

# Calidad de la muestra y niveles de fenilalanina y 17-hidroxiprogesterona en pesquisa neonatal

✉ Lesley del Río, Ernesto C González, Amarilys Frómeta, Elisa M Castells, Yileidis Tejeda

Laboratorio de Pesquisa Neonatal, Centro de Inmunoensayo, CIE  
Calle 134 y Ave. 25, AP 6653, Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba  
E-mail: iqtsh7@cie.sld.cu

## RESUMEN

En los programas de pesquisa neonatal, diferentes analitos son cuantificados en muestras de sangre de recién nacidos, impregnadas sobre papel de filtro. Varios factores pueden afectar la calidad de las muestras e invalidar su empleo en el laboratorio: procedimientos inadecuados en la colecta, calidad del papel de filtro y procesos de secado, almacenamiento y transportación bajo condiciones ambientales extremas. Para documentar la influencia de la calidad de la muestra sobre los niveles de fenilalanina y 17-hidroxiprogesterona en manchas de sangre seca sobre papel de filtro, se analizaron muestras de recién nacidos provenientes del Hospital Materno-Infantil "Ramón González Coro". Las manchas provenientes de una misma muestra se clasificaron según su apariencia, en "válidas" o "no válidas". Los niveles de fenilalanina y 17-hidroxiprogesterona se determinaron mediante el empleo de UMTEST PKU y UMEISA 17OH Progesterona NEONATAL, respectivamente. De 3 043 muestras analizadas, el 19.5% presentó manchas con características "no válidas". Los estudios de concordancia de la correlación entre ellas, mostraron que la calidad de la muestra afectó la precisión y la exactitud de los niveles de fenilalanina y 17-hidroxiprogesterona en sangre seca. "En las manchas con características "no válidas" fueron detectados resultados discordantes, con valores falsos positivos o negativos con respecto a la muestra control. La aplicación correcta de los procedimientos de colecta de las muestras de pesquisa neonatal es esencial para la obtención de resultados confiables en los laboratorios.

**Palabras clave:** sangre seca, papel de filtro, pesquisa neonatal, calidad, fenilalanina, 17-hidroxiprogesterona

*Biotecnología Aplicada 2010;27:294-298*

## ABSTRACT

**Quality of the sample and phenylalanine and 17-hydroxyprogesterone levels in neonatal screening.** In the programs for neonatal screening many different analytes are quantified from dried blood on filter paper cards. Several factors affect the quality of the samples invalidating their employment in the laboratory: inadequate collection procedures, quality of the filter paper, the drying, storage and transportation under extreme environmental conditions. This article aims to show how the quality of the sample collection influences the phenylalanine (Phe) and 17-hydroxyprogesterone (17-OHP) levels. As such, samples of newborns on filter paper from Ramón González Coro Hospital were collected and analyzed. The blood spots from a sample were classified according to their appearance, satisfactory spot (MV) or unsatisfactory spot (MNV). Phe and 17OHP levels were determined by UMTEST PKU and UMEISA 17OH Progesterone NEONATAL, respectively. 19.5% of 3043 newborns samples exhibited unsatisfactory spots. Concordance correlations studies between MV y MNV showed the precision and accuracy were affected by quality of the samples. False positive and negative values (with concerning control sample) were detected from samples with MNV. The correct application of collection procedures for samples is essential in obtaining reliable results in screening neonatal laboratories.

**Keywords:** dried blood spots, filter paper, neonatal screening, quality, Phe, 17-OHP

## Introducción

Los errores innatos del metabolismo constituyen un grupo numeroso de enfermedades que se presentan fundamentalmente en la edad pediátrica. El no realizar un diagnóstico temprano puede conducir a la muerte del paciente o dejar graves secuelas en el desarrollo neurológico y un pronóstico pesimista en cuanto a las posibilidades de desarrollo cognitivo y social [1].

La pesquisa neonatal (PN) de enfermedades originadas por errores congénitos del metabolismo constituye un procedimiento esencialmente preventivo que permite detectar precozmente e identificar inequívocamente una afección que puede llevar potencialmente a un problema grave de salud [2]. Por ello, la PN es aplicada en recién nacidos (RN) aparentemente sanos, antes de que se manifesten los síntomas de la enfermedad, lo que permite comenzar el tratamiento de forma oportuna antes de que sus efectos sean irreversibles.

La colecta de sangre en papel de filtro, método de rutina empleado en la PN, presenta grandes ventajas por simplificar el traslado de las muestras desde lugares distantes hasta un laboratorio central, sin necesidad de refrigeración ni cuidados especiales [3]; además de posibilitar su almacenamiento y conservación sin afectar su estabilidad y facilitar a la vez, su procesamiento y manipulación en el laboratorio. La toma de la muestra implica un menor riesgo biológico y la cantidad de sangre necesaria es pequeña [4].

Sin embargo, varios factores pueden afectar la calidad de las muestras e invalidar su empleo en el laboratorio: procedimientos inadecuados en la colecta, calidad del papel de filtro así como el secado, almacenamiento y transportación bajo condiciones ambientales extremas [4-5]. Las muestras pueden ser clasificadas en satisfactorias o insatisfactorias de acuerdo

1. Raimann BE, Cornejo EV. Una primera aproximación al diagnóstico y tratamiento de errores innatos del metabolismo. En: Colombo CM, Cornejo EV, Raimann BE, eds. Errores innatos en el metabolismo del niño. 1a ed. Santiago de Chile: Editorial Universitaria; 1999, p.45-56.

2. Wilcken B, Wiley V. Newborn screening. Pathology 2008; 40(2): 104-15.

3. Waite KV, Maberly GF, Eastman CJ. Storage conditions and stability of thyrotropin and thyroid hormones on filter paper. Clin Chem 1967;33(6):853-5.

4. Mei JV, Alexander JR, Adam BW, Hannon WH. Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens. J Nutr 2001; 131: 1631S-6S.

con el cumplimiento o no de estos procedimientos. Es válida la muestra cuya mancha de sangre posee aproximadamente un centímetro de diámetro y se encuentra distribuida de forma homogénea en ambas caras del papel, suficiente para realizar varios cortes de 3 mm de la zona central de la mancha [6]. De manera general, la muestra insatisfactoria o “no válida” es la que ha sido tomada, manipulada o transportada al laboratorio inadecuadamente, en la cual es posible detectar ralladuras, coloración inadecuada, contaminación visible o datos incompletos. Las muestras “no válidas” pueden clasificarse según su apariencia en:

- **Muestra insuficiente (MI):** posee una cantidad de sangre insuficiente debido a que se retiró el papel de filtro antes de que se absorbiera hasta el lado contrario

- **Muestra rallada o desgastada (MR):** se observan ralladuras o desgaste debido a que la sangre se aplicó con un tubo capilar u otro dispositivo.

- **Muestra sobresaturada (MS):** se observan manchas con exceso de sangre seca sobre el papel de filtro, probablemente por el uso de un dispositivo o la aplicación en ambos lados de la tarjeta.

- **Muestra aparentemente diluida, desteñida o contaminada (MC):** probablemente antes o después de su obtención, el papel de filtro entró en contacto con las manos o con sustancias como alcohol, soluciones antisépticas, agua, talco u otras. También puede haberse comprimido excesivamente el área de punción o haberse expuesto al calor.

- **Muestra con anillos de suero (MA):** se observan estos anillos porque no se eliminó completamente el alcohol del área de punción en el talón o se comprimó excesivamente esa zona.

- **Muestra con coágulos (MG):** el mismo círculo de papel entró en contacto con gotas de sangre más de una vez.

La fenilketonuria es una enfermedad hereditaria autosómica recesiva, que afecta el catabolismo de la fenilalanina (Phe). Este trastorno es producido por deficiencia del complejo enzimático fenilalanina hidroxilasa que cataliza la conversión de Phe en tirosina [7]. Origina la acumulación de Phe en la sangre, en otros líquidos y en tejidos orgánicos, así como una ligera disminución de los niveles de tirosina en la sangre. La concentración de Phe en el RN portador de la enfermedad puede ser normal hasta el cuarto día de vida, pero aumenta con rapidez al comenzar la alimentación proteica [7]. Si no se inicia el tratamiento en el período neonatal aparecen los signos clínicos de la enfermedad, entre los que se encuentran: retraso mental irreversible, anomalías neurológicas y defectos en la piel y su pigmentación. De ahí que sea de gran importancia el diagnóstico temprano y la aplicación de una dieta deficitaria de Phe, con la cantidad suficiente de este aminoácido para el crecimiento normal del niño [8-9].

La hiperplasia adrenal congénita, forma más común de ambigüedad genital, es causada por la deficiencia de una de las cinco enzimas que participan en la biosíntesis de los corticosteroides en la corteza adrenal y que conduce a diferentes formas de la enfermedad, en la que el 90-95% de los casos se deben a la deficiencia de la enzima 21-hidroxilasa [10]. Esta deficiencia ocasiona la acumulación de altos niveles

de 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (17-OHP), principal marcador bioquímico para la detección de la enfermedad [10]. El rasgo común de estos defectos es la presencia de bajos niveles de cortisol con la consecuente hiperplasia de la corteza adrenal, a causa de la hipersecreción de corticotropina en la hipófisis. Entre los síntomas asociados con la enfermedad se encuentran la deshidratación severa, la virilización de los genitales externos femeninos y el desarrollo prematuro de características sexuales secundarias en los varones, lo que puede prevenirse con el diagnóstico precoz de la enfermedad y el comienzo de una terapia sustitutiva con esteroides [11].

El objetivo del presente trabajo fue documentar la influencia de la calidad de la muestra sobre los niveles de Phe y 17-OHP en manchas de sangre seca de RN sobre papel de filtro, utilizada en los programas de PN.

## Materiales y métodos

Se analizaron 3 043 muestras de sangre de talón de RN, colectadas en papel de filtro provenientes del Hospital Materno-Infantil “Ramón González Coro”. Las muestras fueron clasificadas atendiendo a que en una muestra se encontraran simultáneamente manchas satisfactorias o “válidas” (MV) e insatisfactorias o “no válidas” (MNV). Fueron evaluadas por duplicado y los niveles de Phe y 17-OHP se determinaron empleando los estuches de reactivos UMTEST PKU y UMELISA 17OH Progesterona NEONATAL, respectivamente, producidos por el Centro de Inmunoensayo [12-13].

Se emplearon los equipos y accesorios de la Tecnología SUMA®: perforador manual P-51, lavador de placas automático MAS 301, lector fluorímetro-fotómetro PR-521 y el programa *Strip Reader (Version 9)* para la validación e interpretación de los resultados.

La cuantificación de los niveles de Phe en muestras de RN se realizó empleando el UMTEST PKU, prueba fluorescente basada en el método de *McCaman & Robins* [12]. Se perforaron discos de 3 mm de diámetro de los calibradores, el control del ensayo y las muestras en sangre seca sobre papel de filtro, mediante el empleo del perforador manual P-51. Los discos se adicionaron a cada pocillo de la placa de elución y se le añadieron 70  $\mu$ L de etanol al 70%. La elución se realizó durante 30 minutos en cámara húmeda a 20-25 °C. Se transfirieron 10  $\mu$ L del eluato a las placas de poliestireno, previamente recubiertas con la mezcla de reacción (L-leucil-L-alanina y ninhidrina). Las placas se incubaron una hora en cámara húmeda a 60 °C. Se adicionaron 10  $\mu$ L del reactivo de cobre a cada uno de los pocillos de las tiras de reacción y se incubó en cámara húmeda a 20-25 °C entre 5 y 15 minutos. Para la lectura e interpretación de los resultados se empleó el lector de placas fluorímetro-fotómetro PR 521.

Para la determinación de los niveles de 17-OHP se empleó el UMELISA 17OH Progesterona Neonatal, ensayo heterogéneo inmunoenzimático basado en la competencia entre el antígeno natural (17-OHP) presente en las muestras y el antígeno marcado con la enzima fosfatasa alcalina (17-OHP-FA) [13]. Se perforaron discos de 3 mm de diámetro de los calibradores, el control del ensayo y las muestras en sangre seca sobre papel de filtro, mediante el empleo del perfo-

5. Torök D, Mühl A, Votava F, Heinze G, Solyom J, Crone J, et al. Stability of 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone in dried blood spots after autoclaving and prolonged storage. *Clin Chem* 2002;48(2):370-2.

6. Hannon WH, Boyle J, Davin B, Marsden A, McCabe ERB, Schwartz M, et al. Blood collection on filter paper for neonatal screening programs, 3rd ed, approved standard, NCCLS Document A4-A3. Wayne, PA: NCCLS, 1997.

7. Kaye CL and the Committee on Genetics. Newborn screening fact sheets. *Pediatrics* 2006;118:934-63.

8. Heredero L, Atencio G, Vega JL, Gutiérrez E, Damiani A. Early diagnosis of phenylketonuria in Cuba: preliminary report. *Rev Cubana Pediatr* 1986;58:27-33.

9. Martínez L, Robaina Z, García S, Gutiérrez E. The Cuban program for neonatal screening of phenylketonuria. Twenty years of experience: the clinical and social attention. *Rev Cubana Genet Comunit* 2008; 2:45-51.

10. Antal Z, Zhou P. Congenital adrenal hyperplasia: Diagnosis, evaluation, and management. *Pediatr Rev* 2009;30: e49-e57.

11. White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-Hydroxylase deficiency. *Endocr Rev* 2000; 21(3): 245-91.

12. González EC, Frómata A, del Río L, Castells E, Robaina MS, García SM, et al. Cuban neonatal screening of phenylketonuria using an ultramicro-fluorometric test. *Clin Chim Acta* 2009;396:129-32.

13. González EC, Marrero N, Pérez PL, Frómata A, Zulueta O, Herrera D, et al. An enzyme immunoassay for determining 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone in dried blood spots on filter paper using an ultramicroanalytical system. *Clin Chim Acta* 2008; 396:63-6.

rador manual P-51. Los discos se adicionaron a cada pocillo de la placa de elución y se le añadieron 40  $\mu\text{L}$  de la solución de conjugado 17-OHP-FA. La elución se realizó durante 30 minutos en cámara húmeda a 20-25  $^{\circ}\text{C}$ . Se transfirieron 10  $\mu\text{L}$  del eluato a las placas de poliestireno sensibilizadas con los anticuerpos policlonales anti-17-OHP. Las placas se incubaron dos horas en cámara húmeda a 20-25  $^{\circ}\text{C}$ . Transcurrido este tiempo, se realizaron seis lavados adicionando 28  $\mu\text{L}$  de solución de lavado a cada pocillo, mediante el lavador MAS 301. Se adicionaron 10  $\mu\text{L}$  del sustrato 4-metilumbiferilfosfato y se incubó en cámara húmeda a 20-25  $^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. Para la lectura e interpretación de los resultados se empleó el lector de PR 521.

## Análisis estadístico

Los datos fueron almacenados y procesados mediante la hoja de cálculo de *Microsoft Excel* 2007. Se calcularon los valores medios de concentración de Phe y 17-OHP provenientes de las MV y las MNV. Se evaluaron las diferencias entre los niveles medios de concentración obtenidos mediante el estudio de la correlación de *Pearson* y el cálculo del coeficiente de concordancia de la correlación ( $\rho$ ). Fueron calculados los estadígrafos  $\rho_{12}$  y  $\chi^2_{12}$ , cuyos valores son un indicativo del comportamiento de precisión y exactitud entre dos variables respectivamente [14]. La concordancia de la correlación fue calculada como una medida de la correspondencia entre los niveles de cada analito entre MV y MNV. Valores entre 0.2 y 0.7 indican una concordancia pequeña o menor, valores entre 0.7 y 0.85 indican una concordancia moderada y valores mayores de 0.85 indican una alta concordancia [14]. Se calculó la pendiente de la curva, el intercepto, la línea de mejor ajuste y el coeficiente de regresión. La comparación entre grupos se realizó mediante el Test U de *Mann-Whitney*, para un nivel de confianza del 95% según el programa *Statgraphics*, versión 5.1.

## Resultados y discusión

De 3 043 muestras de RN analizadas, el 19.5% (592) presentaron manchas con alguna característica “no válida”. Fueron determinados las concentraciones de Phe y 17-OHP en cada MV y MNV procedentes de una misma muestra. Se tomó como control la mancha que cumplía con los requisitos establecidos por las normas emitidas por el *National Committee for Clinical Laboratory Standards* de los Estados Unidos (NCCLS) [6]. Se determinó el valor promedio de concentración de Phe para ambos grupos. El valor medio obtenido en MNV fue de 87.7  $\mu\text{mol}$  de Phe/L de sangre total, siendo este ligeramente superior al total de las MV, 82.4  $\mu\text{mol/L}$ .

En la figura 1 se muestra el estudio de correlación y la ecuación de la recta, donde la pendiente, el intercepto y el coeficiente de correlación lineal fueron de 0.270, 58.66 y 0.147, respectivamente. Se obtuvo una baja correlación entre ambos conjuntos de datos ( $r = 0.38$ ) y el cálculo del coeficiente de concordancia de la correlación mostró igualmente una baja concordancia entre los niveles de Phe para MV y MNV ( $\rho = 0.36$ ). Los valores  $\rho_{12}$  y  $\chi^2_{12}$  obtenidos fueron de 0.40 y 0.95, lo que demuestra que la mala calidad de las muestras afecta más la precisión de los valores

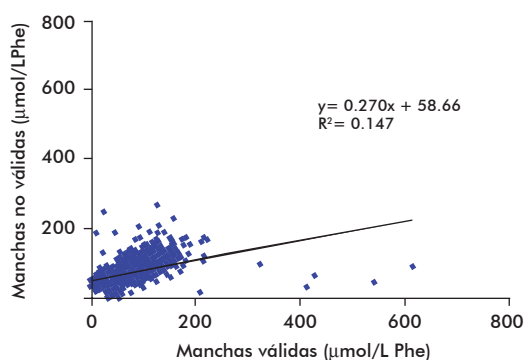


Figura 1. Correlación entre los niveles de Phe determinados en MV y MNV.

que su exactitud. La aplicación del Test U de *Mann-Whitney* mostró que no existían diferencias estadísticamente significativas entre las MNV al comparárlas con las MV ( $p = 0.12$ ).

Una evaluación similar se realizó con los niveles de 17-OHP. Se obtuvieron valores de concentración promedio entre las MV y las MNV de 28.6 y 30.5  $\text{nmol/L}$ , respectivamente. Al valorar la correlación se obtuvo una ecuación de regresión  $y = 0.850x + 5.921$ , un coeficiente de correlación lineal de 0.217 y una baja correlación entre ambos conjuntos de datos ( $r = 0.47$ ), según aparece en la figura 2. El cálculo del coeficiente de concordancia de la correlación mostró una baja concordancia entre los niveles de 17-OHP de las MV y las MNV ( $\rho = 0.39$ ). Los valores  $\rho_{12}$  y  $\chi^2_{12}$  obtenidos fueron de 0.46 y 0.84, lo que reafirma que en este estudio, la mala calidad de la muestra afectó más la precisión de los valores y en menor grado la exactitud.

El valor  $p$  obtenido del estudio de comparación de medias entre MV y MNV fue de 0.84, lo que corrobora que no existen diferencias estadísticamente significativas para un intervalo de confianza del 95%.

Las muestras de RN que presentaron manchas con alguna característica “no válida” ( $n = 592$ ) fueron clasificadas simultáneamente según su apariencia, en : muestras con insuficiente cantidad de sangre (27%), diluidas, desteñidas o contaminadas (26%), con anillos de suero (23%), con coágulos o capas sucesivas (16%) y sobresaturadas (8%).

En cada grupo, los valores medios de concentración de Phe y 17-OHP para las MV y las MNV se

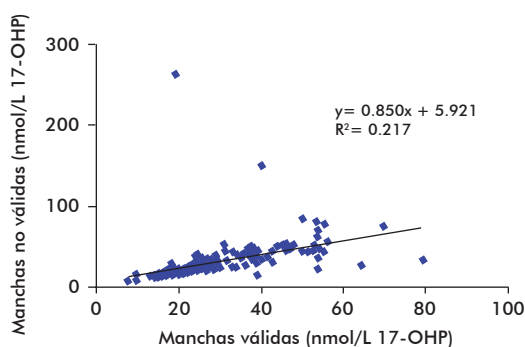


Figura 2. Correlación entre los niveles de 17-OHP determinados en MV y MNV.

14. Lin LI. A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. *Biometrics* 1989;45:255-68.

calcularon por separado. De igual forma se procedió para el cálculo de los estadígrafos  $\rho_{12}$  y  $\chi^2_{12}$  y para los coeficientes de correlación de *Pearson* y la concordancia de la correlación. Las tablas 1 y 2 muestran los valores correspondientes para cada uno de los analitos estudiados.

Las MI exhibieron una disminución en los valores medios de concentración para ambos analitos en las MNV en comparación con las MV provenientes de la misma muestra; mientras que las MG, las MS y las MA mostraron niveles medios superiores a las manchas control. En las MC, los valores medios de Phe aumentaron el 9% y los de 17-OHP fueron similares a los de las manchas control.

La presencia de MI se relaciona con la extracción y formación incorrecta de la gota de sangre para su colecta en el papel de filtro. Para evitar estos fenómenos debe favorecerse el incremento de la presión venosa y trabajar con lancetas con una profundidad menor o igual a 2 mm [4], debe evitarse la aplicación de la sangre con un tubo capilar u otro dispositivo o el quitar el papel de filtro antes de que la sangre llene por completo el círculo o antes de que se absorba hasta el lado contrario del papel. Por último, debe impedirse que antes o después de la obtención de la muestra, se toque el papel de filtro con las manos o se ponga en contacto con sustancias como loción para manos, talco u otras.

Los niveles de Phe y 17-OHP en las MS y las MG aumentan como consecuencia del contacto del papel de filtro con gotas de sangre más de una vez, lo que está condicionado por la aplicación de un exceso de sangre (probablemente con un dispositivo) o de añadir sangre a ambos lados del papel de filtro. Igualmente, en las MA se observó un incremento de los niveles de ambos analitos. En estas muestras se apreció una separación del suero y los eritrocitos, lo que pudo relacionarse con la presencia de un exceso del agente desinfectante, el cual puede precipitar componentes de la sangre que afectan la migración homogénea sobre el papel de filtro. En estos casos debe secarse correctamente el área antes de la punción cutánea, no comprimir excesivamente la zona que rodea el área de

punción y evitar el empleo de tubos capilares para la aplicación de la sangre y el contacto del papel de filtro con sustancias contaminantes. También esta causa de invalidez se ha asociado con procedimientos incorrectos de secado de las muestras. Además, en el caso de las MC, debe evitarse la exposición de las muestras al calor.

Resultados discordantes fueron detectados entre algunas de las MNV, con valores falsos positivos y negativos, con respecto a las manchas control. En Cuba, para el diagnóstico de la fenilcetonuria en edades tempranas se acepta un valor límite de 240  $\mu\text{mol}$  de Phe/L de sangre total. Las muestras que presentan una concentración igual o superior son consideradas como elevadas. En el programa de PN de la hiperplasia suprarrenal congénita se emplea un nivel de corte de 55 nmol de 17-OHP/L de sangre total. En cuatro MNV se detectaron valores de Phe superiores a 240  $\mu\text{mol/L}$ , mientras que en las MV, provenientes de la misma muestra, estos valores se encontraban por debajo del nivel de corte. Un resultado similar se presentó en dos muestras al cuantificar los niveles de 17-OHP.

Desde el punto de vista metodológico, la obtención de resultados falsos positivos en los laboratorios de PN, conlleva la reevaluación de las muestras y en muchos casos, la colecta de una nueva muestra de talón. Una alta tasa de falsos positivos no sólo incrementa el costo real de la pesquisa, sino que provoca estrés psicológico a los padres del niño afectado [15]. Por ello, los programas de PN necesitan controlar todas las posibles variables que provocan este tipo de resultados incorrectos.

Adicionalmente, en el grupo con MNV se detectaron dos muestras cuyos niveles de Phe se encontraban por debajo de los 240  $\mu\text{mol/L}$ , mientras que en las manchas control, los niveles de este analito se encontraban elevados. En el caso de 17-OHP fueron localizadas tres muestras con similar comportamiento.

La obtención de resultados falsos negativos tiene implicaciones aún más graves, pues se reporta como sano a un niño afectado por la enfermedad, lo que impide el inicio del tratamiento temprano y pone en riesgo, en muchos casos, la vida del paciente.

15. Olgemöller B, Roscher A, Liebl B, Fingerhut R. Screening for congenital adrenal hyperplasia: adjustment of 17-hydroxyprogesterone cut-off values to both age and birth weight markedly improves the predictive value. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(12):5790-4.

Tabla 1. Estudio comparativo de los niveles de Phe entre MV y MNV

| MI                          | MC            | MA            | MG            | MS            |
|-----------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| (n = 161)                   | (n = 151)     | (n = 136)     | (n = 16)      | (n = 47)      |
| MV<br>MN<br>V               | MV<br>MN<br>V | MV<br>MN<br>V | MV<br>MN<br>V | MV<br>MN<br>V |
| Media ( $\mu\text{mol/L}$ ) |               |               |               |               |
| 81.3                        | 86.7          | 81.6          | 82.9          | 75.9          |
| 77.6                        | 94.8          | 89.7          | 91.3          | 88.1          |
| pc                          |               |               |               |               |
| 0.47                        | 0.34          | 0.26          | 0.53          | 0.66          |
| $\rho_{12}$                 |               |               |               |               |
| 0.47                        | 0.34          | 0.26          | 0.53          | 0.65          |
| $\chi^2_{12}$               |               |               |               |               |
| 0.97                        | 0.91          | 0.89          | 0.94          | 0.93          |
| p                           |               |               |               |               |
| 0.21                        | 0.20          | 0.43          | 0.08          | 0.06          |

MV: manchas válidas; MNV: manchas no válidas; MI: muestras insuficientes; MC: muestras contaminadas; MA: muestras con anillo de sueros; MG: muestras con coágulos; MS: muestras sobresaturadas

Tabla 2. Estudio comparativo de los niveles de 17-OHP entre MV y MNV

| MI             | MC            | MA            | MG            | MS            |
|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| (n = 161)      | (n = 151)     | (n = 136)     | (n = 16)      | (n = 47)      |
| MV<br>MN<br>V  | MV<br>MN<br>V | MV<br>MN<br>V | MV<br>MN<br>V | MV<br>MN<br>V |
| Media (nmol/L) |               |               |               |               |
| 26.9           | 31.2          | 28.9          | 27.9          | 25.1          |
| 25.0           | 31.3          | 33.9          | 33.1          | 27.5          |
| pc             |               |               |               |               |
| 0.82           | 0.73          | 0.67          | 0.16          | 0.94          |
| $\rho_{12}$    |               |               |               |               |
| 0.81           | 0.72          | 0.66          | 0.15          | 0.88          |
| $\chi^2_{12}$  |               |               |               |               |
| 0.98           | 0.99          | 0.77          | 0.57          | 0.95          |
| p              |               |               |               |               |
| 0.27           | 0.91          | 0.52          | 0.82          | 0.86          |

MV: manchas válidas; MNV: manchas no válidas; MI: muestras insuficientes; MC: muestras contaminadas; MA: muestras con anillo de sueros; MG: muestras con coágulos; MS: muestras sobresaturadas.



Las muestras en papel filtro constituyen una fuente valiosa de información; sin embargo, su confiabilidad depende de la estabilidad de los analitos en las muestras almacenadas [16-17].

Los resultados del presente estudio vienen a confirmar que los ensayos en muestras de sangre seca sobre papel de filtro son susceptibles de ser afectados por diversos factores que pueden alterarlos [16-17]. Entre estos se encuentra la calidad de las muestras, por lo cual debe evaluarse y garantizarse la aplicación correcta del proceder desde la colecta de la muestra hasta el análisis en el laboratorio y así evitar la alteración del resultado en diferentes ensayos. Otros estudios también han mostrado que la aplicación correcta de estos procedimientos es esencial para la obtención de resultados confiables en los laboratorios [18-20].

La colecta de las muestras debe ser realizada correctamente para evitar una muestra insuficiente o "no útil". El control de calidad de la muestra obliga a descartar aquellas que no cumplan los requisitos establecidos. La muestra puede ser rechazada durante el proceso de recepción por presentar las manchas algunas de las características insatisfactorias o durante la ejecución de la prueba cuando la muestra no eluye o eluye parcialmente; si transcurrido el tiempo de dilución, el eluato se mantiene incoloro o con una coloración tenue en dependencia del grado de desnaturalización de la hemoglobina y el disco de sangre mantiene un color oscuro.

Una muestra "no válida" será rechazada por el laboratorio y se requerirá una segunda muestra, ello ocasiona un trauma extra al RN, mayor angustia a los padres y un potencial retraso en el diagnóstico, lo que implica que deben extremarse los cuidados durante el proceso de secado, almacenamiento y envío de las muestras.

El NCCLS describió una metodología de amplia difusión y aceptación para la colecta, secado y conservación de las muestras de sangre seca sobre papel de filtro [6]. Entre los principales procedimientos a seguir para una apropiada colecta de la muestra se encuentran: llenar la tarjeta de identificación de la muestra sin omitir información alguna antes de proceder a la toma de la muestra; no tocar parte alguna del círculo limpio en el papel de filtro antes de la colección de la muestra; limpiar con alcohol al 70% el sitio de la perforación en el talón y retirar el exceso de solvente con algodón o gasa; usar material estéril durante todo el procedimiento; eliminar la primera gota con algodón

o gasa y aplicar la siguiente en el papel de filtro; asegurarse que la sangre sea aplicada por una sola cara y que traspase el papel [4,6]. Una vez depositadas las gotas de sangre, las tarjetas deben colocarse en un dispositivo que permita su secado, suspendidas de forma horizontal, para evitar el contacto con superficies y lograr una difusión homogénea de la gota de sangre. Las tarjetas deben secarse entre 15-25 °C al menos durante tres horas, lejos de la luz solar y almacenarse en lugares limpios, alejados de soluciones antisépticas u otro material que pudiera contaminarlas. Las tarjetas no deben ser secadas en hornos microondas, estufas u otro medio artificial de energía.

El adecuado secado de la muestra es importante pues la humedad puede dañar su calidad e inducir el crecimiento bacteriano o alterar el tiempo de elución de las muestras.

Una vez secas, las tarjetas deben colocarse a 180° una con respecto a la otra, para evitar que las manchas de sangre de diferentes tarjetas estén en contacto y se produzca una contaminación cruzada. Las muestras deben guardarse en sobre de papel, debidamente clasificadas. Es recomendable que las muestras almacenadas en neveras (2-8 °C) o durante su transporte, sean protegidas por una bolsa plástica con desecante en su interior, para evitar que se mojen en caso de rotura de la nevera o por accidente durante su traslado.

Debe emplearse el papel de filtro regulado por el programa de PN [17], cuyas propiedades fisicoquímicas especiales permiten una adecuada capacidad de absorción, retención y homogeneidad. Estos parámetros son esenciales para obtener resultados confiables en la prueba. Deben guardarse las tarjetas sin uso en un lugar limpio, resguardadas del polvo para evitar contaminaciones.

Por último, después de secadas, las muestras deben enviarse lo más rápido posible a los laboratorios bajo las condiciones de embalaje recomendadas, que eviten su exposición al calor o al agua y garanticen la integridad de la muestra [17].

La calidad de las muestras de sangre seca sobre papel de filtro es un paso clave en la PN; por ello, la normalización de los procedimientos y el entrenamiento integral del personal son fundamentales en el aseguramiento de la efectividad de los programas [16]. Conocer cómo las características de la muestra, su conservación, traslado y distribución pueden afectar el ensayo analítico es esencial en la obtención de resultados confiables en los laboratorios.

16. Cedillo B, Estrada RA, Jonguitud V, Parra I. Factores que afectan algunas de las pruebas del tamiz neonatal. *Med Univer* 2007;9(34):3-6.

17. Frómata A, Marrero N, González E, Lugo E, Fernández L, Doménech M. Estudio comparativo de los tres papeles de filtro en los ensayos UMEISA para el tamizaje neonatal de hipotiroidismo congénito y fenilcetonuria. *Rev Biomed* 2002; 13:241-7.

18. Dezateux C. Evaluating newborn screening programmes based on dried blood spots: future challenges. *Br Med Bull* 1998;54:877-90.

19. Pappaioanou M, Kashamuka M, Behets F, Mbala S, Biyela K, Davachi F, et al. Accurate detection of maternal antibodies to HIV in newborn whole blood dried on filter paper. *AIDS* 1993;7(4):483-8.

20. Meites S, Glassco KM. Studies on the quality of specimens obtained by skin-puncture of children. 2. An analysis of blood collecting practices in a pediatric hospital. *Clin Chem* 1985;31(10):1669-72.

Recibido en abril de 2010. Aprobado en diciembre de 2010.