مقایسه کارایی روش‌های سنجش فنیل آلانین خون جهت پایش بیماران فنیل کتونوری

● پروانه مقیمی
کارشناس ارشد بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده شیمی، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران
moghimi.pa@gmail.com

● دکتر ریتا عرب سلغار
دانشیار بیوشیمی بالینی، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز
arabsolghar@gmail.com

● دکتر محمدعلی تخشید
استاد تمام بیوشیمی بالینی، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز
takhshidma@sums.ac.ir

❑ خلاصه

فنیل کتونوری یک بیماری آتوزومی مغلوب است که در اثر نقص در فعالیت آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز ایجاد می‌شود و با افزایش سطح فنیل آلانین در پلاسما و ایجاد عقب ماندگی ذهنی همراه است. جهت جلوگیری از پیامدهای نامطلوب عصبی، یک محدوده درمانی بر اساس غلظت فنیل آلانین در نمونه پلاسمایی (۳۶۰-۱۲۰ میکرومول در لیتر تا سن ۱۲ سالگی و ۶۰۰-۱۲۰ میکرومول در لیتر برای سن بیش از ۱۲ سال) پیشنهاد شده است و رژیم غذایی بیمار بر اساس حفظ این سطح تنظیم می‌گردد. علاوه بر نمونه پلاسمایی از نمونه لکه خون خشک شده (dried blood spot; DBS) در آزمایش‌های غربالگری نوزادان استفاده می‌شود. با این حال، غلظت فنیل آلانین در نمونه‌های DBS تحت تأثیر چندین عامل پیش و حین آزمایش قرار می‌گیرد که بر جواب آزمایش و در نتیجه مدیریت رژیم غذایی و درمان بیمار اثر می‌گذارند. هدف از این مقاله مروری، ارائه یک نمای کلی در مورد مشکلات اندازه‌گیری فنیل آلانین در نمونه‌های DBS و ارائه راهکار جهت اطمینان از سنجش دقیق آن می‌باشد.

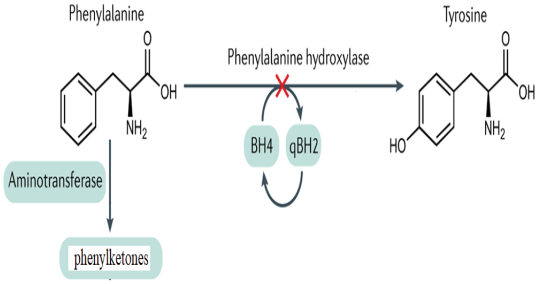
کلمات کلیدی: فنیل کتونوری، فنیل آلانین، نمونه پلاسما، لکه خون خشک شده، کنترل کیفیت

❑ مقدمه

فنیل‌کتونوری یک اختلال آتوزومی مغلوب است که در اثر نقص در فعالیت آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز کبدی ایجاد می‌شود. این آنزیم فنیل آلانین را در حضور کوفاکتور تتراهیدروبیوپتریـن (BH4) به تیروزین تبدیل می‌کند (شکل ۱). فقدان یا کاهش فعالیت این آنزیم موجب نوع کلاسیک فنیل کتونوری می‌گردد که با افزایش سطح فنیل آلانین و متابولیت های آن از جمله فنیل‌کتون ها در پلاسما و بافت‌ها همراه می‌باشد. در نوع بدخیم فنیل‌کتونوری نقص در بیوسنتز یا تشکیل مجدد کوفاکتور تتراهیدروبیوپترین علت ایجاد بیماری می‌باشد (۱). در فنیل‌کتونوری جنینی افزایش سطح فنیل آلانین در خون مادر و انتقال فعال آن از خون مادر به جنین موجب افزایش غلظت پلاسمایی این اسید آمینه در خون و سیستم عصبی جنین و اختلال در

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-04]

تکامل مغز می‌گردد (۲). فراوانی فنیل کتونوری در سفید پوستان حدود یک در هر ده هزار نفر در هر تولد زنده است. در جمعیت ایران، فراوانی این بیماری ۱,۲ در ۱۰۰۰۰ نفر در هر تولد زنده تخمین زده شده است (۳).



شکل ۱: متابولیسم اسید آمینه فنیل آلانین

تظاهرات عمده بالینی فنیل کتونوری تأخیر در رشد و آسیب ذهنی است. در اغلب بیمارانی که تحت رژیم درمانی قرار نگرفته‌اند ضریب هوشی زیر ۵۰ درصد می‌باشد. از دیگر علایم این بیماری می‌توان به حرکات غیر ارادی، ناراحتی‌های پوستی، تشنج، میکروسفالی، محدودیت شدید حرکتی، ناتوانی در تکلم، بیش فعالی و مشکلات دندانی و استخوانی اشاره نمود. اختلال در بیوسنتز نوروترانسمیترهای مغز و استرس اکسیداتیو از عوامل مؤثر در آسیب‌های مغزی این بیماران می‌باشد(۴). تشخیص سریع این بیماری و شروع رژیم غذایی به منظور کنترل سطح فنیل آلانین در پیشگیری از عوارض مغزی و دیگر علائم بیماری اهمیت خاصی دارد. اساس درمان فنیل‌کتونوری رعایت رژیم غذایی محدود از نظر فنیل آلانین (همراه با مکمل‌های جایگزین پروتئین) است که هدف آن حفظ غلظت پلاسمایی فنیل آلانین در محدوده ۱۲۰ تا ۳۶۰ میکرومول در لیتر برای ۱۲ سال اول زندگی و ۶۰۰-۱۲۰ میکرومول در لیتر در سنین بالای ۱۲ سالگی می‌باشد. محدوده هدف بهینه در دوران بارداری ۳۶۰-۱۲۰ میکرومول در لیتر توصیه شده است (۵).

مدیریت درمان بیماری PKU بر اساس سنجش سطح فنیل‌آلانین و تیروزین در نمونه پلاسمایی توصیف شده است. با این‌حال، مزیت‌های مختلف استفاده از لکه خون خشک شده (Dried blood spot; DBS) شامل سهولت در نمونه‌گیری نوزادان، نیاز به مقدار بسیار کم نمونه، پایداری زیاد اسیدهای آمینه در نمونه DBS و امکان ذخیره سازی و حمل و نقل در دمای اتاق موجب توسعه این روش شده است (۶). با این وجود اختلاف در سطح فنیل آلانین نمونه پلاسمایی و نمونه DBS گزارش شده است که می‌تواند بر روند تشخیص و پیگیری بیماران اثر منفی بگذارد. از این‌رو لازم است که پزشکان و سایر افراد مؤثر در مدیریت این بیماری از خطاهای آزمایشگاهی و روش‌های مدیریت کنترل کیفی نمونه‌های DBS اطلاع داشته و آن را در مدیریت درمان بیماران به کار گیرند. در این مقاله مروری به بررسی جنبه‌های مختلف سنجش صحیح و دقیق فنیل آلانین در نمونه‌های خون و ارائه راهکار جهت اطمینان از سنجش دقیق آن پرداخته شده است.

❑ روش‌های آزمایشگاهی سنجش فنیل آلانین

از زمان مطرح شدن غربالگری بیماران PKU تا کنون از روش‌های مختلفی برای سنجش سطح فنیل آلانین خون استفاده شده است که از جمله می‌توان به روش مهار باکتری، سنجش آنزیمی، فلوریمتری، آنالایزر اسیدهای آمینه، کروماتوگرافی مایع با کارایی زیاد (HPLC) و طیف سنجی جرمی اشاره نمود. در انتخاب روش مناسب جنبه‌های مختلفی به ویژه تکرار پذیری روش، زمان کوتاه انجام آزمایش، صحت، دقت و اختصاصیت آن مورد توجه قرار می‌گیرد. با توجه به این معیارها در حال حاضر روش کروماتوگرافی مایع/طیف سنجی جرمی (LC-MS/MS) به عنوان استاندارد طلایی سنجش فنیل آلانین خون مطرح است (۷). استفاده از توانمندی بالای روش HPLC در جدا سازی اجزا مخلوط به همراه توانمندی بالای سیستم MS/MS در شناسایی ترکیبات موجب افزایش کارایی این سیستم در سنجش فنیل آلانین شده است. به علاوه سنجش فنیل آلانین به این روش به زمان آنالیز کوتاهی نیاز دارد از این رو نتایج را می‌توان به موقع به بیماران و پزشکان اطلاع داد که امکان تنظیم سریع رژیم غذایی را فراهم می‌کند.

نمونه پلاسما EDTA- پروتئین زدایی شده، نمونه استاندارد جهت سنجش فنیل آلانین و تیروزین بیماران

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-04]

PKU اســت. با این وجود ســختی، زمان بری و دردناکی نمونه گیری از نوزادان، مراحل متعدد تهیه نمونه پلاسمایی و همچنین تعداد زیاد تکرار نمونه گیری (بسته به نیاز بالینی و ســن بیمار از دو بار در هفته تا ماهانه یکبار) مشکلاتی را ایجاد نموده است. از این رو، سنجش فنیل آلانین در نمونه لکه خون خشــک شــده (Dried blood spot; DBS) به طور گسترده مورد توجه است و به روشی ارجح برای نظارت بر رژیم غذایی بیماران مبتلا به PKU تبدیل شــده است. در این روش با اســتفاده از لانســت، خون مویرگی انگشت روی کاغذ صافی جمع آوری می‌شــود. ســپس نمونه‌ها در شــرایط مناسب خشک شــده و برای سنجش فنیل آلانین به آزمایشگاه فرســتاده می‌شود. در آزمایشگاه، فنیل‌آلانین از DBS با اســتفاده از حلال‌های آلی اســتخراج می‌شود و میزان آن به یکی از روش‌های موجود اندازه گیری می‌گردد. دو نــوع کلــی از حامل‌هــای DBS در تحقیقــات مدرن با توجه به هــدف مطالعه و نوع نمونه مورد اســتفاده قرار می‌گیرند که عبارت‌انــد از حامل‌های از جنس فایبرگلاس (LLC "Immunologist) و از جنــس خمیــر و کاغــذ (UK، Watman).

مزایای DBS به خوبی شــناخته شــده است: حجم کم نمونه مورد نیــاز (۴۰-۱۰ میکرولیتــر)، هزینه‌های پایین ذخیره سازی و حمل و نقل نمونه از جمله این مزایا می‌باشند. با این حال، چندین عامل اســتفاده از DBS برای سنجش کمی غلظت آنالیت را محدود کرده اســت (۸). نشان داده شده است که هماتوکریت، ویسکوزیته خون، ماهیت آنالیت، نوع کاغذ مورد اســتفاده و شــرایط محیطی (دما و رطوبت محیــط) می‌تواند منجر به تغییر در انــدازه لکه‌ها و توزیع ناهموار آنالیت ها شود. بنابراین، پانچ کردن و استخراج یک قطعه ثابت گاهی اوقات می‌تواند منجر به سوگیری غیرقابل قبولی در نتایج سنجش آنالیت شود (۹،۱۰). یک محدودیت دیگر برای کاربرد نمونه‌های DBS برای نظارت بر بیماران، فقدان یک کالیبراتور تجاری در دســترس برای آن اســت که بر اســاس آن تست‌های آزمایشگاهی استاندارد شود. در نتیجه آزمایشــگاه‌ها تمایل دارند که کالیبراتورهای DBS در خود آزمایشــگاه و با جمع آوری خون از یک اهدا کننده سالم و افزودن یک مقادیر مشخص فنیل آلانین تولید کنند. ولی آماده ســازی کالیبراتور DBS در آزمایشگاه‌ها متفاوت است، به عنوان مثال، حجم خون اضافه شده به کاغذ صافی، هماتوکریت متفاوت نمونه یا استفاده از نمونه‌های خون لیز شــده و روش مورد استفاده برای سنجش مقادیر کالیبراتور DBS همگی می‌تواند بر نتایج سنجش تأثیر بگذارد.

صرف نظر از روش مورد استفاده، سنجش اسیدهای‌آمینه پلاسما باید با دقت قابل قبولی انجام گردد. ضریب تغییرات درون آزمایشــگاهی (Coefficient variation; CV) بــرای فنیل آلانین تقریباً ۵ درصد اســت. چنان که انتظار می‌رود، تغییرات بین آزمایشــگاهی بیشتر است و بر اساس داده‌های شبکه تحقیقات اروپایی در بیماری‌های متابولیک ارثــی (ERNDIM) و طرح کنترل کیفــی خارجی کمی اسیدهای آمینه پلاسما (EQA)، در غلظت ۳۵۵ میکرومول در لیتر CV برابر با ۹/۵ درصد در نظر گرفته شــده اســت که این را می‌توان عمدتاً به تفاوت در اســتاندارد سازی در آزمایشــگاه‌های مختلف مرتبط دانســت. به طور کلی، یک کالیبراتور برای اســتاندارد کردن تست استفاده می‌شود. در حال حاضر از یک کالیبراتور مرجع تأیید شده مانند محلول TraceCert از ســیگما و محلول موسسه ملی استاندارد و فناوری SRM2389a استفاده می‌گردد. لازم به ذکر است که این استانداردها محلول‌های آبی اسیدهای آمینه هستند و ماتریکس آن‌ها با ماتریکس نمونه (پلاسما) همسان نیست (۵).

❑ محدوده درمانی هدف و تفاوت در ســنجش فنیل آلانین در نمونه DBS و پلاسما

بخش وســیعی از مطالعاتی که ارتباط افزایش ســطح فنیــل آلانین با بــروز پیامدهای عصبــی نامطلوب را در بیمــاران مبتــلا بــه PKU ارزیابی می‌کنند، بر اســاس سنجش غلظت فنیل آلانین در پلاسما می‌باشند و مقدار آن اســاس محدوده درمانی هدف توصیه شده را تشکیل می‌دهنــد. با این حال، دســتورالعمل‌های نظارت بیماری PKU بر غلظت فنیل آلانین در خون اشــاره می‌کنند و هیچ تمایزی بین دو نوع نمونه پلاســمایی و DBS قائل نمی‌شــود. همچنین اطلاعاتی در مورد مناسب‌ترین نوع نمونه ارائه نمی‌دهند. غلظت فنیل آلانین DBS نســبت

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-04]

به پلاسما زمانی که هر دو با استفاده از روش یکسان اندازه گیری می‌شوند ۱۵ درصد و زمانی که از روش‌های متفاوت استفاده می‌شود ۲۸ درصد کمتر می‌باشد. همچنین، تفاوت بین غلظت فنیل آلانین در خون کامل مایع و پلاسما که با یک نوع فناوری آزمایشگاهی سنجش می‌شود، تقریباً ۸ درصد است. تفاوت‌های گزارش شده بین نمونه‌های پلاسما و DBS به دلیل عوامل متعددی است که عبارتند از: توزیع فنیل آلانین بین پلاسما و گلبول‌های قرمز، راندمان استخراج فنیل آلانین از DBS و سوگیری ابزارهای آزمایشگاهی (۵). تفاوت بین غلظت فنیل آلانین در نمونه DBS و پلاسما می‌تواند تأثیر بالینی قابل توجهی در مدیریت بیماری داشته باشد. مثلاً؛ توصیه می‌شود که در دوران بارداری، غلظت فنیل آلانین در خون باید بین ۱۲۰ تا ۳۶۰ میکرومول در لیتر حفظ شود. با فرض اینکه این محدوده‌های هدف بر اساس غلظت‌های پلاسما هستند، اما در پیگیری بیماری از DBS استفاده می‌شود در آزمایشگاهی که سوگیری منفی آن ۱۵ درصد غلظت ۳۶۰ میکرومول در لیتر DBS معادل غلظت پلاسمایی ۴۲۵ میکرومول بر لیتر است و در آزمایشگاهی با سوگیری منفی ۲۸ درصد، نمونه‌های DBS با غلظت فنیل آلانین ۳۶۰ و ۶۰۰ میکرومول در لیتر (آستانه‌های بالای محدوده درمان هدف بحرانی) به ترتیب معادل ۴۶۱ و ۷۶۸ میکرومول بر لیتر پلاسما خواهند بود (۵).

❑ عوامل دیگری که بر نتایج آزمایش فنیل آلانین بیمار تأثیر می‌گذارد

اگر چه دستورالعمل‌های درمان و نظارت بر بیمار بر اهمیت کنترل غلظت فنیل آلانین تاکید می‌کند، تأثیر عوامل زیر بر گزارش نتیجه نهایی در هیچ یک از دستورالعمل‌ها در نظر گرفته نشده است:

- اهمیت عدم دقت (imprecision) و عدم صحت (inaccuracy) در سنجش فنیل آلانین
- مجموع خطای مجاز (Total allowable error; TAE)
- تأثیر خطاهای پیش از سنجش مانند حجم خون به کار رفته بر روی کاغذ صافی برای ایجاد نمونه‌های DBS

❑ عدم دقت

عوامل متعددی می‌توانند بر نتیجه تست‌های آزمایشگاهی اثر گذاشته و موجب بروز خطا گردند. از این رو ضروری است که متخصصان مراقبت‌های بهداشتی عواملی را که بر نتایج آزمایش فنیل آلانین تأثیر می‌گذارند را درک و بر اساس آن عمل کنند. سنجش عدم قطعیت (measurement of uncertainty; MU) یک الزام برای اعتبارسنجی آزمایشگاه‌های بالینی بر اساس ISO 15-189 می‌باشد (۱۱). MU پارامتری است که پراکندگی مقادیری را مشخص می‌کند که به طور منطقی می‌توان به یک اندازه نسبت داد. برای محاسبه MU نمونه‌های کنترل کیفیت (QC) در هر دسته از نمونه‌های بیمار در یک دوره زمانی مورد سنجش قرار می‌گیرد تا اثر ترکیبی همه عوامل مؤثر بر نتیجه آزمایش را در بر گیرد. برای روشن شدن موضوع به مثال زیر توجه کنید. در یک بررسی که بر روی یک نمونه کنترل DBS در ۱۶۶ دسته آزمایش جداگانه و در یک دوره ۸ ماهه انجام گرفت میانگین و SD نتایج به ترتیب ۳۶۱ و ۱۹/۳ میکرومول در لیتر به دست آمد که CV آن ۵/۳ درصد می‌باشد. با استفاده از این داده‌ها، MU آزمون را می‌توان با استفاده از معادله زیر محاسبه کرد:

$$MU = SD \times 1.96$$

با استفاده از ضریب پوشش ۱،۹۶، احتمال ۹۵٪ وجود دارد که نتیجه واقعی در محدوده MU ± باشد. MU محاسبه شده برای آزمایش بالا ۳۷،۸ میکرومول در لیتر یا ۱۰،۵ درصد به دست آمد که به این معنی است که برای یک نمونه DBS با غلظت فنیل آلانین در آستانه بحرانی ۳۶۰ میکرومول در لیتر، ما ۹۵٪ مطمئن هستیم که نتیجه بین ۳۲۲،۲ و ۳۹۷،۸ میکرومول در لیتر است (یعنی ۳۶۰ میکرومول در لیتر ± ۱۰،۵ درصد). با این حال، این محدوده غلظت شامل تنوع به دلیل عوامل پیش از اندازه گیری مانند تفاوت در تکنیک‌های جمع آوری نمونه DBS یا تفاوت‌های ذاتی بین روش‌های مختلف آزمایشگاهی نمی‌شود.

درک تغییر پذیری روش آزمایش مورد استفاده به منظور ارزیابی سریالی کنترل رژیم غذایی مهم است. از شاخصی به نام مقدار تغییر مرجع (reference change value; RCV) برای تعیین این

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-04]

معیار استفاده می‌گردد (۱۲). RCV به حداقل تفاوت بحرانی بین دو نتیجه متوالی در یک بیمار اشاره دارد که باید از آن فراتر رود تا تغییر معنی داری رخ دهد. از آنجایی که دو مجموعه از نتایج فنیل‌آلانین باید در نظر گرفته شود، ما بایستی دو مجموعه از تغییراتی که باید برای تولید RCV ترکیب شوند را در نظر بگیریم. این تغییرات ترکیبی با معادله زیر نشان داده می‌شود:

$$RCV = 2.77 \times \sqrt{CVA^2 + CVI^2}$$

که در آن CV_A و CV_I به ترتیب CV آنالیتیکال و بیولوژیکی درون فردی می‌باشند. CV_I فنیل‌آلانین در افراد بالغ سالم ۹,۵ درصد و CV_A برای QC فنیل آلانین DBS ۵,۳ درصد است. دو مجموعه از نتایج که مورد مقایسه قرار می‌گیرند باید بیشتر از ۲,۷۷ (یعنی ۲√ × ۱,۹۶) برابر تغییرات بیولوژیکی آنالیتیکال و درون فردی باشد. RCV محاسبه شده برای فنیل آلانین با استفاده از نمونه‌های DBS ۳۰,۲ درصد است. بنابراین، برای یک بیمار با غلظت فنیل آلانین DBS ۳۶۰ میکرومول در لیتر، افزایش یا کاهش بیش از ۱۰۹ میکرومول در لیتر، به دلیل تنوع بیولوژیکی درون فردی یا تنوع آزمایشی می‌تواند رخ دهد بدون آن که نتایج به صورت آماری متفاوت در نظر گرفته شوند (اطمینان ۹۵٪). می‌توان استدلال کرد که اثر تغییرات بیولوژیکی در محاسبه RCV برای بیماران PKU مطرح نمی‌باشد چون برای این بیماران رژیم غذایی تخصصی و مکمل‌هایی تجویز می‌گردد تا غلظت پایدار فنیل آلانین در طول روز حفظ شود. علاوه بر این، به بیماران توصیه می‌شود که نمونه‌ها را در زمان مشخصی از روز، معمولاً صبح ناشتا، جمع آوری کنند زمانی که غلظت فنیل آلانین در بالاترین حد است. بنابراین، با فرض انطباق بهینه با این رژیم غذایی، استفاده از محاسبه RCV ممکن است رویکرد مناسبی برای ارزیابی تغییرات سریالی در غلظت فنیل آلانین در یک بیمار نباشد، زیرا تنها تغییرات زیاد ممکن است به عنوان یک تغییر قابل توجه در نظر گرفته شود. یک رویکرد جایگزین برای محاسبه تفاوت بحرانی بین نتایج دو بیمار، حذف سهم تنوع بیولوژیکی درون فرد است. این را می‌توان با ضرب CV آنالیتیکال (۵,۳ درصد) در ۲,۷۷ که برابر با ۱۴,۷ درصد است محاسبه کرد. بنابراین در غلظت ۳۶۰ میکرومول در لیتر، افزایش یا کاهش بیشتر از ۵۲,۹ میکرومول در لیتر در نمونه‌های متوالی DBS معنی دار در نظر گرفته می‌شود. با این حال، باید توجه داشت که محاسبات MU و RCV سوگیری تست را در نظر نمی‌گیرند (۵).

❑ سوگیری (Bias) روش اندازه گیری

سوگیری یک روش آزمایشگاهی به تفاوت بین نتیجه آزمایش به دست آمده و مقدار مرجع و یا مقدار واقعی اشاره دارد. آزمایشگاه‌های بالینی عملکرد تحلیلی خود را با نتایج طرح‌های EQA مقایسه می‌کنند. برای تعریف سوگیری روش سنجش قابل قبول فنیل آلانین، می‌توان از تنوع بیولوژیکی فنیل آلانین استفاده کرد که ۱۰,۴ درصد محاسبه شده است. به علاوه معادله هورویتز می‌تواند برای محاسبه تغییرات بین آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گیرد (Horwitz equation (%) = 2C−0.15) چون تنها بر اساس غلظت آنالیت مورد استفاده است و مستقل از روش اندازه گیری، ماتریکس نمونه و آنالیت می‌باشد (۱۳). در این معادله C غلظت آنالیت می‌باشد. برای فنیل آلانین در محدوده غلظت ۱۰ تا ۵۰۰ میکرومول در لیتر، این تقریباً معادل ۱۰ درصد یک تغییر بین آزمایشگاهی هدف است. واضح است که آزمایش‌های پلاسما با این سوگیری قابل قبول محاسبه شده ۱۰ درصد مطابقت دارند، در حالی که آزمایش‌های DBS بسته به طرح EQA بسیار متغیر هستند و این تا حدی به این دلیل است که هیچ کالیبراتور تجاری برای سنجش فنیل آلانین DBS وجود ندارد.

تغییرات بین آزمایشگاهی را می‌توان با معرفی یک کالیبراتور DBS به میزان قابل توجهی کاهش داد. تا کنون کالیبراتورهایی توسط مراجع علمی تهیه شده‌اند مانند کالیبراتور اروپایی برای فنیل آلانین DBS (EWS-Phe-01) که توسط انجمن بین المللی غربالگری نوزادان تولید می‌شود. با این حال، این مواد فقط در مقادیر محدود برای تولید کنندگان کیت و سازمان دهندگان طرح EQA در دسترس هستند. گزارش نتایج نادرست می‌تواند اثرات قابل توجهی داشته باشد، زیرا ممکن

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-04]

است در جایی که آزمایشگاه دارای سوگیری منفی برای DBS فنیل آلانین هستند، نتایج به طور کاذب پایین‌تر و برعکس، در آزمایشگاهی که سوگیری مثبت دارند نتایج به طور کاذب افزایش یافته ارائه شود که باعث رژیم غذایی سخت گیرانه می‌شود. بنابراین، با چنین سوگیری‌های بزرگ و متغیری برای نتایج فنیل آلانین DBS که بین آزمایشگاه‌های مختلف مشاهده می‌شود، بدیهی است که هنگام استفاده از محدوده‌های درمانی باید به سوگیری روش توجه شود (۵).

❑ ایجاد اهداف بهینه آنالیتیکال برای سنجش‌های فنیل آلانین

متاسفانه، یک رویکرد ساده برای ایجاد اهداف بهینه آنالیتیکال جهت آنالیت‌هایی که در آزمایشگاه بالینی سنجش می‌شوند وجود ندارد. TAE (total alloawable error) یک آزمایش از راه‌های تعیین این اهداف می‌باشد. TAE یک آزمایش به حداکثر خطای قابل تحمل برای یک آزمایش گفته می‌شود که موجب تأثیر معنی دار بر تصمیم گیری بالینی نگردد (۱۴). TAE به استفاده بالینی از نتیجه آزمایش و تنوع بیولوژیکی‌ذاتی آنالیت بستگی دارد و از تجزیه و تحلیل مطالعاتی که تأثیر بالینی عملکرد تست را ارزیابی می‌کنند، استخراج می‌شود. TAE ۱۸ درصد و بایاس ۱۰,۴ درصد برای فنیل آلانین با استفاده از داده‌های مربوط به تغییرات بیولوژیکی اسیدهای آمینه در پلاسما از افراد بالغ سالم محاسبه شده است. خطای کل (TE) تست‌های فنیل آلانین را می‌توان با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه کرد:

$$TE = Test\ bias + (1.96 \times test\ CV)$$

بررسی TAE نشان داده است که آزمایش‌های فنیل آلانین پلاسما از نظر بالینی برای نظارت بر بیماران مناسب هستند. برعکس، عملکرد آزمون‌های DBS، بسته به اینکه از کدام نتایج EQA برای محاسبه سوگیری آزمون استفاده می‌شود، سازگاری کمتری دارد.

داده‌های متا آنالیز ۱۷ مطالعه (۴۳۲ نفر) نشان داد که غلظت فنیل آلانین بیشتر از ۴۰۰ میکرومول در لیتر با ضریب هوشی کمتر از ۸۵ در بیماران کمتر از ۶ سال مرتبط است. علاوه بر این، نشان داده شده است که آن دسته از بیماران (محدوده سنی ۸ تا ۱۳ سال) با فنیل آلانین بیشتر از ۴۰۰ میکرومول در لیتر در طول عمر، در تمام آزمایش‌هایی که عملکرد اجرایی را ارزیابی می‌کنند، بدتر از بیمارانی که فنیل آلانین کمتر از ۴۰۰ میکرومول در لیتر داشتند، عمل کردند؛ بنابراین ضروری است که آزمایشگاه‌ها بتوانند با اطمینان بین نتیجه آزمایش ۳۶۰ میکرومول در لیتر (حد بالای محدوده درمان هدف) و ۴۰۰ میکرومول در لیتر که بالقوه آسیب رسان است، تمایز قائل شوند؛ بنابراین، خطای سنجش آزمون نباید از اختلاف بین دو نتیجه آزمایش (۴۰ میکرومول در لیتر) که مربوط به TAE برای آزمون ۱۱,۱ درصد ([۳۶۰/۴۰] × ۱۰۰) تجاوز کند. این به طور قابل توجهی کمتر از TAE ۱۸,۲ درصد است که توسط تنوع بیولوژیکی به دست می‌آید. با این حال، مشخص شده است که استفاده از تغییرات بیولوژیکی برای استخراج TAE می‌تواند منجر به تخمین بیش از حد شود (100 × [60/360]) ونزدیک‌تر به TAE ۱۸,۲ درصد است که توسط تنوع بیولوژیکی به دست می‌آید؛ بنابراین، هنگام مقایسه نتایج آزمایش فنیل آلانین بیمار با محدوده‌های درمانی هدف، باید TE آزمایش و مناسب بودن یا نبودن آن برای هدف را بدانیم، یعنی TE آزمایش مورد استفاده در حالت ایده آل باید کمتر از TAE آزمایش باشد.

❑ عوامل پیش از آزمایش مؤثر بر سنجش فنیل آلانین در نمونه‌های DBS

اندازه (حجم خون قرار داده شده بر روی کاغذ صافی) و کیفیت لکه خون تأثیر به سزایی در نتایج به دست آمده از سنجش فنیل آلانین در نمونه‌های DBS دارد. غلظت فنیل آلانین در DBS کوچک‌تر نسبت به نمونه‌های DBS بزرگ‌تر به طور قابل توجهی کمتر است. اگر یک نمونه خون حاوی فنیل آلانین با غلظت ۳۶۰ میکرومول در لیتر، روی کاغذ صافی در حجم‌های مختلف (۱۰۰-۱۰ میکرولیتر) قرار داده شود، میانگین غلظت واقعی فنیل آلانین در این نمونه‌ها از ۳۰۰ میکرومول در لیتر در ۱۰ میکرولیتر تا ۴۰۰ میکرومول در لیتر در ۱۰۰ میکرولیتر متغیر خواهد بود. اگر اثر اندازه DBS و MU آزمایش با هم ترکیب شوند، طیف

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-04]

نتایجی که می‌توان به طور منطقی برای نمونه‌ای با غلظت ۳۶۰ میکرومول در لیتر مشاهده کرد چیزی بین ۲۶۹ و ۴۴۲ میکرومول بر لیتر است. امروزه دستورالعمل‌هایی برای رد / پذیرش نمونه DBS ایجاد شده است. آموزش بیمار / والدین برای جمع آوری نمونه‌های DBS، موجب کاهش تعداد نمونه‌های رد شده گردیده است. از جمله مواردی که در دستورالعمل‌ها مورد توجه قرار دارد می‌توان به موارد زیر اشاره نمود. در هنگام نمونه گیری از قطره اول خون نباید استفاده کرد و دور ریز محسوب می‌گردد. شکل نمونه باید دایره و اندازه قطر لکه بیش از میلی متر باشد. لکه خون از دو طرف یکسان دیده شده و دو لکه روی هم نباشد. در یک دایره نباید بیش از یک لکه باشد. کارت‌ها آغشته به مواد خارجی نباشند و لکه‌های خون بدون اثر انگشت باشند.

بعد از نمونه گیری و قرار دادن قطره روی کاغذ باید فرصت کافی داد (بستگی به میزان رطوبت محیط حداقل ۳ ساعت) تا نمونه خشک شود و نباید آن را فوراً داخل پاکت گذاشت. قرار دادن نمونه در محیط دور از حرارت و نور مستقیم، دور از رطوبت، گرد و غبار، آلودگی با حشرات و درجه حرارت ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتیگراد لازم است. شرایط استاندارد نگهداری و ارسال تا زمان تحویل به آزمایشگاه بایستی رعایت شود. به عبارتی نمونه در زمان نگهداری تا ارسال و حتی زمان ارسال باید در شرایط استاندارد باشد. دور از سرما، گرمای شدید، نور مستقیم آفتاب و رطوبت باشد. رطوبت و نور آفتاب سبب فیکس شدن نمونه و عدم استخراج خون می‌گردد. نمونه نباید با سطوح دیگر یا با یکدیگر در تماس و تحت فشار باشد و در کوتاه‌ترین زمان ممکن به آزمایشگاه ارسال شود.

❑ بحث

اگرچه تفاوت بین غلظت فنیل آلانین پلاسما و نمونه DBS گزارش شده است تأثیر بالینی آن بر مدیریت بیماری PKU ارزیابی نشده است. یک نتیجه DBS در مقایسه با محدوده درمان هدف پلاسما می‌تواند به طور کاذب اطمینان بخش و بالقوه آسیب رسان باشد، به ویژه در آزمایشگاه‌هایی که سوگیری‌های منفی زیادی برای غلظت‌های DBS مشاهده می‌شود. برای ارائه نتایج قابل مقایسه، می‌توان از یک فاکتور کالیبراسیون برای گزارش نتایج DBS به عنوان معادل پلاسما استفاده کرد تا از مقایسه معنی دار نتایج با محدوده‌های درمانی هدف توصیه شده اطمینان حاصل شود. این روش به استفاده از دامنه‌های درمانی متفاوت برای نمونه پلاسما و DBS ترجیح داده می‌شود زیرا ممکن است باعث سردرگمی بیماران و پزشکان شود. با این حال، ضروری است که نمونه‌های DBS جمع آوری شده از اندازه و کیفیت کافی برای اطمینان از نتایج دقیق برخوردار باشند، زیرا تفاوت بین نمونه‌های DBS و پلاسما زمانی که نمونه گیری توسط خود بیمار انجام می‌گیرد نسبت به زمانی که کارشناس با مهارت از سیستم بهداشتی این کار را انجام می‌دهد بیشتر خواهد شد.

بهبود کیفیت نمونه DBS به طور بالقوه می‌تواند با استفاده از دستگاه‌های جمع آوری خون، که حجم مشخصی از خون مایع را برای نمونه گیری جمع آوری می‌کند، حاصل شود. توسعه روش‌های اندازه گیری در بستر بیمار اگر چه که موجب کوتاه شدن زمان آزمایش می‌گردد ولی تا قبل از کالیبراسیون نمونه‌های پلاسما و DBS باید در استفاده از این فناوری احتیاط کرد.

از داروی ساپروپترین دی هیدروکلراید که شکل سنتتیک کوفاکتور تتراهیدروبیوپترین است با موفقیت برای کاهش غلظت فنیل آلانین خون استفاده شده است. کاهش ۳۰ درصدی سطح فنیل آلانین خون به عنوان اثر بخشی این دارو تعریف شده است علاوه بر این، کاهش کم‌تر از ۱۰ تا ۲۰ درصد نیز ممکن است نشان دهنده نتایج بالینی معنادار باشد (۱۵). با این وجود امکان سنجش دقیق این میزان از کاهش توسط نمونه DBS وجود ندارد و توصیه می‌گردد از سنجش فنیل آلانین پلاسما برای تعیین پاسخ به درمان با ساپروپترین استفاده شود.

TAE نشان دهنده حداکثر خطای قابل تحمل قبل از ایجاد تأثیر معنی دار بر مدیریت بیماری است. با این حال، استفاده از داده‌های مطالعات منتشر شده برای محاسبه TAE محدودیت دارد؛ زیرا بسیاری محققان اطلاعاتی در مورد روش نمونه گیری و اینکه آیا از نمونه‌های پلاسما یا DBS استفاده نموده‌اند در اختیار قرار نمی‌دهند. علاوه بر این، به ندرت به ابزار آزمایشگاهی مورد استفاده برای تعیین

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-04]

میزان فنیل آلانین "خون" اشاره می‌شود. این فقدان جزئیات در مورد نوع نمونه، روش آزمایش و قابلیت ردیابی کالیبراتور مورد استفاده، مطالعات بالینی آینده را با هدف استخراج TAE مختل و تضعیف خواهد کرد. توسعه یک کالیبراتور تجاری در دسترس برای استانداردسازی تست‌های فنیل آلانین DBS برای رسیدگی به این مسائل ضروری است. یک تلاش بین المللی بین انجمن‌های حرفه‌ای، گروه‌های مشاوره علمی متخصص، گروه‌های حمایت از بیماران PKU و سازمان‌هایی که تخصص و توانایی تولید مواد کالیبراتور را دارند، به منظور استاندارد سازی تست‌ها مورد نیاز است.

پزشکان باید از تأثیر تغییر پذیری روش‌های آزمایشگاهی، سوگیری روش‌های آزمایشگاهی، اندازه و کیفیت DBS اطلاع داشته تا از تفسیر اشتباه غلظت فنیل آلانین جلوگیری کنند در نتیجه از اطمینان کاذب در مورد انطباق بهینه رژیم غذایی جلوگیری کنند. آزمایشگاه‌های بالینی که از نمونه DBS برای نظارت بر بیماران PKU استفاده می‌کنند باید اطمینان حاصل کنند که: (الف) معیارهای استاندارد شده برای پذیرش / رد نمونه‌ها با هدف بهبود کیفیت DBS برای نظارت اجرا می‌شود. (ب) روش‌های- MS/MS LC برای بهبود عملکرد سنجش جایگزین دیگر روش‌ها گردد. (ج) ارزیابی دقیق سوگیری بین نتایج فنیل آلانین پلاسما و DBS در آزمایشگاه‌ها برای استخراج فاکتور کالیبراسیون به منظور گزارش نتایج DBS به عنوان معادل‌های پلاسما (به طور ایده آل بر اساس هر بیمار) انجام می‌شود، تا از مقایسه معنی دار نتایج بیمار اطمینان حاصل می‌شود. این امر به ویژه در مورد آن دسته از نوزادانی که ممکن است در نتیجه غلظت فنیل آلانین آن‌ها به طور مداوم خارج از محدوده درمان هدف می‌باشد و تحت اقدامات حفاظتی خاص قرار می‌گیرند اهمیت زیادی دارد. MU نتیجه آزمایش فنیل آلانین باید برای راهنمایی پزشکان ارائه شود و به متخصصان تغذیه اجازه تفسیر عینی‌تری از نظارت بر نتایج سریال را بدهند. در نهایت، بیماران و والدین باید به طور منظم در مورد تکنیک‌های جمع آوری خون آموزش ببینند تا نتایج دقیق‌تری جهت کنترل بهینه رژیم غذایی به دست آمده و در نتیجه پیامدهای عصبی نامطلوب کاهش یابد.

References:

1- Van Spronsen FJ, Blau N, Harding C, Burlina A, Longo N, Bosch AM. Phenylketonuria. Nature reviews Disease primers. 2021;7(1):36.

2- Bókay J, Kiss E, Simon E, Szőnyi L. Maternal phenylketonuria. Orvosi hetilap. 2013;154(18):683-7.

3- El-Metwally A, Yousef Al-Ahaidib L, Ayman Sunqurah A, Al-Surimi K, Househ M, Alshehri A, et al. The prevalence of phenylketonuria in arab countries, Turkey, and Iran: A Systematic Review. BioMed research international. 2018;2018:7697210.

4- Keshavarzi F, Rastegar M, Vessal M, Rafiei Dehbidi G, Khorsand M, Ganjkarimi AH, et al. Serum ischemia modified albumin is a possible new marker of oxidative stress in phenylketonuria. Metabolic brain disease. 2018;33(3):675-80.

5- Moat SJ, Schulenburg-Brand D, Lemonde H, Bonham JR, Weykamp CW, Mei JV, et al. Performance of laboratory tests used to measure blood phenylalanine for the monitoring of patients with phenylketonuria. Journal of inherited metabolic disease. 2020;43(2):179-88.

6- Gupta K, Mahajan R. Applications and diagnostic potential of dried blood spots. International journal of applied & basic medical research. 2018;8(1):1-2.

7- Baird S, Clinton Frazee C, 3rd, Garg U. Quantitation of phenylalanine in dried blood spot using liquid chromatography tandem mass spectrometry for monitoring of patients with phenylketonuria (PKU). Methods in molecular biology (Clifton, NJ). 2022;2546:391-9.

8- Youhnovski N, Bergeron A, Furtado M, Garofolo F. Pre-cut dried blood spot (PCDBS): an alternative to dried blood spot (DBS) technique to overcome hematocrit impact. Rapid communications in mass spectrometry: RCM. 2011;25(19):2951-8.

9- Denniff P, Spooner N. The effect of hematocrit on assay bias when using DBS samples for the quantitative bioanalysis of drugs. Bioanalysis. 2010;2(8):1385-95.

10- Ren X, Paehler T, Zimmer M, Guo Z, Zane P, Emmons GT. Impact of various factors on radioactivity distribution in different DBS papers. Bioanalysis. 2010;2(8):1469-75.

11- Pereira P. ISO 15189: 2012 Medical laboratories-requirements for quality and competence. Westgard QC: Madison, WI, USA. 2020.

12- Fraser CG. Reference change values: the way forward in monitoring. Annals of clinical biochemistry. 2009;46(Pt 3):264-5.

13- Horwitz W, Albert R. The Horwitz ratio (HorRat): A useful index of method performance with respect to precision. Journal of AOAC International. 2006;89(4):1095-109.

14- Klee GG. Establishment of outcome-related analytic performance goals. Clinical chemistry. 2010;56(5):714-22.

15- Burton BK, Grange DK, Milanowski A, Vockley G, Feillet F, Crombez EA, et al. The response of patients with phenylketonuria and elevated serum phenylalanine to treatment with oral sapropterin dihydrochloride (6R-tetrahydrobiopterin): a phase II, multicentre, open-label, screening study. Journal of inherited metabolic disease. 2007;30(5):700-7.

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-04]