جمهوري اسلامي ايران
وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشكي
معاونت سلامت

استاندارد های تشخیص آزمایشگاهی در

برنامه کنترل (PKU)

ویژه آزمایشگاه

تدوین:فریده رضی

تجدید نظر اول:دکتر پروین سجادیان

مرکز مدیریت بیماریها

مقدمه:

تاریخچه شروع آزمایشهای غربالگری نوزادان در جهان به سال 1957 میلادی با تشخیص بیماری فنیل کتونوری (PKU) بر میگردد. اکثر کشورهای جهان تشخیص بسیاری از بیماریها را در برنامه غربالگری نوزادان خود قرار داده اند. آزمایشهای غربالگری نوزادان جهت تشخیص بیماریهائی که در بدو تولد از نظر کلینیکی قابل تشخیص نمی باشد و با تشخیص زود هنگام قابل درمان می باشد، انجام می پذیرد. با شروع آزمایشهای غربالگری نوزادان، عقب ماندگی ذهنی، مرگ و میر و جلوگیری از عوارض بیماریهای جدی نوزادان تحت پوشش کاملا مرتفع گردیده و جان بسیاری از نوزادان سراسر جهان با اهداء سلامتی نجات یافته است. یک نوزاد عقب مانده ذهنی علاوه بر تبعات عاطفی، انسانی و فرهنگی که جهت والدین خود رقم می زند هزینه بسیار گزافی را نیز بر جامعه تحمیل می نماید.

بیماری PKU یا فنیل کتونوری (Phenyl ketonuria)

PKU یک بیماری ژنتیک با الگوی آتوزومال مغلوب است که از هر دو والد یعنی پدر و مادر منتقل می شود. چون در ادرار مبتلایان به این بیماری موادی بنام فنیل کتون دفع می شود، به همین جهت بیماری را فنیل کتونوری نامیده اند.

فنیل آلانین یکی از اسید آمینه های ضروری است . پس از مصرف از طریق غذای روزانه مقداری از آن نیاز آنابولیک بدن را تامین نموده و مابقی توسط آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز (phenylalanine hydroxylase) تبدیل به تیروزین می شود. کمبود آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز یا کوفاکتور آن باعث تجمع اسید آمینه در بدن می گردد. فنیل آلانین بر روی سلولهای مغز تاثیر می گذارد و باعث عقب ماندگی ذهنی نوزاد می‌شود و بیماری PKU را سبب می گردد.

علل افزایش فنیل آلانین در خون

1- بیماری PKU :

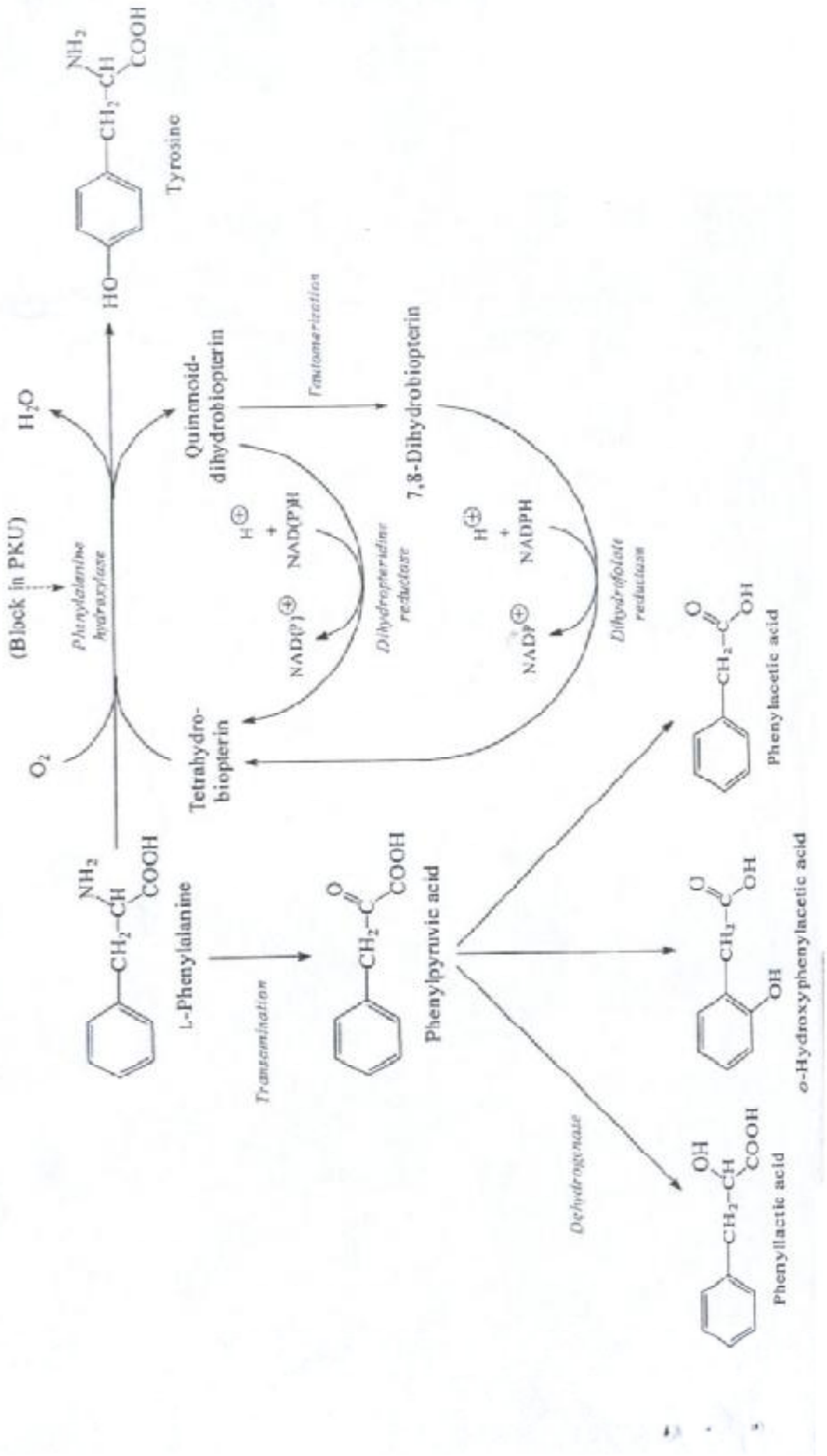
50 درصد از بیماران **PKU** دراین گروه قرار دارند و فعالیت آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز کاملا از بین رفته است . بنابراین تجمع فنیل آلانین در خون ، ادرار و مایع مغزی نخاعی بوجود می آید. در این گروه از بیماران **PKU** سطح سرمی فنیل آلانین از **20mg/dl** بالاتر خواهد بود. (سطح خونی فیزیولوژیک فنیل آلانین کمتر از **2mg/dl**[1] است) .

راه فرعی متابولیسم فنیل آلانین فعال شده و فنیل آلانین تبدیل به فنیل پیرویک اسید می شود که خود این ماده تبدیل به فنیل لاکتیک اسید ، فنیل استیک اسید و ارتوهیدروکسی فنیل استیک اسید می شود. تمام متابولیت های تولید شده از طریق کلیه ها پاک شده و در ادرار دفع می گردد. (شکل 1).

2- بیماری Mild PKU:

فعالیت آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز وجود داشته ولی میزان آن کمتر از حالت نرمال فیزیولوژیک است و میزان افزایش فنیل آلانین در خون به میزان نوع کلاسیک نبوده و سطح سرمی متغیری از فنیل آلانین گزارش شده است . در صورت عدم تشخیص به موقع درجات مختلفی از عقب ماندگی ذهنی با توجه به سطح سرمی فنیل آلانین بروز می نماید.

1- سطح پایینی فنیل آلانین به جهت تصحیح آزمایشگاهی با توجه به اینکه برای کنترل درمان نیز از روش کالریمتری و بر روی کاغذ صافی استفاده می شود، عملا" باید 3 در نظر گرفته شود.



شكل 1- متابوليسم فنيل آلانين

4- PKU بدخیم (BH4 deficient)

1 تا 3 درصد موارد افزایش فنیل آلانین بعلت کمبود ماده **Tetrahydrobiopterin** می باشد که کمبود آن در اثر نقصان در آنزیم **dihydropertidine reductase** یا نقص در یکی از مراحل آنزیمی که منجر به سنتز **biopterin** میشود گزارش گردیده است. **Tetrahydrobiopterin** بعنوان یک **Co enzyme** در هیدروکسیلاسیون **Tryptophan** و **Tyrosin** عمل نموده که محصول این واکنشها تولید پیش نیاز انتقال دهنده های عصبی شامل **Serotonin** ، **Dopamin** و **Norepinephrine** را می نماید. پس کمبود این آنزیم باعث بروز بیماریهای پیشرونده عصبی بسیار شدید می شود. رژیم غذایی بدون فنیل آلانین در خصوص این بیماران کمک کننده نمی باشد ولی با تجویز پیش نیاز انتقال دهنده های عصبی بهبودی بطور نسبی ایجاد می شود.

نشانه های بیماری PKU

این بیماری در بدو تولد هیچگونه نشانه ای ندارد و نوزاد تا 3-2 ماه اول زندگی ظاهراً سالم بنظر می رسد. در عین حال ظهور علائمی همچون عدم تمایل نوزاد به خوردن شیر، استفراغ بعد از خوردن شیر (که ممکن است به اشتباه تنگی در ناحیه پیلور تشخیص داده شود) بروز اگزما، جوش در سطح بدن و بور شدن موهای بدن و رنگ چشمهای آبی بدون سابقه در فامیل (بعلت مهار رقابتی با آنزیم **Tyrosinase**) وجود دارد. معمولا عرق و ادرار این نوزادان بوی زننده و بسیار نامطبوع دارد. این کودکان با علائم عقب ماندگی ذهنی، اغلب نا آرام و پرجنب و جوش بوده و بیش فعال هستند. قدرت تکلم ضعیف و راه رفتن دچار اختلال است.

بیماران **PKU** اگر درمان نشوند تا پایان سال اول بعد از تولد 50 نمره از ضریب هوشی خود را از دست می دهند و اگر تشخیص بعد از سال اول اتفاق افتد عقب ماندگی ذهنی شدید را به همراه دارد. دیگر علائم بیماری، کوچکی سر، آرواره برجسته و دندانهای کاملا جدا از هم است. حدود یک چهارم بیماران دارای صرع هستند و بیش از 50 درصد اطفال دارای طرح نوار مغز (**EEG**) غیر طبیعی می باشند. تظاهرات بالینی بیماری تا 6-5 ماهگی بسیار گمراه کننده است. متاسفانه

تشخیص آن وقتی عملی می گردد که عقب ماندگی ذهنی کودک مسلم شده است و در واقع وجود بیماری با شروع معلولیت تشخیص داده می شود. بنابراین تنها و بهترین راه تشخیص این بیماری، اندازه گیری غلظت فنیل آلانین خون نوزاد در بین روزهای 5-3 بعد از تولد است. تشخیص بیماری از هفته دوم به بعد ممکن است به ضایعه مغزی با درجات مختلف غیر قابل برگشت منتهی شود.

روند انجام نمونه گیری :

خونگیری در فاصله 3 تا 5 روز بعد از تولدو بر اساس روش استانداردی که توسط کمیته ملی استاندارد آزمایشگاههای بالینی (*)CLSI ارائه شده است ، انجام میشود .

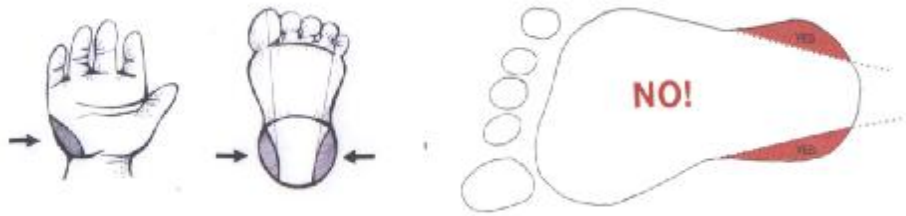
1- *پر کردن فرم نمونه گیری :* فرم مخصوص نمونه گیری باید ابتدا و قبل از نمونه گیری بطور کامل و با جزئیات درج شده تکمیل شود. مشخصات لازم دقیق و خوانا روی فرم مخصوص نمونه گیری با خودکار تکمیل گردد. فرم نمونه گیری باید روی سطح صاف تکمیل شود. قبل از شروع نمونه گیری شماره های پرسشنامه و کارت خونی را تطبیق داده و از یکسان بودن آنها مطمئن شوید . اطمینان از یکسان بودن شماره ها بسیار مهم است .

2- آماده کردن نوزاد:

نوزاد را بر روی تخت نمونه گیری مخصوص (ویا در آغوش مادر نمونه گیری شود) قرار دهید برای جلوگیری از آلودگی و سرماخوردگی نوزاد فقط پای او را لخت نمائید . محل خونگیری پاشنه پای نوزاد است. (شکل2). محل خونگیری می بایست از سطح قلب پائین تر باشد . نوزاد با شیب 10 درجه خوابانده شود. (تخت مخصوص نمونه گیری دارای شیب مناسب است و نیازی به تنظیم شیب نمی باشد). در صورت داشتن اسکار، بریدگی، تورم وراش از نمونه گیری از پاشنه پا خوداری گردد پاشنه پا را با یک گاز یا حوله ولرم به مدت 3 دقیقه گرم کنید تا جریان خون در محل افزایش یابد (حرار ت 41-40 درجه سانتیگراد باعث افزایش جریان خون در موضع می شود). دستهایتان را خوب شسته و دستکشدست کنید . محل لانست در پاشنه پا و

اطراف آن را با الکل ایزوپروپانول 70% ویا با پد الکل به خوبی پاک نموده و صبر کنید تا در جریان هوا خشک شود (الکل باقی مانده روی پوست نمونه را تحت تاثیر قرار داده و بر نتایج آزمایش اثر می گذارد. الکل باعث همولیز گلبول های قرمز می شود و در اطراف نمونه بر روی کاغذ فیلتر حلقه سرمی ظاهر می گردد) .

* CLSI Clinical and Laboratory standards Institute



شکل 2- محل لانست زدن

3- نمونه گیری از نوزاد:

با استفاده از دستکش استریل یکبار مصرف و به کمک یک لانست که طول سوزن آن حداکثر از 2/4میلی متر تجاوز نکندضربه یکنواخت و آرامی به پاشنه پا (شکل 2) وارد نمائید تا خون به راحتی جاری شود. (در نوزادان پره مچور برای جلوگیری از آسیب به استخوان، تاندون و عصب‌عمق پانچ نباید بیشتر از 2 میلی متر باشد)به هر دلیلی که امکان خونگیری از پاشنه پا وجود نداشته باشد، از نرمه کناری دستخون گیری انجام شود. (شکل 2). حاشیه کناری پاشنه پاو نرمه دست مطمئن ترین محل است (شکل 2) .(.در بالغین ازانگشت و بچه های بزرگتر از یکسال معمولاً از نرمه دست استفاده می گردد)به بخش عقبی پاشنه پا ضربه نزنید زیرا استخوان خیلی به پوست نزدیک استقطره اول خون را با گاز استریل تمیز کرده (چون حاوی مایعات نسجی است وباعث رقت خون می گردد وبقایای الکل نیز باعث همولیز گلبول های قرمز می شود)) و سپس با فشارهای متناوب و مختصری که به پاشنه پا وارد می شود قطره بزرگی شکل می گیرد . کارت نمونه گیری را به خون نزدیک کرده تا خود بخود جذب مرکز دایره فیلتر

شده و پشت و روی آن را به صورت یکنواخت بپوشاند و آن را اشباع کند. با یک تکنیک صحیح می توان (5دایره)نمونه روی کاغذ فیلتر را به نمونه ذکر شده تهیه کرد.در صورتیکه از محل لانست زده نمونه گیری انجام نشد ، از زدن لانست مجدد در همان محل اکیدا خودداری و محل مناسب دیگری جهت خونگیری انتخاب شود .

8-در صورت نیاز به نمونه گیری مجدد ، از محل دیگر، با استفاده ازست جدید نمونه گیری (شامل: لانست استریل، پنبه، الکل و گاز استریل) الزامی است .

-ازکارت واتمن ۹۰۳ داراي نام توليد كننده، **شماره ساخت وتاریخ انقضاء و مورد تایید وزارت بهداشت ودرمان استفاده شود.**

-جمع آوری خون بوسیله سرنگ از ورید و انتقال قطره خون بر روی فیلتر پیپر برای غربالگری نوزادان نباید استفاده گرددولی بعنوان روش الترناتیو قابل قبول است .

4-مراقبت از زخم :

بعد از نمونه گیری، پا را بالای سطح بدن نگه دارید. به مدت 5 دقیقه گاز استریل را روی محل خونگیری قرار داده و با دست فشار دهید. سپس می توان با استفاده از چسب مخصوص ضد حساسیت بر روی محل نمونه‌گیری نوزاد را ترخیص نمود .

لانست و تمام وسایل استفاده شده به شکل بهداشتی معدوم شوند .

5- ***نکات مهم در نمونه گیری:***

1. **جهت نمونه گیری نیاز به ناشتا بودن نوزاد نمی باشد**
2. **هیچ گونه آمادگی خاصی به جز موارد ذکر شده برای انجام آزمایش لازم نیست.**
3. **مشخصات نوزاد روی کاغذ فیلتر نمونه گیری صرفا توسط خودکار نوشته شود. استفاده از روان نویس، خودنویس و مداد و.... ممنوع است.**
4. **فیلتر نمونه گیری به هیچ عنوان آغشته به مواد خارجی نگردد.**
5. **از تماس دست حتی با دستکش بر سطوح دوایر خونی جدا خودداری شود .**

6. **در هنگام خونگیری هیچ تاخوردگی و خراش یا پارگی بر روی کاغذ فیلتر نمونه گیری بوجود نیاید.**
7. **از پذیرش نمونه های تهیه شده خارج از سیستم برنامه غربالگری خودداری شود.**

ویژگی های نمونه مناسب :

1- شکل نمونه باید بصورت دایره باشد.

2- قطر لکه خون بیش از 5 میلی متر باشد.

3- لکه خون از دو طرف همسان دیده شود.

4- دو لکه روی هم نباشد.

5- در یک دایره بیش از یک لکه نباشد .

6- کاغذ فیلتر نمونه گیری آغشته به مواد خارجی نباشد.

7- لکه های خون بدون اثر انگشت باشند .

- درصورت نداشتن *ویژگی های فوق*، آزمایشگاه باید نمونه دیگری درخواست کند.

7- شرایط نگهداری نمونه:

1-بعد از تهیه نمونه، کارت نمونه گیری حاوی خون نوزاد را به صورت افقی روی راک مسطح مخصوص قرار دهید.

2- تقریبا 3 ساعت وقت لازم است تا لکه های خون در حرارت اتاق (25-15 درجه سانتی گراد) کاملا خشک شود.

3 -در زمان خشک شدن از قرار دادن کارت های خونی در جریان هوای آلوده به دود و گردوغبار جداً خودداری شود

4- از گذاشتن کارت های خونی در معرض حرارت و تابش مستقیم نور خورشید اکیدا پرهیز شود.

5- کارت های نمونه گیری می بایست بدون چروک و یا تاخوردگی باشند .

6- هر یک از نمونه های کاملاً خشک شده را را جداگانه و به ضمیمه فرم مشخصات نوزاد در پاکت مجزا قرار دهید.

7- احتیاط کنید که خون یک نمونه با خون نمونه دیگر در تماس نباشد.

8- باید جابجائی و حمل و نقل نمونه های خون به آزمایشگاه بدون فشار به فیلتر پیپروایجاد آسیب در آن وانتقال نمونه ها در حدود 24 ساعت بعد از گرفتن نمونه انجام گیرد

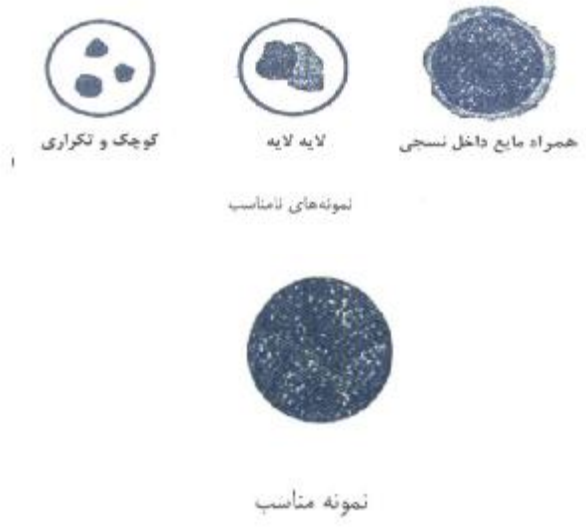
9-مواد شیمیایی وانواع دیگر نمونه ها نباید در ظرف حمل کارتهای خونی بسته بندی شوند

10-کارت های خونی را می توان به مدت یک هفته در پاکت های مقاوم به رطوبت در درجه حرارت اطاق نگهداری نمود.

11-کارت های حاوی لکه های خوندر پاکت های پلاستیکی زیپ دار و حاوی سیلیکاژن در حرارت (4)درجه یخچال و میزان رطوبت کمتر از 30درصد تا (2سال) و در فریزر منهای 20 درجه سانتی گراد به مدت طولانی(بیش از 2 سال) پایدار می مانددرمناطقی با رطوبت بیشتر از 30 درصد بعلت اثر نامساعد رطوبت بر میزان جذب نوری حتماً در انتقال نمونه ها ونگهداری آنها باید رطوبت **محیط** توسط **کارتهای معرف** کنترل گردد.**چراکه رطوبت بر روی پایداری نمونه ها نقش تعیین کننده دارد نمونه های اخذ شده در اسرع وقت به آزمایشگاه غربالگری مرجع در مرکز استان ارسال شوند.**

در صورت عدم امکان ارسال سریع نمونه، آن را در یخچال نگهداری کنید و در اولین فرصت ارسال شود.

شکل 3



☆ **نکتهٔ 1:**

در صورتیکه آزمایشگاه بیمارستان منتخب قادر به انجام ازمایشات کنترل درمان نباشد، بهتر است نمونه های خون روی کاغذ فیلتر به آزمایشگاه غربالگری استان ارسال گردد ودر ان جا آزمایش انجام گردد، پاسخ آزمایشات نمونه های ارسالی از بیمارستان منتخب مراکز استان (بر روی کاغذ صافی) باید تلفنی و در زمان مقرر، توسط آزمایشگاه غربالگری مرکز استان به اطلاع آزمایشگاه بیمارستان منتخب رسانده شود. این آزمایشات در دفاتر هر دو آزمایشگاه ثبت می شود. بیمار هنگام مراجعه برای بررسی بالینی، جواب آزمایش را از آزمایشگاه اخذ می نماید. پزشک متخصص درمانگاه نتیجه آزمایش را بعد از بررسی در پرونده بالینی در محل مربوطه ثبت می نماید. جواب مکتوب آزمایشات به صورت دوره ای و یک جا ارسال و تحویل بیماران می گردد.

☆ **نکتهٔ 2:**

نمونهٔ خون نوزادان برای آزمایش غربالگری به آزمایشگاه غربالگری در مرکز استان ارسال می شود. پاسخ مثبت آزمایشات غربالگری تلفنی و بسیار فوری به مرکز بهداشت شهرستان مربوطه، توسط آزمایشگاه غربالگری اعلام می شود. نتیجه آزمایشات در دفتر آزمایشگاه مرجع غربالگری و در دفتر مرکز بهداشت شهرستان ثبت می شود. مرکز بهداشت شهرستان از

طریق مرکز بهداشتی- درمانی پوشش دهنده محل سکونت نوزاد، وی را برای آزمایش تائید (به روش HPLC) فرا می خواند. جواب های مثبت آزمایشات به این روش، به طریق فوق اعلام می شوند. جواب مکتوب همهٔ آزمایشات اعم از مثبت یا منفی به صورت دوره ای پانزدهم و آخر هر ماه و یک جا ارسال و تحویل بیماران می شود.

روشهای آزمایشگاهی اندازه گیری فنیل آلانین

فنیل آلانین مانند سایر اسیدهای آمینه به روشهای کیفی، نیمه کمی و کمی قابل اندازه گیری است. روشهای مختلف کروماتوگرافی، اسپکتروفتومتری، فلوریمتری، **tandem mass spectrometry** ، **Guthri** وفتومتری (مانندکلرید فریک برای ا ندازه گیری فنیل پیروویک) عمده ترین روشهای اندازه گیری فنیل آلانین می باشند.

1- روشهای کروماتوگرافی:

Thin layer chromatography، **Ione exchange chromatography**، **HPLC** و **Gas liquid chromatography** متداولترین روشهای کروماتوگرافیک اندازه گیری فنیل آلانین هستند. ازبین 3 روش آخر که نتایج را بصورت کمی بیان می‌نمایند، **HPLC** با توجه به حساسیت عالی، قدرت تفکیک مناسب و زمان کوتاه آنالیز بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. کالیبرواسیون و کنترل کیفی در اخذ جواب صحیح و دقیق از این روش اهمیت ویژه ای دارد.

2- فلوریمتری :

فنیل آلانین در حضور **L-lecyle-L-alanine** با نین هیدرین تبدیل به یک ترکیب فلورسنت می‌شود که میزان آن با غلظت فنیل آلانین رابطه مستقیم دارد.راژین قلیایی تارتارات مس برای پایدار کردن محصول فلورسنت بکار می‌رود. این روش یکی از متداولترین روشهای غربالگری در ایالات متحده است.

3-Tandem mass spectrometry:

در این روش دو یا بیشتر **mass analyzer** پشت سر هم قرار می گیرند. ابتدا ترکیب مورد نظر یونیزه شده واز این طریق از سایر مواد جدا می‌شود. در مرحله بعد در برخورد با یک گاز خنثی، به حالت کلوئید درآمده و توسط اسپکترومتر بعدی خوانش می‌شود. این روش از حساسیت، اختصاصیت، صحت و دقت بالایی برخوردار بوده، موارد مثبت و منفی کاذب کمی دارد. از آنجاییکه به فن آوری و تسلط فنی ویژه نیاز دارد و انجام آن هزینه بالایی نیز دارد در مواردی که امکان انتقال فن آوری و غربالگری چندین بیماری در جمعیت وسیع بطور همزمان وجود دارد مقرون به صرفه می باشد.

Guthri test-4

تست گاتری یک روش نیمه کمی میکروبیولوژیک است که از باسیلهای اسپوردار خصوصا **Bacilus subtilis** استفاده می‌نماید. باسیلها در آگاری که حاوی یک ماده مهارکننده رشد باکتری (مهارکننده اغلب ساختمان مولکولی مشابه با اسید آمینه مورد نظردارد) است، تلقیح می‌شوند. نمونه روی آگار قرار گرفته وپلیت انکوبه می‌شود. بعد از مدت مشخص پلیت از نظر رشد باکتری بررسی می‌شود. درصورت وجود مقادیر بالایی از اسیدآمینه موردنظر، فعالیت ماده مهارکننده کاهش یافته و رشد باکتری مشاهده می‌گردد. سیستم طوری طراحی می‌شود که مقادیر غیرطبیعی اسید آمینه را شناسایی نماید.

5- اسپکتروفتومتری

در روشهای اسپکتروفتومتری، فنیل آلانین تحت تاثیر آنزیم مشخص به محصولی تبدیل می‌گردد که این محصول با استفاده از اسپکتروفتومتر قابل سنجش است.

6- آزمایش کلرید فریک

ازکلرید فریک برای شناسایی فنیل پیرویک در ادرار استفاده می‌شود. ولی از آنجاییکه تا مقدارفنیل آلانین خون به**mg/dL** 15-12 نرسد، فنیل پیرویک به مقدار قابل سنجش در این روش

نمی‌رسد، برای مقاصد غربالگری استفاده نمی‌شود. از این روش برای کنترل درمان بیماران ، استفاده می شود.

مقایسه روشها:

هر یک از روشهای فوق الذکر بسته به شرایط می توانند برای مقاصد غربالگری، تایید تشخیص وپیگیری درمان مورد استفاده قرار گیرند. خوشبختانه هماهنگی روشهای مختلف، در مطالعات بسیاری به اثبات رسیده است. یکی ازبهترین این بررسی ها، نتایجی است که از برنامه کنترل کیفی خارجی CDC بدست می‌آید.

برای اجرای این برنامه، نمونه‌هایی با غلظت مشخص فنیل‌آلانین برروی فیلتر کاغذی تهیه و بصورت مجهول برای آزمایشگاهها ارسال می شود. سپس براساس روش اندازه‌گیری، نتایج تقسیم بندی شده، سپس میانگین و پراکندگی برحسب انحراف معیار (درون هر آزمایشگاه و بین آزمایشگاههایی که از روش مشابه استفاده می‌نمایند) محاسبه می‌شود. میانگین هرروش با مقدار مورد انتظار مقایسه شده و نتیجه هر آزمایشگاه درمقایسه با مقدار مورد انتظار اعلام می‌شود.

جداول زیر قسمتی از گزارش عملکرد آزمایشگاهها در اندازه‌گیری فنیل آلانین در خون تام در سال 2006 می باشد که توسط CDC گزارش شده است و از طریق سایت اینترنتی آن قابل دستیابی است. همانطور که مشاهده می گردد، میانگین نتایج (ستون سوم) تقریبا همخوان می باشند.

Method	N	Mean	Average Within Lab SD	Total SD	Y-Intercept*	Slope
Lot 427 - Enriched 7 mg/dL whole blood						
Bacterial Inhibition Assays	137	8.3	1.0	1.1	1.4	1.0
Fluorometric Manual	207	8.8	0.7	1.1	1.4	1.1
Fluor Cont Flo, In house	60	10.2	0.8	2.0	1.5	1.3
Fluor cont Flo, Kit	237	8.9	0.7	1.2	1.5	1.1
Colorimetric	167	10.0	0.8	1.0	1.3	1.3
PerkinElmer Neonatal Kit	525	7.9	0.8	1.3	1.2	1.0
Neo-Genesis (Neomet) Accuwell	78	8.9	0.7	0.8	1.4	1.1
Bio-Rad Quantase	208	8.7	0.8	1.1	1.3	1.1
MP Biomedicals (ICN) Enzyme	39	8.1	0.8	0.9	1.1	1.1
Interscientific Enzyme	98	8.2	1.0	1.0	1.2	1.0
Thin-Layer Chromatography	20	6.4	0.6	3.3	1.3	0.8
HPLC	106	8.3	0.8	1.0	1.1	1.0
Derivatized-MS/MS Non-Kit	974	8.1	0.9	1.2	1.2	1.0
Non-derivatized MS/MS Non-Kit	137	9.2	0.9	1.3	1.3	1.1
Deriv-MS/MS PE NeoGram	278	7.9	0.8	1.0	1.2	1.0
Non-deriv-MS/MS PE NeoGram	30	8.5	0.6	0.8	1.1	1.1
Other	79	9.3	1.0	1.1	1.8	1.1

جدول 1

Lot 428 - Enriched 11 mg/dL whole blood						
Bacterial Inhibition Assays	137	12.3	1.4	1.6	1.4	1.0
Fluorometric Manual	191	13.3	1.2	1.8	1.4	1.1
Fluor Cont Flo, In house	60	15.8	1.3	3.0	1.5	1.3
Fluor cont Flo, Kit	237	13.3	1.1	2.0	1.5	1.1
Colorimetric	151	15.5	1.0	1.2	1.3	1.3
PerkinElmer Neonatal Kit	510	12.0	1.2	2.0	1.2	1.0
Neo-Genesis (Neomet) Accuwell	72	13.7	1.3	1.3	1.4	1.1
Bio-Rad Quantase	204	13.1	1.4	1.7	1.3	1.1
MP Biomedicals (ICN) Enzyme	48	13.0	1.0	1.6	1.1	1.1
Interscientific Enzyme	100	12.6	1.4	1.5	1.2	1.0
Thin-Layer Chromatography	20	10.7	0.6	2.7	1.3	0.8
HPLC	116	12.5	1.0	1.7	1.1	1.0
Derivatized-MS/MS Non-Kit	975	12.5	1.4	1.9	1.2	1.0
Non-derivatized MS/MS Non-Kit	139	13.7	1.7	2.3	1.3	1.1
Deriv-MS/MS PE NeoGram	277	12.0	1.3	1.5	1.2	1.0
Non-deriv-MS/MS PE NeoGram	28	12.9	0.7	0.8	1.1	1.1
Other	79	14.3	1.8	2.2	1.8	1.1

جدول2

انتخاب روش آزمایشگاهی غربالگری، تایید و کنترل درمان در برنامه کشوری غربـالگری فنیـل کتون اوری در ایران

1-غربالگری

درکشورهای مختلف روش مورد استفاده برای غربالگری نوزادان برای بیماری **PKU** متفاوت می باشد. بعنوان مثال در آمریکا شایعترین روشهای مورد استفاده **Guthri** ، فلوریمتری و **Tandem mass spectrometry** می‌باشد (6).

روش اسپکتروفتومتری در بسیاری از مطالعات بعنوان روشی مناسب وقابل دستیابی برای غربالگری معرفی شده است. همچنین همخوانی این روش با سایر روشهای رایج مانند فلوریمتری و **HPLC** بررسی وبه تایید رسیده است.(5و7).

در ایران باتوجه به همخوانی روشهای مختلف اندازه گیری فنیل آلانین و نیز با درنظر گرفتن امکانات کشور، روش اسپکتروفتومتری به عنوان روش غربالگری در کشور انتخاب شده است.

در این روش فنیل آلانین از لکه خون روی فیلتر کاغذی استخراج شده و تحت تاثیر آنزیم فنیل‌آلانین دهیدروژناز قرار می گیرد. واکنش باعث احیای **NAD** موجود در محیط به **NADH** می‌گردد که خود این محصول باعث احیای اندیکاتورشده و رنگ صورتی مایل به قرمز ایجاد می کند. رنگ ایجاد شده که با غلظت فنیل آلانین رابطه مستقیم دارد، در طول موج 490 نانومترخوانش شده و نتیجه در مقایسه با منحنی حاصله از کالیبراتورها، محاسبه می‌شود.

<u>خلاصه مراحل انجام آزمایش غربالگری</u>

نمونه مورد نیاز : خون تام مویرگی گرفته شده برروی کاغذ فیلتر S&S903
کیت وابزار مورد نیاز : الایزا ریدر
شیکر الیزا
بن ماری
سمپلر
سایر موارد مندرج در دستورالعمل کیت
کیت مورد تایید طرح
متدآزمایش : اسپکتروفتومتری
روش انجام آزمایش : روش انجام آزمایش مطابق دستورالعمل کیت
Cut off : 4 **mg/dl**

2- تایید موارد مثبت غربالگری:

به منظور تایید تست مثبت غربالگری، نوزاد باید 4 ساعت ناشتا باشد.

در مراکزی که دسترسی به HPLC دارند، ، باید حداقل به مدت 6-4 ساعت ناشتا باشد.نمونه وریدی درلوله حاوی ضد انعقاد هپارین گرفته شده وپلاسمای حاصله با استفاده از روش HPLC آزمایش می شود..

جداسازی پلاسما از خون تام باید حداکثردر مدت یک ساعت انجام گردد واگر تا زمان انجام آزمایش مدت زیادی بیش از 24 ساعت طول می کشد نمونه ها فریز گرددواین نمونه به مدت یک هفته در منهای 20درجه سانتی گراد و 2ماه در منهای 70درجه پایدار است مقدار Cut off برای پلاسما، mg/dl 4 است.

در مراکزی که دسترسی به HPLC ندارند، نمونه بر روی کاغذ فیلتر تهیه گردد و با توجه به به فرایندهای استخراج که به فرایندهای آزمایش اضافه شده است ضروری است مواردی که فنیل آلانین ان ها مساوی و بالاتر از 3/5 (phe≥3/5)باشد، به بیمارستان منتخب ارجاع شوند.

واحد وزن در سیستم SI (system Internationale) مول است برای تبدیل میلی گرم در دسی لیتر به میکرو مول کافی است از فرمول زیر استفاده گردد

<u>خلاصه مراحل انجام آزمایش تایید</u>

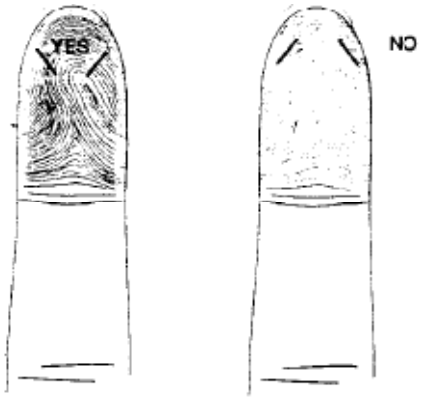
نمونه مورد نیاز : پلاسمای بدست آمده ازخون تام هپارینه
کیت وابزار مورد نیاز : دستگاه HPLC
سمپلر
کنترل و کالیبراتور
سایرموارد لازم براساسSOP
متدآزمایش : High Performance Liquid Chromatography
Cut off : 4 mg/dl

3- آزمایشات کنترل در طول درمان

اندازه‌گیری مرتب سطح خونی فنیل آلانین پس از تشخیص اولیه و شروع رژیم غذایی از الزامات پیگیری موفق است. فواصل اندازه‌گیری در سنین مختلف در بخش استانداردهای درمان آمده است.

برای پیگیری درمان باز هم از روش اسپکتروفتومتری استفاده می شود

. نمونه مورد استفاده در این مرحله نمونه لکه خون است که بسته به سن بیمار از پاشنه پا، کنار دست یا نوک انگشت بدست می‌آید. و بر روی کاغذ صافی به روشی که ذکر شد قرار گرفته، آماده و به آزمایشگاه بیمارستان منتخب مرکز استان ارسال می شود. درصورتیکه سن بیمار کمتراز یکسال باشد، نمونه از پاشنه پا یا نرمه کناری دست (شکل 5) ودر سنین بالاتر از سطح پالمار فالانکس دیستال انگشت میانی و یا انگشت چهارم مطابق شکل زیرگرفته می‌شود. از کناره های انگشت و نوک آن و همچنین سایر انگشتان نباید خونگیری شود.



شکل5

روش کلی نمونه گیری مشابه با نمونه گیری از پاشنه پا بوده و تمامی مراحل مندرج در بخش نمونه گیری باید انجام شود.

تضمین کیفیت در آزمایشگاه غربالگری فنیل کتون اوری :

اغلب بیماریهایی که در نوزادان مورد غربالگری قرار می گیرند، مانند فنیل‌کتون‌اوریا، در بدو تولد بدون علامت و یا دارای علائم غیر اختصاصی بوده وتشخیص آنها از طریق فعالیتهای آزمایشگاهی ممکن می باشد. عملکرد صحیح ودر نتیجه اخذ جواب درست توسط آزمایشگاه باعث نجات یک انسان وبرعکس جواب نادرست باعث بروز عقب ماندگی ذهنی در فرد و تحمیل عوارض ناشی از این مشکل بر خانواده و جامعه می گردد.

توجه به موارد فوق لزوم درپیش گرفتن روندی برای به حداقل رساندن خطاها و اطمینان از نتیجه آزمایش را مطرح می‌سازد. اجرای منظم برنامه تضمین کیفیت در آزمایشگاه غربالگری، تنها راه دستیابی به نتیجه مطمئن می‌باشد. استقراربرنامه تضمین کیفیت می بایست در قسمتهای قبل از آزمایش، حین انجام آزمایش و پس از آزمایش، مشابه وحتی سختگیرانه تر نسبت به سایرآزمایشگاهها صورت گیردو شرکت در برنامه ارزیابی خارجی کیفیت نیز الزامی است.

- قبل از آزمایش:

نمونه گیری صحیح از نوزاد با شرایط مناسب ودر زمان مناسب شرط اول غربالگری است. (مواردی که آزمایش باید دوباره تکرار شود باید مورد توجه باشد). کم بودن حجم نمونه گرفته شده برروی فیلتر کاغذی و بصورت پرنشدن دایره یا عدم اشباع فیلتر کاغذی یکی از رایجترین منابع ایجاد خطا در بخش قبل از تجزیه می باشد. با توجه به اینکه قطر پانچ در اندازه‌گیری فنیل آلانین 5 میلیمتر می باشد، پرکردن دایره از خون بسیار مهم و ضروری است. کوچک بودن لکه خون منجر به اخذ نتیجه کمتر از مقدار واقعی می‌شود. استفاده از کاغذ فیلترمورد تائید برنامه کشوری(واتمن903) و عدم بکارگیری فیلترهای دیگر نیز از ضروریات نمونه گیری صحیح می‌باشد.

آموزش کارکنان ورعایت موارد مندرج در بخش نمونه‌گیری می‌تواند از بروز خطا در این قسمت جلوگیری کند.

- حین آزمایش:

استفاده از کارکنان آموزش دیده و توجیه پذیر در آزمایشگاه غربالگری از مهمترین ارکان تضمین کیفیت است.

ابزارمورد استفاده در آزمایشگاه مانند سمپلر، بن ماری، الیزا ریدرو.....می بایست کالیبره بوده و تحت برنامه منظم کنترل کیفی قرار داشته باشند.

کیت می‌بایست از کیت های مورد تائید آزمایشگاه رفرانس انتخاب شده و دقیقا مطابق با دستورالعمل موجود در آن عمل گردد. بین پانچ نمونه ها حتما پانچر برای جلوگیری از تداخل نمونه به نمونه به دقت تمیز شود

نظر به اینکه در روش اسپکتروفوتومتری معمولا اختلاف جذب قابل توجهی بین اولین وآخرین کالیبراتور وجود ندارد، عدم رعایت هریک از موارد فوق می‌تواند منجر به اخذ نتیجه نامناسب (مثبت یا منفی کاذب) گردد.

ازآنجاییکه که آزمایش کنترل در دو غلظت و در هر سری کاری ضروری است وجود کنترل در داخل کیت الزامی می‌باشد در صورت عدم وجود، باید کنترل از تولید کننده یا وارد کننده درخواست شود. گزارش نتایج بیماران تنها پس از اخذ نتیجه مناسب از کنترلها ممکن می‌باشد.

قابلیت عملکرد کیت خصوصا میزان تکرارپذیری و درستی نتایج که برحسب **CV%** و **Bias%** بیان می‌شود، از موارد دیگری است که حتما آزمایشگاهها باید در نظر داشته باشند. براساس مراجع بین المللی مقدار خطای مجاز برای اندازه‌گیری فنیل آلانین 21.6% می‌باشد (8)، این مقدار خطا بدین معناست که اگر مقدار واقعی فنیل‌آلانین در نمونه‌ای **10mg/dl** باشد، در بهترین شرایط که تمامی منابع ایجاد خطا تحت کنترل است، نتایج ممکن است در محدوده **mg/dl** 12-8 قرائت گردد.

کارکنان آزمایشگاه غربالگری می بایست ازمیزان خطای موجود در آزمایشگاه مطلع باشند و این اطلاعات را در اختیار پزشکان و کارشناسان تغذیه قرار دهند.

- **پس از آ زمایش:**

درج صحیح نتایج و اقدام بموقع در مورد نمونه های مثبت ازبروز خطا در بعد آزمایش جلوگیری می نماید.

لازم به ذکراست مستند سازی خطاهای مشاهده شده، نحوه برخورد با خطاها و هرگونه اقدام دیگری که در آزمایشگاه غربالگری انجام می شود، در مرحله بازنگری طرح، به ارتقاء برنامه غربالگری کمک خواهد کرد.

Reference:

1- Norbert W. Tietz: Fundamentals of clinical chemistry. W.B. SANDERS COMPANY.,2006

2-Hannon H. and Terrel B. "Guidelines on the Prevention and Control of Phyeny-ketouira", Pub. No. WHO/Hkp/pku/gl/90.4, World Health Organization, 1990

3- McCabe ERB, Lednard, Co et al, "Newborn Screening Fact Sheet". Report of the committee on Genetics, American Academy of Pediatrics., Pediatrics83; 443 (1989)

4-Evaluation of 6-year application of the enzymatic colorimetric phenylalanine assay in the setting of neonatal screening for phenylketonuria Schulze A, Mayatepek E,Hoffmann GF. . Clin Chim Acta.۲۰۰۲ Mar;۳۱۷(۱-۲):۲۷-۳۷

5-Phenylketonuria: Screening and Management National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement, October 16-18, 2000

6--Enzymatic method for phenylketonuria screening using phenylalanine dehydrogenase ***Dooley KC.*** Clin Biochem. ۱۹۹۲ Aug;۲۵(٤):۲۷۱-٥.

7-SIX SIGMA -TEST INTERPRETATION GUIDELINES AS TOLERANCE LIMITSJames O. Westgard , PhD.www.westgard.com

8- استانداردهای بالینی، تدوین کمیته کشوری کنترل بیماری **PKU**، 1385

۹- آزمایش غربالگری نوزادان، دکتر حمید رضا کازرونی، ادارهٔ امور آزمایشگاهها، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی استان فارس

1.*Blood Collection on Filter Paper for Newborn Screening Programs; Approved Standard—Fourth Edition CLSI_2006*

Effect of specimen collection method on newborn screening for PKU

Fred W. Lorey and George C. Cunningham

California Department of Health Services, Genetic Disease Branch, 2151 Berkeley Way, Annex 4, Berkeley, CA, 94704, USA

Received 10 November 1993;

accepted 15 April 1994.

Available online 26 April 2005

2. *A method of PKU screening using phenylalanine dehydrogenase and microplate system*
H. Narusea, Y.Y. Ohashi", A. Tsujib, M. Maedab, K. Nakamurac, T. Fujii", A. Yamaguchid, M. Matsumoto" and M. Shibataf
(Accepted 18 September 1991)

3.**Use of the Guthrie bacterial inhibition assay to monitor blood phenylalanine for dietary treatment of phenylketonuria**

Frances J. Rohr[a], Elizabeth N. Allred[b], Melissa Turner[a], Jane Simmons[d] and Harvey L. Levy[a, c, d]

Available online 27 April 2005

4.Effect of specimen collection method on newborn screening for PKU

Fred W. Lorey and George C. Cunningham

accepted 15 April 1994.

٥. *Determination of amino acids by ion-exchange chromatography on er paper spotted blood samples stored at different temperatures and or different periods: comparison with capillary and venous blood*
Yousef M. Abdulrazzaq, Ahmed Ibrahim*
Clinical Biochemistry ٣٤ (٢٠٠١) ٣٩٩–٤٠٦
Available online ١١ October ٢٠٠١.

6.SKIN PUNCTURE ON INFANTS

Chapter 12 Pediatric Procedures

Revised: August 22, 2007

راهنمای تشخیص بیماریهای متابولیک دکتر محمود سلطانی1388

کتاب جامع تجهیزات آزمایشگاهی و فرآورده های تشخیصی 1388

دکتر پروین سجادیان
شهریور ماه 1389