima	Solução tampão com detergente e azida sódica como preservante	1 frasco 20 ml/frasco	5512-01	1 frasco 50 ml/frasco	5512-02
Coenzima Reagente	NAD ⁺ , sal de tetrazolio, azida sódica (preservante) em tampão - liofilizados.	2 frascos 135 mg/frasco	5513-01	5 frascos 135 mg/frasco	5513-01
Padrões de fenilalanina e Controles internos	Amostras secas de sangue humano em papel Whatman 903® com quatro concentrações diferentes de fenilalanina (Entre 1 – 20 mg/dL) para calibração (S1, S2, S3, S4) e dois controles com baixo (C1) e alto (C2) nível de fenilalanina dentro da faixa de calibração. As concentrações exatas estão indicadas em cada cartão. Fornecidos em saco plástico ziplock com dessecante. 8 amostras por cartão.	1 conjunto (6 cartões por embalagem)	5516-01	1 conjunto (6 cartões por embalagem)	5516-01

* 1U = conversão de 1µmol de substrato por minuto a 25°C, pH 10,5

Os componentes do Kit devem ser armazenados a 2-8°C.

Ítems Adicionais Necessários

REF	Descrição
5600-07	Solução de extração de fenilalanina (10x) - 30% Ácido tricloroacético (TCA). Diluir 10 vezes com água deionizada antes de usar
5600-02	Placas de Ensaio (96 poços, fundo chato)
5600-01	Furador de papel (4,75 mm)
5600-06	Selante para placas
5600-03	Pipetas multi-canal
	Leitor de placas com filtros de 570/690 nm (comprimento de onda duplo) ou filtro 570 nm (comprimento de onda único)

O método de transferência a vácuo requer os seguintes componentes adicionais:

5600-05	Placas com filtro (96 poços, acrílico com membrana de PVDF de 0,2 µm)
5600-04	Coletor de vácuo para placas de 96 poços
	Bomba de vácuo

Coleta de Amostras de Sangue

As amostras de sangue neonatal devem ser coletadas usando-se papel de coleta de amostras Whatman 903®. As amostras devem ser coletadas pelo menos 24 horas após o nascimento (preferencialmente entre 48 e 72 horas). Para resultados acurados, o recém nascido deve estar sob uma dieta apropriada que contenha proteínas, tais como o leite materno ou uma fórmula^{13,14}.

Preparação dos Reagentes e Estabilidade (Suficiente para 200 testes)

- Enzima Reagente:** Ao frasco de **Enzima Reagente** (2 mL) adicionar 9 mL de **Tampão da Enzima** e misturar delicadamente (volume total: 11 mL). A **Enzima Reagente** diluída é estável por 30 dias a 2-8°C.
- Coenzima Reagente:** Reconstituir 1 frasco de **Coenzima Reagente** com 33 mL de água destilada/deionizada e agitar delicadamente. Não agitar vigorosamente. A **Coenzima Reagente** reconstituída é estável por 30 dias a 2-8°C.
- Solução de Reação:** Permitir que a **Enzima Reagente** diluída e a **Coenzima Reagente** reconstituída estejam à temperatura ambiente antes de usar (18-25°C). Misturar a **Enzima Reagente** diluída com a **Coenzima Reagente** reconstituída a uma proporção de 1:3 (1 parte de **Enzima Reagente** diluída e 3 partes de **Coenzima Reagente** reconstituída). **Preparar a Solução de Reação imediatamente antes de usar.** A **Solução de Reação** é estável por no máximo 8 horas a 2-8°C.

Procedimento para o Ensaio**Eluição da Fenilalanina das Amostras de Sangue Secas e Transferência das Amostras****Para transferência manual das amostras**

- Cortar (com furador) discos de 4,75 mm (3/16") de diâmetro dos Padrões de Fenilalanina Sanguínea S1-S4 e Controles C1-C2 fornecidos com o kit e posicionar cada disco em seu

respectivo poço numa placa de titulação de 96 poços (recomenda-se preparar duplicatas). Repetir o procedimento para as amostras de pacientes para os poços restantes e anotar suas posições na placa. Cobrir poços não usados com selante para placas.

2. Pipetar **70** μL de solução de extração de fenilalanina (3% TCA) em cada um dos poços e agitar delicadamente por 30-45 min à temperatura ambiente (18-25°C). Examinar periodicamente os poços para verificar se os discos estão completamente imersos na solução de extração.
3. Após a incubação, transferir **50** μL do material extraído para os poços marcados de forma correspondente em uma placa de ensaio nova.

Para a transferência de amostras usando coletor a vácuo

1. Cortar (com furador) discos de 4,75 mm (3/16") de diâmetro dos Padrões de Fenilalanina Sangüínea S1-S4 e Controles C1-C2 fornecidos com o kit e posicionar cada disco em seu respectivo poço numa placa de titulação de 96 poços **com filtro** (recomenda-se preparar duplicatas). Repetir o procedimento para as amostras de pacientes para os poços restantes e anotar suas posições na placa. Cobrir poços não usados com selante para placas.
2. Pipetar **60** μL de solução de extração de fenilalanina (3% TCA) em cada um dos poços e agitar delicadamente por 30-45 min à temperatura ambiente (18-25°C). Examinar periodicamente os poços para verificar se os discos estão completamente imersos na solução de extração.
3. Após a incubação, transferir o material extraído na placa com filtro para uma nova placa de 96 poços aplicando vácuo por 10 segundos (2x) usando um coletor a vácuo. Seguir as instruções do fabricante cuidadosamente para a correta transferência das amostras.

Ensaio

4. Pipetar 200 μL de Solução de Reação recém-preparada em cada poço da placa de ensaio, tomando cuidado para **evitar a formação de bolhas** e incubar a placa por 10-12 min a temperatura ambiente (18-25°C).
5. Ler a absorvância das placas a 570 e 690 nm (comprimento de onda duplo) ou apenas 570 nm (comprimento de onda único) imediatamente após a incubação.

Cálculos

A maioria dos leitores de placa modernos possui programas que calculam os resultados automaticamente usando regressão linear uma vez fornecidas as concentrações dos Padrões. Entretanto, para cálculos manuais, uma Curva Padrão deve ser obtida colocando-se em gráfico os valores de absorvância obtidos a 570 nm menos os obtidos a 690 nm (ou apenas aqueles obtidos à 570 nm) dos Padrões S1-S4 no eixo Y contra os valores das concentrações de fenilalanina dos Padrões no eixo X. Uma **Curva Padrão** é obtida através da regressão linear entre esses pontos. As concentrações de fenilalanina dos pacientes Controle (C1 e C2) podem ser determinadas a partir dessa Curva Padrão.

Note que todas as concentrações são dadas em unidades de mg/mL. Para converter em $\mu\text{mol/dL}$, uma fator de conversão de 60,5 deve ser usado (1 mg/dL = 60,5 $\mu\text{mol/dL}$).

Uma típica Curva Padrão para o Kit de Triagem de Fenilcetonúria da Enzolve é mostrada na Figura 1. Note que este gráfico é apenas para ilustração. Usuários devem obter sua própria Curva Padrão cada vez que realizarem o ensaio.

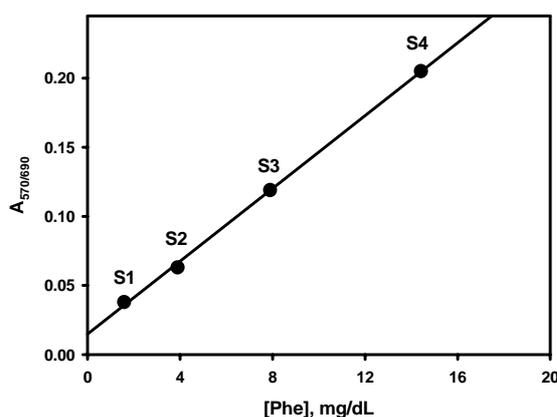


Figura 1. Uma típica Curva Padrão para o Kit de Triagem de Fenilcetonúria da Enzolve

Controle de Qualidade/Padronização

Os Padrões de Fenilalanina e Controles devem ser incluídos em cada placa. Controles internos nas faixas de concentração de fenilalanina baixa (C1) e alta (C2) estão incluídos no kit. Estes controles deve ser incluídos em cada ensaio para monitorar a performance e fidelidade do ensaio. Do mesmo modo, controles externos de referência contendo fenilalanina em diferentes níveis devem ser incluídos rotineiramente.

Os resultados do ensaio só são válidos se as concentrações de cada controle encontrarem-se dentro da faixa de concentração mencionada nos cartões controle. Os resultados do ensaio são inaceitáveis se **qualquer** desses valores estiver fora das especificações. Nesse caso, os resultados da amostra do paciente **não** devem ser reportados.

Naquelas amostras onde os valores de fenilalanina estão abaixo do limite aceitável de detecção, o ensaio deve ser repetido para excluir-se a possibilidade de erros de manipulação das amostras ou durante o procedimento.

Tanto os Padrões de fenilalanina sanguínea quanto os controles estão de acordo com os padrões estabelecidos pelo *Second ISNS (International Society for Neonatal Screening) Reference Preparation for Neonatal Screening (2nd ISNS-RPNS)*.

Faixas Esperadas

Um total de 450 amostras secas de sangue foram testadas usando o Kit de Triagem de Fenilcetonúria (PKU) da Enzolve. Os valores reais das concentrações de fenilalanina eram inferiores a 2,1 mg/dL e apresentaram uma distribuição Gaussiana com uma média de 0,69 mg/mL com um desvio padrão de 0,33 mg/mL, que corresponde à faixa de valores descrita na literatura^{16,17}.

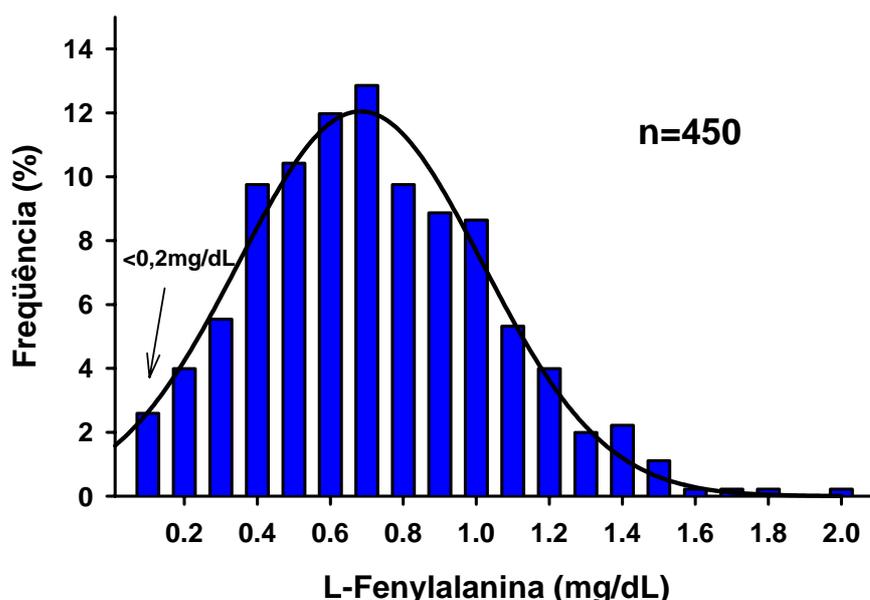


Figura 2. Distribuição Gaussiana do nível de fenilalanina no sangue de uma população saudável

Os dados na Tabela abaixo representam os valores de *cut-off* derivados estatisticamente nos percentis 95, 99 e 99,9 para os níveis de fenilalanina obtidos usando o Kit de Triagem de Fenilcetonúria (PKU) da Enzolve.

Percentil	Valores de <i>Cut-off</i> (mg/dL)
95	1,34
99	1,54
99,9	1,78

É recomendável que cada laboratório estabeleça sua própria faixa normal e valores de *cut-off* estatísticos.

Linearidade e Sensibilidade

O Ensaio de Triagem de PKU da Enzolve é linear até uma concentração de fenilalanina no sangue de 20 mg/mL, obtido de acordo com a Diretiva Proposta EP6-P¹⁵ do CLSI (*Clinical and Laboratory*

Standards Institute, antigo NCCLS). Seguindo a mesma diretiva, o nível mínimo de fenilalanina detectável com o Kit foi estimado em 0.2 mg/mL.

Dados Comparativos

Amostras secas de sangue de pacientes foram analisadas usando-se o Kit de Triagem de Fenilcetonúria da Enzolve, outro ensaio enzimático comercial e o método padrão de espectrometria de massas tandem (MS/MS). As amostras selecionadas para este estudo foram coletadas de indivíduos normais, bem como de pacientes com diagnósticos de PKU já confirmado ou com outras desordens mentais (não-PKU).

Os valores obtidos com o Kit Enzolve são ligeiramente inferiores aos valores obtidos pelo método de MS/MS, enquanto que os valores obtidos pelo produto competidor são 20% mais altos que os valores obtidos pelo MS/MS e mostraram um coeficiente de correlação inferior (Figura 3)

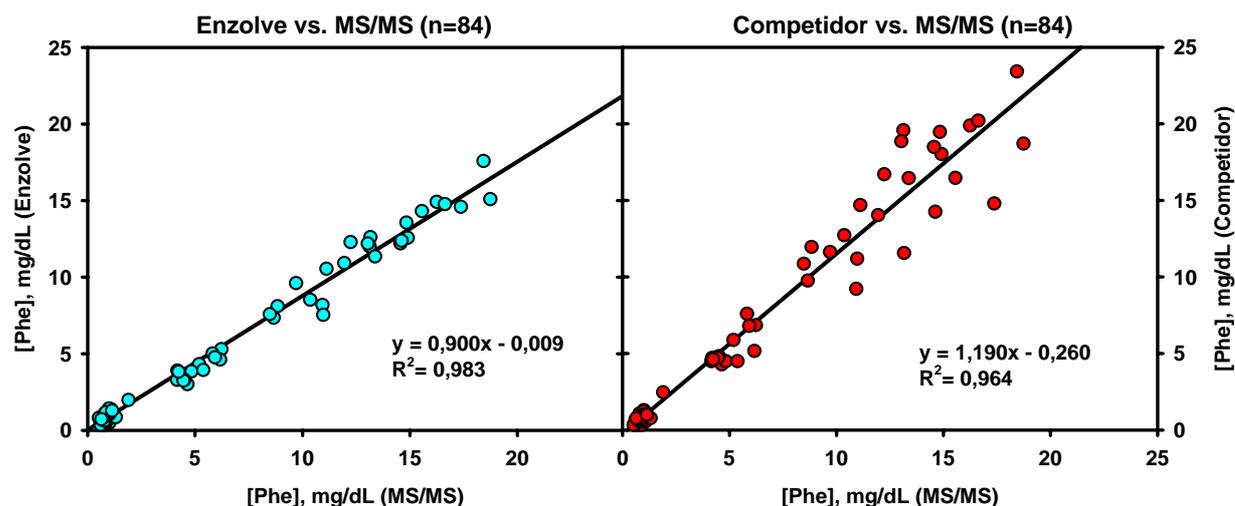


Figura 3. Comparação das concentrações de fenilalanina sanguínea determinadas por dois métodos enzimáticos (Enzolve e produto competidor) com os resultados obtidos por espectrometria de massas tandem

Especificidade e Substâncias que podem interferir com o ensaio

Aminoácidos comuns, antibióticos e seus metabólitos foram usados para testar a especificidade do Ensaio de Triagem de Fenilcetonúria (PKU) da Enzolve. A única substância testada que potencialmente pode interferir com o ensaio é a tetraciclina. Nenhuma outra interferência foi observada na presença de diferentes antibióticos comumente utilizados ou seus metabólitos, que poderiam resultar em falsos negativos ou em falsos positivos.

Precisão do Ensaio

A precisão inter e intraensaios do método Enzolve foi calculada para avaliar os resultados para a mesma amostra em diferentes ensaios (testes interensaio) ou para avaliar as réplicas das mesmas amostras em uma placa (testes intraensaio).

Tipo de Estudo	Resultados		
	Faixa de Concentração (mg/dL)	CV (%)	N
Varição Inter-Ensaio	3,55 – 16,54	5,2 – 10,2	40
Varição Intra-Ensaio	3,85 – 15,43	5,3 – 11,5	20

Precauções e Comentários

Todas as soluções contêm 0,095% de azida sódica como preservante. A azida sódica pode reagir com encanamentos de chumbo e cobre, formando compostos altamente explosivos. Ao descartar os reagentes que contêm azida, grandes quantidades de água devem ser usadas na lavagem de materiais e pias para evitar o acúmulo deste reagente no encanamento.

A solução de extração de amostra contém 3% de ácido tricloroacético (TCA) que é corrosivo. Medidas apropriadas de segurança devem ser tomadas para a manipulação desta solução.

Os Padrões de Fenilalanina e os Controles são preparados usando-se amostras de sangue humano negativas para a presença de anticorpos contra HIV 1 e 2, antígeno de superfície de Hepatite B e Hepatite C. Entretanto, todas as amostras de origem humana devem ser consideradas como potencialmente perigosas e precauções apropriadas devem ser tomadas para a manipulação e descarte dessas amostras.

Sangue coletado em menos de 24 h pode resultar em falsos negativos ou falsos positivos.

Resultados elevados devem ser confirmados através de outros métodos.

É recomendável que cada laboratório estabeleça sua própria faixa normal e valores de *cut-off* estatísticos.

O Kit de Triagem de Fenilcetonúria (PKU) da Enzolve deve ser usado por pessoal apropriadamente treinado e qualificado. Não deve ser usado para auto-diagnóstico e não deve ser vendido em farmácias.

É recomendável que todos os usuários familiarizem-se com o kit antes de reportar resultados.

É recomendável que os resultados sejam interpretados por profissional treinado(a) e que outras informações clínicas sejam consideradas antes de se proceder à intervenção clínica.

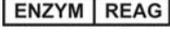
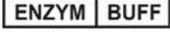
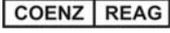
É recomendável que todos os padrões, controles e amostras sejam testados em duplicatas, até que o pessoal do laboratório esteja treinado no procedimento do teste. É compulsório:

- a. Incluir Padrões e Controles em cada placa.
- b. Manter todos os reagentes (Padrões e Controles estoque ou diluídos/reconstituídos) a 2-8°C em frascos fechados e permitir que os reagentes alcancem temperatura ambiente antes de serem utilizados.
- c. Seguir estritamente o protocolo para obter resultados confiáveis. Quaisquer modificações feitas em reagentes ou no procedimento do ensaio são de responsabilidade do usuário.
- d. Manter e calibrar apropriadamente o equipamento usado para o ensaio. Todos os equipamentos devem possuir selos de qualidade.
- e. Não usar o kit ou seus componentes após a data de vencimento indicada nas etiquetas.
- f. Não usar soluções diluídas/reconstituídas após os períodos recomendados de estabilidade ou se elas tornarem-se túrbidas ou descoloridas.
- g. Não usar nenhum componente que esteja quebrado ou que visualmente pareça contaminado.
- h. Não reutilizar placas de ensaio de forma a reduzir as chances de potenciais resultados positivos falsos.

Referências

1. Scriver CR, Kaufman S. (2002) in: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases (Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S, Valle D., Childs, B, Kinzler, K.W., Vogelstein, B. eds.) VIII edition. McGraw Hill, 1667
2. Waisbren SE, Mahon BE, Schnell RR, Levy HL (1987) Pediatrics 79:351
3. Smith L, Beasley MG, Ades AE (1990) Arch Dis Childhood 65:472
4. Guthrie R, Susi A (1963) Pediatrics 32:338
5. Hoffman GL, Laessig RH, Hassemer DJ, Makouski ER (1984) Clin Chem 30:287
6. Chace DH, Sherwin JE, Hillman SL, Lorey F, Cunningham GC (1998) Clin Chem 44:2405
7. Asano Y, Nakazawa A, Endo K (1987) J Biol Chem 262:10346
8. Wendel U, Hummel W, Langenbeck U (1989) Anal Biochem 180:91
9. Wendel U, Koppelkamm M, Hummel W, Sander J, Langenbeck U (1990) Clin Chim Acta 192:165
10. Guilbault GC, Kramer DN (1964) Anal Chem 36:2497
11. Guilbault GC, Kramer DN (1965) Anal Chem 37:1219
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards (1997) Approved Standard LA4-A3 "Blood collection on filter paper for neonatal screening programs". 3rd edition, NCCLS, Villanova, PA
13. Doherty LB, Rohr FJ, Levy HL (1991) Pediatrics 87:240
14. American Academy of Pediatrics, Committee on Genetics: Issues in Newborn Screening (1992) Pediatrics 89:345
15. National Committee for Clinical Laboratory Standards (1986) Proposed Guideline EP6-P "Evaluation of the linearity of quantitative analytical methods" NCCLS, Villanova, PA
16. Reilly A. A et al. (1998) Clin Chem 44:317-326
17. Koch R. K. Am Fam Physician (1999) 60:1462-1466

Símbolos recomendados pela Diretiva de Diagnóstico In Vitro (IVDD 98/79/EC)

 0050	- Conformidade Européia
 REF	- Número de Catálogo
 LOT	- Número do Lote
	- Consulte Instruções de Uso
 IVD	- Para Uso em Diagnóstico In Vitro
	- Fabricante
	- Usar até
	- Suficiente para <n> testes
	- Temperatura Limite
 ENZYM REAG	- Enzima Reagente
 ENZYM BUFF	- Tampão Enzima
 COENZ REAG	- Coenzima Reagente
 STD DBS	- Padrão de Sangue Seco
 CONTROL DBS	- Controle de Sangue Seco