

Kit de Cribado de Fenilcetonuria (PKU) (400/1000 test)

Para la determinación cuantitativa de L-fenilalanina en muestras de sangre seca de humanos recién nacidos

*Para Uso Diagnóstico In Vitro
Solamente Para Uso Profesional*



400



5610-01



1000



5610-02



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

Para informaciones técnicas (en inglés):

Teléfono +353 1 716 3633

Fax +353 1 716 3632

E-mail info@enzolve.com

Uso previsto

El kit de cribado de Fenilcetonuria (PKU) de Enzolve es un test colorimétrico basado en la actividad enzimática diseñado para la determinación cuantitativa de la concentración de fenilalanina en muestras de sangre neonatal recogidas en papel de muestras Whatman 903®

La prueba es adecuada para la detección de PKU/hiperfenilalaninemia en recién nacidos. Unos resultados elevados no constituyen una confirmación del diagnóstico de PKU/hiperfenilalaninemia, pero indican que se debe realizar un estudio más detallado para identificar la presencia de estos trastornos en los neonatos con resultados positivos.

Introducción

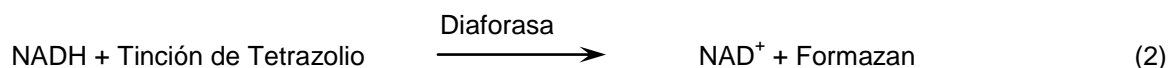
La fenilcetonuria (PKU) es uno de entre una diversidad de desórdenes hereditarios de hiperfenilalaninemia, que pueden ser identificados mediante cribado neonatal, y que está causado por la deficiencia de una enzima en el metabolismo de aminoácidos¹. La incidencia mundial promedio de la PKU es 1:15.000 y varía de país a país y dependiendo del origen étnico de la población¹. Se trata de un defecto metabólico en el que los pacientes no producen la cantidad suficiente de la enzima fenilalanina hidroxidasa (EC 1.14.16.1), que cataliza la conversión de la fenilalanina en tirosina. Las altas concentraciones de fenilalanina y sus metabolitos en sangre junto con otros fluidos de los recién nacidos, interfieren en un desarrollo adecuado del cerebro, dando como resultado un progresivo retardo mental¹⁻³. Este proceso se puede prevenir mediante un diagnóstico precoz y una restricción inmediata de la ingesta de fenilalanina en la dieta, ya que la demora en tomar las medidas necesarias se ha asociado con una mayor gravedad del retraso¹⁻³.

Además del método enzimático, los otros tres métodos utilizados actualmente en todo el mundo para la determinación del nivel de fenilalanina en sangre de los recién nacidos son los siguientes: (1) Ensayo de inhibición bacteriana de Guthrie (BIA)⁴; Método de fluorescencia con el uso de ninhidrina⁵ y (3) Espectrometría de masas en tándem (MS/MS)⁶. Los dos primeros métodos pueden sufrir interferencias por parte de antibióticos lo que puede dar lugar a falsos negativos y a falsos positivos, respectivamente, para la BIA y los métodos de fluorescencia. Aunque el método MS/MS está totalmente automatizado, tiene alta sensibilidad y está libre de cualquier interferencia, requiere un equipo y controles internos de alto coste, así como personal altamente cualificado para su utilización.

El kit de cribado de Fenilcetonuria (PKU) de Enzolve, es un test colorimétrico enzimático, con buena relación calidad/precio, para la determinación cuantitativa de los niveles de fenilalanina en muestras de sangre seca neonatales que se aplicarán en los programas de cribado de PKU en todo el mundo. No se ve afectado por otros aminoácidos o sus metabolitos, ni por la mayoría de los antibióticos, reduciendo así la posibilidad de obtener falsos positivos o falsos negativos. Es rápido (Aprox. 10 minutos), muy específico, alta estabilidad y posibilidad de automatización.

Principio Teórico del Ensayo

El Kit de Cribado de PKU de Enzolve utiliza una Fenilalanina Deshidrogenasa (PheDh) (E.C 1.4.1.20) microbiana recombinante modificada para catalizar la desaminación oxidativa de la fenilalanina sanguínea usando NAD⁺ como cofactor⁷⁻⁹.



El NADH formado se convierte de nuevo en NAD⁺ gracias al sistema Diaforasa/Tetrazolio (2), lo que impide la inhibición de productos y empuja el equilibrio de la reacción de la Deshidrogenasa (1) a casi el 100% de rendimiento^{10,11}. El uso de Diaforasa, diseñado exclusivamente por Enzolve, ha permitido la creación de un método colorimétrico simple, de un solo paso, rápido, preciso y sensible para la determinación de fenilalanina en la sangre.

Componentes del Kit

Componente	Descripción	Cantidad	REF	Cantidad	REF
		400 tests	5610-01	1,000 tests	5610-02
Reactivo Enzimático	Fenilalanina Deshidrogenasa Bacteriana Recombinante (1,9-2,1 U/ml *) y Diaforasa (3.8-4.2 U/ml *) tampón con azida de sodio como conservante	2 viales 2 ml/vial	5511-01	5 viales 2 ml/vial	5511-01
Tampón Enzimático	Solución tampón con detergente y azida de sodio como conservante	1 vial 20 ml/vial	5512-01	1 vial 50 ml/vial	5512-02
Reactivo Coenzimático	Polvos secos de NAD ⁺ , sal de Tetrazolio, tampón y azida de sodio como conservante	2 viales 135 mg/vial	5513-01	5 viales 135 mg/vial	5513-01
Fenilalanina Estándares y Controles	Muestras de sangre seca humana en papel de Whatman 903 [®] con cuatro concentraciones diferentes de fenilalanina (Rango de 1- 20 mg /dl) para la calibración (S1, S2, S3, S4) y dos controles con baja (C1) y alta (C2) concentración de fenilalanina en el rango de calibración. Las concentraciones exactas se dan en cada tarjeta. Se suministra en plástico ziplock con desecante. 8 muestras por tarjeta.	1 set (6 tarjetas por paquete)	5516-01	1 set (6 tarjetas por paquete)	5516-01

* 1U = conversión de sustrato 1µmol por minuto a 25°C, pH 10.5

Los componentes del kit deben ser almacenados a 2-8°C.

Artículos adicionales Requeridos

REF	Descripción
5600-07	Solución de extracción de fenilalanina (10x) 30% Ácido Tricloroacético (TCA). Diluir 10 veces con agua desionizada antes de usar.
5600-02	Placas de Ensayo (96 pocillos, fondo plano)
5600-01	Perforador (4.75 mm)
5600-06	Sellador de placas
5600-03	Pipetas Multi-canal
	Lector de placas con filtros de 570/690 nm (longitud de onda dual) o filtro de 570 nm (una única longitud de onda)

El método de transferencia de vacío requiere los siguientes componentes adicionales:

5600-05	Placas con Filtro (96 pocillos, acrílico con membrana de 0.2 µm de PVDF)
5600-04	Colector de vacío para placas de 96 pocillos. Bomba de vacío.

Tomas de Muestras de Sangre

Las muestras de sangre neonatal se deben tomar usando el papel de recogida de muestras Whatman 903[®] siguiendo el procedimiento estándar LA4-A3¹² aprobado por la NCCLS. Las muestras deben tomarse al menos 24 horas después del nacimiento (preferentemente entre 48 y 72 horas). Para obtener resultados correctos, el recién nacido debe estar bajo una dieta apropiada que contenga proteínas, como la leche materna o fórmula infantil^{13,14}.

Preparación de los Reactivos y Estabilidad (Suficiente para 200 pruebas)

- Reactivo Enzimático:** a 1 vial de **Reactivo Enzimático** (2 ml) se añade 9 ml de **Tampón Enzimático** y se mezcla cuidadosamente (volumen total 11 ml). El **Reactivo Enzimático** diluido es estable durante 30 días a 2-8°C.
- Reactivo Coenzimático:** Reconstituir 1 vial de **Coenzima Reactiva** con 33 ml de agua destilada/desionizada y agitar suavemente. No agitar vigorosamente. El **Reactivo Coenzimático** es estable durante 30 días a 2-8°C.
- Solución de Trabajo:** permitir al **Reactivo Enzimático** diluido y al **Reactivo Coenzimático** reconstituido alcanzar la temperatura ambiente antes de su uso. Mezcle el **Reactivo Enzimático** diluido con el **Reactivo Coenzimático** en proporción de 1:3 (1 parte de **Reactivo Enzimático** por 3 partes de **Reactivo Coenzimático**). **Prepare la Solución de Trabajo en el momento previo a su utilización.** La **Solución de Trabajo** es estable por un máximo de 8 horas a 2-8°C.

Procedimiento Para el Ensayo**Elución de Fenilalanina de Muestras Secas de Sangre Y Transferencia de Muestras****Para la Transferencia Manual de las Muestras**

- Cortar (con punzón) discos de 4,75 mm (3/16") de diámetro de los estándares de fenilalanina S1-S4 y de los controles C1-C2 suministrados con el kit en sus respectivos pocillos de una

placa de microtitulación de 96-pocillos (se recomienda la preparación de duplicados). Corte los discos que tienen las muestras de los pacientes, transfíralos a los pocillos individuales restantes y anote su posición en la placa. Cubrir los pocillos sin usar con un sellador de placas.

- Pipetear **70** μL de la solución de extracción de Fenilalanina (3% TCA) dentro de los pocillos y agitar suavemente la placa durante 30-45 minutos a temperatura ambiente (18-25°C). Compruebe periódicamente los pocillos para asegurarse de que todos los discos perforados están completamente sumergidos en la solución de extracción.
- Después de la incubación, transfiera **50** μL del material extraído de cada pocillo a los pocillos correspondientes en una nueva placa de ensayo.

Para la Transferencia de Muestras Mediante un Colector de Vacío

- Cortar (con punzón) discos de 4,75 mm (3/16") de diámetro de los estándares de fenilalanina S1-S4 y de los controles C1-C2 suministrados con el kit en sus respectivos pocillos de una placa de **filtro** de 96-pocillos (se recomienda la preparación de duplicados). Corte los discos que tiene las muestras de los pacientes, transfíralos a los pocillos individuales restantes y anote su posición en la placa. Cubrir los pocillos in usar con un sellador de placas.
- Pipetear **60** μL de la solución de extracción de Fenilalanina (3% TCA) dentro de los pocillos y agitar suavemente la placa durante 30-45 minutos a temperatura ambiente (18-25°C). Compruebe periódicamente los pocillos para asegurarse de que todos los discos perforados están completamente sumergidos en la solución de extracción.
- Después de la incubación, transfiera el material extraído de la placa de filtro a los pocillos correspondientes en una nueva placa de ensayo aplicando vacío por 2x10 segundos usando un colector de vacío. Por favor, siga las instrucciones del fabricante cuidadosamente para una correcta transferencia de las muestras.

Prueba

- Pipetear 200 μL de la Solución de Trabajo recientemente preparada en cada uno de los pocillos de la placa de ensayo, asegurándose de que **no se crean burbujas**, e incube la placa durante 10-12 minutos a temperatura ambiente (18-25°C).
- Lea la absorbancia de la placa a 570 y a 690 nm (longitud de onda dual) o sólo a 570 nm (una única longitud de onda) inmediatamente después de la incubación.

Cálculo de los Resultados

La mayoría de los lectores de placas modernos incorporan un software que calcula los resultados automáticamente mediante regresión lineal, una vez dadas las concentraciones de los estándares. Sin embargo, para cálculos manuales, se debe construir una curva estándar colocándose en la gráfica los valores de absorbancia obtenidos a 570 nm menos los obtenidos a 690 nm (o sólo las obtenidas a 570 nm) de los estándares S1-S4 en el eje-Y frente a la concentración de Fenilalanina sobre el eje-X. La línea recta de mejor ajuste se dibuja a través de estos puntos para dar como resultado la curva estándar. Las concentraciones de fenilalanina de los controles (C1 y C2) y las muestras de los pacientes se pueden leer ahora directamente en esta curva estándar.

Tenga en cuenta que todas las concentraciones se dan en mg/dl. Para convertirlo en $\mu\text{mol/dl}$, se debe utilizar un factor de conversión ($1\text{mg/dl} = 60,5 \mu\text{mol/dl}$).

A continuación se muestra una típica curva estándar para el kit de detección de Fenilcetonuria (PKU) de Enzolve (Figura 1). Tenga en cuenta que este gráfico es sólo con fines ilustrativos. Los usuarios deben construir su propia curva estándar cada vez que se realiza el ensayo.

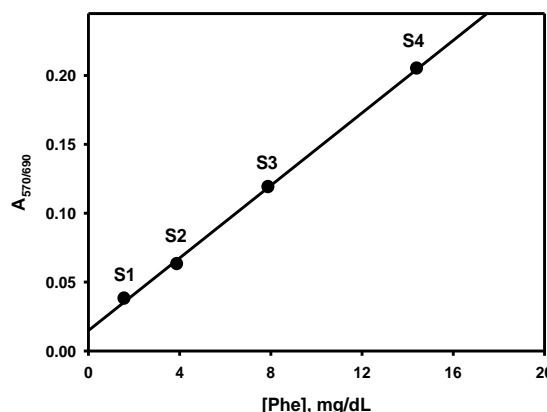


Figura 1. Una Típica Curva Estándar para el Kit de Cribado de Fenilcetonuria (PKU) de Enzolve

Control de Calidad/Trazabilidad

Las manchas de sangre seca estándar y control deben procesarse en cada placa. Los controles internos en el bajo (C1) y en el alto (C2) rango de las concentraciones de fenilalanina están incluidos en el kit. Estos controles deben ser incluidos en cada ensayo con el fin de supervisor el rendimiento y la fiabilidad de la prueba. Igualmente, controles de referencia externos que contengan fenilalanina en diferentes niveles deberían ser rutinariamente incluidos.

Los resultados del ensayo son válidos si las concentraciones de cada control se encuentran dentro de los límites que se ofrecen en las tarjetas de control. Los resultados del ensayo son inaceptables si los valores medidos para **cualquiera** de los controles caen fuera de las especificaciones. En este último caso, **no** debe informarse de los resultados de la muestra del paciente.

En las muestras donde los valores de fenilalanina se encuentran por debajo del límite aceptable de detección, se deberá repetir la prueba para descartar errores de muestreo o de mal procedimiento.

El calibrado de los estándares y controles incluidos en el kit de cribado de Fenilcetonuria (PKU) de Enzolve se ajustan a los establecidos por Second ISNS Reference Preparation for Neonatal Screening (2nd ISNS-RPNS).

Valor de Variación Estimado

Se realizaron pruebas de rutina a un total de 450 Muestras de Sangre Seca usando el Kit de Cribado de Fenilcetonuria (PKU) de Enzolve. Los valores reales de las concentraciones de fenilalanina mostraron valores inferiores a 2.1 mg/dL y seguían una distribución Gaussiana con una media de 0.69 mg/dL y una desviación estándar de 0.33 mg/dL, que están dentro del rango de valores aportados por la bibliografía^{16,17}.

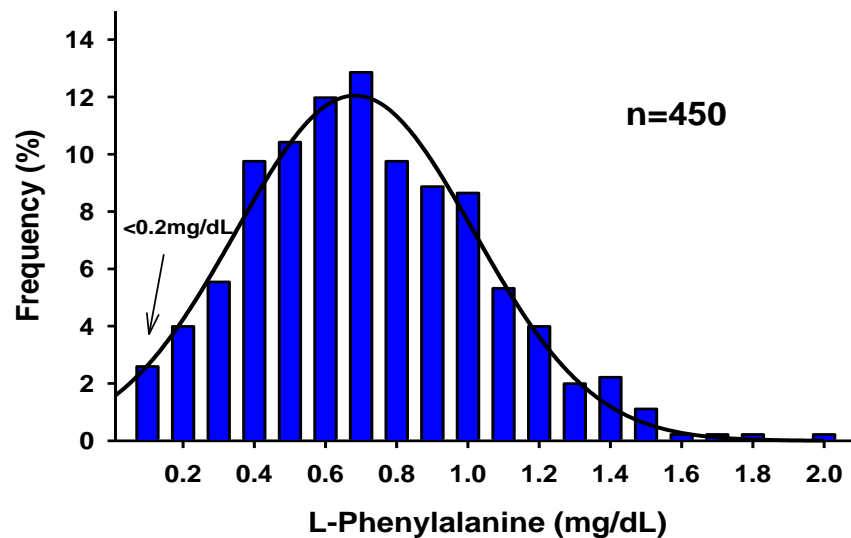


Figura 2. Distribución Gaussiana de los niveles de fenilalanina sanguínea en población sana.

Los datos de la siguiente tabla representan los valores de cut-off derivados estadísticamente en los percentiles de 95, 99 y 99.9 para los niveles obtenidos de fenilalanina usando el Kit de Cribado de Fenilcetonuria de Enzolve Kit

Percentil	Valores Cut-off (mg/dL)
95	1.34
99	1.54
99.9	1.78

Se recomienda que cada laboratorio obtenga su propio valor de variación normal y de corte estadístico.

Linealidad y sensibilidad

El ensayo de cribado de PKU de Enzolve es lineal hasta una concentración en sangre de fenilalanina de 20 mg/dl evaluados de acuerdo con las Directrices de NCCLS EP6-P¹⁵. Siguiendo la misma pauta se estimó que el nivel mínimo de fenilalanina detectable es de 0.2 mg/dl.

Datos Comparativos

Muestras de sangre seca de pacientes fueron analizadas utilizando el Kit de Cribado de Fenilcetonuria (PKU) de Enzolve, otro ensayo enzimático comercial y el método estándar de espectrometría de masas tándem (MS/MS). Las muestras para este estudio fueron seleccionadas tanto de población sana normal como de pacientes ya diagnosticados con PKU u otros desórdenes mentales (no-PKU).

Los valores obtenidos con el kit de Enzolve son ligeramente inferiores que los valores obtenidos mediante el método de MS/MS, mientras los valores obtenidos por el producto competidor son un 20% más altos que los valores obtenidos mediante el método de MS/MS y con un pobre coeficiente de correlación (Figura 3).

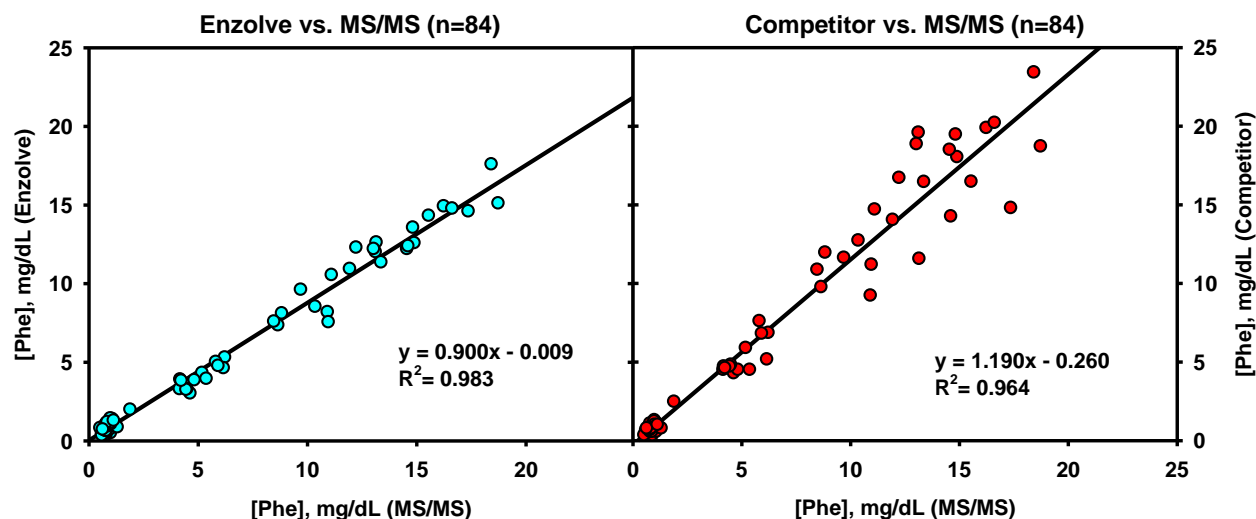


Figura 3. Comparación de las concentraciones de fenilalanina en sangre determinados mediante dos métodos enzimáticos (Enzolve y un producto competidor) con los resultados obtenidos mediante espectrometría de masa en tándem.

Especificidad y sustancias que pueden interferir en el ensayo

Aminoácidos comunes, antibióticos y metabolitos fueron utilizados para valorar la especificidad del ensayo de cribado de Fenilcetonuria de Enzolve. La única sustancia que se encontró potencialmente interferente fue la Tetraciclina. Ninguna otra interferencia fue observada en presencia de antibióticos comúnmente utilizados o sus metabolitos que podrían conducir a un falso positivo o a un falso negativo.

Precisión del Ensayo

La precisión Inter- e Intra-ensayo del método de Enzolve fue calculado mediante la evaluación de las mismas muestras en múltiples ensayos (inter-ensayo) o mediante ensayos de N réplicas de las mismas muestras (intra-ensayo)

Tipo de Estudio	Resultados		
	Rango de concentraciones (mg/dl)	CV (%)	N
Variación Inter-Ensayo	3.55 – 16.54	5.2 – 10.2	40
Variación Intra-Ensayo	3.85 – 15.43	5.3 – 11.5	20

Precauciones y Advertencias

Todas las soluciones contienen 0.095% de azida sódica como conservante. La azida sódica podría reaccionar con tuberías de plomo y cobre para formar compuestos metálicos altamente explosivos. Al eliminar los reactivos que contengan azida, lavar con una gran cantidad de agua para impedir la acumulación de azida.

La solución de extracción de la muestra contiene 3% de ácido tricloroacético (TCA) que es corrosivo. Se deben tomar las precauciones adecuadas de seguridad cuando se trabaje con esta solución.

La sangre humana empleada para preparar los Estándares y Controles ha sido analizada habiéndose comprobado que es negativa a la presencia de anticuerpos de VIH 1 y 2, a los antígenos superficiales

de la Hepatitis B y C. Sin embargo, todas las muestras sanguíneas de origen humano deben ser consideradas como un peligro potencial y se deben tomar las precauciones adecuadas para su manejo y eliminación.

Las muestras recogidas en menos de 24 horas pueden dar lugar a falsos negativos o falsos positivos. Resultados elevados deben ser confirmados mediante otros métodos.

Se recomienda que cada laboratorio obtenga su propio valor de variación normal y de corte estadístico.

El Kit de Cribado de Fenilcetonuria (PKU) está diseñado para uso exclusivo de personal de laboratorio formado y cualificado. No es para autodiagnóstico o venta en farmacias.

Se recomienda que todos los usuarios se familiaricen con el uso del kit antes de la presentación de los resultados.

Se recomienda que los resultados sean interpretados por personal formado y que otras informaciones clínicas sean consideradas antes de proceder a la intervención clínica.










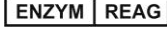
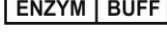
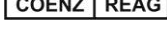
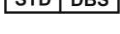

Se recomienda que todos los estándares, controles y muestras sean procesados por duplicado hasta que el personal de laboratorio esté entrenado en el procedimiento del análisis. Es obligatorio:

- a. Incluir Estándares y Controles en cada placa.
- b. Mantenga todos los reactivos (Estándares y Controles, almacenados o diluidos/reconstituidos) a 2-8°C en recipientes cerrados y permitir que los reactivos alcancen la temperatura ambiente antes de su utilización.
- c. Seguir estrictamente el protocolo para conseguir resultados fiables. Cualquier modificación en los reactivos o en el ensayo son responsabilidad del usuario.
- d. Mantener y calibrar apropiadamente el equipo usado para el ensayo. Todo el equipo debería estar certificado con el sello de CE.
- e. No use el Kit o sus componentes después de las fechas de vencimiento indicadas en las etiquetas.
- f. No use las soluciones diluidas/reconstituidas después del período recomendado de estabilidad o si se han puesto turbias o descoloridas.
- g. No use ningún componente que esté obviamente roto o que visualmente esté contaminado.
- h. No reutilizar las placas de ensayo con el fin de reducir las probabilidades de obtener falsos positivos.

Referencias

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, Hassemmer 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 por la Directiva de Diagnóstico In Vitro (IVDD 98/79/EC)

 0050	- Conformidad Europea
 REF	- Número de Catálogo
 LOT	- Número de Lote
	- Consulte Instrucciones de Uso
 IVD	- Para Uso Diagnóstico In Vitro
	- Fabricante
	- Usar antes de
	- Suficiente para <n> test
	- Temperatura Límite
 ENZYM REAG	- Reactivo Enzimático
 ENZYM BUFF	- Tampón Enzimático
 COENZ REAG	- Reactivo Coenzimático
 STD DBS	- Estándar de Sangre Seca
 CONTROL DBS	- Control de Sangre Seca