



Valores de normalidad de fenilalanina en recién nacidos según edad gestacional y tipo de alimentación



TESIS DOCTORAL

Doctorando: PABLO SÁNCHEZ GONZÁLEZ

**Director: Prof. Ernesto Cortés Castell
Codirector: Prof. Vicente Gil Guillén**

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ, 2014

D. JAVIER FERNANDEZ SÁNCHEZ, Director del
Departamento de Medicina Clínica de la Universidad
Miguel Hernández

AUTORIZA:

La presentación y defensa como Tesis Doctoral del trabajo
“Valores de normalidad de fenilalanina en recién nacidos según edad
gestacional y tipo de alimentación” realizado por D. Pablo Sánchez
González bajo la dirección de los Profesores D. Ernesto Cortés
Castell y D. Vicente Gil Guillén.

Lo que firmo en San Juan de Alicante a Treinta de Octubre
de Dos Mil Catorce.

Prof. J. Fernández
Director
Dpto. Medicina Clínica



DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLINICA

Campus de San Juan. Ctra. de Valencia (N-332), Km. 87 – 03550 San Juan de Alicante
Telf.: 96 5919449 – Fax: 96 5919450
c.electrónico: med.psiqui@umh.es

D. Ernesto Cortés Castell, y D. Vicente Gil Guillén,
Profesores Titulares de esta Universidad Miguel
Hernández, como Directores de Tesis

CERTIFICAN:

Que el trabajo “Valores de normalidad de fenilalanina en recién nacidos según edad gestacional y tipo de alimentación” realizado por D. Pablo Sánchez González ha sido llevado a cabo bajo nuestra dirección y se encuentra en condiciones de ser leído y defendido como Tesis Doctoral en la Universidad Miguel Hernández.

Lo que firmamos para los oportunos efectos en San Juan de Alicante a Treinta de Octubre de Dos Mil Catorce.

Fdo. Prof. E. Cortés
Director de Tesis

Fdo. Prof. V. Gil
Director de Tesis



DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLINICA

Campus de San Juan. Ctra. de Valencia (N-332), Km. 87 – 03550 San Juan de Alicante
Telf.: 96 5919449 – Fax: 96 5919450
c.electrónico: med.psiqui@umh.es

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente la realización de este trabajo:

A los profesores Ernesto Cortés y Vicente Gil, por haberme dado una segunda oportunidad de demostrarme que puedo realizar un trabajo de investigación y por su gran profesionalidad, alto grado de conocimiento y trato cordial que tanto me han facilitado las cosas.

A la Dra. Herminia Manero, por permitirme continuar parte de su trabajo e introducirme en el magnífico mundo del Cribado Neonatal de Enfermedad Metabólicas.

A la Dra. Marisa Graells, Jefe de Servicio de Análisis Clínicos, por el inestimable apoyo y ánimo que me ha ido transmitiendo durante este largo camino.

A todos mis compañeros residentes del laboratorio, en especial a Carolina y Álvaro, por haber podido compartir juntos las buenas y malas experiencias de realizar una tesis.

Al resto de compañeros del Servicio y del Hospital General de Alicante.

A mis amigos de Granada y Madrid, que nunca dudaron de mí y siempre confiaron en que podía.

Un agradecimiento especial a mi familia por haberme dado la oportunidad de formarme en lo que realmente me gustaba y por el apoyo incondicional que siempre me han dado.

A todos aquellos profesionales del Laboratorio, clínico o de investigación, que cada día ponen su "granito de arena" para hacer más relevante el papel del mismo en el diagnóstico de enfermedades.



A Nicolás, María José y Alberto

INTRODUCCIÓN

Este estudio pretende comprobar si habría que establecer diferentes puntos de corte de valores de fenilalanina (Phe) según la edad gestacional y el tipo de alimentación que reciben los recién nacidos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se recogieron los datos de 11.831 muestras de sangre desecada en papel de filtro de todos los recién nacidos en la provincia de Alicante y en el Hospital General Universitario de Alicante durante un período de 3 años. Las variables estudiadas fueron: días desde el nacimiento a la toma de la muestra de sangre, sexo, tipo de lactancia, peso al nacimiento y edad gestacional. La concentración de Phe se determinó mediante una técnica fluorométrica (Perkin Elmer). En el análisis estadístico, las relaciones entre variables se determinaron mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Para dilucidar la repercusión individual de cada una de las variables analizadas sobre el valor de Phe, se ha realizado el análisis de correlación multivariable.

RESULTADOS

La concentración de Phe es más elevada en recién nacidos alimentados con nutrición parenteral y/o enteral (1,50 mg/dl) respecto a aquellos niños alimentados con fórmula láctea (1,20 mg/dl), y en aquellos niños alimentados con leche materna (1,10 mg/dl). Los recién nacidos muy pretérmino tienen concentraciones de Phe más elevadas (1,40 mg/dl) con respecto a los recién nacidos a término (1,00 mg/dl). En el análisis multivariante, los niveles de Phe aumentan según lo hace la prematuridad, y se elevan en la alimentación parenteral y/o enteral, únicamente utilizada en los recién nacidos pretérmino y muy pretérmino ($p = 0,000$).

CONCLUSIONES

La concentración de Phe es más elevada en recién nacidos alimentados con nutrición parenteral y/o enteral y en aquellos con edad gestacional menor. El sexo no influye en los valores de Phe. Aunque la concentración de Phe varía levemente entre la primera semana de vida respecto a edades mayores, ésta es muy pequeña y sin ninguna importancia ante un cribado neonatal que, aunque debe realizarse durante la primera semana de vida, no va a descartar muestras tardías.

INTRODUCTION

This study aims to test if it is necessary to set different cutoffs values of phenylalanine (Phe) levels by gestational age and type of feeding given to newborns.

MATERIAL AND METHODS

Data from 11,831 blood samples dried on filter paper of all newborns in the province of Alicante and General Hospital of Alicante for a period of 3 years were collected. The variables studied were: days from birth to the blood sampling, gender, type of feeding, birth weight and gestational age. Phe concentration was determined by a fluorometric assay (Perkin Elmer). The statistical analysis revealed the relationships between variables determined by the non-parametric Kruskal-Wallis test. To elucidate the individual impact of each variable on the Phe concentration, a multivariate correlation was made.

RESULTS

Phe concentration is higher in infants fed with parenteral and/or enteral nutrition (1.50 mg/dl) compared to those fed with formula (1.20 mg/dl), and those fed with human milk (1.10 mg/dl). The very preterm infants have higher concentrations of Phe (1.40 mg/dl) compared to term infants (1.00 mg/dl). In multivariate analysis, Phe levels do increase as prematurity, and rise in parenteral and/or enteral nutrition only used in preterm and very preterm infants ($p = 0.000$).

CONCLUSIONS

Phe concentration is higher in infants fed with parenteral and/or enteral nutrition and in those with an early gestational age. Gender does not influence Phe levels. Although Phe levels vary slightly between the first week of life compared to older ages, difference is very small and has no importance in order to be considered in a newborn screening programme which must be done during the first week of life and must also include late blood samples.



INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	21
1.1.- EL AMINOÁCIDO FENILALANINA.....	23
1.1.1.- DESCRIPCIÓN: CARÁCTER ESENCIAL.....	23
1.1.2.- HOMEOSTASIS EN EL ORGANISMO.....	25
1.1.3.- RUTA CATABÓLICA NORMAL DE LA FENILALANINA.....	29
1.1.4.- CATABOLISMO DEFECTUOSO: FENILCETONURIA.....	31
1.2.- METABOLISMO PROTEICO EN EL EMBARAZO.....	34
1.2.1.- TRANSPORTE MATERNO FETAL DE AMINOÁCIDOS.....	35
1.2.2.- ACTIVIDAD DEL SISTEMA FENILALANINA HIDROXILASA.....	39
1.3.- METABOLISMO PROTEICO EN EL NEONATO.....	40
1.3.1.- CAMBIOS POST-INGESTA EN LOS NIVELES DE AMINOÁCIDOS. VARIACIÓN BIOLÓGICA.....	41
1.4.- DIFERENCIAS SEGÚN TIPO DE ALIMENTACIÓN.....	42
1.5.- NUTRICIÓN EN EL RECIÉN NACIDO PRETÉRMINO.....	44
1.6.- CRIBADO NEONATAL DE HIPERFENILALANINEMIAS: VALORES DE NORMALIDAD.....	47
2. JUSTIFICACIÓN.....	53
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	57
3.1.- HIPÓTESIS.....	59
3.2.- OBJETIVOS.....	61

4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	63
4.1.- POBLACIÓN.....	65
4.1.1.- CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	65
4.1.2.- CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	66
4.1.3.- MUESTREO.....	66
4.2.- DETERMINACIONES ANALÍTICAS.....	68
4.2.1.- CUANTIFICACIÓN DE PHE EN SANGRE DESECADA EN PAPEL.....	68
4.2.2.- CONTROLES DE CALIDAD EN EL ENTORNO DE LOS VALORES DE LA NORMALIDAD.....	70
4.2.2.1.- Control interno.....	70
4.2.2.2.- Evaluación externa de la calidad.....	71
4.3.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	73
5. RESULTADOS.....	75
5.1.- DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA.....	77
5.1.1.- VARIABLE PHE.....	77
5.1.2.- CARACTERIZACIÓN DEL RESTO DE VARIABLES.....	78
5.1.2.1.- Variable “días a la toma de muestra”.....	79
5.1.2.2.- Variable “peso al nacimiento”.....	80
5.1.2.3.- Caracterización de las variables cualitativas.....	81
5.2.- VARIACIÓN SEGÚN EL SEXO.....	82
5.3.- VARIACIÓN CON LOS DIAS A LA TOMA DE LA MUESTRA.....	83
5.4.- VARIACIÓN CON EL TIPO DE LACTANCIA.....	84
5.5.- VARIACIÓN CON LA EDAD GESTACIONAL.....	86
5.5.1.- VARIACIÓN CON LA EDAD GESTACIONAL EN FUNCIÓN DEL TIPO DE LACTANCIA.....	86
5.6.- ANÁLISIS MULTIVARIANTE.....	89

6. DISCUSIÓN.....	93
6.1.- DISEÑO DEL ESTUDIO Y TAMAÑO MUESTRAL.....	95
6.2.- CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA	96
6.3.- VARIACIÓN SEGÚN EL SEXO.....	97
6.4.- VARIACIÓN SEGÚN DIAS A LA TOMA DE LA MUESTRA.....	98
6.5.- VARIACIÓN SEGÚN EL TIPO DE LACTANCIA	100
6.6.- VARIACIÓN CON LA EDAD GESTACIONAL	103
6.7.- ANÁLISIS MULTIVARIANTE	105
7. CONCLUSIONES.....	109
8. BIBLIOGRAFÍA.....	113
9. ANEXOS.....	127
ANEXO 1.....	129
ANEXO 2.....	137
ANEXO 3.....	157
ANEXO 4.....	159



1. INTRODUCCIÓN

1.1.- EL AMINOÁCIDO FENILALANINA

1.1.1.- Descripción: carácter esencial

Existen cientos de aminoácidos (aa) en la naturaleza, pero sólo veinte de ellos aparecen formando parte de la estructura de las proteínas, los llamados clásicamente aa proteicos, los cuales tienen una importancia clave en el balance nitrogenado y en la nutrición de los distintos organismos vivos. Dichos organismos presentan considerables diferencias en su capacidad para sintetizar los veinte aa proteicos. Mientras que la mayor parte de las bacterias y plantas pueden sintetizarlos todos, los mamíferos sólo pueden sintetizar aproximadamente la mitad, generalmente aquellos en los que las vías metabólicas son sencillas. Según esto, podemos clasificar los aa proteicos en base a los requerimientos dietéticos de los mismos. En este sentido, se han clasificado en:

1. Aminoácidos esenciales: Son aquellos cuya supresión produce efectos nutricionales y metabólicos adversos. Por esencialidad, se entiende la incapacidad del organismo, tanto para sintetizar la estructura carbonada como para la adición de un grupo amino a la misma (Viña, 1991).
2. Aminoácidos no esenciales: Aquellos que el organismo vivo es capaz de sintetizar a partir de moléculas precursoras.
3. Aminoácidos condicionalmente esenciales: Aquellos que se hacen indispensables en situaciones de patología metabólica, inmadurez, estrés severo y falta de aporte de sus precursores.

Los aa esenciales en el ser humano son los necesarios para mantener una buena nutrición en el adulto y promover un adecuado crecimiento y desarrollo en el niño, en situaciones de salud y enfermedad (Laidlaw, 1987; Young, 1994b). Dichos aa esenciales se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 1: Clasificación de los aminoácidos según necesidades nutricionales.

Aminoácidos		
<i>Esenciales</i>	<i>Condicionalmente esenciales</i>	<i>No esenciales</i>
FENILALANINA (Phe)	TIROSINA (Tyr)*	GLICINA (Gly)
TRIPTÓFANO (Trp)	CISTEÍNA (Cys)	ALANINA (Ala)
ISOLEUCINA (Ile)	HISTIDINA (His)**	A. GLUTAMICO (Glu)
LEUCINA (Leu)	ARGININA (Arg)**	A. ASPARTICO (Asp)
VALINA (Val)	ORNITINA (Orn)**	SERINA (Ser)
LISINA (Lys)	CITRULINA (Cir)**	PROLINA (Pro)
TREONINA (Thr)		ASPARAGINA (Asn)
METIONINA (Met)		GLUTAMINA (Gln)

(*) Condicionalmente esencial en la Fenilcetonuria

(**) Condicionalmente esenciales en el neonato

El concepto de aa semiesencial o condicionalmente indispensable, es especialmente importante en el neonato debido a sus necesidades especiales y la inmadurez de algunos de los sistemas enzimáticos, sobre todo en el recién nacido pretérmino y algunas patologías como la fenilcetonuria (Rassin, 1994), en la cual pasa a ser esencial la Tyr.

La Phe es un aa aromático, neutro y no polar, cuya cadena lateral contiene un anillo bencénico. También se le clasifica junto con el Trp como un aa hidrófobo con estructura cíclica (Figura 1). La Phe es considerada esencial en base a que no puede ser sintetizada por el organismo humano. Concretamente, la estructura carbonada es la parte considerada esencial ya que el cetoácido correspondiente es transaminado a Phe con rapidez por el organismo (Nelson, 2001). Su aporte es importante para la producción de Tyr gracias a la acción de la enzima Phe hidroxilasa (PAH) que va a producir la reacción de hidroxilación en el carbono 4 (C4) del grupo fenilo (Figura 1). La Tyr se considera un aa no esencial simplemente por el hecho de que puede ser sintetizada a partir del aa esencial Phe.

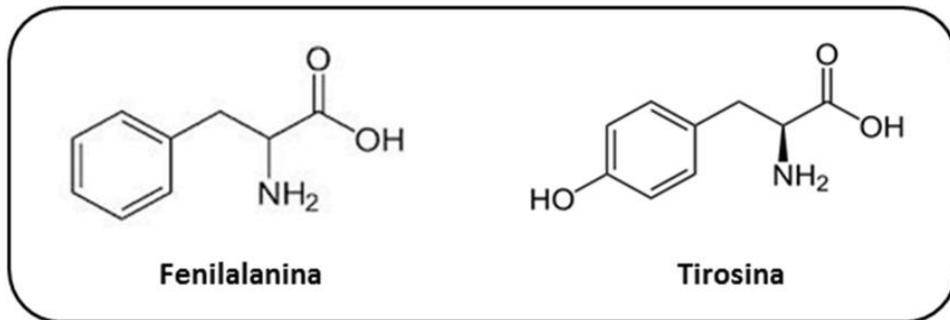


Figura 1: Estructura química de los aminoácidos Phe y Tyr.

La mayor parte de la Phe no utilizada para la síntesis proteica se transforma en Tyr, aa precursor de catecolaminas, tiroxina y constituyente de neuropéptidos cerebrales.

1.1.2.- Homeostasis en el organismo

El pool de aa libre es el nexo de unión entre las proteínas procedentes del medio exterior y la reserva proteica de los tejidos. Los aa libres van a ser usados como sustratos para la síntesis proteica y también son el resultado del catabolismo proteico; de esta manera, las entradas de aa al pool libre se hacen desde la dieta y la degradación de proteínas y las salidas son hacia la síntesis proteica, la oxidación de los aa (Waterlow, 2006), la síntesis de algunas biomoléculas de gran interés fisiológico y la eliminación urinaria.

En condiciones fisiológicas, el pool de aa libre es muy estable y supone un porcentaje muy pequeño de la cantidad de aa en el organismo, de aproximadamente el 0,7%, con una concentración aproximada en plasma de 2,5 mM, siendo la Gln el más abundante. Tres tejidos, además del intestino encargado de su absorción, juegan un papel importante en la regulación del pool de aa libre, el músculo esquelético, que posee el 35-89% de los mismos, el hígado que no representa más del 10% y el riñón con un 4%. En plasma se estima que no representa más de un 6%, pero supone un fiel reflejo de la

situación metabólica de los mismos, siendo además los niveles, para la mayoría de los aa, relativamente constantes en contra de la variación observada para los flujos de aa entre órganos, sugiriendo un papel muy relevante en el mecanismo homeostático de los aa (Scriver, 2001). Estos órganos participan en el mantenimiento del pool de aa, determinando el destino de los aa tanto de origen endógeno como de exógeno.

Los factores que intervienen en el mantenimiento de la homeostasis de proteínas y aa son principalmente (Young, 1994a):

- Síntesis proteica: está regulada, fundamentalmente, tanto por cambios en las concentraciones celulares de aa como por cambios en el estado de fosforilación de factores iniciadores, sobre todo en la fase de iniciación de la traducción. Además, las hormonas están íntimamente implicadas en los cambios dietéticos, ya sea por influencia sobre la transcripción o en la traducción.
- Degradación de proteínas: en las células eucariotas, las proteínas son continuamente degradadas y reemplazadas, y este recambio o “turnover” está implicado en numerosas funciones regulatorias “in vivo” como la degradación de proteínas con conformaciones anormales o la rápida degradación de péptidos reguladores, entre otras. Además, hay que tener en cuenta que el proceso de degradación proteica es muy costoso desde el punto de vista energético, requiriendo la hidrólisis de altas cantidades de ATP, teniendo implicaciones desde el punto de vista nutricional.
- Oxidación de aminoácidos: el objetivo de la oxidación de aa es producir intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, que alimenta las vías metabólicas que proporcionan energía. Los cambios en la oxidación responden rápidamente a la alteración en la toma de aa debido a la alteración de las enzimas implicadas que modifican su actividad y dicha alteración en la disponibilidad de sustrato parecen ser un factor regulatorio primordial. El efecto global, por tanto, es que se tiende a la conservación de aa y de nitrógeno cuando la toma es baja, y de manera inversa, se tiende a la pérdida de aa y nitrógeno cuando el consumo es abundante.

- Producción de urea: el ciclo de la urea puede ser considerado como la vía común y final en la eliminación del nitrógeno procedente de los grupos amino de los aa y posiblemente tenga un papel en el ajuste de las concentraciones de nitrógeno teniendo en cuenta el balance pérdida-ganancia, de manera que podría actuar como un mecanismo para conservar el nitrógeno cuando la entrada de aa procedentes de la dieta son mucho menores que las necesidades fisiológicas de los mismos (Figura 2).

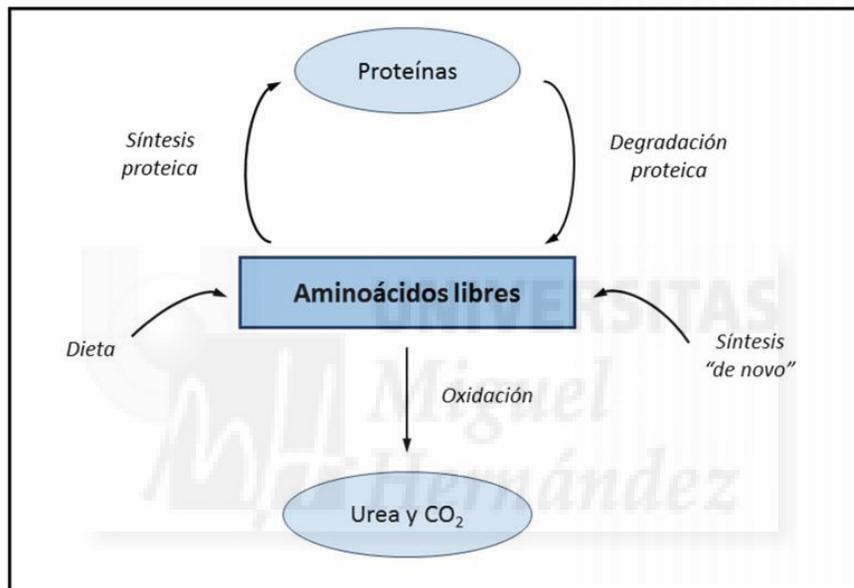


Figura 2: Representación de los sistemas bioquímicos responsables de la homeostasis de proteínas y metabolismo de aminoácidos "in vivo".

Menos importancia cuantitativa tiene, en general, la eliminación de aa en la orina y la síntesis de derivados de los aa. Los cambios en las velocidades de las distintas vías de este sistema dan lugar a modificaciones en el balance nitrogenado, la dirección e intensidad del cambio.

El transporte de aa entre órganos es un proceso altamente activo y regulado que proporciona aa tanto para la síntesis proteica como para el desarrollo de funciones específicas. El movimiento neto de aa depende del estado fisiológico y nutricional, de manera que en situación postprandial, el sentido dominante del flujo va desde el

intestino hacia el resto de tejidos mientras que en situación de ayuno, principalmente se produce desde el músculo hacia el hígado y riñón (Brosnan, 2003). Durante el ayuno, se produce la transaminación de aa ramificados produciendo un flujo de nitrógeno desde el músculo en forma de Ala y Gln. El aminoácido Ala es captado por el hígado, donde, por reacción de transaminación y posterior reducción, da lugar a lactato, entrando en la vía gluconeogénica. La Gln es captada preferentemente por el intestino, liberando Ala, y también por el riñón, el cual usa Gln para la excreción de amonio, muy importante para la regulación ácido-base y también para la gluconeogénesis. Las vías de transporte de los aa entre los distintos órganos están expresadas en la figura siguiente (Figura 3).

El transporte de aa por la sangre está condicionado por la demanda en cada instante. Su vida media es muy corta y su concentración pequeña (2.5 mM), mientras que su cantidad corporal en forma de proteínas es aproximadamente, unas 300 veces mayor.

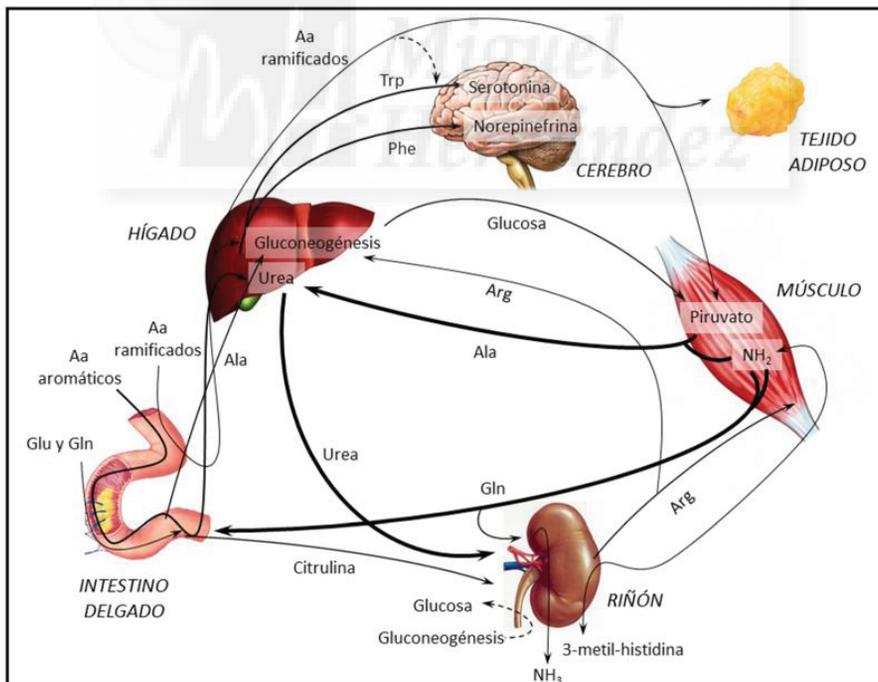


Figura 3. Transporte de aminoácidos entre órganos (adaptado de Young, V.R., 1994). Glu: ácido glutámico; Gln: glutamina; Arg: arginina; Ala: alanina; Trp: triptófano; Phe: fenilalanina. Se destaca (flechas negras) el papel clave de la Gln y Ala y sus interrelaciones con los aminoácidos ramificados, nutricionalmente indispensables, además del flujo nitrogenado entre hígado, músculo y riñón.

1.1.3.- Ruta catabólica normal de la fenilalanina

La Phe se puede clasificar, desde el punto de vista catabólico, como un aa cetogénico, puesto que el producto final de su degradación va a ser acetil-CoA, el cual va a entrar en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos para rendir energía o puede usarse en la síntesis de ácidos grasos, vía β -oxidación.

La Phe tiene en condiciones normales únicamente dos destinos: su incorporación en las cadenas de polipéptidos, o la síntesis de Tyr para cubrir las necesidades de este aminoácido, tanto en la síntesis de proteínas como de otras moléculas. La degradación de la Phe y su producto de oxidación, Tyr, siguen una vía de degradación común que tiene como productos finales el fumarato y el acetoacetato, el cual se hidrolizará a 2 moléculas de acetil-CoA (Nelson, 2001).

La síntesis de Tyr, constituye la etapa inicial de la degradación de Phe que es hidroxilada por acción del sistema holoenzimático PAH (EC 1.14.16.1), constituido por el apoenzima PAH y su cofactor obligatorio tetrahidrobiopterina (THBP). La PAH es una enzima que pertenece al grupo de las oxidasas de función mixta, que catalizan la reacción simultánea de un sustrato por un átomo de oxígeno de la molécula de O_2 y la reducción del otro átomo de oxígeno a H_2O . La THBP va a transportar electrones desde el NADH al O_2 , oxidándose a dihidrobiopterina (DHBP) en el proceso. Seguidamente, la DHBP es reducida para regenerar la THBP por el enzima DHBP reductasa, en una reacción que requiere NADH (Figura 4). La enzima PAH se expresa con cierta actividad desde antes del nacimiento como se indica en estudios realizados con aa marcados en niños pretérmino (Kilani, 1995; van den Akker, 2009). En el hombre, la enzima PAH se expresa exclusivamente en el hígado y el riñón, siendo predominante en el hígado, con una actividad cuatro veces superior a la del riñón (Ayling, 1975), de tal manera que en ciertas patologías hepáticas como la cirrosis pueden producirse incrementos secundarios de la Phe y/o Tyr, no debidos a un déficit genético de la hidroxilasa (Tessari, 2010). La síntesis de Tyr a partir de Phe es un proceso altamente regulado en base a las necesidades de proteínas, de manera que la Phe plasmática no refleja los cambios en la síntesis de proteínas (Rafii, 2008).

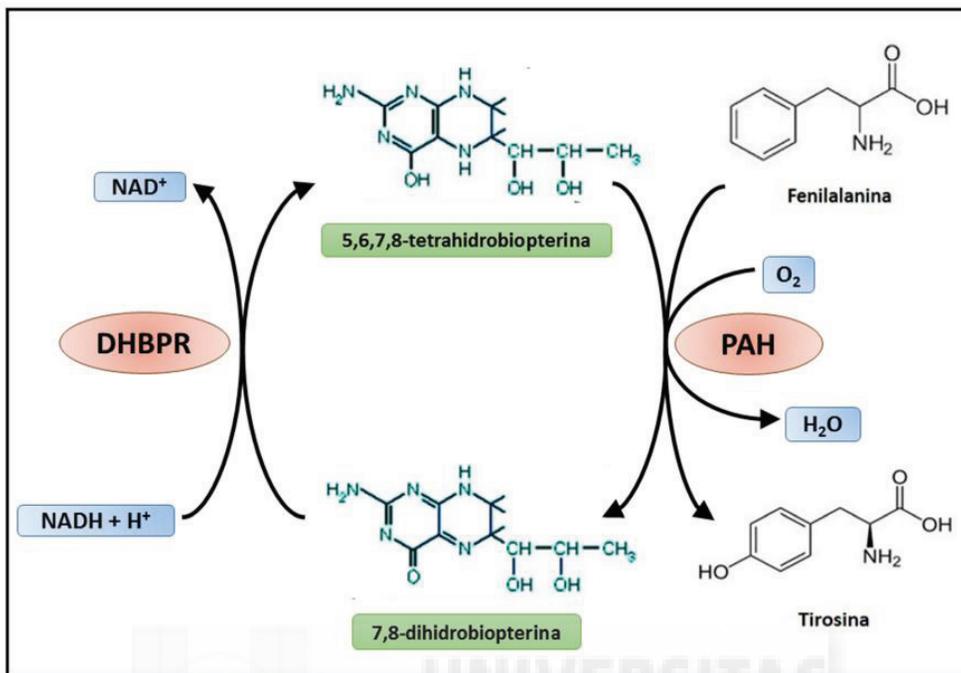


Figura 4: Esquema de la reacción de hidroxilación de la Phe a Tyr. PAH: fenilalanina hidroxilasa; DHBPR: Dihidrobiopterina reductasa

Posteriormente, tras la hidroxilación a Tyr, el destino de estos dos aa es convertirse en una serie de moléculas de gran importancia como la dopamina, molécula con función neurotransmisora o las catecolaminas (adrenalina y nor-adrenalina), moléculas con acción hormonal secretadas por la médula adrenal. Otras moléculas que provienen de la Tyr son las hormonas tiroideas y la melanina, pigmento negro de la piel (Frenstrom, 2007). Lógicamente, la Phe y la Tyr como aa proteicos que son van a actuar como moléculas precursoras en la síntesis de proteínas y en caso de superávit, van a entrar en las rutas catabólicas ya descritas para la obtención de energía (Figura 5).

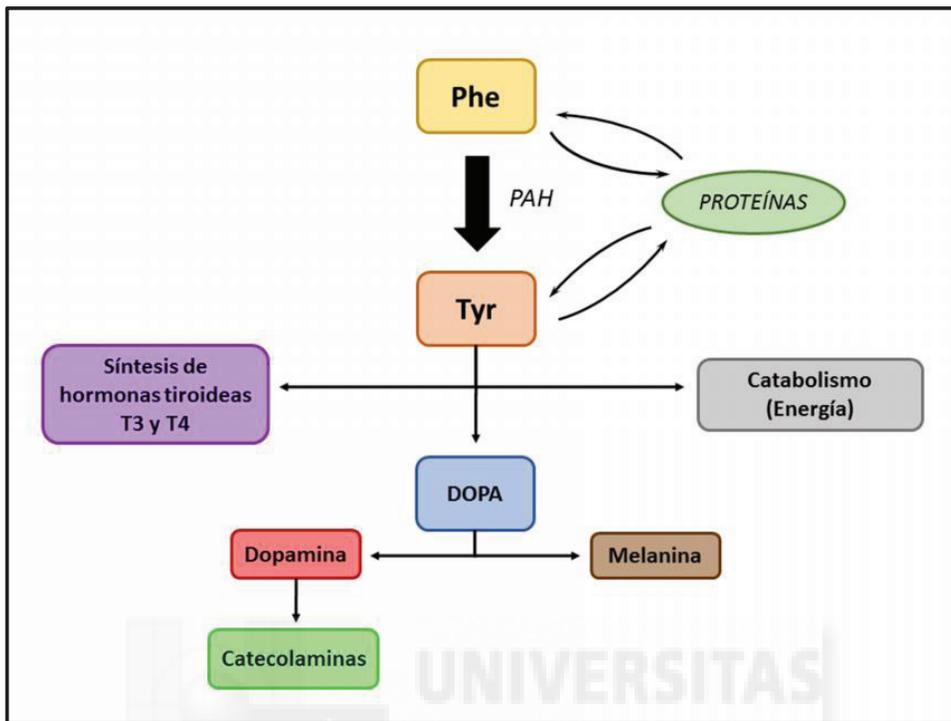


Figura 5: Destinos metabólicos de las moléculas derivadas de la degradación de Phe y Tyr.

1.1.4.- Catabolismo defectuoso: fenilcetonuria

Cuando se produce el bloqueo en la reacción de hidroxilación de Phe a Tyr (Figura 6), la Tyr pasa a ser un aa esencial, junto con la Phe, dando como resultado, además, un incremento de las concentraciones del aminoácido Phe que proviene tanto de la dieta como del recambio proteico en el organismo. Este incremento de Phe, produce un espectro de desórdenes que comúnmente se conocen como hiperfenilalaninemias (HPA) y que incluyen a la fenilcetonuria (PKU), cuando existe una deficiencia completa o casi completa de la enzima PAH y las HPA-no-PKU cuando el porcentaje residual de actividad de la hidroxilasa es mayor que en el caso de la PKU. A su vez, las HPA se pueden clasificar atendiendo a los niveles de Phe en sangre y a los niveles de Phe tolerados en la dieta en toda una serie de gradaciones (Mitchell, 1993; Scriver, 2001; Blau, 2010).

Las causas genéticas que producen las HPA incluyen mutaciones en el gen que codifica para la PAH (localizado en el cromosoma 12), que da lugar a la PKU clásica y mutaciones tanto en los genes que codifican para las enzimas que sintetizan el cofactor THBP como en los que codifican para las enzimas que regeneran el cofactor THBP a partir de DHBP (Figura 4) (Zurfluh, 2008). Hay que destacar que el tratamiento a seguir es diferente según el déficit.

El desencadenamiento bioquímico de la enfermedad se produce porque el acúmulo de la Phe hace que entre en juego una ruta secundaria, no habitual, en la que el primer paso es la transaminación de la Phe que da lugar a ácido fenilpirúvico, que junto a la Phe, se acumulan en sangre y se excretan por la orina. Además, gran parte del ácido fenilpirúvico se descarboxila produciendo fenilacetato, que confiere un olor característico a la orina de los individuos afectados (Nelson, 2001). Los productos derivados del metabolismo secundario de la Phe son moléculas neurotóxicas que, junto con el exceso de Phe y el déficit de catecolaminas intracerebrales, producen alteraciones en la sustancia blanca cerebral (Frenstrom, 2007; Anderson, 2010).

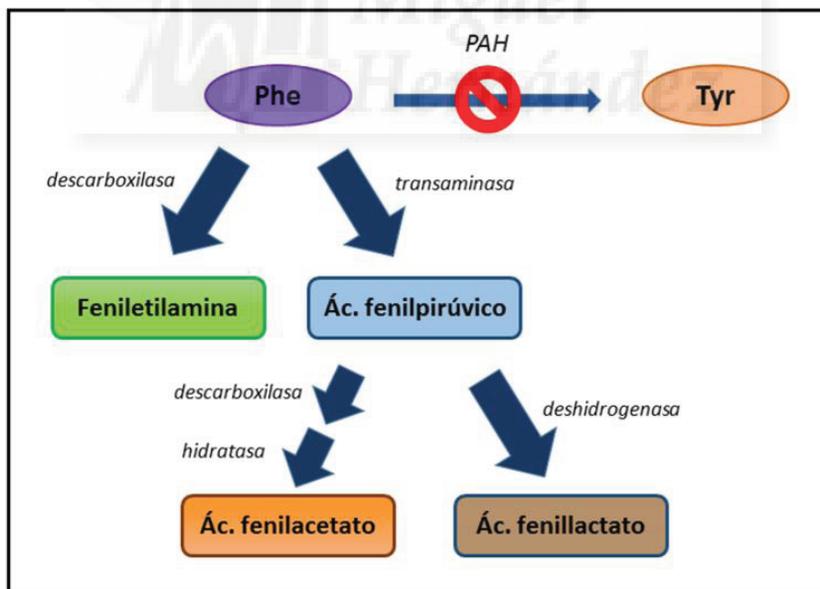


Figura 6. Rutas alternativas en caso de bloqueo del paso Phe a Tyr (hiperfenilalaninemias y fenilcetonuria).

La PKU e HPA son errores congénitos del metabolismo, con código ICD10, E70.0 (Orphanet, 2011) con herencia mendeliana autosómica recesiva que están causados por mutaciones en el gen PAH (OMIM: 612349) (Scriver, 2001; Orphanet, 2011) localizado en el locus 12q22.q24.2. La prevalencia de la PKU varía ampliamente a lo largo del mundo, siendo en Europa alrededor de 1 caso por cada 10.000 nacimientos. Se conocen alrededor de 548 mutaciones en el gen (Blau, 2010), con diferentes grados de inactividad de la enzima, dando lugar a una amplia gama de manifestaciones de la enfermedad con diferente grado de severidad. La PKU es una enfermedad susceptible de ser cribada en la población general debido a la elevación precoz tras el nacimiento del aminoácido Phe en niños afectados, que es desencadenada por el alto grado de catabolismo proteico en respuesta a la alimentación, siendo esto suficiente para que el cribado sea positivo en el déficit moderado y severo de PAH, aunque sólo con el valor de Phe en sangre realizado en el cribado no se puede predecir de forma exacta el fenotipo de la enfermedad (Ponzzone, 2008).

La acumulación de Phe y/o de sus metabolitos derivados en las primeras etapas de la vida genera una patología asociada muy grave desde el punto de vista neurológico, perjudicando el desarrollo normal del cerebro dando lugar a retraso mental grave que puede ser irreversible si no se trata precozmente. Cuando se detecta esta enfermedad de forma temprana con el cribado neonatal de HPA, se puede prevenir mediante un control dietético, que consiste en un tratamiento precoz con dieta muy controlada en el aporte de Phe durante la niñez y adolescencia, que sea suficiente para cubrir las necesidades de crecimiento, pero no en exceso para evitar la necesidad de su hidroxilación a Tyr. En estas condiciones, la Tyr se convierte en aminoácido esencial por lo que sería necesario monitorizar sus niveles en estos pacientes (Sharman, 2010). En el caso del déficit de cofactor THBP en su forma activa, bien por déficit en la síntesis o en la recuperación, más extraño según incidencia, no es eficaz el tratamiento con una dieta controlada, haciéndose necesario el aporte del cofactor. Aunque la respuesta de los niveles de Phe al tratamiento con restricción dietética es buena, en estos pacientes suelen persistir los déficits neurológicos, por lo que los estudios actuales sobre la enfermedad empiezan a atisbar la necesidad de nuevos tratamientos como son los

suplementos con THBP o la administración de aa neutros transportados por el mismo transportador LAT1 (entre los que se encuentran Tyr y Trp). Lo más recientemente publicado apunta hacia la terapia sustitutiva enzimática con Phe-amonioliasa o la terapia génica, estando éstas todavía en vías de desarrollo (Mitchell, 1993; Blau, 2010; Feillet, 2010; Harding, 2010; van Spronsen, 2010).

1.2.- METABOLISMO PROTEICO EN EL EMBARAZO

El embarazo está asociado a profundos cambios anatómicos, fisiológicos y metabólicos que van a permitir la adaptación de la madre para poder soportar las necesidades de crecimiento y desarrollo adecuados del feto. Aunque la glucosa es la principal fuente de energía para el feto, la síntesis de proteínas es un componente esencial para el crecimiento fetal y la síntesis “de novo” tanto de tejido materno como de fetal. Desde el punto de vista proteico, el embarazo se caracteriza por un estado de hipoaminoacidemia, es decir, una concentración de aa libres en plasma disminuida en comparación con mujeres no embarazadas. Esta caída, alrededor del 20-25%, suele ser más patente en el primer trimestre de gestación, aunque se mantiene durante todo el embarazo, volviendo a niveles normales tras el parto. El incremento del volumen plasmático producido en el embarazo, junto con un aumento en el aclaramiento renal de aa no parecen explicar del todo este fenómeno, siendo la captación activa y continua de aa por parte del feto responsable de la mayor parte de la disminución de la concentración plasmática de los mismos, produciendo una situación de deficiencia de sustratos (Verhaeghe, 1992).

Tal y como se observa en la Figura 2, el pool de aa libres en plasma es el eje central regulador del metabolismo proteico. El embarazo va a producir una modificación en la complejidad de este modelo, de manera que ahora tanto el pool de aa como el propio metabolismo proteico fetales van a contribuir al pool de aa libres materno, siendo muy dificultoso su cuantificación real. En concordancia con esto, el “turnover”

de proteínas en el embarazo puede ser considerado como la suma de los diferentes turnovers de los tejidos maternos y fetales, destacando en este sentido el papel adaptativo del hígado, de manera que en la gestación se produce un aumento muy marcado del recambio proteico materno a nivel hepático (incremento de la síntesis y degradación proteicas), lo que tiene como resultado un incremento neto del flujo de aa desde el hígado materno que quedan disponibles para la síntesis fetal de proteínas (Kalhan, 1991). Además, los aa provenientes de la movilización de proteínas musculares maternas van a ser transportados al feto, disminuyendo los niveles sanguíneos maternos durante la gestación (Lietchy, 1991). Existen diversos factores que pueden afectar al aporte neto de aa y al desarrollo fetal, como son la actividad de los transportadores en la placenta, la superficie placentaria o la concentración de aa en la madre (Lietchy, 1991; Regnault, 2002). Además, en experimentos con modelos animales de retraso del crecimiento intrauterino, se ha visto que tanto la superficie placentaria como el área de absorción de aa están reducidas y que el retraso de crecimiento está asociado al cambio en la capacidad de transporte y las vías metabólicas de la unidad feto-placentaria (Regnault, 2005).

1.2.1.- Transporte materno fetal de aminoácidos

La placenta es un órgano especializado en el intercambio de nutrientes, gases y productos de desecho entre la circulación umbilical del feto y la circulación uterina de la madre. La placenta humana es una placenta hemomonocorial vellosa, donde el epitelio coriónico del trofoblasto invade y destruye tanto el epitelio uterino como el endotelio de los capilares del útero, de manera que las microvellosidades del epitelio coriónico están bañadas directamente en la sangre materna. Para que los nutrientes puedan atravesar la placenta, éstos deben cruzar en primer lugar la membrana plasmática de las microvellosidades que dan a la circulación materna, después atravesar el sincitiotrofoblasto y posteriormente, cruzar la membrana basal que da la circulación fetal (Figura 7).

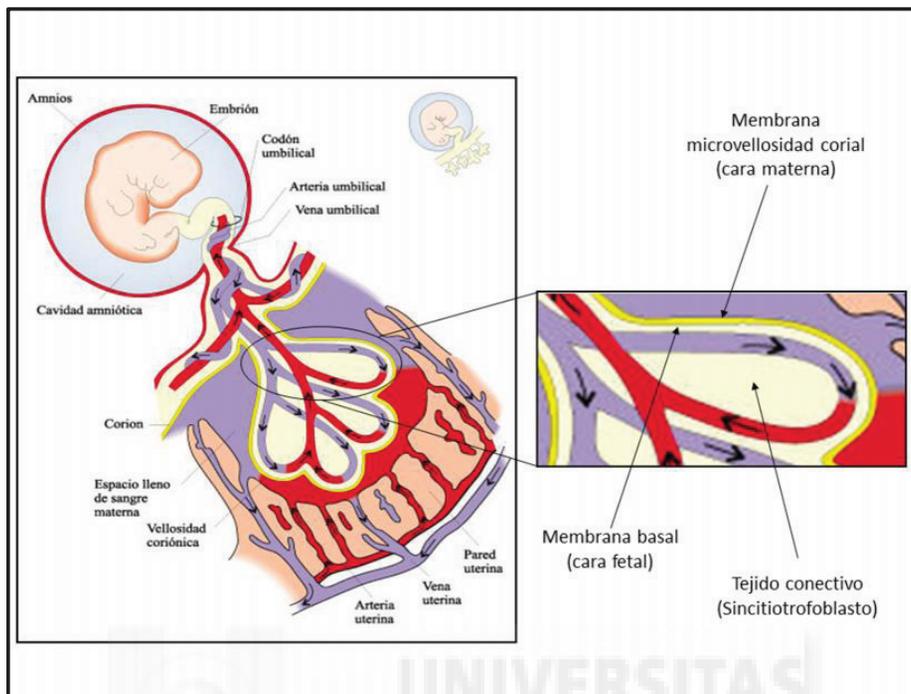


Figura 7. Esquema de la placenta humana que muestra la barrera de intercambio de nutrientes.

Desde el punto de vista del transporte de aa, la membrana plasmática de las microvellosidades es capaz de captar aa por un proceso de transporte activo, dependiente de energía y en contra de gradiente que va a acumular aa en la matriz del sincitiotrofoblasto (Lietchy, 1991). Una vez allí, pueden ser metabolizados o transportados a la circulación fetal. Se ha visto que algunos aa captados por la placenta regresan a la circulación materna en lugar de ser transferidos al feto, pudiendo ser un mecanismo usado por la placenta para permitir la captación de otros aa mediante el uso de intercambiadores (Cleal, 2008). Existen dos tipos de transportadores de aa: los acumuladores, que median el influjo de aa, permitiendo aumentar su concentración en el interior celular y los intercambiadores, que permutan aa a través de la membrana celular, permitiendo alterar la composición sin modificar la concentración total de los mismos. En la membrana plasmática de las microvellosidades coriónicas, existen transportadores de tipo acumuladores e intercambiadores que van a captar aa de la sangre materna hacia el sincitiotrofoblasto, como por ejemplo, Glu, Asp, Gly y Ser. Sin

embargo, en la membrana basal que da a la circulación fetal, además de transportadores de tipo intercambiadores, debe existir otro tipo de transportador que permita el transporte continuo de aa hacia la circulación fetal, como demuestran experimentos con el transporte de Leu (Clea, 2008) (Figura 8):

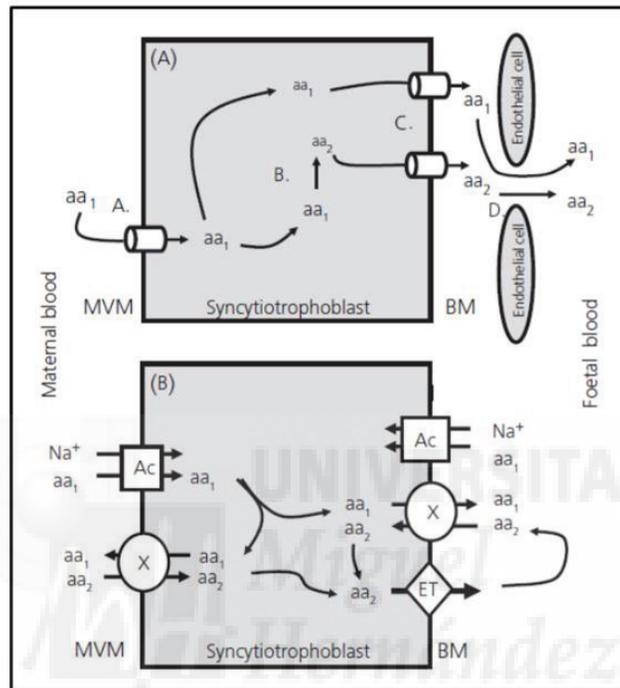


Figura 8. Mecanismos de transporte materno-fetal de aminoácidos (Clea, 2008). Ac: transportador acumulador; X: transportador intercambiador; ET: transportador no intercambiador; MVM: membrana plasmática de las microvellosidades coriales; BM: membrana basal.

La demanda de aa por el feto es continua y proporcional a su peso, lo que hace que los aa libres de la madre disminuyan, y en concreto la Phe, alrededor de un 10% entre las 16 – 20 semanas de gestación respecto a los mismos valores basales en situación de no embarazo (Kalhan, 1991).

La Phe es transportada de la madre al feto vía placenta mediante un transportador activo, que suministra su cantidad necesaria para el normal desarrollo fetal, pero condicionada a los valores de éste en la sangre materna. El transporte de Phe y Leu en embarazos normales, se realiza de forma más rápida que otros aa esenciales.

Sin embargo, en gestaciones complicadas con retraso del crecimiento fetal, el transporte es más lento y está disminuido, y el grado de disminución parece tener relación con la severidad del retraso de crecimiento del feto (Paolini, 2001; Galan, 2009) y con una reducción en la superficie placentaria de intercambio, así como en una disminución cuantitativa y cualitativa de transportadores específicos (Regnault, 2002).

El líquido amniótico parece que también juega un papel tanto en el transporte como en el almacenamiento de aa, observándose una concentración disminuida de todos los aa en comparación con la sangre materna y fetal (Jauniaux, 1999). Durante el embarazo, se ha observado una disminución progresiva de las concentraciones de todos los aa en el líquido amniótico, sobre todo en el segundo trimestre de gestación, exceptuando Glu, Asp, Ser y Tau. Esta disminución es muy patente en el caso concreto de la Phe, con una gran disminución entre las semanas 18 a 19 de gestación (Galán, 1997). Este hecho puede estar causado por una mayor retención renal de aa por el feto, sobre todo alrededor de la semana 10 de gestación, cuando el riñón comienza a formar orina y por una coincidencia en el momento de inflexión y aceleración del aumento de tamaño fetal con su correspondiente síntesis acelerada de proteínas. Respecto al transporte de aa, durante la primera mitad del embarazo, ocurre una difusión pasiva a través de la piel del feto que puede ser probablemente el mecanismo principal de paso de aa desde la sangre fetal hacia el líquido amniótico, lo que sugiere que la medida de la concentración de aa en líquido amniótico podría proporcionar una medida indirecta del metabolismo y transporte placentarios (Jauniaux, 1999).

1.2.2.- Actividad del sistema fenilalanina hidroxilasa

Diversos estudios demuestran que tanto el sistema enzimático PAH como la enzima DHBPR se expresan en el hígado fetal desde etapas tempranas del desarrollo en ratas (Brenneman, 1965). En experimentos “in vitro”, dicha actividad enzimática es detectable en el hígado fetal humano a partir de la octava semana de gestación (Friedman, 1986; Kilani, 1995), alcanzando valores próximos a los del adulto durante el segundo trimestre de embarazo, siendo las propiedades catalíticas semejantes (Jakubovic, 1971; Raiha, 1973; Ryan, 1986). Los recién nacidos muy pretérmino (RNMP) de menos de 29 semanas de gestación, son capaces de metabolizar Phe a Tyr antes de instaurar la alimentación con la misma velocidad que los adultos (Kilani, 1995).

En el recién nacido a término (RNT), se ha visto que el aporte de Tyr al feto a través del cordón umbilical al final de la gestación es mínimo o incluso ligeramente negativo. Durante el segundo trimestre de gestación son los transportadores placentarios de aa los encargados de transportar Tyr al feto. El flujo de Tyr parece estar inhibido por otros aa, lo que hace que el feto sea muy dependiente de la síntesis endógena de Tyr a partir de Phe. Diferentes estudios “in vivo” con isótopos estables muestran que la Tyr no parece ser un aminoácido condicionalmente esencial en el feto a término, puesto que la Phe es hidroxilada a Tyr a una velocidad considerable (van den Akker, 2009)

Al final de la gestación, es la placenta la encargada de suministrar un exceso de Phe al feto. De ésta, solo una pequeña parte es utilizada para la síntesis proteica y el resto para la formación de Tyr (Chien, 1993; van den Akker, 2009).

1.3.- METABOLISMO PROTEICO EN EL NEONATO

Desde el punto de vista fisiológico y metabólico, durante el parto se va a producir la transición de la vida intrauterina a la vida extrauterina, dando lugar a un cambio en el estado de dependencia total de la madre a una independencia absoluta del neonato, en relación al aporte de nutrientes y oxígeno, mantenimiento de la temperatura corporal y excreción de los productos de desecho. Estos cambios extraordinarios requieren mecanismos especiales y extremadamente sincrónicos que van a encargarse de la modulación del metabolismo hacia la adaptación adecuada del recién nacido al nuevo ambiente bioquímico.

Metabólicamente, la situación del recién nacido se caracteriza por la interrupción repentina del flujo sanguíneo placentario, de manera que la disponibilidad de sustratos aminoacídicos para la síntesis de proteínas quedan suspendido por la ligación del cordón umbilical (Kalhan, 2008). Desde ese momento, comienza una etapa de ayuno en la que el neonato depende exclusivamente de las reservas de glucógeno, grasas y proteínas almacenadas para mantener sus funciones vitales. Concretamente, respecto al metabolismo proteico, la reducción en el aporte de aa en el período perinatal induce una serie de cambios hormonales que desembocan en un efecto neto de degradación proteica, en el sentido en el que los aa almacenados en el músculo son liberados para ser usados como sustratos gluconeogénicos. Además, existe una alta reutilización de nitrógeno procedente del grupo amino de los aa (disminución de la producción de urea), reflejando una adaptación a situaciones de bajo aporte proteico que va a servir para mantener y aumentar las reservas proteicas (Heine, 1991). Una vez que el neonato comienza la lactancia y como adaptación a un patrón de intermitencia en la alimentación, la baja producción de urea junto con una disminución de la gluconeogénesis procedente de aa, permiten ahorrar energía, ya que el nitrógeno es desviado para favorecer la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos (Medina, 1992). Además, los aa absorbidos directamente en la digestión van a producir un incremento en sus concentraciones plasmáticas, lo que lleva a una alta tasa de recambio proteico, precisamente para asegurar la disponibilidad de aa para la alta tasa de síntesis de

proteínas esenciales requeridas para el crecimiento del neonato (Heine, 1991; Medina, 1992).

Los valores de Phe tanto en sangre de cordón como en sangre periférica al nacimiento bajan durante el primer día de vida, estabilizándose alrededor del tercer día, una vez introducida la alimentación (Sirvent, 1992), dependiendo esta situación del tipo de lactancia y de la inmadurez metabólica inherente a la prematuridad (Moya, 2003). Sin embargo, se ha observado que existe una disminución clara entre los valores de Phe alrededor de la primera semana de vida frente a los valores al mes, con la misma fórmula láctea (Buades, 1989) y dentro de la primera semana (Vento, 1990b). No obstante, no existen diferencias entre los valores de Phe al nacimiento y a la primera semana de vida en la evolución entre niños a término y pretérmino, aunque los valores de Phe son siempre menores en los RNT (Sirvent, 1990).

1.3.1.- Cambios post-ingesta en los niveles de aminoácidos. Variación biológica

En estudios realizados en niños a término alimentados con leche materna o fórmula con distintas concentraciones de proteínas, se observa que tras la ingesta se produce un aumento de la concentración total de aa, presentando un pico máximo entre los 30 y 60 minutos y que depende de la concentración de proteínas recibida. Los niveles vuelven a valores basales (ayuno) tras dos a cuatro horas. En los RNPT también se produce este aumento (Tikanoja, 1982; Moro, 1999; Fingerhut, 2010). Además, los niveles plasmáticos de aa esenciales son mayores en aquellos neonatos alimentados con fórmula respecto a los recién nacidos alimentados con leche materna, siendo similar la cinética para cada aminoácido de manera individual (Moro, 1999).

En niños sanos nacidos a término, tanto una infusión de aa corta en el tiempo (3-5 horas) como un aumento de la concentración de aa en la infusión produce una supresión de la degradación proteica y una menor tasa de síntesis de urea, seguido de un retorno a un estado basal en el que los aa infundidos están disponibles para ser oxidados (Heine, 1991).

La correcta interpretación de los cambios en los niveles de aa es fundamental para el pronóstico, diagnóstico y seguimiento clínicos de los errores congénitos del metabolismo. Se ha observado en individuos sanos que los coeficientes de variación intraindividual para los aa esenciales son menores que para los aa no esenciales, lo que sugiere que los aa esenciales están sometidos a un control homeostático más estricto que el resto. Concretamente, la concentración media de Phe en plasma es de 63 μ M, con un coeficiente de variación intraindividual de 9,5% (Corte, 2010). Además, otros autores describen que la Phe aumenta un 18% tras la ingesta siendo la variación intraindividual de los distintos aa del 12% al 32% (Fingerhut, 2010).

1.4.- DIFERENCIAS SEGÚN TIPO DE ALIMENTACIÓN

Las proteínas de la leche materna, que en humanos representan aproximadamente un 1% del total, son la fuente de aa necesarias para la síntesis proteica y el crecimiento del neonato. La aproximación más frecuentemente usada para estimar los requerimientos proteicos del neonato es la estimación de la ingesta exclusiva de proteínas contenidas en la leche materna, considerándose el “gold standard” al que se va a referir la composición de las fórmulas lácteas artificiales.

La composición proteica de la leche materna varía según la etapa de lactancia, distinguiendo entre:

- Calostro: secretado durante los 3 – 4 días siguientes al parto, con una concentración media de 2 g/dl de proteína total.
- Leche de transición: secretada desde el día 6 hasta el día 15 tras el parto, con una concentración media de 1,5 g/dl de proteína total.
- Leche madura: secretada a partir del día 15 posparto, con una concentración media de 1 g/dl de proteína total.

Se observa una disminución del contenido proteico total durante la lactancia debido principalmente a la disminución de IgA secretada y lactoferrina. Este contenido

proteico se ha relacionado con la tasa de crecimiento del neonato, de manera que existe una correlación directa entre concentración de proteína láctea y el tiempo requerido para duplicar el peso del neonato (Raiha, 1994a).

La mayoría de las fórmulas adaptadas se basan en leche bovina suplementada con caseína (rica en Tyr) o proteínas séricas de la leche (como la IgA, rica en Tre) que tiene un contenido proteico de, aproximadamente 2,2 g/100 Kcal (1,5 g/dl) siendo mucho mayor al presente en la leche materna madura, con un contenido proteico nutricional disponible de unos 0,85 g/dl, de manera que la ingesta proteica en los recién nacidos alimentados por fórmula es mucho mayor a aquellos alimentados con leche materna (Raiha, 1994b; Moro, 1999), resultando no sólo en un aumento de la concentración de aa plasmáticos sino también en un patrón diferente de los mismos (Heine, 1994; Rassin, 1994). En cuanto a las concentraciones plasmáticas de Phe, se ha visto que en recién nacidos alimentados con fórmulas ricas en caseína, los niveles plasmáticos de Phe son mayores, con una tasa de oxidación menor que en niños alimentados con leche materna (Pomi, 1984; Darling, 2004). Distintos estudios muestran la influencia de la alimentación en los niveles plasmáticos de aa, de manera que en un estudio realizado en recién nacidos con tres alimentaciones distintas se ha encontrado un aumento de la concentración plasmática de aa con la edad, más marcado en los grupos de lactancia con fórmula que en los de lactancia materna. En concreto, en lo que se refiere a la Tyr y Phe encuentran hasta un 20% de incremento entre los alimentados con fórmula frente a lactancia materna (Scott, 1990). Así mismo, se ha observado que en niños pretérmino alimentados con distintas leches suplementadas, leche materna y fórmula derivada de leche bovina, y todas ellas con el mismo contenido de proteínas, la concentración postprandial de aa plasmáticos no dependía únicamente de la cantidad de proteína presente en la leche ingerida, sino también de la fuente de dichos aa (Moro, 1999).

Puesto que la Phe y otros aa neutros son precursores de diversas sustancias con función neurotransmisora como las catecolaminas y son transportados a través de la barrera hematoencefálica por un transportador común, un cambio en las concentraciones plasmáticas de los mismos puede influir negativa o positivamente en el

transporte de otros aa, alterando su concentración en el sistema nervioso central. En este sentido, se ha observado que en niños alimentados con nutrición parenteral, los niveles plasmáticos elevados de Phe y disminuidos de Tyr hacen que disminuya el transporte de Tyr al cerebro, que en última instancia provocará cambios en las concentraciones cerebrales de catecolaminas, con un riesgo potencial de alteraciones en el desarrollo neuropsicológico (Heine, 1994; Rassin, 1994).

1.5.- NUTRICIÓN EN EL RECIÉN NACIDO PRETÉRMINO

En los RNPT, por una parte, el metabolismo nitrogenado va a sufrir una serie de modificaciones en las primeras semanas de vida, produciéndose la inducción de las enzimas implicadas al iniciar la dieta. Esta posible inmadurez de algunas rutas metabólicas suele ser más pronunciada en los niños prematuros; por ejemplo, la función hepática puede ser insuficiente para llevar a cabo las funciones de detoxificación y síntesis de manera adecuada (Beath, 2003). Así mismo, se ha descrito un retraso en la maduración de la actividad de Tyr aminotransferasa y la parahidroxifenil piruvato oxidasa que puede producir HPA e hipertirosinemia en niños prematuros (Raiha, 1974). Incluso, se ha descrito cierto grado de inmadurez de la PAH (Shortland, 1994).

Por otra parte, los requerimientos proteicos de los RNPT y sobre todo, de los pertenecientes al grupo de RNMPT (que suelen corresponder a recién nacidos de muy bajo peso) no son homogéneos, por lo que la administración de nutrientes debe, por un lado, satisfacer las necesidades de mantenimiento en el período de transición (desde el nacimiento hasta el décimo día de vida) y por otro, permitir una ganancia adicional de peso que asegure el crecimiento normal (Kashyap, 1994; Llanos, 2004). Para ello, en la mayoría de los casos, a los RNPT y RNMPT se les suministran alimentaciones especiales suplementadas con una mayor cantidad de nutrientes y en especial de proteínas, lo que puede producir un incremento en las concentraciones, así como una alteración de los perfiles de aa plasmáticos (Vento, 1990b; Kashyap, 1994). Entre los posibles mecanismos

responsables de las diferencias en la concentración de aa entre los niños alimentados con leche materna y los alimentados con fórmula, puede estar la disminución del catabolismo de los aa esenciales provocado por las fórmulas muy ricas en caseína, como se ha visto para la Phe y Tyr (Darling, 2004). Además, en algunos estudios se ha observado que la leche de las madres de niños RNPT contiene, en las primeras semanas, una concentración mayor de lípidos y proteínas que la de madres de RNT y que ésta es óptima para el normal desarrollo de los RNPT (Anderson, 1981).

En el período de transición, el objetivo es lograr el aporte energético y de nutrientes suficientes para evitar el aumento del catabolismo proteico, que conllevaría una pérdida de masa muscular importante. Numerosos estudios han determinado que se exige como mínimo un aporte de aa de aproximadamente 1,5 – 2,0 g/Kg/día para prevenir el aumento del catabolismo proteico (Llanos, 2004; Hay, 2010), siendo la nutrición parenteral la principal fuente de aa en este período e iniciando una nutrición enteral mínima usando la leche de la propia madre (Llanos, 2004). Sin embargo, en periodos de máximo crecimiento, las necesidades proteicas están determinadas, sobre todo, por los grandes requerimientos para el crecimiento, que vienen a suponer alrededor del 50% del total de las proteínas ingeridas (Fomon, 1991; Dewey, 1996). Estos altos requerimientos proteicos disminuyen durante el primer mes de vida, pasando de valores aproximadamente de 1,9 g/Kg/día alrededor del primer mes hasta los 0,8 – 1,2 g/Kg/día al año de vida (Kashyap, 1994). Estas concentraciones de proteínas son aportadas con garantía por la lactancia materna exclusiva hasta los 6 meses de vida (Raiha, 1989).

En los RNPT se plantea, generalmente, una nutrición más agresiva con concentraciones más elevadas de aa y ácidos grasos para favorecer el rápido crecimiento y desarrollo y llegar a los niveles estándar correspondientes a la edad post-concepcional lo antes posible. En distintos estudios, se ha visto que aunque una alimentación con concentraciones muy elevadas de proteínas y ácidos grasos tras el nacimiento es importante para algunos aspectos del desarrollo, los niños alimentados con leche materna pueden tener un mejor resultado en el desarrollo a largo plazo, aunque sufran crecimientos más lentos al principio de su vida (Hay, 2006). Así mismo,

cuando se comparan niños pretérmino y de bajo peso alimentados ambos con leche materna y con fórmula, se ha observado que aquellos alimentados con fórmula tienen mayor riesgo de desarrollar complicaciones, como enterocolitis necrotizante aunque su tasa de crecimiento a corto plazo sea más rápida (Llanos, 2004; Quigley, 2007). Además las fórmulas suplementadas con una concentración proteica muy elevada pueden presentar efectos no deseados, como acidosis metabólica, concentraciones excesivas de amonio, uremia, hiperaminoacidemia, restricción del crecimiento y alteraciones en el desarrollo (Goldman, 1974; Premji, 2006; Clark, 2007). Desde el punto de vista del aporte nutricional, es difícil evaluar la ingesta óptima de niños prematuros en crecimiento, puesto que no existe un estándar de referencia para cada edad gestacional. Sin embargo, en los RNPT se recomienda que el aporte proteico debe ser de al menos 3,5 g/Kg/día, pero con fórmulas bien balanceadas para evitar efectos secundarios (Hay, 2008). Se ha estimado que un aporte de proteínas de alrededor de 4,0 g/Kg/día para RNPT de 24-28 semanas de gestación se podría considerar como la barrera a no sobrepasar (Hay, 2010).

Como ya se ha mencionado anteriormente, mientras que las fórmulas lácteas de inicio cada vez tienden a ser lo más semejantes a la leche materna, las fórmulas especiales para RNPT tienen una mayor proporción de nutrientes en general, y de proteínas en particular. Este hecho, junto con la inmadurez de sobra conocida, y posible déficit transitorio inherente de la actividad PAH en estos recién nacidos, plantea la posibilidad de que puedan existir diferencias entre los valores de normalidad de Phe (Moya, 2003). De esta manera, se ha observado contrariamente a lo anteriormente expuesto, que la concentración plasmática de aa ramificados, y en general, de todos los esenciales es menor en los niños con retraso de crecimiento intrauterino frente a los recién nacidos adecuados a su edad gestacional (Vento, 1990a, 1991, 2002), siendo la edad gestacional similar en ambos grupos. Posiblemente, esta reducción en la concentración plasmática pueda deberse a la situación previa ocurrida en el embarazo, durante el cual se produce una disminución del aporte de aa al feto debido, principalmente, a una down-regulación en el funcionamiento de los transportadores placentarios de aa en estos niños (Jansson, 2006; Cleal, 2008).

1.6.- CRIBADO NEONATAL DE HIPERFENILALANINEMIAS: VALORES DE NORMALIDAD

El cribado neonatal se puede definir como la actividad de salud pública dirigida a la aplicación de procedimientos de selección a poblaciones de individuos recién nacidos aparentemente “sanos” para la identificación presintomática de aquellos afectados por un determinado estado genético, metabólico o infeccioso, con el objetivo de hacer posible la rápida intervención que conduzca a una reducción significativa de la morbilidad, mortalidad y discapacidades asociadas (Calderón-López, 2008; Cortés, 2011). Dicha actuación comenzó en el caso de las enfermedades metabólicas, dentro de las cuales, el diagnóstico de la PKU en recién nacidos se considera el primer éxito histórico en los programas de cribado neonatal debido a la identificación temprana del defecto enzimático, justo tras el nacimiento, en fase preclínica y que permite el inicio del tratamiento de una dieta restringida en Phe (Berry, 2013). Las ventajas demostradas han condicionado su extensión a la detección de otros grupos de enfermedades.

La PKU se conoce con el nombre de enfermedad de Folling en honor al médico noruego que la descubrió en 1934, cuando describe a dos hermanos con retraso mental asociado a excreción de ácido fenilpirúvico en orina, sugiriendo que era debido a un trastorno hereditario del metabolismo de la Phe, ya que en estos enfermos la concentración de Phe era más elevada que en individuos normales. En 1937, Jarvis demuestra que la administración de Phe en individuos normales produce una elevación inmediata de la Tyr, mientras que en los enfermos no se detecta este aumento, confirmando el error metabólico que se produce en las HPA. En 1954, Bickel propuso el tratamiento nutricional mediante dietas con restricción de Phe, lo que cambió radicalmente las perspectivas del curso de la enfermedad y abrió las posibilidades terapéuticas de las enfermedades metabólicas, siendo un paso crucial en la introducción del cribado neonatal (Berry, 2013).

En 1963, Guthrie describe un ensayo simple, semicuantitativo que permitía detectar Phe en sangre seca sobre papel. Se basaba en el principio de inhibición del crecimiento bacteriano sobre una placa de agar producido por la competición entre una

sustancia con una estructura similar a la sustancia inhibitoria (Kemper, 2014), sentando las bases para la detección de las HPA en grandes poblaciones e instaurándose paulatinamente en prácticamente todo el mundo el cribado neonatal de la PKU (Guthrie, 1963). Sin embargo, fue muy criticado debido a su baja especificidad y variabilidad en los resultados. Posteriormente, el método fluorométrico de McCaman y Robins mejoró la precisión, pero con el inconveniente de la necesidad de una muestra líquida de plasma o suero, por lo que fue modificado para la medición de Phe en sangre seca sobre papel aplicado tanto en cribado neonatal como en seguimiento de los niveles de Phe en pacientes fenilcetonúricos con tratamiento dietético (Wu, 1979). El desarrollo metodológico de la espectrometría de masas en tándem (EMT) aplicado al cribado neonatal ha supuesto una revolución sin precedentes, de manera que hoy día la mayoría de los centros de cribado usan rutinariamente esta tecnología. La EMT es un procedimiento por el cual se pueden identificar de forma temprana una gran cantidad de enfermedades metabólicas simultáneamente, mediante la cuantificación de aa y acilcarnitinas en muestras de sangre desecada, procedente de la punción en el talón de un recién nacido, lo que la hace una herramienta muy adecuada para uso rutinario en el cribado neonatal de enfermedades metabólicas. Las ventajas de la EMT con respecto a otros métodos son preparación simple y fácil de las muestras, alto rendimiento, alta sensibilidad analítica y como consecuencia, reducción del número de falsos positivos detectados, mejorando el valor predictivo positivo de la prueba del talón (Chace, 1998). Respecto al cribado de HPA, la EMT puede diagnosticar la PKU con una tasa de falsos positivos muy baja (unas 100 veces menor que el método fluorimétrico) con una excelente sensibilidad y precisión. Además, al determinar simultáneamente varios aa, entre los que se encuentran Tyr y Phe, mejora la detección de niños positivos para PKU mediante la relación Phe/Tyr, en lugar de la determinación única de Phe, siendo un método coste-efectivo (Chace, 1998; Ceglarek, 2002). Recientemente, se ha desarrollado una mejora en el análisis de compuestos bioquímicos con la tecnología de EMT, denominada espectrometría de masas con análisis directo en tiempo real (DART-MS), que consiste, en la ionización de la muestra de sangre desecada en papel y

posterior monitorización por acople de electroforesis capilar, mejorando los parámetros de sensibilidad y rapidez en la aplicación del cribado neonatal de PKU (Wang, 2013).

En Estados Unidos, la tasa de incidencia de HPA y PKU desde 1996 a 2005 recogidos por el National Newborn Screening and Genetic Resource Center muestran que de un total de unos 40 millones de niños analizados, se detectaron 3.173 casos positivos, resultando en una incidencia de 1:12.707 recién nacidos vivos, siendo consistente con los datos publicados en la literatura de una prevalencia de PKU que varía entre 1:11.400 a 1:15.000 (Berry, 2013).

En Europa, en el año 2004, se recogieron datos de los 47 países que realizaban el cribado para PKU. Se estudiaron 51.968.998 niños, encontrándose que la prevalencia variaba de 1:3.000 a 1:30.000 recién nacidos vivos (Loeber, 2007). Este cribado está instaurado en gran número de países conociéndose la incidencia aproximada en las diferentes etnias. Los últimos datos apuntan a una incidencia que va desde 1:2.600 recién nacidos en la población turca hasta 1:200.000 entre la población finlandesa o de judíos askenazíes, no existiendo datos fiables de aquellos países en los que no se viene realizando el cribado neonatal, como por ejemplo, la población africana (Mitchell, 2010).

En España, desde su implantación en 1968, se han ido publicando los datos acumulados (Moya, 1993; Alonso, 1999; Dulín, 2001c, b, a; Arena, 2010), de forma que hasta el año 2012, con unos 13 millones y medio de recién nacidos analizados, se han encontrado 564 casos de PKU, 891 de HPA y 5 con déficit de cofactor, con una incidencia combinada de 1:8.302 (AECNE, 2012). Poco a poco, van surgiendo nuevas perspectivas para la mejora de los programas de cribado neonatal, sobre todo por la experiencia acumulada a largo plazo del seguimiento de los pacientes detectados (Kerruish, 2005; Aoki, 2007; Brosco, 2008; van Spronsen, 2010; Berry, 2013).

La concentración de Phe en sangre de niños recién nacidos sanos oscila normalmente entre 0,85 – 1,80 mg/dl (50 – 110 μ mol/l). Sin embargo, individuos con deficiencia de la PAH muestran concentraciones plasmáticas de Phe que son persistentemente más elevadas de 2,0 mg/dl (120 μ mol/l) (Scriver, 2001), de manera que aquellos con concentraciones entre 2 – 10 mg/dl (120 – 600 μ mol/l) se clasifican como niños con HPA moderada, con concentraciones entre 10 – 20 mg/dl (600 – 1.200

$\mu\text{mol/l}$) niños con PKU moderada y con concentraciones superiores a 20 mg/dl ($> 1.200 \mu\text{mol/l}$) niños con PKU clásica (Blau, 2010). Normalmente, los niveles elevados de Phe se correlacionan con mutaciones más severas en los genes responsables del metabolismo de la Phe. Algunos recién nacidos sin PKU y sobre todo, RNPT (Beath, 2003), muestran transitoriamente concentraciones elevadas de Phe de más de 6 mg/dl ($360 \mu\text{mol/l}$) que se han relacionado con una maduración retrasada de las enzimas que se requieren para el metabolismo de la Phe (Shortland, 1994; Koch, 1999). La concentración de Phe en sangre varía con la dieta del recién nacido, de manera que se han observado concentraciones mayores en individuos alimentados con fórmula láctea respecto a aquellos niños alimentados con leche materna (Raiha, 1994b; Koch, 1999; Moro, 1999), siendo el contenido de Phe en la leche materna menor (0,42 – 0,50 mg Phe/g leche) respecto al contenido en fórmulas lácteas, que es aproximadamente el doble (Raiha, 1994a; Koch, 1999).

Las estrategias de cribado neonatal en cuanto a la extracción de la muestra y los puntos de corte de HPA y PKU varían entre los distintos centros y laboratorios de referencia. En Estados Unidos, con el desarrollo de la EMT, el punto de corte usado para Phe cuantificada con técnicas fluorométricas (4,3 mg/dl ó $258 \mu\text{mol/l}$) fue sustituido por (3,0 mg/dl ó $180 \mu\text{mol/l}$) dada la mayor sensibilidad analítica de la EMT (Chace, 1998). En España, el punto de corte establecido para la detección de PKU oscila entre 2,0 – 2,5 mg/dl ($120 - 150 \mu\text{mol/l}$) (AECNE, 2012). Concretamente, en el laboratorio del Hospital General Universitario de Alicante, se sigue la estrategia de extracción doble, una primera a partir de las 48 horas de vida, antes del alta hospitalaria, para la detección de hipotiroidismo congénito y hemoglobinopatías, y una segunda a partir del quinto día de vida, para la detección de la PKU y fibrosis quística. Además, el punto de corte establecido es de 2,5 mg/dl ($150 \mu\text{mol/L}$) (Manero, 2012). El algoritmo seguido se muestra en el ANEXO IV del documento de procedimiento normalizado de trabajo del laboratorio **PNT-CN-03**: “Determinación de Phe en sangre desecada en papel de filtro” (Anexo 2) y que se presenta en los anexos.

Sin embargo, aunque existe variación intraindividual en la concentración de aa y el tiempo transcurrido desde la ingesta también influye en dicha concentración, esta

*Valores de normalidad de Phe en recién nacidos
según edad gestacional y tipo de alimentación*

variación no tiene influencia en la tasa de rellamadas o la aparición de falsos positivos o negativos en los programas de cribado neonatal con los puntos de corte actualmente establecidos (Corte, 2010).





2. JUSTIFICACIÓN

El cribado neonatal es un servicio incluido en la cartera de Salud Pública de la Sanidad Española cuyo principal objetivo es dar la máxima cobertura posible, realizándose por tanto, a todos los recién nacidos, incluidos aquellos nacidos muy prematuramente. Por tanto, este estudio pretende comprobar si habría que establecer diferentes puntos de corte de valores de Phe según la edad gestacional y el tipo de alimentación que reciben los recién nacidos.





3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1.- HIPÓTESIS

Los valores de Phe varían según la edad gestacional y el tipo de alimentación



3.2.- OBJETIVOS

1. Determinar si existe variación de la concentración de Phe con el sexo del recién nacido
2. Determinar el rango de confianza de los valores de Phe en recién nacidos según el tiempo a la toma de la muestra de sangre
3. Determinar el intervalo de confianza al 95% de los valores de Phe según el tipo de lactancia
4. Calcular la posible variación de los valores de normalidad de Phe según la edad gestacional
5. Eliminar mediante análisis multivariante las posibles variables de confusión respecto a los parámetros antes mencionados (edad gestacional, tipo de lactancia y tiempo a la toma de la muestra)
6. Calcular los valores predictivos de Phe según el tipo de lactancia y grupo de edad gestacional



4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1.- POBLACIÓN

El estudio actual se ha realizado recogiendo los datos de las muestras de sangre desecada en papel de filtro obtenidas para el Cribado Neonatal de Enfermedades Metabólicas de todos los recién nacidos en la provincia de Alicante y en el Hospital General Universitario de Alicante durante un período de 3 años que abarca desde Julio del año 2010 a Junio del año 2013.

Los datos que se recogieron fueron:

- Días desde el nacimiento a la toma de la muestra de sangre
- Sexo
- Tipo de lactancia
- Peso al nacimiento
- Edad gestacional

Todos estos datos constan en la ficha de cada neonato que se entrega a los padres para la realización del cribado de enfermedades metabólicas.

4.1.1.- Criterios de inclusión

Se incluyeron en este trabajo todos los niños nacidos en la provincia de Alicante, en el período desde Julio de 2010 a Junio de 2013 y que cumplen las condiciones siguientes:

- Fichas de los niños en las que figuraba los días desde el nacimiento hasta la toma de la muestra de sangre.
- Aquellos niños en los que la calidad de la muestra estaba conforme a los criterios de calidad preanalíticos (Espada, 2001).

4.1.2.- Criterios de exclusión

- Niños con valores de Phe superiores de 2,5 mg/dl (151,5 μ mol/l) puesto que dicho valor es el punto de corte que se usa de forma rutinaria en éste y en el resto de laboratorios españoles, el cual, además, ha sido evaluado y aceptado previamente mediante estudios de percentiles en nuestra población.
- Aquellos casos en los que los datos de lactancia, edad gestacional y peso al nacimiento no fueron registrados por el personal sanitario competente.
- Extracción de la muestra de sangre con más de 10 días tras el nacimiento.

4.1.3.- Muestreo

Las muestras se recogieron en todos los Hospitales y Centros Sanitarios pertenecientes tanto a la red pública como a la red privada de la provincia de Alicante, siguiendo el protocolo elaborado por la Consellería de Sanidad y los criterios de calidad de la toma de muestras (Espada, 2001).

Se rellenó un formulario específico del Programa de Cribado de Neonatal de la Comunidad Valenciana, previo a la extracción de la muestra de sangre, que se realiza de forma rutinaria según el protocolo previamente mencionado, y en el que constan tanto los datos identificativos como los datos clínicos del niño.

La toma de la muestra se realizó por punción en el talón, previa asepsia de la zona con isopropanol, evaporación del mismo e impregnación en papel CF12.

Las muestras obtenidas cada día se conservaron en condiciones adecuadas hasta el envío al laboratorio para su procesamiento. Todos los hospitales tienen al menos dos días de envío al laboratorio de cribado mediante mensajeros específicos.

Una vez que las muestras han sido recepcionadas en el laboratorio, se continúa con su procesado, el cual incluye:

- Numeración de las muestras
- Registro en la aplicación informática proporcionada por Consellería de Sanidad (MetaB) de los datos identificativos y clínicos del niño presentes en la ficha

- Análisis de las muestras mediante el método analítico descrito posteriormente
- Introducción de los valores de Phe en la ficha electrónica de cada niño en el programa informático MetaB
- Validación post-analítica de los datos por el facultativo

Todo este proceso se realizó siguiendo los protocolos del laboratorio de Cribado Neonatal del HGUA PNT-CN-01: "Recepción de muestras, identificación y registro informático" (Anexo 1) y PNT-CN-03: "Determinación de Phe en sangre desecada en papel de filtro" (Anexo 2) y que se presentan como anexos.

Para este trabajo se creó un archivo Excell en el que se registraron los valores de Phe que cumplían los criterios de inclusión y exclusión previamente descritos, junto con el resto de datos previamente mencionados (edad gestacional, días a la toma de la muestra, sexo, tipo de lactancia y peso al nacimiento) de forma anónima y no filiable.

Con las muestras obtenidas se definieron distintos subgrupos atendiendo a las variables:

- Sexo: hombre y mujer
- Edad gestacional en semanas
- Días desde el nacimiento a la toma de muestra en días
- Tipo de alimentación: materna, mixta, fórmula y nutrición parenteral y/o enteral (NP/NE)
- Grupos de edad gestacional. La división de las muestras según edad gestacional se realizó de acuerdo a la clasificación de los recién nacidos según edad gestacional, considerando a los niños con edad gestacional inferior a 32 semanas recién nacidos muy pretérmino (RNMPT); de 32 a 37 semanas, recién nacidos pretérmino (RNPT) y de 37 en adelante, recién nacidos a término (RNT) (Avery, 1988; Sáenz, 2008; SEN, 2011).

4.2.- DETERMINACIONES ANALÍTICAS

4.2.1.- Cuantificación de Phe en sangre desecada en papel

La determinación cuantitativa de Phe en sangre se realiza mediante el kit “Neonatal Phenylalanine” (Perkin Elmer) optimizado para la determinación en muestras de sangre desecadas sobre papel de filtro y según el protocolo del laboratorio que se presenta en los anexos, elaborado siguiendo las normas relativas a la calidad y competencia (AENOR, 2007), documento PNT-CN-03: “Determinación de Phe en sangre desecada en papel de filtro” (Anexo 2).

El principio del método se basa en una modificación del procedimiento fluorométrico publicado por McCaman y Robins (McCaman, 1962; Wu, 1979). El ensayo se fundamenta en el incremento de fluorescencia de un producto de reacción Phe-nihidrina producido por el dipéptido L-leucil-L-alanina. Se usa además, un tampón que contiene ácido succínico para optimizar la fluorescencia e incrementar la especificidad y un reactivo que contiene cobre con el fin de potenciar la reacción y reducir el ruido de fondo (Figura 9):

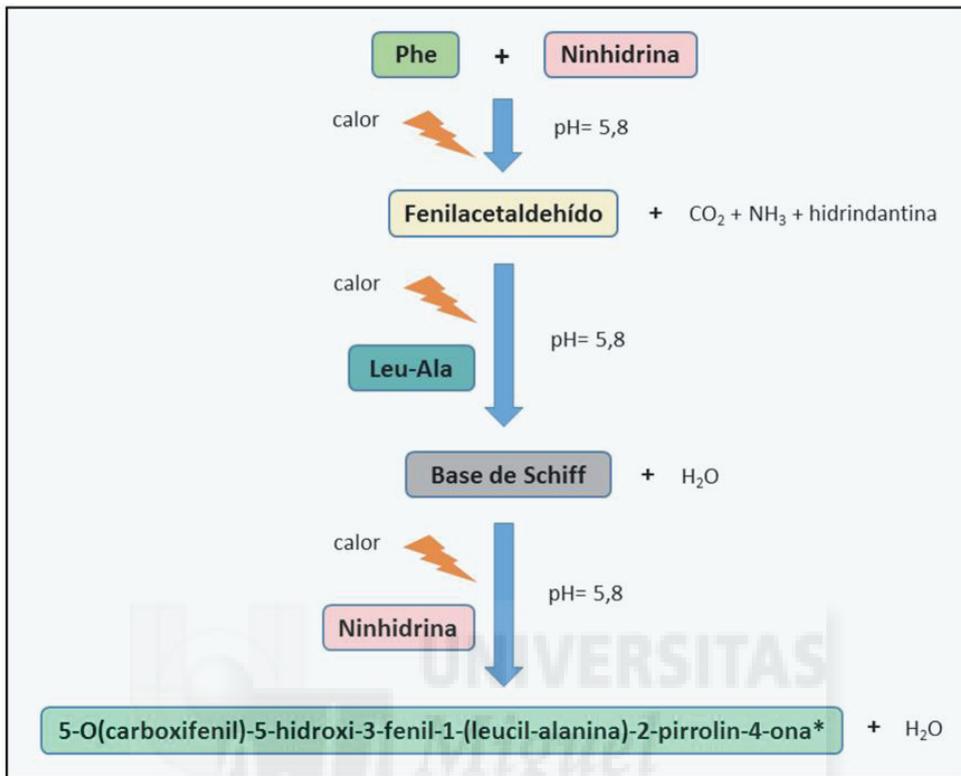


Figura 9. Esquema de la reacción de formación del complejo fluorescente (*) tras reacción del aminoácido Phe con ninhidrina para su posterior cuantificación. La cantidad de fluorescencia emitida es directamente proporcional a la concentración inicial de Phe en la muestra.

La fluorescencia se mide usando una longitud de onda de excitación de 390 nm y una longitud de onda de emisión de 480 nm. Este método es capaz de medir específicamente sólo Phe, aún en presencia de otros aa.

La concentración se ha expresado en mg/dl al ser ésta la que aparece en la ficha electrónica del programa MetaB y que figuran en todos los programas de control utilizados. No obstante, también se expresan a lo largo del texto las equivalencias en unidades del Sistema Internacional ($\mu\text{mol/l}$). Fácilmente puede interconvertirse entre estas unidades mediante la fórmula:

$$[Phe](\mu\text{mol/l}) = [Phe](\text{mg/dl}) \times 60,5$$

4.2.2.- Controles de calidad en el entorno de los valores de la normalidad

4.2.2.1.- Control interno

En cada serie analítica se introducen dos controles proporcionados por Perkin Elmer junto con el kit "Neonatal Phenylalanine":

- Normal: concentración de 2,0 mg/dl (121 μ mol/l)
- Patológico: concentración de 7,0 mg/dl (424 μ mol/l)

En la siguiente figura, se representan los valores de estos controles obtenidos en el laboratorio de Cribado Neonatal del HGUA en 28 series analíticas diferentes:

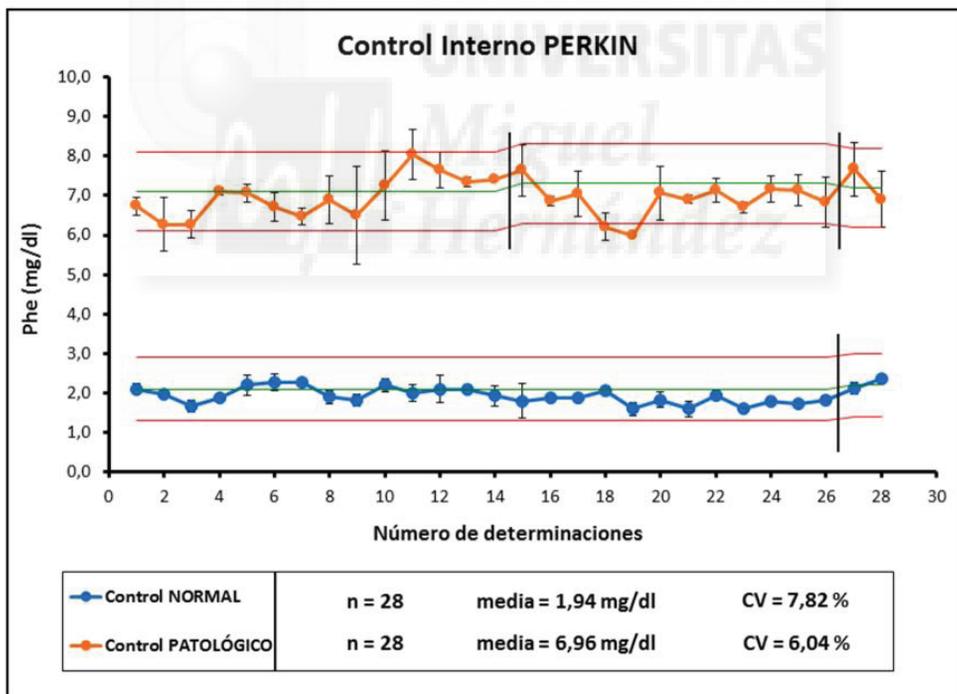


Figura 10. Representación gráfica de los controles internos de Perkin del mes de Julio de 2012. Las líneas continuas verdes y rojas representan la media y el rango \pm 2 SD, respectivamente. Las líneas negras verticales representan cambios de lote de control.

Se van a aceptar los controles siempre que exista una variación interserial inferior al 20%. Los criterios de aceptación de controles están determinados en la especificación de calidad del laboratorio E2-PNT-CN-03: "Control interno de calidad" (Anexo 3) que se adjunta también como anexo.

4.2.2.2.- Evaluación externa de la calidad

Para la evaluación por un programa de control externo, se participa en los siguientes planes de intercomparación de laboratorios, siguiendo las recomendaciones establecidas (Hawkins, 2006; Gella, 2009; Izquierdo, 2011):

- "Infant Screening Quality Assurance Program". Center for Disease Control (CDC) Atalanta, USA:
 - o Evaluación de carácter semestral con 3 niveles de concentración para procesar en 5 series analíticas diferentes.
 - o Evaluación de carácter trimestral con 5 muestras problema de distintas concentraciones, entre las cuales, puede haber alguna muestra patológica. Los resultados se emiten indicando si están o no en rango de normalidad o anormalidad
- "Programa de Evaluación Externa de la Calidad de la Asociación Española de Cribado Neonatal (AECNE)". Suministra tres controles con carácter mensual. Una vez emitidos los resultados, son analizados estadísticamente por AECNE y publicados en la página web de la sociedad, así como el conjunto de los mismos a lo largo de un año. Ese programa sigue las guías de participación en programas de intercomparación (ENAC, 2008).

Los resultados del mes de Julio de 2012 se presentan en las figuras siguientes para cada uno de los tres niveles analizados. Están indicados mediante una flecha los resultados del laboratorio de Alicante, siendo desconocida la asignación de los demás resultados al resto de laboratorios participantes:

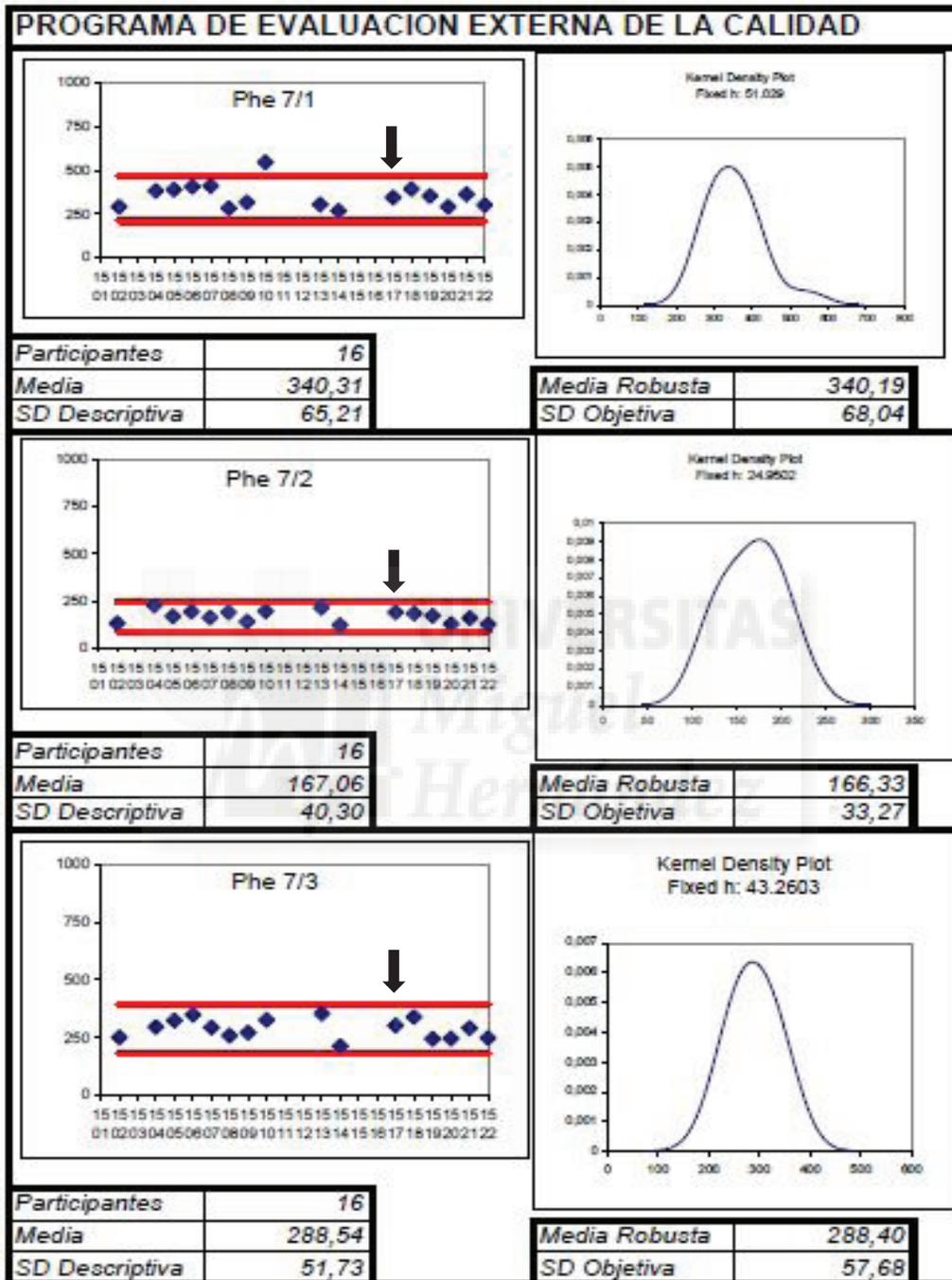


Figura 11. Informe de Julio de 2012 de los controles externos de Phe realizados por AECNE (www.aecne.es). La flecha representa los valores de nuestro laboratorio dentro del conjunto global de datos.

Los criterios de aceptación de los controles quedan reflejados en la especificación de calidad del laboratorio E3-PNT-CN-03: "Control externo de la calidad" (Anexo 4) y que se presenta en los anexos.

4.3.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se han procesado a través del paquete estadístico IBM- SPSS Statistic (Statistical Package for the Social Sciences, 2000) versión 22.0. Se han obtenido estadísticas descriptivas, como frecuencias, proporciones, medidas de tendencia central y de dispersión.

Posteriormente para decidir el uso de pruebas paramétricas o no paramétricas se aplicó la prueba de normalidad y bondad de ajuste de Kolmogorov–Smirnov. Ésta prueba rechaza o aprueba la hipótesis de normalidad de los datos, e indica si la estadística inferencial a aplicar es mediante pruebas paramétricas o no paramétricas.

Las distribuciones han sido analizadas mediante el test no paramétrico Kruskal-Wallis.

Con el fin de dilucidar la repercusión individual de cada una de las variables analizadas sobre el valor de Phe, se ha realizado el análisis de correlación multivariable de la variable dependiente Phe (mg/dl) considerando variables predictoras el sexo, la dieta (materna, mixta, fórmula y NP/NE), el grupo de edad gestacional (RNT, RNPT y RNMPT) y tiempo a la toma de la muestra de sangre (durante la primera semana o posterior).

Se ha considerado un nivel de significación estadística $p < 0,05$.



5. RESULTADOS

5.1.- DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

5.1.1.- Variable Phe

Los valores de Phe no siguen una distribución normal según el resultado de la prueba de Kolmogorov-Smirnov ($p < 0,05$) con una mediana de 1,1 mg/dl (66 $\mu\text{mol/l}$) y un rango intercuartílico (p75-p25) de 0,5 mg/dl (30 $\mu\text{mol/l}$).

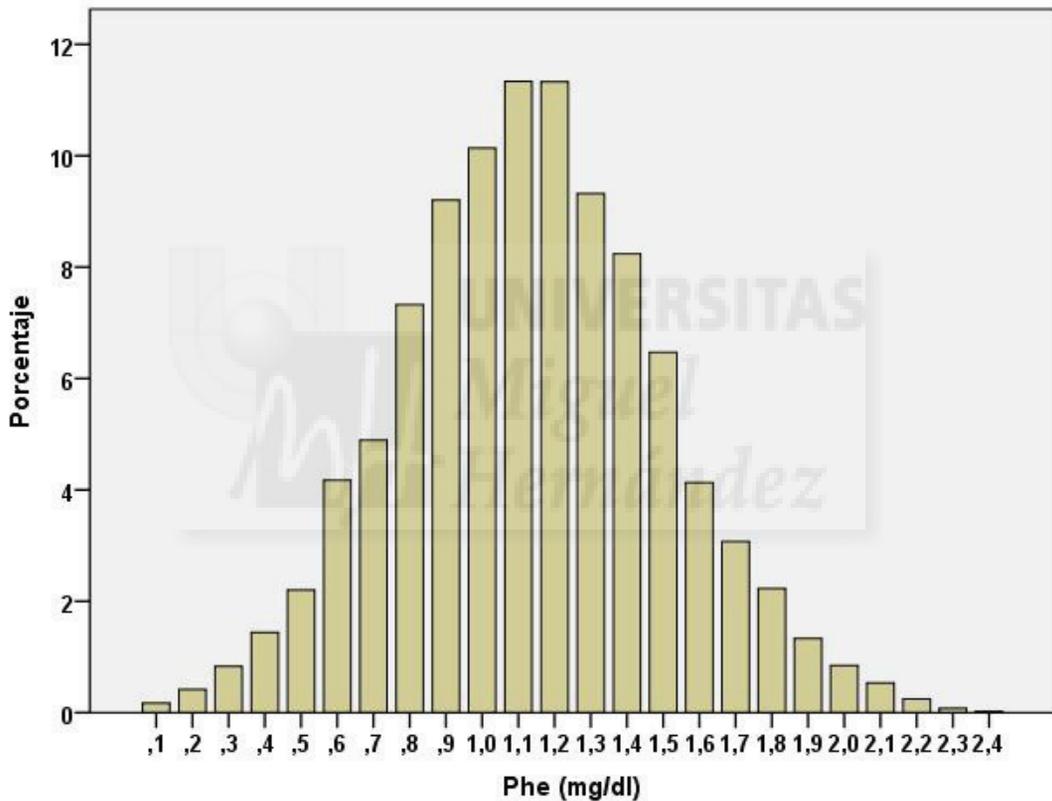


Figura 12. Distribución de los valores de Phe en el total de la muestra (n = 11.811)

Además, se ha calculado la distribución por percentiles de los valores de Phe, quedando reflejados en la siguiente tabla:

Tabla 2. Valores de percentiles de la variable Phe

Percentiles Phe (mg/dl)						
5	10	25	50	75	90	95
0,50	0,70	0,90	1,10	1,40	1,60	1,80

5.1.2.- Caracterización del resto de variables

Para el resto de variables cuantitativas (edad gestacional, días a la toma de la muestra, peso al nacimiento, grupos de edad gestacional y grupos día a la toma de muestra) se establecieron las pruebas pertinentes para comprobar si seguían o no una distribución paramétrica. El resultado final fue que ninguna de las variables seguía una distribución normal. El resumen de las pruebas se muestra a continuación:

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de Phe (mg/dl) es normal con la media 1,138 y la desviación estándar 0,39.	Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra	,000 ¹	Rechace la hipótesis nula.
2	La distribución de DIAS A LA MUESTRA es normal con la media 5,368 y la desviación estándar 2,75.	Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra	,000 ¹	Rechace la hipótesis nula.
3	La distribución de PESO AL NACIMIENTO es normal con la media 2.868,851 y la desviación estándar 697,49.	Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra	,000 ¹	Rechace la hipótesis nula.
4	La distribución de EDAD GESTACIONAL es normal con la media 37,481 y la desviación estándar 34,82.	Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra	,000 ¹	Rechace la hipótesis nula.
5	La distribución de GRUPO EDAD GESTACIONAL es normal con la media 2,358 y la desviación estándar 0,56.	Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra	,000 ¹	Rechace la hipótesis nula.
6	La distribución de GRUPO DIAS A LA MUESTRA es normal con la media 1,055 y la desviación estándar 0,23.	Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra	,000 ¹	Rechace la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

¹Lilliefors corregido

Figura 13. Resumen de contraste de hipótesis del resto de variables del estudio

5.1.2.1.- Variable “días a la toma de muestra”

La variable “días a la toma de muestra” no sigue una distribución paramétrica y posee una mediana de 5 días y un rango intercuartílico (p75-p25) de 2 días.

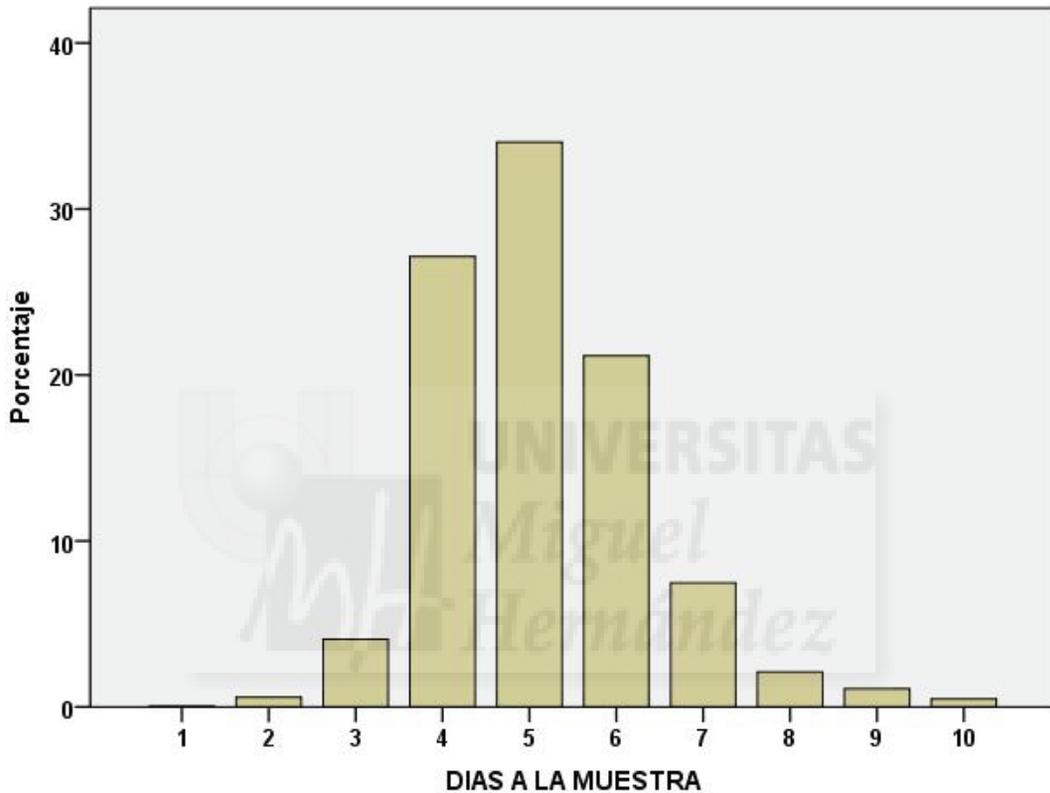


Figura 14. Distribución de los valores de “días a la muestra” en el total (n = 11.498)

Además, se ha calculado la distribución por percentiles de los valores de “días a la muestra”, quedando reflejados en la siguiente tabla:

Tabla 3. Valores de percentiles de la variable “Días a la muestra”

Percentiles “Días a la muestra” (días)						
5	10	25	50	75	90	95
4,0	4,0	4,0	5,0	6,0	7,0	7,0

5.1.2.2.- Variable “peso al nacimiento”

La variable “peso al nacimiento” no sigue una distribución paramétrica y posee una mediana de 2.915 g y un rango intercuartílico (p75-p25) de 830 g.

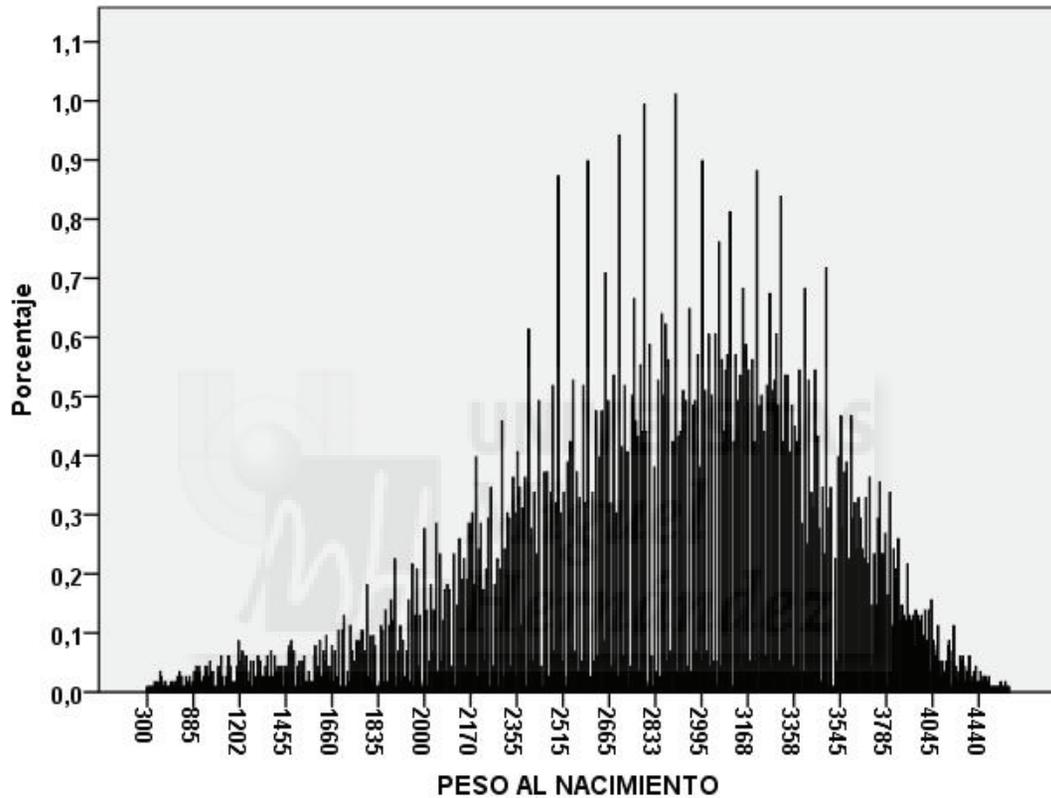


Figura 15. Distribución de los valores de “peso al nacimiento” en el total de la muestra (n = 11.572)

Además, se ha calculado la distribución por percentiles de los valores de “peso al nacimiento”, quedando reflejados en la siguiente tabla:

Tabla 4. Valores de percentiles de la variable “Peso al nacimiento”

Percentiles “Peso al nacimiento” (g)						
5	10	25	50	75	90	95
1.680	2.020	2.480	2.915	3.310	3.660	3.850

5.1.2.3.- Caracterización de las variables cualitativas

Las frecuencias y porcentajes de las variables cualitativas sexo, tipo de lactancia y grupo de edad gestacional se representan en la siguiente tabla:

Tabla 5. Porcentajes de la muestras según sexo, tipo de lactancia y grupos de edad gestacional

Variable	n (%)	
Sexo	<i>Hombre</i>	6.141 (51,9)
	<i>Mujer</i>	5.681 (48,0)
Tipo Lactancia	<i>Materna</i>	6.447 (55,7)
	<i>Mixta</i>	2.998 (25,9)
	<i>Artificial</i>	2.073 (17,9)
	<i>NP/NE</i>	64 (0,6)
Grupo EG	<i>RNMPT</i>	487 (4,1)
	<i>RNPT</i>	6.578 (55,9)
	<i>RNT</i>	4.702 (40,0)

5.2.- VARIACIÓN SEGÚN EL SEXO

Se ha investigado la posible variación de los valores de Phe con el sexo de los recién nacidos. Puesto que la variable Phe es una variable que sigue una distribución no paramétrica, se realiza el análisis estadístico que corresponde, obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 6. Mediana, rango intercuartílico e intervalo de confianza al 95% (I.C.) de los valores de Phe (mg/dl) según el sexo (n = 11.804)

Sexo	n	Mediana	Rango (p75-p25)	I.C (95%)	p (K.W)
Hombres	6.132	1,10	0,50	1,13 – 1,16	ns
Mujeres	5.672	1,10	0,50	1,12 – 1,14	

Se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los valores de Phe entre ambos sexos.

Sin embargo, aunque la Phe no parece depender del sexo, podría ser que hubiera diferencias en la distribución muestral por sexos en función de la edad gestacional, lo que puede estar interfiriendo en la estadística inferencial. En la siguiente tabla se muestra la distribución de los grupos de edad gestacional en función del sexo:

Tabla 7. Distribución de los grupos de edad gestacional en función del sexo (n = 11.760)

	Sexo		
	Hombres n (%)	Mujeres n (%)	
Grupo EG	RNMPT	274 (4,5)	213 (3,8)
	RNPT	3.477 (56,9)	3.099 (54,8)
	RNT	2.355 (38,6)	2.342 (41,4)

χ^2 (Chi- Cuadrado): p = 0,002

Se observa que existen diferencias significativas de la distribución de los grupos de edad gestacional en función del sexo, lo que justificaría un estudio multivariante que aclarase la influencia de los grupos de edad gestacional sobre los niveles de Phe.

5.3.- VARIACIÓN CON LOS DIAS A LA TOMA DE LA MUESTRA

Para abordar la posible variación de los valores de Phe con los días de vida a la toma de la muestra, se agruparon los valores de la variable “días a la toma de muestra” en una nueva variable cualitativa que se llamó “Grupo días a la toma de muestra”, cuya descripción se representa en la siguiente tabla:

Tabla 8. Porcentaje de la muestra según la variable “Grupo días a la muestra” (n = 11.520)

Variable	n (%)
Grupo Días a la muestra	
≤ 7 días	10.888 (92,0%)
> 7 días	632 (5,3 %)

A continuación, se procedió mediante el estudio estadístico de test no paramétrico, recogiendo los resultados en la tabla siguiente:

Tabla 9. Mediana, rango intercuartílico e intervalo de confianza al 95% (I.C) de los valores de Phe (mg/dL) según los días a la toma de la muestra (n = 11.565)

Grupo Días a la muestra	n	Mediana	Rango (p75-p25)	I.C (95%)	p (K.W)
≤ 7 días	10.871	1,14	0,50	1,13 – 1,14	0,047
> 7 días	632	1,20	0,50	1,14 – 1,20	

Se puede afirmar con un nivel de significación $p < 0,05$ que los valores de Phe son ligeramente mayores en aquellos pacientes a los que se les extrajo la muestra con más de 7 días de vida.

De la misma manera que en el caso del sexo, puede ser que haya diferencias en la distribución de los días a la toma de muestra en función de la edad gestacional, lo que se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 10. Distribución de los grupos de días a toma de muestra en función de la edad gestacional (n = 11.458)

	Días la toma de muestra	
	≤ 7 días n (%)	> 7 días n (%)
Grupo EG	<i>RNMPT</i>	378 (4,5)
	<i>RNPT</i>	5.802 (53,6)
	<i>RNT</i>	4.650 (42,9)

χ^2 (Chi- Cuadrado): $p = 0,000$

Puesto que existen diferencias claramente significativas en la distribución de los días a la toma de la muestra en función de la edad gestacional, esta interacción entre variables también justificaría un estudio multivariante para determinar la contribución individual de la variable “ grupo días a la toma de la muestra” sobre los valores de Phe.

5.4.- VARIACIÓN CON EL TIPO DE LACTANCIA

Se analizó también la posible asociación de las variables “tipo de lactancia” con los niveles de Phe. Para ello, se procedió al estudio estadístico específico para variables no paramétricas, cuyo resultado se refleja en la siguiente tabla:

Tabla 11. Mediana, rango intercuartílico e intervalo de confianza al 95% (I.C) de los valores de Phe (mg/dl) según el tipo de lactancia (n = 11.564)

Tipo Lactancia	n	Mediana	Rango (p75-p25)	I.C (95%)	p (K.W)
<i>Materna</i>	6.434	1,10	0,40	1,09 – 1,11	0,000
<i>Mixta</i>	2.996	1,20	0,50	1,16 – 1,20	
<i>Fórmula</i>	2.070	1,20	0,50	1,15 – 1,18	
<i>NP/NE</i>	64	1,50	0,50	1,42 – 1,62	

De manera muy significativa, se puede observar que los valores de Phe difieren en las distintas categorías de tipo de lactancia. Concretamente, los niños alimentados con lactancias mixtas y con fórmula tienen valores de Phe mayores comparado con los niños alimentados exclusivamente con lactancia materna. Además, los niños que se alimentan con NP y/o NE son los que tienen valores mayores de Phe en comparación al resto.

Al igual que para los casos anteriores, se calculó la influencia de la edad gestacional sobre el tipo de lactancia, obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 12. Distribución del tipo de lactancia en función de la edad gestacional (n = 11.527)

	Tipo de lactancia				
	<i>Materna</i> n (%)	<i>Mixta</i> n (%)	<i>Fórmula</i> n (%)	<i>NP/NE</i> n (%)	
Grupo EG	<i>RNMPT</i>	86 (1,3)	230 (7,7)	120 (5,8)	35 (54,7)
	<i>RNPT</i>	2.767 (43,2)	2.231 (74,6)	1.395 (67,5)	29 (45,3)
	<i>RNT</i>	3.552 (55,5)	530 (17,7)	552 (26,7)	0

χ^2 (Chi- Cuadrado): p = 0,000

Debido a las diferencias entre la distribución del tipo de lactancia en función de la variable “grupos de edad gestacional”, para eliminar interferencias entre variables, también queda justificado un análisis multivariante que determine la contribución individual del tipo de lactancia sobre los valores de Phe.

5.5.- VARIACIÓN CON LA EDAD GESTACIONAL

Se siguió una estrategia de estudio similar para la variable “edad gestacional”, de manera que los valores de la misma se agruparon en una nueva variable cualitativa “Grupos EG”, descrita anteriormente. A continuación, se procedió a analizar la posible asociación de ambas variables mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, cuyo resultado se presenta en la siguiente tabla:

Tabla 13. Mediana, rango intercuartílico e intervalo de confianza al 95% (I.C) de los valores de Phe (mg/dl) según la edad gestacional (n = 11.767)

Grupo EG	n	Mediana	Rango (p75-p25)	I.C (95%)	p (K.W)
RNMPT	487	1,40	0,60	1,36 – 1,43	
RNPT	6.577	1,20	0,40	1,19 – 1,21	0,000
RNT	4.687	1,00	0,40	1,01 – 1,03	

Se puede afirmar que las diferencias encontradas en la concentración de Phe en los distintos grupos son muy significativas, de manera que los niveles de Phe son mayores en los niños RNMPT (< 32 semanas de gestación) en comparación con los RNPT (de 32 a 37 semanas) y con los RNT (> 37 semanas), respectivamente.

5.5.1.- Variación con la edad gestacional en función del tipo de lactancia

A continuación, para comprobar la variación de los valores de Phe con la edad gestacional se evaluó cada tipo de lactancia de manera individual. Los resultados de los test estadísticos para cada tipo de lactancia se muestran a continuación:

Tabla 14. Mediana, rango intercuartílico e intervalo de confianza al 95% (I.C) de los valores de Phe (mg/dl) según la edad gestacional clasificados por tipo de lactancia (n = 11.509)

Tipo de lactancia	Grupo EG	n	Mediana	Rango (p75-p25)	I.C (95%)	p (K.W)
Materna (n = 6.392)	RNMPT	86	1,40	0,60	1,30 – 1,47	0,000
	RNPT	2.766	1,20	0,40	1,19 – 1,21	
	RNT	3.540	1,00	0,40	1,01 – 1,03	
Mixta (n = 2.990)	RNMPT	230	1,40	0,60	1,34 – 1,45	0,000
	RNPT	2.231	1,20	0,50	1,18 – 1,22	
	RNT	529	1,00	0,40	0,97 – 1,03	
Fórmula (n = 2.065)	RNMPT	120	1,40	0,50	1,27 – 1,41	0,000
	RNPT	1.395	1,20	0,50	1,19 – 1,23	
	RNT	550	1,00	0,40	0,99 – 1,04	
NP/NE (n = 64)	RNMPT	35	1,60	0,60	1,51 – 1,75	0,000
	RNPT	29	1,50	0,70	1,23 – 1,55	
	RNT	0	-	-	-	

Al igual que para todos los casos, se observan diferencias significativas en los niveles de Phe entre los distintos grupos de lactancia y edad gestacional, siendo los RNMPT los que tienen concentraciones mayores de Phe, independientemente del tipo de lactancia. Además, se observan valores mayores de Phe en niños alimentados con fórmula y NP/NE respecto al resto de alimentaciones, siendo los valores más altos en aquellos niños alimentados con NP y/o NE.

Además, se comprueban los valores en el total de la distribución, obteniendo para ello los percentiles, que se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 15. Percentiles de los valores de Phe (mg/dl) según la edad gestacional clasificados por tipo de lactancia.

Tipo de lactancia	Grupo EG	Percentiles				
		10	25	75	90	95
<i>Materna</i> (n = 6.392)	<i>RNMPT</i>	0,87	1,10	1,70	1,93	2,07
	<i>RNPT</i>	0,70	1,00	1,40	1,70	1,80
	<i>RNT</i>	0,60	0,80	1,20	1,40	1,50
<i>Mixta</i> (n = 2.990)	<i>RNMPT</i>	0,81	1,10	1,70	1,90	2,10
	<i>RNPT</i>	0,80	0,90	1,40	1,70	1,80
	<i>RNT</i>	0,60	0,80	1,20	1,40	1,50
<i>Fórmula</i> (n = 2.065)	<i>RNMPT</i>	0,80	1,10	1,60	1,75	2,00
	<i>RNPT</i>	0,70	1,00	1,50	1,70	1,80
	<i>RNT</i>	0,60	0,80	1,20	1,40	1,60
<i>NP/NE</i> (n = 64)	<i>RNMPT</i>	1,16	1,40	2,00	2,10	2,12
	<i>RNPT</i>	0,70	1,00	1,70	1,90	2,10
	<i>RNT</i>	-	-	-	-	-

Ante los resultados que se han presentado, cabe la duda razonable de que hayan implicaciones cruzadas entre las distintas variables estudiadas; por ejemplo, se ve cómo la frecuencia del tipo de alimentación es muy distinta según el grado de prematuridad, siendo posible por tanto la confusión de la repercusión de unos parámetros sobre otros. Así, queda establecido la serie de relaciones que figuran en la siguiente representación y las dudas que ello plantea:

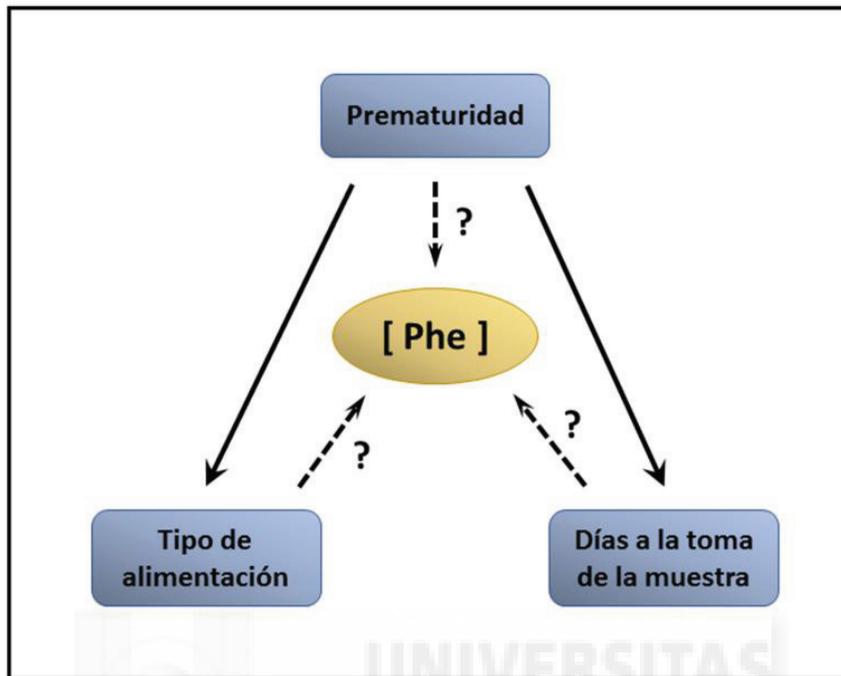


Figura 16. Relaciones entre las distintas variables a estudio. En línea sólida, se muestran las relaciones ya conocidas y establecidas que influyen en la concentración neonatal de Phe, mientras que en línea discontinua se muestran aquellas posibles relaciones en estudio en este trabajo.

5.6.- ANÁLISIS MULTIVARIANTE

Como se ha visto anteriormente, los valores de Phe no varían con el sexo de los recién nacidos, pero sin embargo, son sensiblemente mayores en aquellos niños con más de 7 días de vida (a la hora de la toma de la muestra) y claramente superiores en los RNMP (< 32 semanas de gestación) y alimentados con NP y/o NE respecto a otros tipos de lactancia. Por tanto, para comprobar la repercusión individual de cada una de las variables analizadas sobre el valor de Phe, se ha realizado el análisis de correlación multivariante de la variable dependiente Phe (mg/dl) considerando como variables predictoras el sexo, la dieta (materna, mixta, fórmula y NP/NE), el grupo de edad gestacional (RNT, RNPT y RNMP) y tiempo a la toma de la muestra de sangre (durante

la primera semana o posterior), obteniéndose un modelo con $r = 0,279$ y $r^2 = 0,078$ que es significativo con $p = 0,000$. Los resultados del estudio se expresan en la tabla siguiente:

Tabla 16. Coeficiente de correlación y significancia de los valores de Phe frente a cada una de las variables estudiadas. En la columna de las variables, la variable de referencia se indica tras el símbolo “//”.

Variable	Coeficiente tipificado β (I.C. 95%)	Significación
Sexo (niño//niña)	0,009 (-0,007 – 0,21)	ns
Lactancia mixta//materna	-0,001 (-0,018 – 0,17)	ns
Lactancia fórmula//materna	-0,004 (-0,023 – 0,15)	ns
NP/NE // materna	0,041 (0,119 – 0,308)	0,000
RNMPT//RNT	0,193 (0,340 – 0,416)	0,000
RNPT//RNT	0,246 (0,178 – 0,209)	0,000
Muestra en 1 ^o semana//posterior	0,032 (0,023 – 0,085)	0,001

La expresión gráfica de los mismos están expresados en la figura siguiente (Figura 17), en la que se observa con claridad como los niveles de Phe aumentan según lo hace la prematuridad (menor edad gestacional), siendo prácticamente iguales con las alimentaciones materna, mixta y fórmula, pero se elevan en la alimentación parenteral y/o enteral, únicamente utilizada en los RNPT y RNMPT.

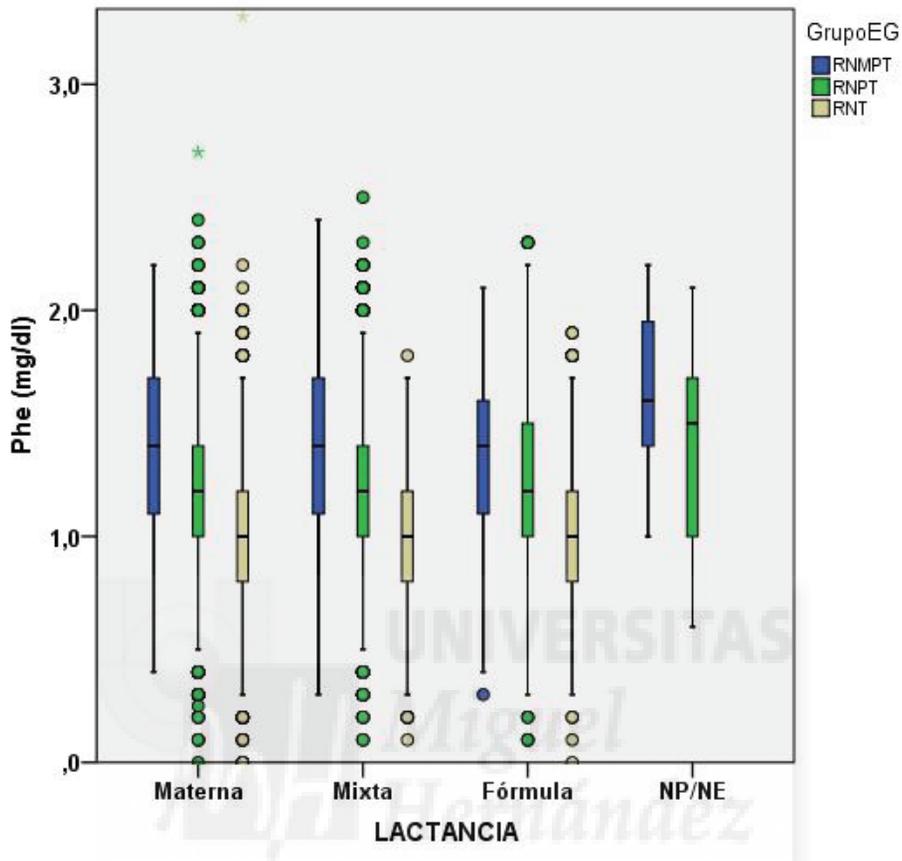


Figura 17. Valores de Phe (mg/dl) según grupo de edad gestacional y tipo de alimentación tras análisis multivariante

Además, se han calculado los valores predictivos de concentración de Phe según este modelo para los distintos subgrupos de edad gestacional y de tipo alimentación que vienen expresados en la figura siguiente (Figura 18):

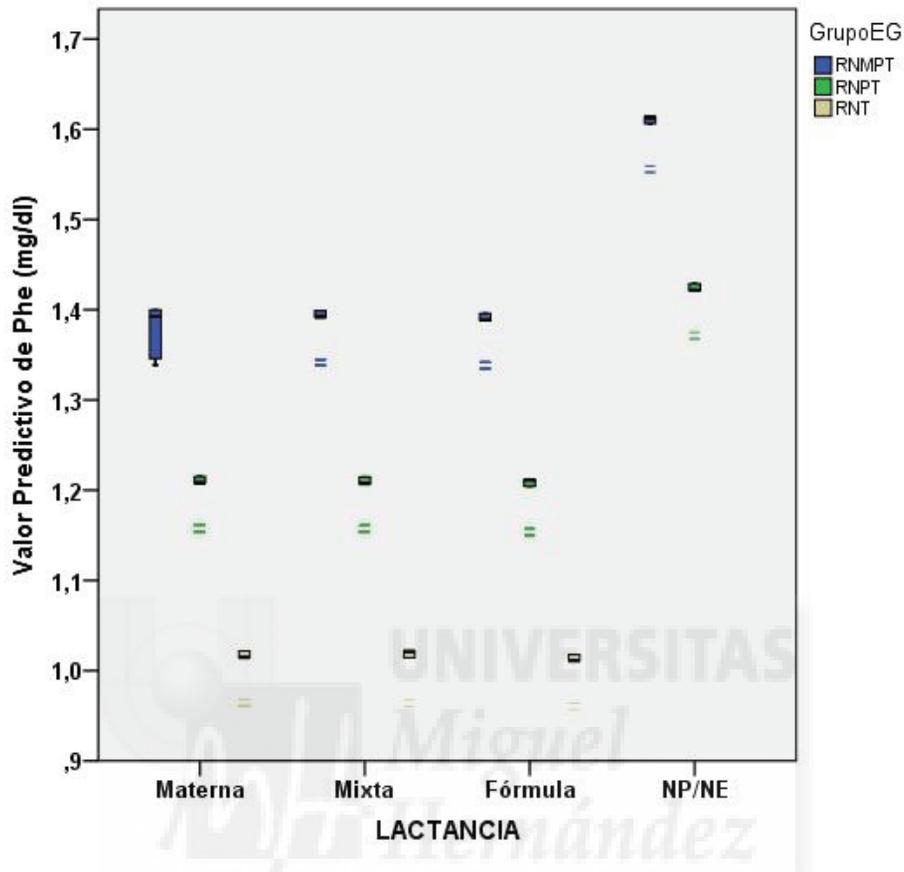


Figura 18. Valores predictivos de normalidad de los valores de Phe (mg/dl) según grupo de edad gestacional (RNT, RNPT y RNMPT) y tipo de alimentación.

Se puede observar que la concentración esperada de Phe es más elevada a medida que disminuye la edad gestacional, independientemente del tipo de alimentación, excepto en los neonatos alimentados con NP/NE, en los que se observan valores mucho más altos para ambos grupos (RNMPT y RNPT).



6. DISCUSIÓN

6.1.- DISEÑO DEL ESTUDIO Y TAMAÑO MUESTRAL

Este trabajo ha consistido en un estudio descriptivo de los valores de Phe obtenidos en el cribado neonatal de todos los recién nacidos de la provincia de Alicante que cumplieron los criterios de inclusión y exclusión establecidos, sin intervención alguna ni modificación sobre las variables establecidas, realizándose de forma totalmente anónima y utilizándose los datos únicamente de forma estadística. Así mismo, se han estudiado algunas de las variables que podrían influir en los valores de corte del cribado neonatal de HPA establecidos para la población general (Holton, 1973; Clemens, 1990), como son el tipo de alimentación (lactancia materna, con fórmula o mixta y NP/NE), la edad gestacional y los días transcurridos desde el nacimiento hasta la toma de la muestra.

Los datos para este estudio se han extraído de forma totalmente anónima de las fichas del cribado neonatal de los recién nacidos de toda la provincia de Alicante, durante un periodo de 3 años, concretamente desde el 1 de Julio de 2010 al 30 de Junio de 2013. Además, todas las muestras analizadas cumplían todos los criterios de calidad preanalítica establecidos en la bibliografía (Espada, 2001; Mei, 2001).

Se ha iniciado el estudio a partir de una muestra total de 11.831 recién nacidos, con la que se han realizado grupos según las distintas variables analizadas (sexo, edad gestacional, edad a la toma de muestra y tipo de alimentación) con el fin de poder analizar la posible repercusión de cada una de las variables estudiadas sobre dicha concentración de Phe. Del mismo modo se realizaron subgrupos combinando las distintas variables, con el fin de utilizar muestras homogéneas. En esta distribución de subgrupos, todos tuvieron un número suficiente de muestras, subsanando la falta de tamaño muestral que se observaba para los RNPT en un trabajo anterior llevado a cabo en el laboratorio de cribado neonatal del HGUA (Manero, 2012).

6.2.- CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA

Al estudiar la muestra total, se observa que todas las variables a estudio no siguen una distribución normal, por lo que se recurre a un análisis estadístico basado en métodos no paramétricos (Figura 13). Al comparar las distintas variables en relación a la concentración de Phe, se constata que existen diferencias significativas en los días a la toma de muestra (Tabla 9), tipo de lactancia (Tabla 11) y edad gestacional (Tabla 13). La mayor edad gestacional (RNT) en el grupo de lactancia materna (Tabla 14) está en concordancia con otros autores y es debida a tres factores:

- menor tiempo de permanencia de estos niños hospitalizados,
- necesidad de fórmulas enriquecidas en los RNPT y RNMPT en los que se recomiendan aportes proteicos más elevados que los contenidos en la leche materna (Hay, 2008),
- dificultad de los RNPT y RNMPT en el acceso a la lactancia materna al estar más tiempo hospitalizados (Merewood, 2006; Nakao, 2008; Walker, 2008; Vieira, 2010).

Los porcentajes de RNT y con lactancia materna son mayores respecto a otros tipos de lactancia y a aquellos neonatos con edad gestacional menor (Tabla 5) concordando con los datos de la población general en la que la frecuencia de partos a término y de lactancia materna es mayor.

La distribución de la muestra dividida en tres grupos de edad gestacional respecto al tipo de lactancia (Tabla 12), resulta en una distribución no homogénea en la que se observan unos porcentajes de tipo de alimentación muy diferentes entre los tres grupos de edad gestacional, siendo mucho más frecuente la lactancia materna entre los RNT que en los RNPT, siendo todavía menos frecuente en los RNMPT, coincidiendo con lo anteriormente expuesto.

Respecto a la variable “días de vida a la toma de muestra”, se observa en la muestra total un porcentaje casi total (92%) de recién nacidos a los que se les punciona el talón antes de la primera semana de vida, estando en concordancia con las recomendaciones internacionales de toma de muestra del cribado neonatal para una estrategia de dos muestras, en la que la segunda muestra es extraída entre el 2º y 5º día de vida (Calderón-López, 2008). Además, se observa un mayor porcentaje de RNPT con

más de 1 semana de vida respecto al resto en el momento de la toma de muestra (Tabla 10), pudiéndose explicar por la mayor estancia hospitalaria debido a su inmadurez y a la mayor probabilidad de enfermedad de base de estos recién nacidos (Merewood, 2006; Nakao, 2008; Walker, 2008; Vieira, 2010).

El porcentaje de recién nacidos con los distintos tipos de alimentación se aproximan a lo descrito para la población española en general, con un porcentaje de lactancia materna al alta hospitalaria de aproximadamente el 90% (de la Torre, 2001). En el presente estudio, el porcentaje de lactancia materna y mixta en la muestra total es de 81,6% (Tabla 5). Además, en este trabajo se ha conseguido aumentar el porcentaje de RNPT y RNMPT a un 60% (Tabla 5) con respecto al 7,5% presentado en un trabajo anterior, en el que también se estudió la posible influencia de la edad gestacional sobre la concentración de Phe en el recién nacido (Manero, 2012), dando mayor consistencia estadística a los resultados previamente obtenidos.

6.3.- VARIACIÓN SEGÚN EL SEXO

No se observa variación de la concentración de Phe con el sexo de los recién nacidos (Tabla 6). Sin embargo, puesto que existe una diferencia significativa entre la distribución de sexos respecto a la edad gestacional (Tabla 7), podría ocurrir una interferencia entre variables que produjera una variación de la Phe en función del sexo debido a dicha variación por la edad gestacional. Sin embargo, tras en el análisis multivariante, se descartó esta influencia confirmándose, por tanto, que el sexo *per sé* no influye en los valores de Phe de los recién nacidos (Tabla 16).

De manera contraria, existen diferentes trabajos en los que se concluye que existen diferencias en los niveles de aa plasmáticos en función del sexo; concretamente, los niveles de Phe, hidroxiprolina, y aa ramificados son mayores en hombres ancianos que en mujeres del mismo grupo de edad (Cynober, 1983). En otro trabajo, se observa que los niveles de Phe, Glu y Gln son más elevados en hombres y mujeres de edad avanzada respecto a individuos más jóvenes (Bancel, 1994). Sin embargo, estos estudios

se han realizado en población adulta, no habiendo datos en población neonatal, por lo que no existen referencias claras que pudieran permitir establecer relaciones en la variación de aa plasmáticos según el sexo en este tipo de población.

6.4.- VARIACIÓN SEGÚN DIAS A LA TOMA DE LA MUESTRA

Se observa que los niveles de Phe son significativamente algo mayores en aquellos niños a los que se les ha extraído la muestra en un tiempo superior a la primera semana de vida respecto a la extracción en los primeros 7 días de vida (Tabla 9). Dadas las posibles interferencias entre variables que pueden influir en la concentración de Phe, se vio que existen diferencias significativas entre los grupos de edad gestacional y los días a la toma de muestra, de manera que el 42,9% de los RNT y el 53,6% de los RNPT se extrajeron la muestra antes de la primera semana, mientras que sólo el 7,8% de los RNT se les extrajo la muestra a partir de la primera semana de vida (Tabla 10). Esto puede explicarse en base a que los RNPT y RNMPT, debido a su extremo grado de inmadurez y al necesitar cuidados médicos especiales, permanecen mucho más tiempo hospitalizados (Merewood, 2006; Nakao, 2008; Walker, 2008; Vieira, 2010), retrasando la extracción de la muestra. Además, se suma que estos recién nacidos, en el período de transición que tiene como principal objetivo evitar el catabolismo proteico, reciben alimentaciones artificiales que tienen una carga proteica mayor (Llanos, 2004; Hay, 2010) que en el caso de los RNT, usualmente alimentados por lactancia materna, lo que va a producir un incremento de la concentración plasmática de aa (Vento, 1990b; Kashyap, 1994), así como una alteración del perfil plasmático de los mismos. Sin embargo, tras el análisis multivariante que excluye las interferencias entre variables, se observa que el tiempo a la toma de la muestra es un factor que claramente influye en la concentración de Phe del neonato, cuando se extrae la muestra tras la primera semana de vida (Tabla 16).

En el período perinatal, respecto al metabolismo proteico, se va a producir una reducción en el aporte de aa debido a la ligación del cordón umbilical (Kalhan, 2008), por lo que las reservas de aa musculares van a servir de sustrato energético del recién nacido (Heine, 1991). Esto va a producir una disminución de la concentración de aa plasmáticos, lo cual unido a la intermitencia de la lactancia y al comienzo de períodos de ayuno entre tomas, hace que los aumentos de aa plasmáticos sean moderados, ya que los aa absorbidos directamente se van a usar en la síntesis proteica dado el alto requerimiento de crecimiento del neonato (Heine, 1991; Medina, 1992).

En cuanto a los valores de Phe, estos disminuyen durante el primer día de vida, estabilizándose alrededor del tercer día tanto en sangre de cordón como en sangre periférica, una vez introducida la alimentación (Sirvent, 1992), dependiendo del tipo de lactancia y de la inmadurez metabólica inherente a la prematuridad (Moya, 2003). Sin embargo, se ha observado que existe una disminución clara entre los valores de Phe alrededor de la primera semana de vida frente a los valores al mes, con la misma fórmula láctea (Buades, 1989) y dentro de la primera semana (Vento, 1990b). No obstante, no existen diferencias entre los valores de Phe al nacimiento y a la primera semana de vida en la evolución entre RNT y RNPT, aunque los valores de Phe son siempre menores en los RNT (Sirvent, 1990).

Por tanto, se puede concluir que la concentración de Phe varía moderadamente en la primera semana de vida, aunque se mantiene dentro de valores normales y que la toma de la muestra debe realizarse siempre, cuando sea posible, antes de la primera semana de vida estando en concordancia con las recomendaciones internacionales de los Programas de Cribado Neonatal (Loeber, 2007; AECNE, 2012; Berry, 2013), ya que puede ser un factor que puede conducir a error si no se tiene en cuenta la situación fisiológica (prematuridad) y alimentaria del neonato, factores que pueden retrasar la extracción de la muestra. Sin embargo, a día de hoy, con la introducción de la tecnología de EMT de manera rutinaria en la mayoría de centros de cribado neonatal, el tiempo de la toma de la muestra no es un factor tan determinante puesto que la determinación simultánea de la relación Phe/Tyr da una mayor sensibilidad a la prueba del talón para el cribado de la PKU y HPA (Chace, 1998; Ceglarek, 2002).

6.5.- VARIACIÓN SEGÚN EL TIPO DE LACTANCIA

Los valores de Phe son ligeramente mayores en niños alimentados con lactancia mixta y fórmula láctea en comparación con aquellos alimentados exclusivamente con lactancia materna (Tabla 11). Esto puede explicarse porque la mayoría de fórmulas adaptadas se basan en la leche bovina suplementada con una fracción proteica mayor rica en aa esenciales, aumentando la concentración de proteína total de dichas fórmulas con respecto a la leche materna (Raiha, 1994b; Moro, 1999), concordando con lo que demuestran otros autores que evalúan la concentración de Phe en niños alimentados con fórmula láctea y con leche materna (Darling, 2004). Concretamente, en el presente estudio, el incremento de la concentración de Phe entre niños alimentados con fórmula en comparación con aquellos alimentados con lactancia materna es aproximadamente de un 9%, estando en concordancia con el resultado de otros autores que encuentran un incremento de hasta un 20% (Scott, 1990).

Además, también se observa que los valores de Phe son significativamente mayores en niños alimentados con NP/NE comparado con el resto, concretamente un 36% (Tabla 11). La posible explicación a esta observación puede ser la gran heterogeneidad en los requerimientos proteicos de los niños alimentados con NP y/o NE, que normalmente suelen corresponder a los RNPT y, sobre todo, a los RNMPT, que en este estudio, entre ambos grupos conforman el 100% de los neonatos alimentados de esta manera (Tabla 12). Estos requerimientos, por un lado, tienen que satisfacer las necesidades de mantenimiento de las funciones básicas para evitar un aumento del catabolismo proteico y, por otro, conducir a la ganancia de peso que permita al neonato crecer (Kashyap, 1994; Llanos, 2004). Para ello, a estos recién nacidos se les suele administrar alimentaciones más agresivas con una mayor carga de nutrientes en general y de proteínas en particular, lo que conduce a un aumento de la concentración de aa plasmáticos (Vento, 1990b; Kashyap, 1994), resultando en una mejora en la tasa de crecimiento y ganancia de peso, incluso en RNMPT sanos (Morisaki, 2014). Respecto al contenido proteico en las fórmulas, se realizó un estudio propio para ver el contenido de proteínas de las fórmulas presentes en el mercado español en el año 2010,

observándose una diferencia muy significativa (t Student, $p < 0,0001$) entre los valores de las fórmulas de inicio (media: 2,10 y SD: 0,17 g proteína/100 Kcal) y las fórmulas para pretérminos (media: 2,85 y SD: 0,24 g proteína/100 Kcal) (Figura 19):

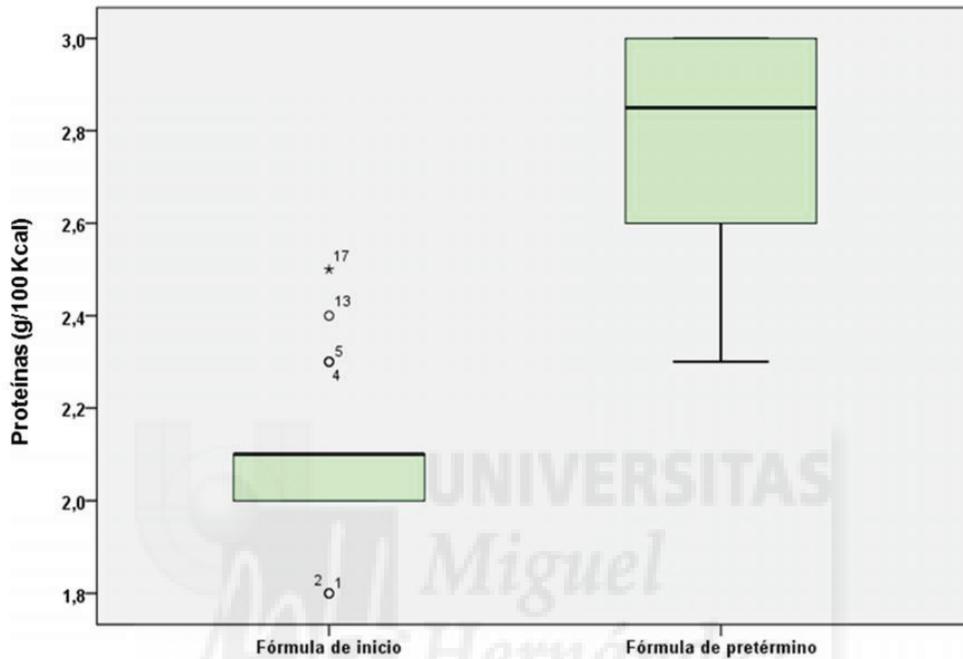


Figura 19. Valores de fórmulas lácteas de inicio (n=21) y fórmulas para pretérminos (n=10) habituales en España.

Otro factor que puede alterar las concentraciones postprandiales de aa es la fuente de dichos aa usados para la preparación de las fórmulas lácteas o de las NP/NE (Moro, 1999).

Como se ha comentado anteriormente, los RNPT, y muy especialmente, los RNMP (< 32 semanas de gestación) son los que suelen depender más de la NP, sobre todo en el período de transición, puesto que no pueden cubrir sus necesidades energéticas utilizando únicamente la vía enteral debido por un lado, a la inherente inmadurez anatómico-funcional del intestino y por otro, al alto riesgo de sufrir enterocolitis necrotizante (Llanos, 2004). Por tanto, en este tipo de pacientes, la NP va

a tener el objetivo fundamental de proporcionar un nivel seguro de ingesta de nutrientes con el fin de disminuir la morbilidad y la mortalidad y asegurar un desarrollo neurocognitivo y desarrollo psicomotor cercano a los RNT (Heine, 1994; Gomis, 2007; Ziegler, 2011).

No existen unos criterios unificados de cantidad de proteínas que la NP debe contener a nivel mundial, existiendo, sin embargo, recomendaciones oficiales por parte de organismos internacionales. Así, la LSRO (Life Sciences Research Office) propone que en los RNPT, independientemente del peso al nacimiento, el rango de ingesta proteica por NP debe estar entre 3,4 – 4,3 g/Kg/día (Klein, 2002). La Sociedad Europea de Gastroenterología Pediátrica (ESPGHAN), sin embargo, recomienda distintos aportes proteicos en función del peso al nacimiento (Agostoni, 2010), tal y como se muestra en la siguiente tabla (Tabla 17):

Tabla 17. Rangos de aporte proteico recomendados por la ESPGHAN para RNPT alimentados con NP (adaptado de Ziegler, 2011)

Aporte proteico	Peso al nacimiento	
	< 1.200 g	≥ 1.200 g
<i>g/Kg/día</i>	4,0 – 4,5	3,5 – 4,0
<i>g/100 Kcal</i>	3,6 – 4,1	3,2 – 3,6

Sin embargo, a pesar de las recomendaciones, la mayoría de los protocolos establecidos para NP en neonatos afirman que el cálculo de los requerimientos energéticos totales, entre los que se incluyen los requerimientos proteicos, deben realizarse de forma individualizada según la edad gestacional, el estado nutricional y la enfermedad subyacente (Gomis, 2007).

Concretamente, en el Hospital General Universitario de Alicante, los aportes proteicos usualmente pautados por el Servicio de Neonatología consisten en un aporte inicial en todo RNPT o neonato desnutrido de 1,0 – 1,5 g/Kg/día que tiene como objetivo

evitar el catabolismo proteico, pero en RNPT con un peso inferior a 1.500 g, se comienza directamente con un aporte proteico de 2,5 g/Kg/día desde el primer día de vida, llegando a un aporte máximo de 3,5 – 3,8 g/Kg/día en un plazo máximo de 2 – 3 días (Hay, 2008; Bustos, 2012), estando en concordancia con las recomendaciones que mencionan no sobrepasar los 4,0 g/Kg/día (Hay, 2010; Embleton, 2014), con el fin de conseguir un aumento lineal de la ganancia de peso en el neonato (Kashyap, 1994; Ziegler, 2011).

Tal y como se observa en la Tabla 12, al encontrar diferencias en la distribución del tipo de lactancia en función de los grupos de EG, se realizó el análisis multivariante para descartar interferencias de otras variables sobre el tipo de lactancia que influyeran en la concentración de Phe, permitiendo evaluar el efecto del tipo de lactancia por sí solo sobre los valores plasmáticos de Phe, resultando en que, de entre todos los tipos de lactancia, sólo la NP y/o NE promueve una elevación de la concentración de Phe de manera muy significativa (Tabla 16).

6.6.- VARIACIÓN CON LA EDAD GESTACIONAL

Las variaciones encontradas en la concentración de Phe entre los grupos de edad gestacional es muy significativa, siendo mayores a medida que la edad gestacional es menor, objetivándose los valores más altos en los RNMPT (Tabla 13). Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en un trabajo anterior realizado por el Laboratorio de Cribado Neonatal del Hospital donde también se cumplía esta relación directa (Manero, 2012), incluso con tamaño muestral de RNPT muy pequeño que restaba potencia estadística al estudio. Otros autores también han observado este fenómeno (Zaffanello, 2003; Zaffanello, 2005).

Al realizar la distribución de la edad gestacional según el tipo de lactancia (Tabla 14), se observan diferencias estadísticamente significativas en los valores de Phe entre los distintos grupos de lactancia y edad gestacional, siendo mayores en RNMPT y RNPT respecto a los RNT en todos los tipos de lactancia, observándose además los valores más

altos en aquellos niños alimentados con NP y/o NE en comparación al resto de alimentaciones, hecho que se confirma al evaluar la totalidad de la distribución mediante el cálculo de los percentiles (Tabla 15). Cuando se realiza el análisis multivariante para eliminar interferencias entre variables, se observa que la baja edad gestacional (RNPT y RNMPT) influye de manera muy significativa en los valores de Phe en neonatos, pudiendo confirmarse una relación directa entre la concentración de Phe y el grado de prematuridad (Tabla 16).

La explicación a este hecho podría deberse, por un lado, a la inmadurez inherente en los RNPT frente a los RNT, siendo mucho más patente en los RNMPT, que normalmente suelen corresponder a los neonatos de muy bajo peso al nacimiento, en los cuales, la inmadurez de rutas metabólicas hepáticas encargadas de la detoxificación, síntesis proteica y metabolismo de aa esenciales, como la ruta de la PAH o la Tyr-aminotransferasa pueden ser insuficientes, pudiendo producir HPA e hipertirosinemia, respectivamente (Raiha, 1974; Shortland, 1994; Beath, 2003). Además, en estos RNMPT es muy frecuente, que debido a la inmadurez pulmonar, sufran complicaciones habituales como el síndrome de distrés respiratorio neonatal, en el que también se ha visto una elevación de los valores de Phe (Ryckman, 2013), al igual que en adultos con la misma patología (Kuo, 1989), probablemente debido a una actividad disminuida del enzima PAH por la depleción de su cofactor THBPT (Ploder, 2008).

Por otro lado, tal y como se ha expuesto en el punto anterior, el mayor aporte proteico que reciben estos niños normalmente alimentados con fórmula y en el caso de los RNMPT, en su gran mayoría, con NP y/o NE, podría también explicar este fenómeno.

6.7.- ANÁLISIS MULTIVARIANTE

Como ya se ha comentado anteriormente, se realizó un análisis multivariante para evaluar, de manera individual e independiente, todas y cada una de las variables que influyen en la concentración plasmática de Phe, obteniéndose que sólo la NP/NE respecto a otros tipos de alimentaciones, los RNPT y RNMPT respecto a los RNT, y la obtención de la muestra con un tiempo mayor a 7 días respecto a la toma en la primera semana de vida influyen positivamente en la concentración de Phe neonatal (Tabla 16). Cuando se observan estos datos representados gráficamente (Figura 17), se puede vislumbrar que con independencia del tipo de alimentación, los RNPT, pero sobre todo los RNMPT, son los que presentan valores mayores de Phe respecto a los RNT, concluyendo que la baja edad gestacional favorece una mayor concentración de Phe en sangre en estos neonatos, en concordancia con otros autores (Beath, 2003; Moya, 2003; Quigley, 2007) y reforzando los resultados anteriormente obtenidos con los datos muestrales totales (Tablas 13 y 14). Además, la concentración de Phe es mayor en aquellos niños alimentados con NP/NE (que corresponden a RNPT y sobre todo, a RNMPT) respecto a los RNT, concluyendo que este tipo de alimentación es la que produce valores mayores de Phe plasmáticos respecto al resto de alimentaciones (Ziegler, 2011), reforzando y concordando de igual manera con los resultados anteriormente expuestos (Tablas 11 y 15).

Por último, como parte de este análisis multivariante, se realizó un cálculo de los valores de Phe estimados en neonatos distribuidos según edad gestacional y tipo de alimentación (Figura 18), por ser las variables que claramente influyen de manera más notable en la concentración plasmática de Phe. Se observa que los valores de Phe, con independencia del tipo de alimentación, en el caso de los RNMPT están en torno a 1,4 mg/dl (85 μ mol/l), siendo más altos que en el caso de los RNPT que se sitúan alrededor de 1,2 mg/dl (73 μ mol/l), , exceptuando los neonatos alimentados con NP/NE, en los que los valores son más altos para ambos grupos (Tabla 18):

Tabla 18. Valores de Phe en RNMPT y RNPT en niños alimentados con NP/NE respecto al resto de alimentaciones en el estudio multivariante

Grupo EG	NP/NE	Resto de alimentaciones
<i>RNMPT</i>	1,60 mg/dl (97 μ mol/l)	1,40 mg/dl (85 μ mol/l)
<i>RNPT</i>	1,43 mg/dl (87 μ mol/l)	1,20 mg/dl (73 μ mol/l)

Por tanto, se puede concluir que aunque para los RNMPT y RNPT, los valores de Phe son más altos que para los RNT, el 95% de estos neonatos queda incluido en un intervalo de valores de concentración de Phe que se encuentra por debajo del punto de corte de 2,5 mg/dl (151 μ mol/l) usado en el Laboratorio de Cribado del Hospital de Alicante (Manero, 2012) y que está incluido en los valores de punto de corte establecidos para el cribado de PKU y HPA en España (AECNE, 2012). Estos resultados, por tanto, vienen a reforzar la buena elección del punto de corte actualmente establecido y que incluso, ante una hipotética disminución del mismo, estos neonatos con valores plasmáticos mayores de Phe quedarían incluidos en lo que se considera “normal” para el cribado neonatal de PKU y HPA, no siendo necesario el establecimiento de un punto de corte exclusivo para este tipo de pacientes.

Tras el estudio multivariante, y retomando las relaciones entre las distintas variables que influyen en la concentración de Phe neonatal, se puede concluir que, según los presentes resultados y tal y como se representa en la siguiente gráfica (Figura 20), el grado de prematuridad, el tipo de alimentación y el tiempo de vida en el momento de la toma de la muestra influyen en la concentración plasmática de Phe en el recién nacido.

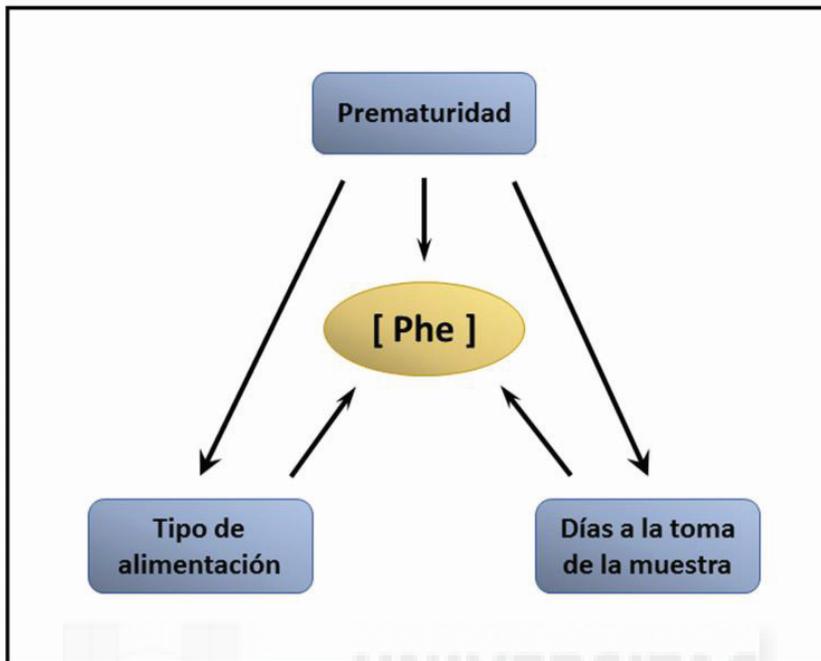


Figura 20. Relaciones entre las distintas variables a estudio tras el análisis multivariante. Las flechas muestran las relaciones entre las distintas variables que influyen en la concentración neonatal de Phe.



7. CONCLUSIONES

1. El sexo no influye sobre la concentración de fenilalanina en el neonato.
2. El tiempo a la toma de la muestra puede ser un factor de confusión, aunque la variación en la concentración de fenilalanina está dentro del rango de normalidad.
3. Se observa una variación importante en los valores de fenilalanina en los casos con nutrición parenteral y/o enteral con un intervalo de confianza superior significativamente a los valores en niños alimentados con lactancia materna, mixta o fórmula.
4. La edad gestacional influye sobre los valores de normalidad de fenilalanina, aumentando conforme disminuye la misma.
5. En el análisis multivariante, se observa que hay significación estadística en la variación de la concentración de fenilalanina por la dieta parenteral y/o enteral, el grado de prematuridad y la extracción de la muestra en la primera semana de vida frente a un tiempo posterior.
6. A partir de la distribución de los valores de concentración de fenilalanina según el tipo de alimentación y los grupos de edad gestacional, se han determinado los valores predictivos de normalidad de cada uno de estos subgrupos.
7. Los valores predictivos de normalidad de fenilalanina muestran en todos los grupos según el tipo de alimentación, un incremento en los recién nacidos muy pretérmino y recién nacidos pretérmino.

8. Los valores de concentración de fenilalanina en neonatos alimentados con lactancia materna, mixta o fórmula láctea son similares e inferiores a los obtenidos en neonatos alimentados con nutrición parenteral y/o enteral.
9. A pesar de las variaciones significativas constatadas, no se aprecia en ningún caso que los valores de normalidad de fenilalanina estén fuera de los puntos de corte internacionalmente establecidos.
10. Aunque se percibe una pequeña variación en la concentración de fenilalanina entre la primera semana de vida respecto a edades mayores, ésta es muy pequeña y sin ninguna importancia ante un cribado que, aunque debe realizarse durante la primera semana de vida, no debe descartar muestras tardías.



8. BIBLIOGRAFÍA

- AECNE (2012). Asociación Española de Cribado Neonatal. Acceso Diciembre 2012.
- AENOR (2007). Laboratorios Clínicos: Requisitos particulares relativos a la calidad y la competencia. UNE-EN-ISO *Madrid 15189*.
- Agostoni, C., Buonocore, G., Carnielli, V.P., De Curtis, M., Darmaun, D., Decsi, T., *et al.* (2010). Enteral nutrient supply for preterm infants: commentary from the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Committee on Nutrition. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 50, 85-91.
- Alonso, J.R., Barroso, F.; Barroso, M.L. et al. (1999). Newborn screening activity in Spain (1993-1998). 4th Meeting of the International Society of Neonatal Screening Stockholm 149.
- Anderson, G.H., Atkinson, S.A., and Bryan, M.H. (1981). Energy and macronutrient content of human milk during early lactation from mothers giving birth prematurely and at term. *The American journal of clinical nutrition* 34, 258-265.
- Anderson, P.J., and Leuzzi, V. (2010). White matter pathology in phenylketonuria. *Molecular genetics and metabolism* 99 *Suppl 1*, S3-9.
- Aoki, K., Ohwada, M., and Kitagawa, T. (2007). Long-term follow-up study of patients with phenylketonuria detected by the newborn screening programme in Japan. *Journal of inherited metabolic disease* 30, 608.
- Arena, J., Cortés, E.; Dulín, E. et al. (2010). Actividad de los centros de detección precoz neonatal de errores congénitos del metabolismo en España, en el período 2000-2008. *Boletín Real Patronato sobre Discapacidad* 69, 14-30.
- Avery, M.E., Richardson, D. (1988). History and Epidemiology. In: *Avery's diseases of the newborn*. WB Saunders Company 1988 USA *Chapter 1*, 1-12.
- Ayling, J.E., Helfand, G.D., and Pirson, W.D. (1975). Phenylalanine hydroxylase from human kidney. *Enzyme* 20, 6-19.
- Bancel, E., Strubel, D., Bellet, H., Polge, A., Peray, P., and Magnan de Bornier, B. (1994). [Effect of the age and the sex on plasma concentration of amino acids]. *Annales de biologie clinique* 52, 667-670.
- Beath, S.V. (2003). Hepatic function and physiology in the newborn. *Seminars in neonatology* : SN 8, 337-346.

- Berry, S.A., Brown, C., Grant, M., Greene, C.L., Jurecki, E., Koch, J., *et al.* (2013). Newborn screening 50 years later: access issues faced by adults with PKU. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 15, 591-599.
- Blau, N., van Spronsen, F.J., and Levy, H.L. (2010). Phenylketonuria. *Lancet* 376, 1417-1427.

- Brenneman, A.R., and Kaufman, S. (1965). Characteristics of the hepatic phenylalanine-hydroxylating system in newborn rats. *The Journal of biological chemistry* 240, 3617-3622.

- Brosco, J.P., Sanders, L.M., Seider, M.I., and Dunn, A.C. (2008). Adverse medical outcomes of early newborn screening programs for phenylketonuria. *Pediatrics* 122, 192-197.

- Brosnan, J.T. (2003). Interorgan amino acid transport and its regulation. *The Journal of nutrition* 133, 2068S-2072S.

- Buades, A., Cortés, E.; Srivent, M.C.; Moya, M. (1989). Independencia de los niveles plasmáticos de aminoácidos durante la primera semana de vida. XVI Congreso Nacional de Bioquímica Alicante.

- Bustos, G., Gomis, P. (2012). Nutrición parenteral en el recién nacido. Servicio de Neonatología y Servicio de Farmacia Hospital 12 de Octubre Madrid, 1-19.

- Calderón-López, G.M., Jiménez-Parrilla, F.; Losada-Martínez, A. (2008). Screening neonatal. *Protocolos Diagnóstico Terapéutico de la AEP: Neonatología*, 423-433.

- Ceglarek, U., Muller, P., Stach, B., Buhrdel, P., Thiery, J., and Kiess, W. (2002). Validation of the phenylalanine/tyrosine ratio determined by tandem mass spectrometry: sensitive newborn screening for phenylketonuria. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC* 40, 693-697.

- Clark, R.H., Chace, D.H., and Spitzer, A.R. (2007). Effects of two different doses of amino acid supplementation on growth and blood amino acid levels in premature neonates admitted to the neonatal intensive care unit: a randomized, controlled trial. *Pediatrics* 120, 1286-1296.

- Cleal, J.K., and Lewis, R.M. (2008). The mechanisms and regulation of placental amino acid transport to the human foetus. *Journal of neuroendocrinology* 20, 419-426.

- Clemens, P.C., Neumann, S.J., Wulke, A.P., and Burmester, J.G. (1990). Newborn screening for hyperphenylalaninemia on day 5: is 240 $\mu\text{mol/liter}$ the most appropriate cut-off level? *Preventive medicine* 19, 54-60.

- Corte, Z., and Venta, R. (2010). Biological variation of free plasma amino acids in healthy individuals. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC* 48, 99-104.
- Cortés, E. (2011). Cribado Neonatal de Enfermedades Congénitas. En *Tratado de Pediatría Cruz, M. Ed. 10 ed, Editorial Ergon-AEP*, pp 66-71.

- Cynober, L., Blonde, F., Nguyen Dinh, F., Gerbet, D., and Giboudeau, J. (1983). [Measurement of plasma and urinary amino acids with gas chromatography in healthy subjects. Variations as a function of age and sex]. *Annales de biologie clinique* 41, 33-38.

- Chace, D.H., Sherwin, J.E., Hillman, S.L., Lorey, F., and Cunningham, G.C. (1998). Use of phenylalanine-to-tyrosine ratio determined by tandem mass spectrometry to improve newborn screening for phenylketonuria of early discharge specimens collected in the first 24 hours. *Clinical chemistry* 44, 2405-2409.

- Chien, P.F., Smith, K., Watt, P.W., Scrimgeour, C.M., Taylor, D.J., and Rennie, M.J. (1993). Protein turnover in the human fetus studied at term using stable isotope tracer amino acids. *The American journal of physiology* 265, E31-35.

- Darling, P.B., Dunn, M., Gilani, G.S., Ball, R.O., and Pencharz, P.B. (2004). Phenylalanine kinetics differ between formula-fed and human milk-fed preterm infants. *The Journal of nutrition* 134, 2540-2545.

- de la Torre, M.J., Martin-Calama, J., and Hernandez-Aguilar, M.T. (2001). Breast-feeding in Spain. *Public health nutrition* 4, 1347-1351.

- Dewey, K.G., Beaton, G., Fjeld, C., Lonnerdal, B., and Reeds, P. (1996). Protein requirements of infants and children. *European journal of clinical nutrition* 50 Suppl 1, S119-147; discussion S147-150.

- Dulín, E., Cortés, E.; Chamorro, F. et al. (2001a). Actividad de los centros de detección precoz de errores congénitos del metabolismo en España. *Evaluación sanitaria (1996 - 1999) Boletín del Real Patronato sobre Discapacidades nº 49*, 3-17.

- Dulín, E., Cortés, E.; Chamorro, F. et al. (2001b). Estado actual de los programas de Cribado Neonatal en España. *Evaluación año 1999. Acta Ped Esp* 59 (9), 467-478.

- Dulín, E., Chamorro, F.; Cortés, E et al. (2001c). Actividad nacional de los centros de cribado neonatal: Año 1999. *IV Congreso de Errores Congénitos del Metabolismo Tenerife*.

- Embleton, N.D., and Simmer, K. (2014). Practice of parenteral nutrition in VLBW and ELBW infants. *World review of nutrition and dietetics* 110, 177-189.

- ENAC (2008). Entidad Nacional sobre Acreditación. Guía sobre la participación en programas de intercomparaciones. G-ENAC *Madrid*.
- Espada, M., Dulín, E. (2001). Procedimiento para la obtención de especímenes de sangre sobre papel de filtro en los Programas de Detección Precoz Neonatal de Errores Congénitos del Metabolismo. *Quim Clin* 20, 81-88.

- Feillet, F., van Spronsen, F.J., MacDonald, A., Trefz, F.K., Demirkol, M., Giovannini, M., *et al.* (2010). Challenges and pitfalls in the management of phenylketonuria. *Pediatrics* 126, 333-341.

- Fingerhut, R., De Jesus Silva Arevalo, G., Baumgartner, M.R., Haberle, J., Rohrbach, M., Figueroa, A.W., *et al.* (2010). Postprandial changes of amino acid and acylcarnitine concentrations in dried blood samples. *Journal of inherited metabolic disease* 33, S235-239.

- Fomon, S.J. (1991). Requirements and recommended dietary intakes of protein during infancy. *Pediatric research* 30, 391-395.

- Frenstrom, J.D., Frenstrom, M.H. (2007). Tyrosine, phenylalanine and catecholamine synthesis and function on the brain. *The Journal of nutrition* 137, 1539S-1547S.

- Friedman, P.A., Kaufman, S. (1986). A study of the development of phenylalanine hydroxylase in foetuses of several mammalian species. *Archives of biochemistry and biophysics* 146, 684.

- Gella, F.J., Canalías, F.; Izquierdo, S.; Martínez, V.; Sánchez, M. (2009). Recomendaciones para la estimación de la incertidumbre de medida en el laboratorio clínico. *Documentos de la SEQC* 27-9.

- Goldman, H.I., Goldman, J., Kaufman, I., and Liebman, O.B. (1974). Late effects of early dietary protein intake on low-birth-weight infants. *The Journal of pediatrics* 85, 764-769.

- Gomis, P., Gómez, L.; Martínez, C.; Moreno, J.M.; Pedrón, C.; Pérez-Portabella, C.; Pozas del Río, M.T. (2007). Documento de consenso SENPE/SEGHNP/SEFH sobre nutrición parenteral pediátrica. *Nutrición Hospitalaria* 22(6), 710-719.

- Guthrie, R., and Susi, A. (1963). A Simple Phenylalanine Method for Detecting Phenylketonuria in Large Populations of Newborn Infants. *Pediatrics* 32, 338-343.

- Harding, C.O., and Blau, N. (2010). Advances and challenges in phenylketonuria. *Journal of inherited metabolic disease* 33, 645-648.

- Hawkins, R.C. (2006). Effect of variability in assay bias and imprecision on external quality assessment bias and imprecision measures. *Annals of clinical biochemistry* 43, 507-509.

- Hay, W.W. (2006). Early postnatal nutritional requirements of the very preterm infant based on a presentation at the NICHD-AAP workshop on research in neonatology. *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association* 26 *Suppl* 2, S13-18.
- Hay, W.W., Jr. (2008). Strategies for feeding the preterm infant. *Neonatology* 94, 245-254.
- Hay, W.W., and Thureen, P. (2010). Protein for preterm infants: how much is needed? How much is enough? How much is too much? *Pediatrics and neonatology* 51, 198-207.
- Heine, W. (1991). Neonatal protein metabolism. In: *Principles of perinatal-neonatal metabolism* Cowet, R.M. Ed. *Springer-Verlag* 1991, 405-425.
- Heine, W. (1994). Qualitative aspects of protein in human milk and formula: amino acid pattern. *Protein Metabolism During Infancy Nestlé Nutrition Workshop Series vol. 33*, 121-132.
- Holton, J.B. (1973). Large-scale investigation of 2 phenylketonuria screening methods and factors affecting blood phenylalanine levels in the newborn. *Archives of disease in childhood* 48, 161.
- Izquierdo, S., Gella, F. J.; Canalías, F.; Sánchez, M.; Martínez, E. (2011). Recomendaciones para el estudio de la veracidad de los procedimientos de medida de laboratorio clínico mediante la participación en programas de evaluación externa de la calidad. *Documentos SEQC* 3, 2-6.
- Jakubovic, A. (1971). Phenylalanine-hydroxylating system in the human fetus at different developmental ages. *Biochimica et biophysica acta* 237, 469-475.
- Jansson, T., and Powell, T.L. (2006). IFPA 2005 Award in Placentology Lecture. Human placental transport in altered fetal growth: does the placenta function as a nutrient sensor? -- a review. *Placenta* 27 *Suppl A*, S91-97.
- Jauniaux, E., Gulbis, B., and Gerloo, E. (1999). Free amino acids in human fetal liver and fluids at 12-17 weeks of gestation. *Hum Reprod* 14, 1638-1641.
- Kalhan, S.C., Assel, B.G. (1991). Protein metabolism in pregnancy. In: *Principles of perinatal-neonatal metabolism* Cowet, R.M. Ed. *Springer-Verlag* 1991, 163-176.
- Kalhan, S.C., and Bier, D.M. (2008). Protein and amino acid metabolism in the human newborn. *Annual review of nutrition* 28, 389-410.

- Kashyap, S., and Heird, W.C. (1994). Protein requirements of low birthweight, very low birthweight and small for gestational age infants. *Protein Metabolism During Infancy Nestlé Nutrition Workshop Series vol. 33*, 133-151.
- Kemper, A.R. (2014). Newborn screening. Official reprint from UpToDate Wolters Kluwer Health, 1-10.
- Kerruish, N.J., and Robertson, S.P. (2005). Newborn screening: new developments, new dilemmas. *Journal of medical ethics 31*, 393-398.
- Kilani, R.A., Cole, F.S., and Bier, D.M. (1995). Phenylalanine hydroxylase activity in preterm infants: is tyrosine a conditionally essential amino acid? *The American journal of clinical nutrition 61*, 1218-1223.
- Klein, C.J. (2002). Nutrient requirements for preterm infant formulas. *The Journal of nutrition 132*, 1395S-1577S.
- Koch, R.K. (1999). Issues in newborn screening for phenylketonuria. *American family physician 60*, 1462-1466.
- Kuo, C.D., Wu, W.G., Wang, J.H., Chen, S.M., and Chiang, B.N. (1989). Proton nuclear magnetic resonance studies of plasma to determine metabolic status of patients with adult respiratory distress syndrome. *Clinical chemistry 35*, 667-670.
- Laidlaw, S.A., and Kopple, J.D. (1987). Newer concepts of the indispensable amino acids. *The American journal of clinical nutrition 46*, 593-605.
- Lietchy, E.A., Lemons, J.A. (1991). Protein metabolism in the fetal-placental unit. In: *Principles of perinatal-neonatal metabolism Cowet, R.M. Ed. Springer-Verlag 1991*, 276-290.
- Loeber, J.G. (2007). Neonatal screening in Europe; the situation in 2004. *Journal of inherited metabolic disease 30*, 430-438.
- Llanos, A., Mena, P.; Uauy, R. (2004). Tendencias actuales en la nutrición del recién nacido prematuro. *Rev Chil Pediatr 75*, 107-121.
- Manero, H. (2012). Variables que pueden influir en el cribado neonatal de hiperfenilalaninemias y fenilcetonuria. Tesis Doctoral Universidad Miguel Hernández, 1-153.
- McCaman, M.W., Robins, E. (1962). Fluorometric method for determination of phenylalanine in serum. *The Journal of laboratory and clinical medicine 59*, 885-890.

- Medina, J.M., Vicario, C.; Juanes, M.C.; Fernández, E. (1992). Biochemical adaptations to early extrauterine life. In: Chapter 11 Perinatal Biochemistry CRC Press, Inc, 234-253.
- Mei, J.V., Alexander, J.R., Adam, B.W., and Hannon, W.H. (2001). Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens. *The Journal of nutrition* 131, 1631S-1636S.
- Merewood, A., Brooks, D., Bauchner, H., MacAuley, L., and Mehta, S.D. (2006). Maternal birthplace and breastfeeding initiation among term and preterm infants: a statewide assessment for Massachusetts. *Pediatrics* 118, e1048-1054.
- Mitchell, J. (2010). Expanded carrier screening in the Ashkenazi Jewish population. *Human mutation* 31, v.
- Mitchell, J.J. (1993). Phenylalanine Hydroxylase Deficiency. In *GeneReviews*, R.A. Pagon, M.P. Adam, T.D. Bird, C.R. Dolan, C.T. Fong, and K. Stephens, eds. (Seattle (WA)).
- Morisaki, N., Belfort, M.B., McCormick, M.C., Mori, R., Noma, H., Kusuda, S., *et al.* (2014). Brief parenteral nutrition accelerates weight gain, head growth even in healthy VLBWs. *PLoS one* 9, e88392.
- Moro, G., Minoli, I., Boehm, G., Georgi, G., Jelinek, J., and Sawatzki, G. (1999). Postprandial plasma amino acids in preterm infants: influence of the protein source. *Acta paediatrica* 88, 885-889.
- Moya, M., Cortés, E.; Ballester, I.; Gimeno, I. (2003). Aminograma sérico y aporte proteico neonatal precoz. Comunicación Mesa Redonda XIX Congreso Español de Medicina Perinatal San Sebastián 2003.
- Moya, M., Cortés, E.; Remón, J.M.; (1993). Neonatal screening in Spain 1968 - 1992. *New Horizons in Neonatal Screening Farriaux, J.P. and Dhondt, J.L. Eds. Excerpta Médica Ed.*
- Nakao, Y., Moji, K., Honda, S., and Oishi, K. (2008). Initiation of breastfeeding within 120 minutes after birth is associated with breastfeeding at four months among Japanese women: a self-administered questionnaire survey. *International breastfeeding journal* 3, 1.
- Nelson, D.L., Cox, M.M. (2001). *Lehninger: Principles of Biochemistry*. Worth Publishers 3ª ed Ed Omega 2001.
- Orphanet (2011). Portal de información de enfermedades raras medicamentos huérfanos. Acceso 14 de Abril de 2011 http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.

- Ploder, M., Neurauter, G., Spittler, A., Schroecksadel, K., Roth, E., and Fuchs, D. (2008). Serum phenylalanine in patients post trauma and with sepsis correlate to neopterin concentrations. *Amino acids* 35, 303-307.

- Pomi, L., Peano, L., and Colla, D. (1984). [Use of screening for amino acid disorders in the study of the nutrition of the newborn infant: various milk formulas and changes in plasma amino acids]. *La Pediatria medica e chirurgica : Medical and surgical pediatrics* 6, 261-268.

- Ponzone, A., Spada, M., Roasio, L., Porta, F., Mussa, A., and Ferraris, S. (2008). Impact of neonatal protein metabolism and nutrition on screening for phenylketonuria. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 46, 561-569.

- Premji, S.S., Fenton, T.R., and Sauve, R.S. (2006). Higher versus lower protein intake in formula-fed low birth weight infants. *The Cochrane database of systematic reviews*, CD003959.

- Quigley, M.A., Henderson, G., Anthony, M.Y., and McGuire, W. (2007). Formula milk versus donor breast milk for feeding preterm or low birth weight infants. *The Cochrane database of systematic reviews*, CD002971.

- Rafii, M., McKenzie, J.M., Roberts, S.A., Steiner, G., Ball, R.O., and Pencharz, P.B. (2008). In vivo regulation of phenylalanine hydroxylation to tyrosine, studied using enrichment in apoB-100. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 294, E475-479.

- Raiha, N.C. (1973). Phenylalanine hydroxylase in human liver during development. *Pediatric research* 7, 1-4.

- Raiha, N.C. (1974). Biochemical basis for nutritional management of preterm infants. *Pediatrics* 53, 147-156.

- Raiha, N.C. (1989). Milk protein quantity and quality and protein requirements during development. *Advances in pediatrics* 36, 347-368.

- Raiha, N.C. (1994a). Protein content of human milk, from colostrum to mature milk. *Protein Metabolism During Infancy Nestlé Nutrition Workshop Series vol. 33*, 87-103.

- Raiha, N.C. (1994b). Protein requirement of healthy term infants during first four months of life. *Protein Metabolism During Infancy Nestlé Nutrition Workshop Series vol. 33*, 153-164.

- Rassin, D.K. (1994). Essential and non-essential amino acids in neonatal nutrition. *Protein Metabolism During Infancy Nestlé Nutrition Workshop Series vol. 33*, 183-195.

- Regnault, T.R., de Vrijer, B., and Battaglia, F.C. (2002). Transport and metabolism of amino acids in placenta. *Endocrine* 19, 23-41.
- Regnault, T.R., Friedman, J.E., Wilkening, R.B., Anthony, R.V., and Hay, W.W., Jr. (2005). Fetoplacental transport and utilization of amino acids in IUGR--a review. *Placenta* 26 *Suppl A*, S52-62.
- Ryan, W.L., Orr, W. (1986). Phenylalanine conversion to tyrosine by the human fetal liver. *Archives of biochemistry and biophysics* 113, 684.
- Ryckman, K.K., Dagle, J.M., Shchelochkov, O.A., Ehinger, N., Poole, S.D., Berberich, S.L., et al. (2013). Association of amino acids with common complications of prematurity. *Pediatric research* 73, 700-705.
- Sáenz, P. (2008). Nuevo modelo de alta precoz para el niño pretérmino: impacto sobre el bienestar psicológico de los padres, calidad y costes asistenciales. Tesis Doctoral Universidad Miguel Hernández.
- Scott, P.H., Sandham, S., Balmer, S.E., and Wharton, B.A. (1990). Diet-related reference values for plasma amino acids in newborns measured by reversed-phase HPLC. *Clinical chemistry* 36, 1922-1927.
- Scriver, C.R., Kaufman, S. (2001). Hyperphenylalaninemia: Phenylalanine hydroxylase deficiency. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases Scriver et al. Eds. 8ª ed. Ed. McGraw-Hill. 2001, 1667-1724.*
- SEN (2011). Comisión de Estándares de la Sociedad Española de Neonatología. *Acceso Mayo 2011.*
- Sharman, R., Sullivan, K.A.; Young, R.M.; McGill, J.J. (2010). Tyrosine monitoring in children with early and continuously treated phenylketonuria: result of an international practice survey. *Journal of inherited metabolic disease* Sep 30.
- Shortland, G.J., Walter, J.H., Fleming, P.J., and Halliday, D. (1994). Phenylalanine kinetics in sick preterm neonates with respiratory distress syndrome. *Pediatric research* 36, 713-718.
- Sirvent, M.C. (1992). Evolución del perfil plasmático de aminoácidos en el neonato. Tesis Doctoral Universidad de Alicante.
- Sirvent, M.C., Cortés, E.; Vento, M. y Moya, M. (1990). Estudio de las variaciones del metabolismo de los aminoácidos en la primera semana de vida mediante cuatificación sérica por HPLC. IV Reunión Perinatal, Barcelona 1990.

- Tessari, P., Vettore, M., Millioni, R., Puricelli, L., and Orlando, R. (2010). Effect of liver cirrhosis on phenylalanine and tyrosine metabolism. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 13, 81-86.
- Tikanoja, T., Simell, O., Viikari, M., and Jarvenpaa, A.L. (1982). Plasma amino acids in term neonates after a feed of human milk or formula. II. Characteristic changes in individual amino acids. *Acta paediatrica Scandinavica* 71, 391-397.
- van den Akker, C.H., Schierbeek, H., Dorst, K.Y., Schoonderwaldt, E.M., Vermes, A., Duvekot, J.J., *et al.* (2009). Human fetal amino acid metabolism at term gestation. *The American journal of clinical nutrition* 89, 153-160.
- van Spronsen, F.J. (2010). Phenylketonuria: a 21st century perspective. *Nature reviews Endocrinology* 6, 509-514.
- Vento, M., Cortés, E.; Moya, M. *et al.* (1990a). Modificaciones en los patrones de aminoácidos plasmáticos como consecuencia de la desnutrición uterina. IV Reunión de Bioquímica Perinatal, Barcelona 1990.
- Vento, M., Moya, M; Cortés, E. *et al.* (1991). Plasma aminogram changes due to intrauterine growth retardation: management implications. *Ann C Intensiv vol. 6*, 55.
- Vento, M., Moya, M; Cortés, E.; Sirvent, M.C. (1990b). Efecto de la alimentación sobre el perfil de aminoácidos en el neonato prematuro. XII Reunión Anual de Medicina Perinatal II Workshop Neonatal: Metabolismo, nutrición y alimentación del prematuro y del recién nacido de bajo peso Valencia 1990, pp 95-106.
- Vento, M., Viña, J.; Sirvent, M.C.; Cortés, E. (2002). Branched chain amino acid plasmatic levels in term intrauterine growth retarded infants. *Acta Ped Esp* 60, 8:, 381-384.
- Verhaeghe, J., Van Assche, F. A. (1992). Maternal Aminoacid Metabolism during Pregnancy. In: Chapter 3 Perinatal Biochemistry CRC Press, Inc, 54-64.
- Vieira, T.O., Vieira, G.O.; Giugliani, E.R.; Mendes, C.M.; Martins, C.C.; Silva, L.R. (2010). Determinants of breastfeeding initiation within the first hour of life in a Brazilian population: cross-sectional study. *BMC public health* Dec 9; 10:760.
- Viña, J.R., Viña, J. (1991). Biosíntesis y catabolismo de aminoácidos específicos. . En *Bioquímica Aspectos estructurales y vías metabólicas Herrera, E. ed. 2ª ed. Ed. Interamericana-McGraw-Hill 1991*, 833-868.
- Walker, M. (2008). Breastfeeding the late preterm infant. *Journal of obstetric, gynecologic, and neonatal nursing : JOGNN / NAACOG* 37, 692-701.

- Wang, C., Zhu, H., Cai, Z., Song, F., Liu, Z., and Liu, S. (2013). Newborn screening of phenylketonuria using direct analysis in real time (DART) mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry* 405, 3159-3164.
- Waterlow, J.C. (2006). Free amino acids: their pools, kinetics and transport. In: Chapter 3 Protein Turnover *CAB International Head Office. Oxfordshire. UK.*
- Wu, J.T., Wu, L.H., Ziter, F.A., and Ash, K.O. (1979). Manual fluorometry of phenylalanine from blood specimens collected on filter paper: a modified procedure. *Clinical chemistry* 25, 470-472.
- Young, V.R., El-Khoury, A.E.; Sánchez, M.; Castillo, L. (1994a). The biochemistry and physiology of protein and amino acid metabolism, with reference to protein nutrition. *Nestle Nutrition Workshop Series vol. 33. 1994.*
- Young, V.R., and Pellett, P.L. (1994b). Plant proteins in relation to human protein and amino acid nutrition. *The American journal of clinical nutrition* 59, 1203S-1212S.
- Zaffanello, M., Maffei, C., and Zamboni, G. (2005). Multiple positive results during a neonatal screening program: a retrospective analysis of incidence, clinical implications and outcomes. *Journal of perinatal medicine* 33, 246-251.
- Zaffanello, M., Zamboni, G., Maffei, C., and Tato, L. (2003). Neonatal birth parameters of positive newborns at PKU screening as predictors of false-positive and positive results at recall-testing. *Journal of medical screening* 10, 181-183.
- Ziegler, E.E. (2011). Meeting the nutritional needs of the low-birth-weight infant. *Annals of nutrition & metabolism* 58 *Suppl 1*, 8-18.
- Zurfluh, M.R., Zschocke, J., Lindner, M., Feillet, F., Chery, C., Burlina, A., *et al.* (2008). Molecular genetics of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Human mutation* 29, 167-175.



UNIVERSITAS
Miguel
Hernández

9. ANEXOS

ANEXO 1



PNT-CN- 01
Edición 1

SERVICIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS
DEPARTAMENTO DE SALUD DE ALICANTE
HOSPITAL GENERAL

Recepción de muestras, identificación
y registro informático

COPIA N°:

FECHA DE ENTREGA: 30/03/2012

SERVICIO: ANÁLISIS CLÍNICOS

DESTINATARIO:

CARGO:

CONTROL de MODIFICACIONES		
Descripción	Edición	Fecha Edición
Se añade lo derivado de la realización de anemia falciforme y fibrosis quística	1	30/03/2012

REVISADO: **Responsable de Calidad** APROBADO: **Jefe de Servicio**

Fecha de Revisión: Fecha de Aprobación:

Firma: Firma:



PNT-CN- 01
Edició 1

**SERVICIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS
DEPARTAMENTO DE SALUD DE ALICANTE
HOSPITAL GENERAL**

**Recepción de muestras, identificación
y registro informático**

1. OBJETO
2. ALCANCE
3. REFERENCIAS Y DEFINICIONES
4. DESARROLLO
5. RESPONSABILIDADES
6. FORMATOS





PNT-CN- 01
Edición 1

**SERVICIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS
DEPARTAMENTO DE SALUD DE ALICANTE
HOSPITAL GENERAL**

**Recepción de muestras, identificación
y registro informático**

1. Objeto

El objeto del presente documento es describir las actividades desarrolladas por el LABORATORIO de ANÁLISIS CLÍNICOS DEL HOSPITAL GENERAL DE ALICANTE para definir el proceso que se sigue para la recepción de las muestras de cribado neonatal y el registro de la petición.

2. Alcance

Describir las actividades empleadas en el LABORATORIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS DEL HOSPITAL GENERAL DE ALICANTE para la recepción y registro de todas las muestras para Cribado Neonatal de los recién nacidos de la Provincia de Alicante remitidas por los hospitales, centros de salud de la misma o por los representantes de los recién nacidos.

3. Referencias y definiciones

- UNE-EN-ISO 9001:2008: Sistemas de Gestión de la Calidad (SGC) - Requisitos.
- UNE-EN-ISO 9000:2000: SGC - Fundamentos y Vocabulario.
- UNE-EN-ISO 9004:2000: SGC - Guía de la Mejora Continua.
- Decreto 108/2000 para la Autorización de los Laboratorios Clínicos.
- Manual de la Calidad
- Protocolos de Cribado Neonatal en vigor de la Dirección de Salud Pública de la Consellería de Sanidad.



PNT-CN- 01
Edició 1

SERVICIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS
DEPARTAMENTO DE SALUD DE ALICANTE
HOSPITAL GENERAL

Recepción de muestras, identificación
y registro informático

- Documento Calidad Preanalítica: "Procedimiento para la obtención y recogida de especímenes de sangre sobre papel de filtro en los Programas de detección Precoz Neonatal de Errores Congénitos del Metabolismo". M. Espada. E. Dulín. Química Clínica 2001; 20(2) 81-88.

4. Desarrollo

4.1. Recepción y control de la calidad de las muestras.

Las fases previas de recogida de muestras y fichas con los datos de filiación del recién nacido, así como el envío a la Sección están especificados en la documentación que se adjunta y que es emitida por la Consellería de Sanidad de la Comunidad Valenciana.

La recepción de las muestras de sangre desecada impregnada en papel se realiza sobre una mesa despejada, en la cual se van abriendo los sobres de las muestras y las fichas, comprobándose la recepción de cada muestra con los listados remitidos, éstos son fechados y firmados si hay conformidad.

Si existen errores, omisiones o falta de muestras se comunica inmediatamente la incidencia por teléfono al centro de envío y se registra en la ficha informatizada del recién nacido en MetaB.

Se codifican las muestras y las fichas del niño con la fecha del día de recepción y un número correlativo iniciado en 1.

Se separan las muestras de HIPOTIROIDISMO y ANEMIA FALCIFORME (fichas y papel de filtro con distintivo color verde, en documentos referidos) de las muestras para HIPERFENILALANINEMIAS y FIBROSIS QUISTICA (ficha y papel de filtro con distintivo color rojo, en documentos referidos).



PNT-CN- 01
Edición 1

**SERVICIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS
DEPARTAMENTO DE SALUD DE ALICANTE
HOSPITAL GENERAL**

**Recepción de muestras, identificación
y registro informático**

Se anotan en la ficha del recién nacido en MetaB aquellas muestras que son insuficientes, deficientes o incluso sin sangre impregnada (Documento Calidad Preanalítica).

Se llama telefónicamente a los padres o tutores de los niños con muestras deficientes para que remitan una nueva muestra, indicándoles el centro más cercano al que pueden acudir. Si no hay teléfono consignado se envía carta con esta misma finalidad.

Se registra en la ficha informatizada del recién nacido en MetaB.

Las fichas pasan a su registro informático y archivo, y las muestras se guardan en cajas herméticas en la cámara frigorífica (BG-5) hasta su procesamiento y durante un periodo de, al menos, 2 años. Su conservación y uso posterior está descrito el PNT-CN-05.

Se aceptarán todas las muestras en las que el papel de filtro este impregnado de sangre por los dos lados en cantidad suficiente para poder extraer un disco totalmente impregnado, con el taladro de muestras. Se rechazarán las que no cumplan este requisito. También se rechazarán aquellas muestras de niños que ya tengan las pruebas realizadas

4.2. Registro informático

Se utiliza para todo el proceso del cribado neonatal el Programa de la Consellería de Sanidad "MetaB", al que se accede mediante un password personal.

El sistema informático está diseñado para permitir a todos los usuarios entrar en los campos de introducción de datos del recién nacido y muestras, no así en el de resultados, validación de los mismos e informes a los que únicamente tiene acceso el personal facultativo.



PNT-CN- 01
Edició 1

**SERVICIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS
DEPARTAMENTO DE SALUD DE ALICANTE
HOSPITAL GENERAL**

**Recepción de muestras, identificación
y registro informático**

Se introduce el número SIP del recién nacido o lectura del número de referencia barrado de la ficha, que es único y común a los dos volantes posibles del mismo niño.

En el caso de que éste no sea reconocido, se introduce el nombre y apellidos del niño, cuidando la duplicidad de niños con los mismos nombres y apellidos y diferenciándolos mediante el día de nacimiento. Después se introducen todos los demás datos presentes en las fichas y la muestra.

Debido a que el sistema de numeración de la muestra en el programa no permite la misma numeración correlativa para segundas muestras de una misma determinación en el mismo niño, el sistema de informatización de segundas muestras (por deficiente la primera, resultados dudosos, etc.) se realiza mediante los dígitos de día de recepción, mes, dos dígitos del año seguido por el número asignado en la recepción (ddmmaan°ref). Esta numeración deberá de tenerse en cuenta para la introducción informática de los resultados de las mismas.

4.3. Conservación de fichas y soporte informático.

Las fichas, por su contenido en datos personales, se guardarán en el laboratorio de forma controlada, archivándose en las estanterías del laboratorio al menos durante cinco años, y bajo las condiciones de seguridad de todo el Laboratorio General. Su destrucción se efectuará de forma que no puedan ser identificados ni recogidos los datos de las mismas, no siendo necesaria su conservación después de transcurrido dicho tiempo al estar los datos archivados en soporte informático.

La destrucción se efectuará siempre de más antigua a actual, por periodos de años completos.



PNT-CN- 01
Edición 1

**SERVICIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS
DEPARTAMENTO DE SALUD DE ALICANTE
HOSPITAL GENERAL**

**Recepción de muestras, identificación
y registro informático**

5. Responsabilidades

Es responsabilidad del personal administrativo y técnico de la sección la realización de la recepción, control de las muestras y registro informático según este documento.

La asignación de password es función del Facultativo Responsable de la Sección que lo solicita a los Servicios Informáticos de la Consellería de Sanidad y es responsabilidad del usuario su utilización personal.

Es responsabilidad del Facultativo la supervisión y el cumplimiento de éste procedimiento.

6. Formatos

- Programa de la Consellería de Sanitat "MetaB"



ANEXO 2



PNT-CN-03
Edición 1

SERVICIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS
DEPARTAMENTO DE SALUD DE ALICANTE
HOSPITAL GENERAL

Determinación de fenilalanina (Phe)
En sangre desecada en papel de filtro

COPIA N°:

FECHA DE ENTREGA: 04/02/2011

SERVICIO: ANÁLISIS CLÍNICOS

DESTINATARIO:

CARGO:

CONTROL de MODIFICACIONES		
Descripción	Edición	Fecha Edición
Revisión del procedimiento	1	06/03/12

REVISADO: **Responsable de Calidad** APROBADO: **Jefe de Servicio**

Fecha de Revisión: Fecha de Aprobación:

Firma: Firma:



PNT-CN-03
Edició 1

**SERVICIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS
DEPARTAMENTO DE SALUD DE ALICANTE
HOSPITAL GENERAL**

**Determinación de fenilalanina (Phe)
En sangre desecada en papel de filtro**

1. OBJETO
2. ALCANCE
3. REFERENCIAS Y DEFINICIONES
4. DESARROLLO
5. RESPONSABILIDADES
6. FORMATOS/ESPECIFICACIONES
7. INDICADORES
8. FORMATOS
9. ANEXOS





PNT-CN-03
Edición 1

**SERVICIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS
DEPARTAMENTO DE SALUD DE ALICANTE
HOSPITAL GENERAL**

**Determinación de fenilalanina (Phe)
En sangre desecada en papel de filtro**

1. Objeto

Describir las actividades desarrolladas por el LABORATORIO de ANÁLISIS CLÍNICOS DEL HOSPITAL GENERAL DE ALICANTE para la determinación cuantitativa de fenilalanina (Phe) en especímenes de sangre desecada en papel de filtro.

2. Alcance

Se aplica a todas las muestras que lleguen al LABORATORIO DE ANALISIS CLÍNICOS DEL HOSPITAL GENERAL DE ALICANTE para la determinación de Fenilalanina (Phe) dentro del programa de Cribado Neonatal de la Consellería de Sanidad

3. Referencias y definiciones

- 1 UNE-EN-ISO 9001:2008: Sistemas de Gestión de la Calidad (SGC) - Requisitos.
- 2 UNE-EN-ISO 9000:2000: SGC - Fundamentos y Vocabulario.
- 3 UNE-EN-ISO 9004:2000: SGC - Guía de la Mejora Continua.
- 4 Decreto 108/2000 para la Autorización de los Laboratorios Clínicos.
- 5 Manual de la Calidad
- 6 Cuadernillo del protocolo establecido en el kit de reactivos para la determinación de Phe neonatal, en el que figuran la bibliografía más relevante, certificado del control de calidad de los estándares y controles internos.



PNT-CN-03
Edició 1

**SERVICIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS
DEPARTAMENTO DE SALUD DE ALICANTE
HOSPITAL GENERAL**

**Determinación de fenilalanina (Phe)
En sangre desecada en papel de filtro**

4. Desarrollo

4.1. Principios del método

El ensayo está basado en la técnica de fluorescencia por excitación del complejo formado por el aminoácido Phe con ninhidrina, en presencia del péptido L-Leucil-L-Alanina e ión de Cobre II. Se utiliza como longitud de onda de excitación 390 nm y de emisión 486 nm.

4.2. Características analíticas del método

Se aplica a especímenes de sangre recogidos sobre papel de filtro en un intervalo de trabajo entre 0,5-30 mg/dl de fenilalanina en sangre.

El valor de referencia discriminante se ha establecido en 2,5 mg/dl en sangre, por consenso internacional y de la Asociación Española de Cribado Neonatal (AECNE).

Los resultados de precisión y límite de determinación se encuentran en los informes de validación suministrados por la casa comercial y son comprobados continuamente en el laboratorio.

4.3. Material y Equipos

- Flurómetro Delfia 1232 (CN-1)
- Agitadores automáticos de placas microtiter (CN-5 y CN-6)).
- Taladros manuales de 3mm.
- Pipetas automáticas para dispensar entre 40-1000 μ l.
- Pipetas automáticas entre 1-10 ml.
- Pipetas graduadas de 10 ml.
- Probetas graduadas de 250 y 100 ml.
- Cámara Frigorífica regulada a la temperatura de 5 ± 3 °C.(BG-5)



PNT-CN-03
Edición 1

**SERVICIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS
DEPARTAMENTO DE SALUD DE ALICANTE
HOSPITAL GENERAL**

**Determinación de fenilalanina (Phe)
En sangre desecada en papel de filtro**

- Reloj cronómetro avisador.
- Vaso de precipitados.
- Incubador de 60 ± 5 °C (CN-2).
- Microplacas de 96 pocillos inertes, transparentes.
- Microplacas de 96 pocillos inertes, opacas. Cubre placas.

4.4. Reactivos, Calibradores y Controles

Los reactivos son específicos y exclusivos para la realización del análisis de la Phe neonatal y son suministrados por Perkin Elmer Life Sciences, bajo la forma comercial de Kit Neonatal Phenylalanine, referencia NP 1000.

4.4.1. Reactivos

- Reactivo de Sulfato de Zinc. 1 botella de 30 ml preparado para el uso. Mantener en la Cámara Frigorífica BG-5 a 2-8°C.
- Reactivo Ninhidrina PKU (tóxico). 10 botellas con reactivo seco a reconstruir con 6,5 ml de buffer de reconstitución. Se debe de reconstruir el día anterior y conservar en la Cámara Frigorífica BG-5 a 2-8°C hasta su uso.
- Buffer de reconstitución. 1 botella de 118 ml preparado para su uso. Conservar en la Cámara Frigorífica a 2-8°C.
- Reactivo de cobre. 1 botella de 240 ml preparada para uso. Conservar en la Cámara Frigorífica a 2-8°C.
- Agua de calidad reactivo desionizada.

El control de los lotes de reactivo en uso se registra en el R2-PGS-CN



PNT-CN-03
Edición 1

**SERVICIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS
DEPARTAMENTO DE SALUD DE ALICANTE
HOSPITAL GENERAL**

**Determinación de fenilalanina (Phe)
En sangre desecada en papel de filtro**

4.4.2. Calibradores.

Contiene 5 curvas de calibración, con concentraciones aproximadas de: 0,4; 1,6; 2,8; 5,2; 10 y 15 mg/dl de Phe en sangre, con pequeñas variaciones según lotes.

En la especificación E1-PNT-CN-03 están definidos los materiales de calibración que se utilizan, a qué técnicas aplican, la frecuencia de utilización, el tratamiento de los datos y los criterios de aceptación y evaluación de resultados.

Conservar todos los componentes del kit de Phe neonatal en la Cámara Frigorífica (BG-5) 5 ± 3 °C hasta la fecha de caducidad indicada en el envase.

4.5. Requisitos específicos de seguridad

Debido a que no siempre se puede establecer que especímenes pueden resultar infecciosos, todas las muestras de sangre deberán tratarse siguiendo las "Precauciones universales" recogidas en las guías para la manipulación de especímenes publicadas por la U.S. Centers for Disease and Control y la NCCLS.

4.6. Realización de la técnica

Habitualmente se van completando placas hasta tener 3, momento en el que se procede a su realización. Ello supone una secuencia de realización del método, salvo semanas con días festivos, de al menos 3 análisis semanales, de forma que en el peor de los casos, ninguna muestra está más de 5 días para conocer su resultado.



PNT-CN-03
Edición 1

**SERVICIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS
DEPARTAMENTO DE SALUD DE ALICANTE
HOSPITAL GENERAL**

**Determinación de fenilalanina (Phe)
En sangre desecada en papel de filtro**

4.6.1. Características de las muestras.

La Sección de Cribado Neonatal recibe los especímenes de sangre sobre papel de filtro obtenidos mediante punción en el talón. El procedimiento de extracción y envío de las muestras están descritos en la normativa de la Consellería de Sanidad, la recepción de las muestras está descrita en el documento PNT-CN-01.

Las muestras se conservan en recipientes herméticos en la Cámara Frigorífica BG-5 a 5 ± 3 °C hasta la realización del análisis.

4.6.2. Operaciones previas

Todos los reactivos deben de estar a temperatura ambiente.

Una hora antes de medir la fluorescencia se debe encender el Contador de fluorescencia Delfia 2D 1420 (CN-1) que realiza un autotest para comprobar las condiciones de funcionamiento y en caso de no cumplir los requisitos necesarios indica que se comunique al servicio técnico para su corrección

Se mantiene contrato de mantenimiento de Contador de fluorescencia Delfia 2D 1420 (CN-1) con la casa comercial que suministra el kit Phe neonatal, Perkin Elmer Life Sciences.

Preparación de la Hoja de trabajo de Phe (R1-PNT-CN-03), sobre la plantilla, identificando la posición de cada uno de los puntos de la curva de calibrado, controles y muestras.



PNT-CN-03
Edició 1

**SERVICIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS
DEPARTAMENTO DE SALUD DE ALICANTE
HOSPITAL GENERAL**

**Determinación de fenilalanina (Phe)
En sangre desecada en papel de filtro**

4.6.3. Realización

- Obtener discos de aproximadamente 3mm de diámetro, usando taladradores homogéneos, de la curva de calibrado, muestras y controles según su situación en la hoja de trabajo, depositándolos en los pocillos de la placa, para ello utilizar las placas de plástico inerte transparente.
- Añadir 15 µl de solución de extracción (Solución de sulfato de zinc). Mezclar suavemente y tapar. Comprobar que el disco esté bañado.
- Incubar 30-60 min. a t. ambiente o durante toda la noche en la Cámara Frigorífica BG-5 a 2-8°C. Tapar para minimizar evaporación.
- Añadir 40 µl de agua desionizada o destilada. Tapar y agitar suavemente durante 2 min.
- Transferir 25 µl del contenido de cada pocillo a nuevas placas, estas placas opacas, cuidando que se correspondan los lugares de los pocillos entre las placas inicial y final. Usar pipetas multicanales.
- Añadir 50 µl de reactivo de ninhidrina PKU y cubrir para evitar la evaporación. Agitar suavemente.
- Incubar de 30 a 40 min a 60°C en Incubador CN-2. Atemperar antes del siguiente paso.
- Añadir 200 µl por pocillo de reactivo de sulfato de cobre.
- Tapar y agitar durante un instante en agitador automático para placas.
- Incubar 30-90 min a temperatura ambiente.
- Leer la fluorescencia en el Contador de fluorescencia Delfia 2D 1420 (CN-1) con el protocolo 85 de PKU usando longitud de onda de 350 nm para la excitación y 480 nm para la emisión.



PNT-CN-03
Edición 1

**SERVICIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS
DEPARTAMENTO DE SALUD DE ALICANTE
HOSPITAL GENERAL**

**Determinación de fenilalanina (Phe)
En sangre desecada en papel de filtro**

- La fluorescencia se mantiene estable durante aproximadamente 1 hora.

4.6.4. Cálculos

Los datos se procesan automáticamente en el programa informático Multical, el cual traslada la información a modo registro gráfico e informático al programa MetaB .

4.7. Control de la calidad

4.7.1. Control Interno.

En la especificación E2-PNT-CN-03 están definidos los materiales de control interno que se utilizan, a qué técnicas aplican, la frecuencia de utilización, el tratamiento de los datos y los criterios de aceptación y evaluación de resultados.

En cada serie analítica se introducen dos controles por duplicado, uno de concentración media (1.3 mg/dl de Phe en sangre, según lote) y otro de concentración alta (5,2 mg/dl de Phe en sangre, según lote), dichos valores se van introduciendo en el programa Medlab QC y se imprimen cada vez que se cambia de lote, guardando la gráfica en la carpeta de controles internos.

Criterios de repetición

Una vez revisados los controles y aceptada la serie se evalúan todos los resultados de muestras para comprobar que ninguno de ellos tiene un valor significativamente diferente de la media. En caso que esto ocurra, la muestra



PNT-CN-03
Edición 1

**SERVICIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS
DEPARTAMENTO DE SALUD DE ALICANTE
HOSPITAL GENERAL**

**Determinación de fenilalanina (Phe)
En sangre desecada en papel de filtro**

se repetirá en la serie siguiente, anotando en la hoja de trabajo como repeticiones.

Estas repeticiones se registrarán en el R3-PGS-CN

Solicitud de nueva muestra: Si se confirma el valor, se comunica a los familiares por teléfono o correo la necesidad de repetir el análisis. Si el valor está por encima del valor de seguridad se comunica al centro de seguimiento que le corresponda para la puesta en tratamiento inmediato, según protocolo de la Consellería que se acompaña. Registrando las llamadas y el centro de referencia al que se envía en la ficha informatizada de MetaB.

4.7.2. Evaluación externa de la calidad.

Como evaluación externa de la calidad, el laboratorio participa en los siguientes ejercicios de intercomparación:

- "Infant Screening Quality Assurance Program". Center for Disease Control (CDC) Atlanta. USA. Evaluación trimestral con cinco problemas de distintas concentraciones por envío, cuyos resultados se imprimen y guardan en carpeta de controles externos.
- Programa de "Evaluación Externa de la Calidad en la Detección Precoz Neonatal" llevada a cabo entre todos los centros de cribado neonatales nacionales por la Asociación Española de Cribado Neonatal (AECNE) con tres niveles de concentraciones mensuales, cuyos resultados se imprimen y guardan en carpeta de controles externos.



PNT-CN-03
Edición 1

**SERVICIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS
DEPARTAMENTO DE SALUD DE ALICANTE
HOSPITAL GENERAL**

**Determinación de fenilalanina (Phe)
En sangre desecada en papel de filtro**

En la especificación E3-PNT-CN-03 están definidos los materiales de control externo que se utilizan, a qué técnicas aplican, la frecuencia de utilización, el tratamiento de los datos y los criterios de aceptación y evaluación de resultados.

4.8. Registro de los resultados y comunicación de los mismos

Los resultados se expresan en mg/dl de fenilalanina (Phe) en sangre.

El reflejo del resultado en la ficha informatizada del recién nacido se introduce, en el caso de todos los análisis normales, mediante el procedimiento del programa Metab de “integración de resultados”, así como los de resultados dudosos y altos. Las listas de trabajo, con sus correspondientes resultados (R2-PNT-CN-03 Calibraciones, controles y resultados del Cribado Neonatal de Phe) se imprimen y guardan en papel durante al menos tres años, eliminándose consecutivamente.

Una vez introducidos los resultados, éstos han de ser validados, apareciendo para su validación individual, todos aquellos casos en que se haya dado algún caso dudoso, repetición de muestras por cualquier motivo, etc.

Los casos patológicos son comunicados inmediatamente a los padres y centros de seguimiento, según PNT-CN-04, para que sean sometidos a análisis de confirmación diagnóstica y tratamiento, registrando las llamadas y el centro de referencia al que se envía en la ficha informatizada de MetaB. De los casos positivos se imprime una ficha, conservándose en papel en R5-PGS-CN. Carpeta registros positivos.



PNT-CN-03
Edición 1

**SERVICIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS
DEPARTAMENTO DE SALUD DE ALICANTE
HOSPITAL GENERAL**

**Determinación de fenilalanina (Phe)
En sangre desecada en papel de filtro**

5. Responsabilidades

Es responsabilidad del personal técnico de la sección el desarrollo del método en todas sus fases bajo la supervisión del personal facultativo.

Es responsabilidad del personal facultativo de la sección la medida y el control de calidad, el registro y la validación de los resultados.

La llamada para cita y petición de nuevas muestras una vez indicada por el personal facultativo puede realizarla cualquiera de los estamentos del personal, únicamente cuando los padres soliciten una información adicional, será el personal facultativo el encargado de la misma.

Se procurará no realizar en viernes o días previos a festivos la comunicación de valores dudosos o altos para no intranquilizar a los padres.

La comunicación de resultados positivos a los centros de seguimiento será realizada por el personal facultativo o bajo su supervisión.

6. Formatos/Especificaciones

- E1-PNT-CN-03 Calibración de Phe en sangre desecada
- E2-PNT-CN-03 Control de calidad interno de Phe en sangre desecada
- E3-PNT-CN-03 Control de calidad externo de Phe en sangre desecada

7. Indicadores

8. Formatos

Programa de la Consellería de Sanitat . MetaB

- F1-PNT-CN-03 Calibraciones, controles y resultados del Cribado Neonatal de Phe



PNT-CN-03
Edició 1

**SERVICIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS
DEPARTAMENTO DE SALUD DE ALICANTE
HOSPITAL GENERAL**

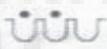
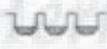
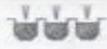
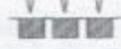
**Determinación de fenilalanina (Phe)
En sangre desecada en papel de filtro**

- F2-PGS-CN Control de reactivos
- F3-PGS-CN “Dietario del año en curso”. Registro de repeticiones
- F5-PGS-CN. Carpeta positivos
- F7-PGS-CN- Hoja de trabajo para técnicas de cribado neonatal.

9. Anexos

- Anexo I. Esquema de trabajo de la técnica de fenilalanina
- Anexo II. Esquema de uso del incubador
- Anexo III. Esquema de realización de lista de trabajo en Multicall
- Anexo IV. Esquema de lectura de placas en Multicall
- Anexo V. Algoritmo funcionamiento fenilalanina

ANEXO I

Neonatal Phenylalanine kit NP-1000 / NP-4000 Protocolo resumido		
PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS		
Reconstituir reactivo de PKU		6.5 mL [20 mL para el kit de 50 placas] de tampón de reconstitución PKU. Mezclar bien hasta que se disuelva.
Solución de extracción		Sulfato de zinc 3 partes Etanol absoluto 2 partes
PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO		
Taladrar calibradores, controles y muestras		Utilizar una microplaca clara con fondo en V para la fase de extracción
Añadir solución de extracción		15 µL, dé suaves golpecitos a la placa para mezclar los contenidos
Incubar		30–60 min. a T.A. o 18 h a +2–+8°C
Añadir agua desionizada		40 µL, dé suaves golpecitos a la placa para mezclar los contenidos
Transferir al pocillo correspondiente de la microplaca blanca		25 µL del contenido del pocillo
Añadir reactivo de PKU		50 µL, dé suaves golpecitos a la placa para mezclar los contenidos
Incubar		Incubador precalentado: 30–40 min. a +60°C o 120–140 min. a +37°C
Añadir reactivo de cobre		200 µL, dé suaves golpecitos a la placa para mezclar los contenidos
Incubar		30–90 min. a T.A.
Medir		KIT 84 o 85 (390 nm excitación, 486 nm emisión)



PNT-CN-03
Edición 1

SERVICIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS
DEPARTAMENTO DE SALUD DE ALICANTE
HOSPITAL GENERAL

Determinación de fenilalanina (Phe)
En sangre desecada en papel de filtro

ANEXO II

INCUBADOR WALLAC PARA PKU

- ENCENDER del botón situado a la izquierda.
- PRESIONAR las placas hacia dentro.
- PRECALENTAR las placas a utilizar a 60° (desde Ready):
- **TEMP 1 START**
- **TEMP 2 START**
- **TEMP 3 START** (La luz parpadeará en naranja).
- Cuando la luz naranja se quede fija.
- SACAR las bandejas negras (abrir las con cuidado en ángulo de 45°).
- INTRODUCIR las placas blancas dentro de las bandejas.
- COLOCAR las bandejas a incubar, en el incubador.
- PRESIONAR las bandejas hacia dentro.
- PRESIONAR la tecla **C**, para volver a ready.
- **1 START**
- **2 START**
- **3 START**
- LUZ ROJA encendida durante 40 minutos a 60°.
- LUZ VERDE Y PITANDO, ha terminado la incubación.
- SACAR LAS PLACAS.



PNT-CN-03
Edición 1

SERVICIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS
DEPARTAMENTO DE SALUD DE ALICANTE
HOSPITAL GENERAL

Determinación de fenilalanina (Phe)
En sangre desecada en papel de filtro

ANEXO III: LISTA DE TRABAJO

- Entrar en el ordenador contiguo al aparato VICTOR^2D:
 - Usuario: **19cribado**
 - Contraseña: **cribado**
- Ir a aplicaciones de equipo y entrar en **DVICTOR MULTICALC**
- **F3: WORK LIST**
- **F2: CREATE**
- **ELEGIR PRUEBA: 85 PKU, ENTER**
- Con la lista manual delante, ir a la placa uno:
 - No hay que meter los calibradores, ni los controles de la primera placa.
 - Comenzar a identificar directamente por la primera muestra precedida por la fecha, dd-mm-aa-Nº, o ddmmaa Nº (SI SON REPETICIONES) a partir de la lista de trabajo manual en la que están indicadas las fechas encima del nº del pocillo.
 - Continuar por las placas siguientes identificando los controles una sola vez cada uno: CN y CA.
- Si las muestras son consecutivas (ej. dd-mm-aa-01 y la siguiente dd-mm-aa-02....03....04....) al terminar de escribir la primera damos F7, que irá incrementando el número de la muestra sucesivamente mientras vayamos tecleando INTRO.
- Si no son consecutivas, pero son de la misma fecha también podemos aplicar la técnica del F7 variando las últimas cifras, poniéndonos con el cursor (flechas del teclado) bajo las cifras que queremos cambiar.
- Cuando se hayan metido todos los números de las muestras: **ESCAPE**
- **F1: QUIT Y SAVE (*)**
- **ESCAPE HASTA PANTALLA PRINCIPAL**
- **A: IMPRIMIR, ENTER, ENTER**

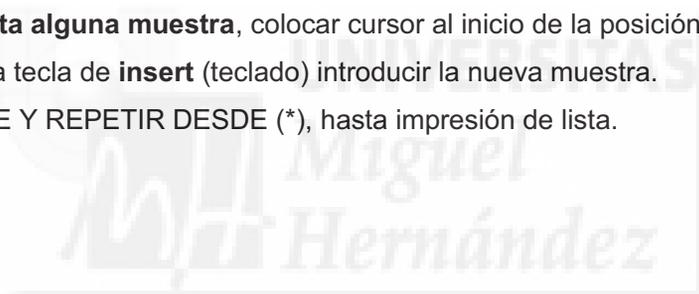


PNT-CN-03
Edición 1

SERVICIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS
DEPARTAMENTO DE SALUD DE ALICANTE
HOSPITAL GENERAL

Determinación de fenilalanina (Phe)
En sangre desecada en papel de filtro

- →: PLATEPRI, **ENTER**
- La lista sale impresa automáticamente. Se comprueba que coincida con la plantilla manual
- **OJO!! EN CASO DE NO COINCIDIR CON PLANTILLA, SE MODIFICA:**
 - **F3 (WORK LIST)**
 - **F1 (EDITAR)**
 - Seleccionar la lista a modificar, con el cursor ir a la posición equivocada, modificarla
 - **Si falta alguna muestra**, colocar cursor al inicio de la posición posterior y con la tecla de **insert** (teclado) introducir la nueva muestra.
- **ESCAPE Y REPETIR DESDE (*)**, hasta impresión de lista.





PNT-CN-03
Edición 1

SERVICIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS
DEPARTAMENTO DE SALUD DE ALICANTE
HOSPITAL GENERAL

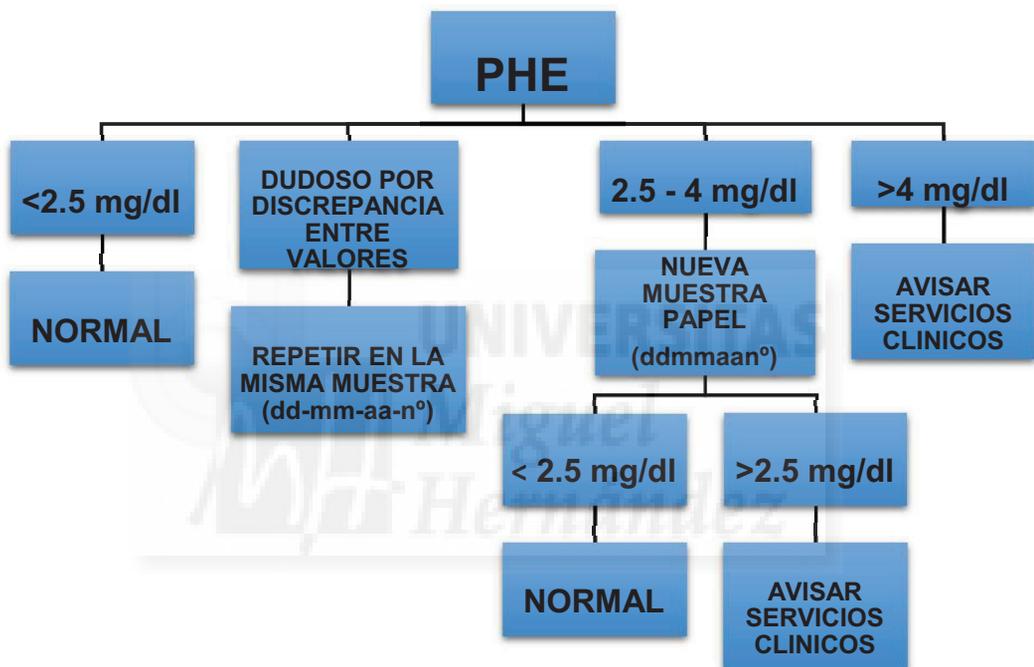
Determinación de fenilalanina (Phe)
En sangre desecada en papel de filtro

ANEXO IV

LECTURA DE PLACAS

- OJO, SIEMPRE SE COMIENZA A LEER CON LA LISTA DE TRABAJO MÁS ANTIGUA DE LA TÉCNICA ESCOGIDA.
- Entrar en el ordenador contiguo al aparato VICTOR^2D:
- Usuario: **19cribado**
- Contraseña: **cribado**
- **Seleccionar en el programa Multical la posición COUNTER.**
- Entrar en WALAC 1240 MANAGER
- Picar en varita mágica.
- NEXT
- ELEGIR PRUEBA: PKU o NTSH,
- NEXT
- Indicar el número de placas picando en la parte superior en el signo placa+. Si alguna placa no está completa colocar el cursor en el vértice inferior de la posición última ocupada hasta el final de la placa, seleccionar EMPTY.
- **Observar que los pocillos quedan en blanco,**
- **NEXT, NEXT**
- Colocar las placas en el lector y FINISH.
- Si hay más de una placa, cambiar cuando el botón LOAD del VICTOR 2 parpadee. Una vez cambiada la placa presionar la tecla LOAD.
- **Repetir con las placas a leer.**
- Los resultados salen impresos automáticamente.

ANEXO V





PNT-CN-03
Edición 1

SERVICIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS
DEPARTAMENTO DE SALUD DE ALICANTE
HOSPITAL GENERAL

Determinación de fenilalanina (Phe)
En sangre desecada en papel de filtro

F7-PGS-CN- Hoja de trabajo para técnicas de cribado neonatal



Pharmacia
Pharmacia Ibérica, S. A.

DELFLIA™

ENSAYO FECHA INCUBACION

N.º LOTE OPERADOR

CADUCIDAD

Hoja de Trabajo:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	A
B	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	B
C	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	C
D	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	D
E	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	E
F	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	F
G	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	G
H	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

OBSERVACIONES:

.....

.....

ANEXO 3



LABORATORIOS CLINICOS
 DEPARTAMENTO DE SALUD DE ALICANTE
 HOSPITAL GENERAL

CONTROL INTERNO DE CALIDAD

E2-PNT-CN-03

FENILALANINA

CONTROLES	TÉCNICAS	UBICACIÓN	FRECUENCIA	TRATAMIENTO DE DATOS	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y EVALUACIÓN DE RESULTADOS
C NORMAL		En uso: Cámara frigorífica BG-5		Los datos se procesan automáticamente en el programa informático Multical, el cual guarda la información a modo registro gráfico e informático.	Se acepta la serie si: - Los resultados control tienen un CV igual o inferior al 20%
C ANORMAL Incluidos en el kit DELFIA Phenilalanina kit PerkinElmer	PHE	2º estante de la izda (dentro de una funda de plástico) Nuevo (dentro de la caja del kit)	C NORMAL en cada placa, por duplicado C ANORMAL en cada placa, por duplicado	Los datos se pasan de forma manual al programa MedlabQC, en aplicaciones de equipo del ordenador H1200INF1024-M	Se revisa la serie si: - Dos o más controles sobrepasan el 20% de CV. En estos casos se rechaza la serie si los valores alterados se encuentran en la zona de corte, valorando la variabilidad biológica y capacidad diagnóstica de la prueba. Siempre a criterio del facultativo.

ANEXO 4



LABORATORIOS CLINICOS
DEPARTAMENTO DE SALUD DE ALICANTE
HOSPITAL GENERAL

CONTROL EXTERNO DE CALIDAD

E3-PNT-CN-03

FENILALANINA

CONTROLES	FRECUENCIA	TRATAMIENTO DE DATOS	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y EVALUACIÓN DE RESULTADOS
PROGRAMA DE CONTROL EXTERNO DE CALIDAD AECNE	<p>3 niveles de sangre impregnada en papel que se reciben una vez al mes</p> <p>Phe µmol/l sangre</p>	<p>El facultativo rellenará el archivo Excel correspondiente (Mis documentos archivo 1517. "año en curso") con los resultados obtenidos y la presunción diagnóstica (multiplicar PKU x 60.6 para convertir unidades), haciendo constar en las mismas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Código del laboratorio - Número del control - Número de lote del kit 	<p><u>Aceptación:</u> Resultados dentro de la media calculada para todos los laboratorios por AECNE</p> <p>Si resultados fuera de la media: Se realiza un seguimiento del parámetro mediante los controles internos Se llama al servicio técnico.</p>
PROGRAMA CONTROL EXTERNO DE CALIDAD CDC	<p>1) 5 niveles de sangre impregnada en papel que se reciben cada tres meses.</p> <p>Phe µmol/l sangre</p>	<p>El facultativo rellenará la página web correspondiente en la dirección wwwn.cdc.gov/nsqap/public/default.aspx con los resultados obtenidos y la presunción diagnóstica (multiplicar x 60.6 para convertir unidades), haciendo constar en las mismas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Código del laboratorio - Número del control 	<p>Idem para CDC</p>