

کاربرد

اندازه گیری غلظت فنیل آلانین در لکه خون خشک شده به روش کلریمتریک آنزیماتیک (Cat.No. DG.PKU.01)

مقدمه

بیماری فنیل کتونوریا یا PKU (Phenylketonuria) یک نقص متابولیک است که به صورت اتوزومال مغلوب (Autosomal recessive) به ارث می رسد. در افراد مبتلا به این بیماری ژن مسئول ساخت آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز (Phenylalanine hydroxylase) که بر روی کروموزوم ۱۲ واقع شده است به دلیل وقوع جهش، غیر فعال بوده یا به مقدار کافی بیان نمی شود. در فقدان این آنزیم کبدی، تبدیل فنیل آلانین به تیروزین انجام نشده و غلظت سرمی فنیل آلانین و اجسام کتونوی مشتق از آن (اسیدهای فنیل پیرووات، فنیل لاکتات، فنیل استات و فنیل اتیل آمین) افزایش می یابد. تجمع این متابولیتها در خون و مغز به تدریج منجر به صدمات مغزی غیر قابل بازگشت می شود.

این بیماری در هفته های اول تولد، نشانه های بارز و واضحی ندارد. ولی به تدریج بیمار در پایان ماههای اول دچار تاخیر در تکامل، استفراغ، کاهش رشد و روشن شدن رنگ موی سر و صورت می شود. در صورت عدم درمان و پیشگیری بیمار به عقب افتادگی ذهنی، کوچکی دور سر و اختلالات رفتاری مبتلا می گردد.<sup>(۱-۳)</sup>

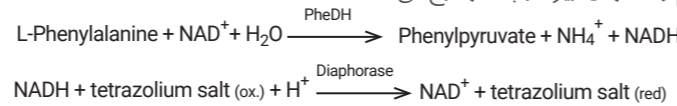
میزان بروز PKU در بین سفید پوستان ۱:۱۰۰۰۰ تولد زنده است. ولی بالاترین میزان بروز PKU در جهان از ایران و کشورهای همجوار گزارش شده است. به طوریکه میزان بروز آن در استانهای مختلف کشور ۱:۵۰۰۰ تا ۱:۸۰۰۰ تولد گزارش شده است. رواج گسترده ازدواجهای فامیلی نقش مهمی در این امر دارد.<sup>(۴-۶)</sup>

هر چند امکان درمان کامل در مورد PKU وجود ندارد ولی در صورت تشخیص زودرس و شروع تغذیه مخصوص این نارسائی از ابتدای نوزادی امکان پیشگیری از عوارض شدید آن میسر است.<sup>(۷)</sup> با تعیین کمی غلظت فنیل آلانین در خون خشک شده بر روی فیلتر کاغذی با استفاده از کیت دیازیست می توان با شناسایی و درمان به موقع نوزادان از بروز اختلالات ذهنی و جسمی مرتبط جلوگیری نمود.

اساس روش سنجش

مدت زمان انجام تست: ۶۰ دقیقه + ۶۰ دقیقه

طراحی کیت Neonatal PKU بر اساس روش کلریمتریک آنزیماتیک می باشد. در این روش ابتدا از لکه های خون خشک شده بر روی کاغذ فیلتر ۹۰۳ شرکت Schleicher & Schuell حاوی خون نوزادان، استانداردها و کنترلها دایره هایی به قطر ۵ میلی متر جدا کرده و درون چاهکها قرار می دهند. با افزودن بافر استخراج کننده و طی زمان انکوباسیون اول فنیل آلانین نمونه ها از لکه خون جدا می شود. محلول استخراج شده به چاهکهای جدید منتقل شده و بعد از خنثی سازی pH، آنزیم فنیل آلانین دهیدروژناز و سوبسترای آن اضافه می گردد. طی انکوباسیون دوم واکنشهای زیر در چاهکها رخ می دهند:



در واکنش دوم، نمک Tetrazolium احیا شده و رنگ آلبالویی تولید می گردد. شدت رنگ ایجاد شده که با غلظت فنیل آلانین ارتباط مستقیم دارد، در طول موج ۴۹۲ نانومتر (با دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر) اندازه گیری می گردد.

توجه و احتیاط

- این کیت تشخیصی به صورت *in vitro* قابل استفاده می باشد.
- کلیه محلول های کیت آماده مصرف هستند، فقط محلول واکنش قبل از استفاده نیاز به آماده سازی دارد.
- کلیه اجزای این کیت برای مصرف با اجزای هم سری ساخت کیت ارائه شده اند.
- توصیه می شود در هر تست استانداردها جهت رسم منحنی استفاده شوند. همچنین در صورتی که همزمان بیش از یک پلیت تست گذاشته شود، رسم منحنی برای هر پلیت ضروری است.
- کالیبره بودن ابزارها و دستگاهها در صحت نتایج اثر گذار است.
- جهت ساخت اجزای این کیت از مواد شیمیایی و زیستی استفاده شده است. لذا توصیه می شود هنگام کار از تماس مستقیم با مواد پرهیز شود.

محتویات کیت

اجزای تشکیل دهنده کیت ۹۶ تستی Neonatal PKU به شرح زیر می باشد:

| ردیف | نام اجزاء   | مقدار/تعداد             |
|------|---|-------------------------|
| ۱    | پلیت خام  | 2/96 wells              |
| ۲    | استانداردهای A-F (Standards A-F) برحسب (mg/dl) (mg/dl × 60.5= μmol/L) | 6 / 1 Dried blood spots |
| ۳    | کنترل پایین و بالا (Controls Low & High)                              | 2 / 1 Dried blood spots |
| ۴    | بافر استخراج کننده (Elution Buffer)                                   | 1/12 ml                 |
| ۵    | بافر خنثی کننده (Neutralizing Buffer)                                 | 1/6 ml                  |
| ۶    | محلول A (Reagent A)   | 1/0.3 ml                |
| ۷    | محلول B (Reagent B)   | 1/0.3 ml                |
| ۸    | بافر واکنش (Reagent Buffer)   | 1/12 ml                 |

شرایط نگهداری و پایداری

- کیت را در دمای ۸-۲ درجه سانتیگراد نگهداری کنید.
- پایداری کیت در دمای ۸-۲ درجه سانتیگراد، قبل از شروع استفاده (In Shelf) و حین استفاده (In use) بر مبنای استاندارد CLSI (EP25-A)<sup>(۸)</sup> بررسی گردید که نتایج به شرح زیر می باشد:

| قبل از شروع استفاده (In Shelf) | تا پایان تاریخ انقضا |
|--------------------------------|----------------------|
| حین استفاده (In use)           | تا ۶ ماه             |

جمع آوری و آماده سازی نمونه ها

سن مناسب جهت اندازه گیری میزان فنیل آلانین در نوزادان، ۵-۳ روزگی یعنی ۷۲-۱۲۰ ساعت پس از تولد می باشد.<sup>(۹)</sup> نمونه مناسب جهت انجام آزمایش خون تام جذب شده بر روی کاغذ فیلتر ۹۰۳ شرکت Schleicher & Schuell است که ترجیحا از پاشنه پای نوزاد گرفته می شود. نحوه نمونه گیری مطابق دستورالعمل کشوری<sup>(۹)</sup> و استاندارد NCCLSLA4-A4<sup>(۱۰)</sup> انجام می گیرد بدین ترتیب که ابتدا پاشنه پا را گرم کرده و بعد با الکل ۷۰ درصد تمیز نموده و اجازه دهید الکل روی پوست خشک شود. سپس در حالیکه پاشنه پا از سطح قلب نوزاد پایین تر است با لانسست ضربه ای یکنواخت و آرام در حاشیه کناری پاشنه پا وارد نمایید. قطره اول را با گاز استریل پاک نمایید. با ماساژ آرام که به پاشنه می دهید قطرات بعدی را روی کاغذ فیلتر ۹۰۳ بنشانید. خون جذب شده باید تمام دایره را از دو طرف بپوشاند - آنرا اشباع کند. به تعداد لازم نمونه گیری را انجام داده سپس کاغذ را به صورت افقی بر روی سطح تمیز قرار دهید. از تماس دست با دایره های کاغذ فیلتر قبل و بعد از خونگیری، خود داری شود. لازم است نمونه ها به مدت ۳ ساعت در مجاورت هوای تمیز در دمای ۱۵-۲۵ درجه سانتیگراد، دور از تابش مستقیم آفتاب خشک شوند. نمونه های خشک شده باید دور از رطوبت و در یخچال (دمای ۴ درجه سانتیگراد) نگهداری شوند.

مواد و وسایل لازم که همراه کیت عرضه نمی شوند

- دستگاه الیزا ریدر دارای فیلتر ۴۹۲ و ۶۳۰ نانومتر کالیبر شده
- سمپلرهای ۱۰۰، ۵۰ و ۲۵ میکرولیتر کالیبر شده
- سرسمپلرهای یکبار مصرف
- پانچر ۵ میلی متری
- شیکر

روش انجام تست

قبل از انجام تست:

- تمام مواد و نمونه ها را به دمای اتاق (۲۵-۲۰ درجه سانتیگراد) برسانید.
- برای تهیه محلول واکنش، به ازای هر رج ۱ میلی لیتر از بافر واکنش (Reagent Buffer) را با ۲۵ میکرولیتر محلول A و ۲۵ میکرولیتر محلول B مخلوط نمایید. این محلول تا ۱۰ دقیقه بعد از ساخت قابل استفاده می باشد.

خلاصه روش کار

پانچ ۵ میلی متری لکه های خون خشک شده از استاندارد، کنترل، نمونه نوزاد

افزودن ۱۰۰ μl بافر استخراج کننده

۶۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق (روی شیکر)

افزودن ۱۰۰ μl بافر خنثی کننده به چاهک جدید

انتقال ۵۰ μl محلول استخراج شده به چاهک جدید حاوی بافر خنثی کننده

افزودن ۱۰۰ μl محلول واکنش

۶۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق

خوانش میزان جذب نوری در طول موج ۴۹۲ نانومتر با دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر

منابع

1. Al Hafid N., John Christodoulou J. Phenylketonuria: A review of current and future treatments. Translational Pediatrics. 4: 4, 2015.
2. LIDKSY. A.S AND *et al.* The PKU locus in man is on chromosome 12. Am J Hum Genet. 36:527-533, 1984.
3. Wegberg A.V. and *et al.* The complete European guidelines on phenylketonuria: diagnosis and treatment. Orphanet Journal of Rare Diseases. 12:162-2017.
4. وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، معاونت سلامت، استانداردهای بالینی کنترل PKU ویژه متخصصین، سال ۱۳۸۹.
5. El-Metwally A. and *et al.* The Prevalence of Phenylketonuria in Arab Countries, Turkey, and Iran: A Systematic Review. BioMed Research International. 2018
6. P. Hardehid and *et al.* The Birth Prevalence of PKU in Populations of European, South Asian and Sub-Saharan African Ancestry Living in South East England. Annals of Human Genetics. 72, 65-71, 2008.
7. Bodamer O.A. Screening for Phenylketonuria. Ann Nestlé [Eng] 68:53-57, 2010.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of Stability of *In Vitro* Diagnostic Reagents; Approved Guideline – First Edition. NCCLS Document EP25-A. 2009.
9. دکتر فریده رضی، دکتر حمیدرضا کارونی، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، معاونت سلامت، استانداردهای تشخیص آزمایشگاهی در برنامه کنترل PKU ویژه آزمایشگاه، ویرایش اول.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Blood Collection on Filter Paper for Newborn Screening Programs; Approved Standard—Fourth Edition. NCCLS document LA4-A4, 2003.
11. Laposata M. Laboratory Medicine: The Diagnosis of Disease in the Clinical Laboratory. LANGE Basic Science. Second edition. Chap: Clinical Laboratory Reference Values .
12. وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، معاونت بهداشت و کنترل فینیل کتونوری (PKU) و سایر هیپر فینیل آلانینی ها (HPA). تجدید نظر دوم ۱۳۸۹.
13. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline. Second Edition. NCCLS Document EP5-A2. 2004.
14. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Establishing and Verifying an Extended Measuring Interval Through Specimen Dilution and Spiking. First Edition. EP34. 2018.

۲. **صحت:** به منظور بررسی صحت جواب های کیت PKU نوزادان دیازیست، نتایج بدست آمده با این کیت به دو روش زیر ارزیابی گردید:

روش **Colorimetric Enzymatic Assay**

غلظت فینیل آلانین ۸۱۲ نمونه خشک نوزاد با کیت دیازیست و کیت مرجع به روش Colorimetric Enzymatic Assay اندازه گیری شد. نتایج بدست آمده از مقایسه دو روش ضریب همبستگی خطی (۲) ۰/۹۷ را نشان می دهد. غلظت نمونه ها با کیت دیازیست بین ۰/۱۵ تا ۱۳/۱ و با روش مرجع ۰/۲ تا ۱۳/۹ mg/dl بود. نتایج مقایسه دو روش به شرح زیر است:

| روش               | تعداد نمونه | غلظت نمونه‌ها (mg/dl) | Intercept | Slope |
|-------------------|-------------|-----------------------|-----------|-------|
| Passing/Bablok    | ۸۱۲         | ۰/۲-۱۴                | -۰/۱۲     | ۱/۰۹  |
| Linear Regression | ۸۱۲         | ۰/۲-۱۴                | -۰/۰۴     | ۱/۰۳  |

روش **(HPLC) High Performance Liquid Chromatographic**

غلظت فینیل آلانین ۴۴ نمونه لکه خون خشک شده نوزاد سالم (n=۲۲) و مبتلا به فینیل کتونوریا (n=۲۲) با کیت دیازیست و کیت مرجع با روش HPLC اندازه گیری شد. نتایج بدست آمده از مقایسه دو روش ضریب همبستگی خطی (۲) ۰/۹۹ را نشان می دهد. غلظت نمونه ها با کیت دیازیست بین ۰/۶ تا ۴۰ و با روش مرجع ۰/۵ تا ۴۰ mg/dl بود. نتایج مقایسه دو روش به شرح زیر است:

| روش               | تعداد نمونه | غلظت نمونه‌ها (mg/dl) | Intercept | Slope |
|-------------------|-------------|-----------------------|-----------|-------|
| Passing/Bablok    | ۴۴          | ۰/۶-۴۰                | -۰/۰۱۲    | ۰/۹۹  |
| Linear Regression | ۴۴          | ۰/۵-۴۰                | -۰/۰۰۹    | ۰/۹۹  |

۳. **دقت:** شاخص دقت این کیت بر مبنای استاندارد CLSI (EP5-A2) (۱۳) ارزیابی گردیده است. بدین منظور میزان فینیل آلانین ۳ نمونه با غلظت‌های مختلف اندازه‌گیری و انحراف معیار و ضریب تغییرات محاسبه گردید که در جدول زیر آمده است:

| شماره نمونه | تعداد سنجش | میانگین غلظت (mg/dl) | Within Run |       | Total |       |
|-------------|------------|----------------------|------------|-------|-------|-------|
|             |            |                      | SD         | %CV   | SD    | %CV   |
| ۱           | ۶۰         | ۲/۰۸                 | ۰/۲۴       | ۱۱/۸۶ | ۰/۲۹  | ۱۴/۱۸ |
| ۲           | ۶۰         | ۴/۹۳                 | ۰/۳۲       | ۶/۴۴  | ۰/۳۶  | ۷/۳۹  |
| ۳           | ۶۰         | ۸/۷۴                 | ۰/۴۳       | ۴/۸۷  | ۰/۵۶  | ۶/۳۹  |

۴. **خطی بودن:** به منظور بررسی صحت اندازه‌گیری نمونه‌های با غلظت بالای ULQ (upper limit of quantitation) تست خطی بودن این کیت بر مبنای استاندارد CLSI (EP34) (۱۴) انجام گردید. بدین منظور نمونه خون سیتراته با غلظت ۲۱/۲ mg/dl با نمونه خون سیتراته با غلظت ۰/۸۱ mg/dl به صورت متوالی رقیق شد و روی کاغذ ۹۰۳ نمونه گذاری شد. سپس غلظت‌ها با کیت Neonatal PKU اندازه‌گیری گردید. درصد ریکآوری رقت که شاخص میزان دقت رقت‌گیری می باشد، طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$۱۰۰ \times \frac{\text{غلظت اندازه گیری شده (mg/dl)}}{\text{غلظت مورد انتظار (mg/dl)}}$$

(محدوده درصد ریکآوری بدست آمده بین ۹۴/۱ تا ۱۰۱/۴ است)

| رقت  | غلظت مورد انتظار (mg/dl) | غلظت اندازه گیری شده (mg/dl) | % ریکآوری |
|------|--------------------------|------------------------------|-----------|
| ۱:۲  | ۱۱/۰۰                    | ۱۱/۰۶                        | ۱۰۰/۵     |
| ۱:۴  | ۵/۹۰                     | ۵/۵۵                         | ۹۴/۱      |
| ۱:۸  | ۳/۳۵                     | ۳/۲۰                         | ۹۵/۵      |
| ۱:۱۶ | ۲/۰۸                     | ۲/۱۱                         | ۱۰۱/۴     |
| ۱:۳۲ | ۱/۴۴                     | ۱/۴۴                         | ۱۰۰/۰     |

کنترل کیفی

تست در صورتی تأیید می گردد که:

- جذب نوری استاندارد صفر کمتر از ۰/۰۵ باشد.
- جذب نوری استاندارد آخر بیش از ۰/۲۵ باشد.
- خوانش کنترل‌های پایین و بالای کیت در محدوده مورد قبول باشد.
- توصیه می‌گردد جهت حصول اطمینان از نتایج کیت، علاوه بر کنترل‌های ارائه شده در کیت، به صورت دوره‌ای از کنترل‌های دقت و صحت تجاری نیز استفاده گردد. بدیهی است نتایج بدست آمده بایستی در محدوده مورد قبول قرائت گردد.

تداخل‌ها و محدودیت‌ها

- نتایج بررسی اختصاصیت آنزیم فینیل آلانین دهیدروژناز سویه باسیلوس بادئوس (*Bacillus Badius*) نسبت به اسید آمینه‌های آروماتیک و آلیفاتیک به شرح زیر می باشد:

| ماده افزوده شده | درصد اختصاصیت |
|-----------------|---------------|
| L-Phenylalanine | ۱۰۰           |
| L-Tyrosine      | ۲/۲۵          |
| L-Methionine    | ۲             |
| Leucine         | ۳             |
| Isoleucine      | ۰/۲           |

- محدوده قابل اندازه‌گیری غلظت فینیل آلانین با این کیت، ۰/۱-۴۰ mg/dl می‌باشد.

مقادیر طبیعی

از بررسی غلظت فینیل آلانین ۸۱۲ نمونه لکه خون تام نوزاد، دامنه مقادیر طبیعی فینیل آلانین نوزادان تعیین شد. نتایج نشان داد که غلظت فینیل آلانین ۹۹٪ نوزادان کمتر از ۲/۶ با میانگین ۱/۳ mg/dl و انحراف معیار ۰/۶ می باشد.

بر اساس دستورالعمل کشوری حد تمایز (Cut Off) غلظت فینیل آلانین در آزمون غربالگری PKU برای نمونه های تهیه شده روی کاغذ فیلتر در هفته اول تولد ۴ mg/dl می باشد. نوزادانی که میزان فینیل آلانین آنها بیش از حد تمایز کشوری باشد جهت آزمایش‌های تاییدی فراخوان می شوند. تایید تشخیص نوزادان منوط به نتایج بدست آمده از اندازه گیری فینیل آلانین و تیروزین پلاسما به روش HPLC است. در صورتیکه:

- فینیل آلانین خون بیش از ۲۰ mg/dl
- تیروزین خون نرمال
- متابولیت‌های فینیل آلانین در ادرار افزایش یافته
- بیان تترآ هیدروبیوپترین (کوفاکتور فینیل آلانین هیدروکسیلاز) نرمال
- تشخیص فینیل کتونوری تأیید می گردد.<sup>(۱۲)</sup>

ویژگی‌های اختصاصی کیت

۱. **حساسیت:** حداقل غلظت قابل اندازه گیری فینیل آلانین که از استاندارد صفر قابل تمایز باشد را حساسیت گویند. این مقدار که بر اساس میانگین غلظت استاندارد صفر بعلاوه دو برابر انحراف معیار محاسبه گردیده است (بدست آمده از ۱۰ تست)، ۰/۱ mg/dl می‌باشد.

مراحل انجام تست :

۱. با پانچر مخصوص دایره هایی به قطر ۵ میلی متر از لکه های خشک شده خون استاندارد‌ها، کنترل‌ها و نوزادان جدا نموده و در چاهک مربوطه بیاندازید. سپس به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر بافر استخراج کننده اضافه نموده و پلیت را روی میز تکان دهید تا محتویات آن به خوبی مخلوط شوند.
۲. پلیت را ۶۰ دقیقه در دمای اتاق بر روی شیکر قرار دهید.
۳. به تعداد نمونه ها چاهک جدید در فریم چیده و به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر بافر خنثی کننده اضافه نمایید.
۴. از محلول استخراج شده ۵۰ میکرولیتر به حفره مربوطه حاوی بافر خنثی کننده بیافزاید.
۵. به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول واکنش اضافه نمایید.
۶. پلیت را ۶۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.
۷. میزان جذب نوری را در طول موج ۴۹۲ نانومتر با دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر بخوانید.

محاسبه نتایج

غلظت فینیل آلانین نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد (رسم به‌صورت دستی یا دستگاه الیزا ریدر) تعیین می‌گردد. در این منحنی جذب نوری استاندارد‌ها را در طول موج ۴۹۲ نانومتر بر روی محور عمودی (Y) و غلظت آن‌ها را بر حسب mg/dl بر روی محور افقی (X) مشخص کنید و بر اساس آن منحنی را رسم نمایید. با استفاده از منحنی ترسیم شده و جذب نوری بدست آمده از نمونه، غلظت فینیل آلانین آن قابل محاسبه می‌باشد. جدول و نمودار زیر به عنوان مثال ارائه شده است.

| نمونه       | جذب نوری | میانگین جذب نوری | غلظت فینیل آلانین (mg/dl) |
|-------------|----------|------------------|---------------------------|
| استاندارد A | ۰/۰۱۹    | ۰/۰۱۹            | ۰                         |
|             | ۰/۰۱۹    |                  |                           |
| استاندارد B | ۰/۰۴۸    | ۰/۰۴۵            | ۱                         |
|             | ۰/۰۴۲    |                  |                           |
| استاندارد C | ۰/۰۹۳    | ۰/۰۹۵            | ۴                         |
|             | ۰/۰۹۷    |                  |                           |
| استاندارد D | ۰/۱۷۲    | ۰/۱۷۳            | ۱۰                        |
|             | ۰/۱۷۵    |                  |                           |
| استاندارد E | ۰/۲۸۷    | ۰/۲۸۴            | ۲۰                        |
|             | ۰/۲۸۱    |                  |                           |
| استاندارد F | ۰/۵۲۲    | ۰/۵۱۶            | ۴۰                        |
|             | ۰/۵۱۰    |                  |                           |
| کنترل پایین | ۰/۰۴۴    | -                | ۰/۹۸                      |
| کنترل بالا  | ۰/۱۷۵    | -                | ۱۰/۱۵                     |
| لکه خون     | ۰/۰۴۵    | -                | ۱/۰۱                      |

