

Neonatal PKU

موارد استفاده:

تعیین کمی فنیل آلانین در خون خشک شده بر روی فیلتر کاغذ نوزادان

I. مقدمه

بیماری فنیل کتونوریا (PKU) نوعی اختلال متابولیک ارثی از نوع Autosomal Recessive است. در این بیماری، به علت کمبود یا فقدان آنزیم کیدی فنیل آلانین هیدروکسیلاز تبدیل فنیل آلانین به تیروزین انجام نمی‌شود و غلظت سرمی فنیل آلانین و دیگر مشتقات آن از قبیل فنیل پیروات، فنیل لاکتیک، فنیل استیک اسید و غیره افزایش می‌یابد^(۱). طبق آمار بین المللی از هر ۱۰۰۰۰ تا ۱۵۰۰۰ نوزاد به دنیا آمده یک مورد ابتلا به این نوع اختلال متابولیکی دیده می‌شود^(۲) که در صورت عدم درمان، منجر به عقب افتادگی ذهنی و دیگر ناهنجاریهای مرتبط با آن می‌گردد. نوزاد مبتلا به PKU در بدو تولد نشانه بارزی از بیماری ندارد ولی به تدریج علائمی مانند استفراغ، بی قراری، ضایعات پوستی، بوری موی سر و بدن، بوی کپک در عرق و ادرار و تاخیر در رشد و تکامل ظاهر می‌شود^(۳). با گذشت زمان کودک دچار عقب افتادگی ذهنی و جسمی می‌شود. این نوزادان در صورت شناسائی قبل از سومین هفته زندگی، با استفاده از رژیم‌های حاوی فنیل آلانین محدود می‌توانند زندگی طبیعی داشته باشند^(۴-۷) با توجه به فقدان علائم بالینی در بدو تولد و موثر بودن درمان، غربالگری و شناسائی به موقع این نوزادان بسیار حائز اهمیت است^(۸). با استفاده از کیت تعیین کمی فنیل آلانین پادتن علم در خون خشک شده بر روی فیلتر کاغذی، می‌توان با شناسایی و درمان به موقع این نوزادان از بروز اختلالات ذهنی و جسمی مرتبط جلوگیری به عمل آورد.

II. اصول اندازه‌گیری

کیت اندازه‌گیری فنیل آلانین پادتن علم بر مبنای سنجش واکنش آنزیماتیک طراحی شده است. بدین منظور ابتدا دایره‌هایی به قطر ۵ میلیمتر از خون خشک شده بر روی فیلتر کاغذی در داخل حفره‌های پلیت قرار داده سپس محلول استخراج کننده فنیل آلانین بر روی لکه‌های خونی اضافه می‌شود. بعد از طی زمان انکوباسیون محلول استخراج شده به حفره‌های پلی استیرن جدید منتقل می‌شود. به محلول انتقالی بعد از خنثی سازی pH، ترکیبی از فنیل آلانین دهیدروژناز (PDH) و سوبسترای آنزیم اضافه می‌شود. PDH ضمن احیای، NAD^+ فنیل آلانین موجود در محلول‌ها را به فنیل پیروات تبدیل می‌کند. واکنش $NADH$ با نمک TETRAZOLIUM باعث ایجاد رنگ آلبالویی می‌شود. شدت رنگ ایجاد شده با غلظت فنیل آلانین موجود در نمونه‌ها نسبت مستقیم دارد. شدت رنگ دهی با اسپکتروفتومتر مخصوص میکروپلیت در طول موج ۴۹۲ نانومتر با دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. برای تعیین غلظت فنیل آلانین نمونه‌ها ابتدا منحنی جذب نور استاندارد را برحسب غلظت فنیل آلانین آنها رسم و سپس غلظت فنیل آلانین نمونه از روی منحنی استاندارد تعیین می‌شود.

III. محتویات کیت:

محلول‌های این کیت (Cat.No.P-PKI) برای انجام ۹۶ تست در نظر گرفته شده و تاریخ انقضای هر یک بر روی شیشه آن درج شده است. دمای مناسب برای نگهداری کیت ۲-۸ درجه سانتی‌گراد است.

۱. پلیت: ۲ عدد پلیت ۹۶ حفره‌ای خام
۲. استانداردها: ۶ لکه خون خشک شده بر روی کاغذ صافی ۹۰۳ حاوی فنیل آلانین.
۳. کنترل‌ها: ۲ لکه خون خشک شده بر روی کاغذ صافی ۹۰۳ حاوی فنیل آلانین.
۴. بافر استخراج کننده (Elution buffer): ۱۲ میلی‌لیتر بافر ترخیص کننده اسیدی
۵. بافر خنثی کننده (Neutralizing Solution): ۶ میلی‌لیتر بافر خنثی کننده بازی
۶. محلول (Reagent A): ۰/۳ میلی‌لیتر محلول حاوی فنیل آلانین دهیدروژناز (PDH) و بافر PBS
۷. محلول (Reagent B): ۰/۳ میلی‌لیتر محلول حاوی NAD^+ و بافر PBS
۸. بافر واکنش (Reagent buffer): ۱۲ میلی‌لیتر بافر واکنش حاوی PBS, Tetrazolium و نگهدارنده

IV. وسایل مورد نیاز (این وسایل همراه کیت عرضه نمی‌شوند):

۱. دستگاه اسپکتروفتومتر میکروپلیت با دامنه جذب نوری ۳-۰ در طول موج ۴۹۲ نانومتر با دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر
۲. میکروپلیت ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ میکرولیتر و تیپ‌های یکبار مصرف
۳. پانچر ۵ میلیمتری
۴. شیکر

V. جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه‌ها:

نمونه مناسب برای اندازه‌گیری فنیل آلانین موجود در خون نوزاد ۲۴ تا ۷۲ ساعته، خون تام جذب شده بر روی کاغذ صافی ۹۰۳ شرکت Schleicher & Schuell است. نحوه نمونه‌گیری توصیه شده طبق گزارش LA₄-A₂, NCCLS به شرح زیر است:

- پاشنه پای نوزاد را با آب و صابون بشویید و خشک کنید. محل نمونه‌گیری با الکل ضدعفونی شود. Lancet را در پاشنه پا فرو برید، قطره اول را پاک کنید و قطره دوم خون را بر روی دایره نقش بسته بر روی کاغذ صافی ۹۰۳ بنشانید. خون جذب شده باید تمام دایره را بپوشاند. کاغذ را به صورت افقی بر روی سطح تمین قرار دهید تا در مجاورت هوا و دور از نور مستقیم آفتاب خشک شود. بعد از ۳ ساعت لکه‌های خونی خشک شده، با رطوبت‌گیر در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شود.^(۹)

VI. روش کار:

قبل از شروع کار باید دمای تمامی محلول‌ها به دمای اتاق برسد.

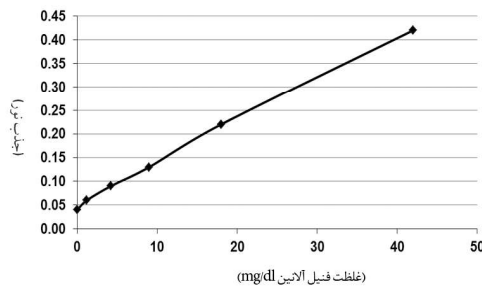
۱. ابتدا دایره‌هایی به قطر ۵ میلیمتر از لکه‌های خشک شده خون نوزادان، استاندارد‌ها و کنترل‌ها جدا کنید (با پانچر مخصوص) و در حفره‌ها بیاندازید.
۲. به هر حفره ۱۰۰ میکرولیتر بافر استخراج کننده (Elution buffer) اضافه کنید. سپس با تکان دادن پلیت، محتویات حفره‌ها را به مدت ۳۰ ثانیه مخلوط نمائید.
۳. پلیت را ۱ ساعت در دمای اتاق بر روی شیکر قرار دهید. (بدون پوشش)
۴. به تعداد نمونه‌ها حفره‌های پلی استیرن جدید را در فریم چیده و ۵۰ میکرولیتر بافر خنثی کننده (Neutralizing buffer) اضافه کنید.
۵. به حفره‌های حاوی بافر خنثی کننده ۵۰ میکرولیتر از بافر استخراج شده اضافه کنید.
۶. به هر حفره ۱۰۰ میکرولیتر محلول واکنش اضافه نمائید. برای تهیه این محلول به ازای هر رج ۱ میلی‌لیتر از بافر واکنش (Reagent buffer) را با ۲۵ میکرولیتر محلول A، ۲۵ میکرولیتر محلول B مخلوط نمائید. این محلول تا ۱۰ دقیقه بعد از ساخت قابل استفاده می‌باشد. توصیه می‌گردد محلول واکنش بعد از انتقال بافر استخراج شده تهیه شود.
۷. پلیت را یک ساعت در دمای اتاق و در تاریکی مطلق قرار دهید.
۸. میزان جذب نوری حفره‌ها را در طول موج ۴۹۲ نانومتر (با طول موج دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر) بخوانید.

VII. محاسبه نتایج:

پس از تعیین میزان جذب نوری استاندارد‌ها و نمونه‌ها و ترسیم منحنی، غلظت فنیل آلانین لکه‌های خون خشک شده قابل محاسبه می‌باشد. در این منحنی که با استفاده از دستگاه الیزا ریدر (قابل برنامه‌ریزی) و با به صورت دستی ترسیم می‌شود، محور Y شاخص میزان جذب نور استاندارد‌ها و محور X شاخص غلظت استاندارد‌های PKU برحسب mg/dl است. نتایجی که در جدول زیر آمده، فقط مثال است و نباید برای تعیین غلظت نمونه‌ها از آن استفاده شود.

غلظت فنیل آلانین (mg/dl)	جذب نور	نمونه
۰	۰/۰۴	استاندارد A
۱/۲	۰/۰۶	استاندارد B
۴/۲	۰/۰۹	استاندارد C
۹/۰	۰/۱۳	استاندارد D
۱۸/۰	۰/۲۲	استاندارد E
۴۲/۰	۰/۴۲	استاندارد F
۵/۹	۰/۱۰۷	لکه خونی

برای ترسیم منحنی از ارزش‌های مندرج بر روی برگه استاندارد‌ها استفاده کنید.



(غلظت فنیل آلانین mg/dl)

VIII. مقادیر طبیعی:

با استفاده از لکه های خون تام ۶۵۰ نوزاد سه تا پنج روزه، مقادیر طبیعی فنیل آلانین این نوزادان با کیت PKU پادتن علم بررسی گردید. طبق نتایج بدست آمده، غلظت فنیل آلانین ۹۹٪ از نوزادان کمتر از ۲mg/dl و با میانگین ۱/۴mg/dl است. توصیه می شود مراکز غربالگری بنا به دستورالعمل کشوری برای تفسیر نتایج خود ضمن در نظر گرفتن شرایط تولد نوزاد (سن ، وزن ، زودرس، دوقلو یا چند قلو بودن و...) غلظت ۴mg/dl را Cut off منظور فرمایند.

IX. ویژگی های اختصاصی تست:

۱. حساسیت: به حداقل غلظت فنیل آلانین که اختلاف جذب نور آن نسبت به جذب نور استاندارد صفر، معنی دار باشد حساسیت کیت گفته می شود. این مقدار برای کیت PKU پادتن علم mg/dl ۰/۱ است.

۲. اختصاصی بودن: اختصاصی بودن عملکرد آنزیم فنیل آلانین دهیدروژناز با اندازه گیری غلظت فنیل آلانین قبل و بعد از افزودن mg/dl ۱۰ از اسید آمینه های تیروزین، متیونین، لوسین و سیستئین بررسی شد. این اسید آمینه ها تداخل معنی داری در عملکرد این آنزیم ندارند.

۳. دقت: شاخص دقت کیت با مقایسه تکرار پذیری جواب ها به روش میان سنجی (Inter-assay) و درون سنجی (Intra-assay) تعیین شده است. برای این منظور ۳ نمونه ده بار در یک دوره آزمایش (درون سنجی) و یکبار در ده دوره آزمایش متفاوت (میان سنجی) تعیین غلظت شده است. نتایج انحراف معیار (SD) و ضریب تغییرات (CV) در جدول آمده است.

جدول شاخص دقت

میان سنجی			درون سنجی		
میانگین mg/dl	SD	%CV	میانگین mg/dl	SD	%CV
۴/۳	۰/۴	۸/۳	۵/۸	۰/۴	۶/۷
۸/۲	۰/۶	۷/۳	۸/۹	۰/۶	۶/۴
۱۴/۳	۰/۸	۵/۷	۱۴/۹	۰/۸	۵/۱

۴. صحت: برای بررسی صحت غلظت فنیل آلانین به دست آمده با کیت PKU نوزادان پادتن علم، غلظت فنیل آلانین تعدادی نمونه نرمال و غیر نرمال به روش Fluorometric اندازه گیری شد. تفاوت غلظت به دست آمده با دو روش در کلیه غلظت ها کمتر از ۱۰ درصد است.

۵. ریکاوری و رقت: ریکاوری به حالتی اطلاق می شود که با افزودن حجم معینی از یک محلول با غلظت بالا، به نمونه رقیق تر، افزایش غلظت حاصل شود. برای تعیین ریکاوری، چندین نمونه خون سیتراته با غلظت بالای فنیل آلانین به نمونه خون سیتراته که غلظت پائینی از فنیل آلانین دارد، افزوده شده است.

غلظت فنیل آلانین این نمونه ها پس از لکه گذاری بر روی کاغذ صافی ۹۰۳ شرکت Schleicher & Schuell اندازه گیری شد.

در صد ریکاوری طبق فرمول زیر محاسبه می شود:

$$\frac{\text{غلظت اندازه گیری شده (mg/dl)}}{\text{غلظت پیش بینی شده (mg/dl)}} \times 100$$

دامنه درصد ریکاوری بدست آمده از ۹۵ تا ۱۱۸/۴ است.

جدول ریکاوری

ریکاوری %	غلظت اندازه گیری شده mg/dl	غلظت پیش بینی شده mg/dl	غلظت افزوده شده mg/dl
-	۲/۷	-	-
۱۰۹/۴	۳/۵	۳/۲	۰/۵
۱۱۸/۴	۴/۵	۳/۸	۱/۱
۹۵	۵/۷	۶/۰	۳/۳

برای بررسی خطی بودن رقتهای فنیل آلانین بر روی منحنی چندین نمونه غلیظ، پس از رقیق شدن متوالی با استاندارد صفر، اندازه گیری شده و نتایج یک نمونه برای مثال در جدول زیر آورده شده است. دامنه درصد ریکاوری به دست آمده از ۹۱/۴ تا ۱۰۸/۶ است.

جدول رقت

ریکاوری %	غلظت اندازه گیری شده (mg/dl)	غلظت پیش بینی شده (mg/dl)	رقت
-	۲۷/۹	-	-
۹۳/۶	۱۳/۱	۱۴	۱:۲
۹۱/۴	۶/۴	۷/۰	۱:۴
۱۰۸/۶	۳/۸	۳/۵	۱:۸

X. References

- Armstrong MD., Shaw KNF and Robinson KS. Studies on phenylketonuria. II. The secretion of hydroxyphenyl-acetic acid in phenylketonuria. J. Biol. Chem. 213 ,797-804,1955.
- Berry, H.K., Screening Newborns for Genetic Disease.The PKU Model. Diagnostic Medicine 7(1):50,1984.
- Behrman, Richard E., Kliegman, Robert, Nelson, Waldo E., Karen Marodante, Jenson, Hal B. Nelson essentials of pediatrics. ISBN 1-4160-0159-X.Chapter 55, page 255, 2006.
- Wolf,L.I., Inherited Metabolic Disorders: Errors of Phenylalanine and tyrosine in serum.Adv.Clin.Chem.ed.by Sobotkaand Stewart .6pp.97-230, 1963.
- Hoffman, G.I. et.al.,Dual Channel Continuous Flow System for Determination of Phenylalanine and Galactose: Application to Newborn Screening.Clin Chem. 30(2):287,1984.
- Scriver, C.R., and Clow, C.L., Phenylketonuria: Epitome of Human Biochemical Genetics Part 1.N Engl J Med .303:1336,1980.
- Wešť, E.S. and Todd, W.R. Textbook of Biochemistry, 3rd ed.MacMillan,New York.1095-98,1964.
- Kirkman, H.N.,Carroll, C.L., Moore, EG., et al., Fifteen-Year Experience with Screening for Phenylketonuria with an Automated Fluorometric Method. Am J Hum Genet.34:743-752,1982.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards: Blood collection on filter paper for neonatal screening programs, approved standard, 3rd ed. NCCLS Document LA4-A3 .17:16,1997.

احتیاط!

با توجه به اینکه محلول های به کار رفته در این کیت ها حاوی مواد سمی مانند تیمروزال و مواد پروتئینی با منشأ انسانی و حیوانی هستند، و اینکه با هیچ تستی نمی توان از عدم وجود ویروس هایی چون HCV، HBV، HIV در این محلول ها اطمینان کامل حاصل کرد، خواهشمند است هنگام کار احتیاط های لازم از جمله استفاده از دستکش، امتناع از خوردن و آشامیدن و سیگار کشیدن، خودداری از پیچ کردن با دهان و پرهیز از هرگونه تماس محلول با چشم و دست ها، رعایت شود.