

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

● دکتر ریتا عرب سلغار

دانشیار بیوشیمی بالینی، گروه علوم
آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه
علوم پزشکی شیراز

arabsolghar@gmail.com



● پروانه مقیمی

کارشناس ارشد بیوشیمی، گروه
زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده
شیمی، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران

moghimi.pa@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 اتوزومی 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 محدودۀ 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

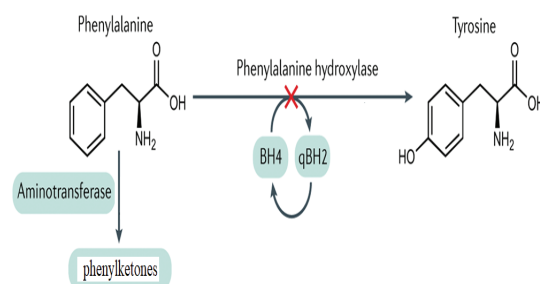
و ارائه راهکار جهت اطمینان از سنجش دقیق آن می‌باشد.
کلمات کلیدی: فنیل کتونوری، فنیل آلانین، نمونه پلاسما، لکه خون خشک شده، کنترل کیفیت

□ مقدمه

فنیل کتونوری یک اختلال اتوزومی مغلوب است که در اثر نقص در فعالیت آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز کبدی ایجاد می‌شود. این آنزیم فنیل آلانین را در حضور کوفاکتور تتراهیدروبیوپترین (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 متابولیت‌های آن از جمله فنیل کتون‌ها در پلاسما و بافت‌ها همراه می‌باشد. در نوع بدخیم فنیل کتونوری نقص در بیوسنتز یا تشکیل مجدد کوفاکتور تتراهیدروبیوپترین علت ایجاد بیماری می‌باشد (۱). در فنیل کتونوری 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



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 علائم این بیماری می‌توان به حرکات غیر ارادی، ناراحتی‌های پوستی، تشنج، میکروسفالی، محدودیت شدید حرکتی، ناتوانی در تکلم، بیش‌فعالی و مشکلات دندان‌های 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 فنیل کتونوری 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 فنیل آلانین و تیروزین در نمونه پلاسمایی توصیف شده است. با این حال، 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 این رو 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، آنالیزر 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 پلازما EDTA- پروتئین زدایی شده، نمونه استاندارد جهت سنجش فنیل آلانین و تیروزین بیماران

PKU است. با این وجود سختی، 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 سن بیمار از دو بار در هفته تا ماهانه یکبار) مشکلاتی را ایجاد نموده است. از این رو، سنجش فنیل آلانین در نمونه لکه خون خشک شده (Dried blood spot; DBS) به طور گسترده مورد توجه است و به روشی ارجح برای نظارت بر رژیم غذایی بیماران مبتلا به PKU تبدیل شده است. در این روش با استفاده از لانس، خون مویرگی انگشت روی کاغذ صافی جمع آوری می‌شود. سپس نمونه‌ها در شرایط مناسب خشک شده و برای سنجش فنیل آلانین به آزمایشگاه فرستاده می‌شود. در آزمایشگاه، فنیل آلانین از DBS با استفاده از حلال‌های آلی استخراج می‌شود و میزان آن به یکی از روش‌های موجود اندازه گیری می‌گردد. دو نوع کلی از حامل‌های DBS در تحقیقات مدرن با توجه به هدف مطالعه و نوع نمونه مورد استفاده قرار می‌گیرند که عبارت‌اند از حامل‌های از جنس فایبرگلاس (LLC "Immunologist") و از جنس خمیر و کاغذ (UK, Watman).

مزایای DBS به خوبی شناخته شده است: حجم کم نمونه مورد نیاز (۴۰-۱۰ میکرولیتر)، هزینه‌های پایین ذخیره سازی و حمل و نقل نمونه از جمله این مزایا می‌باشند. با این حال، چندین عامل استفاده از DBS برای سنجش کمی غلظت آنالیت را محدود کرده است (۸). نشان داده شده است که هماتوکریت، ویسکوزیته خون، ماهیت آنالیت، نوع کاغذ مورد استفاده و شرایط محیطی (دما و رطوبت محیط) می‌تواند منجر به تغییر در اندازه لکه‌ها و توزیع ناهموار آنالیت‌ها 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 دسترس برای آن است که بر اساس آن تست‌های آزمایشگاهی استاندارد شود. در نتیجه آزمایشگاه‌ها تمایل دارند که کالیبراتورهای DBS در خود آزمایشگاه و با جمع آوری خون از یک اهدا کننده سالم و افزودن یک مقادیر مشخص فنیل آلانین تولید کنند.

ولی آماده سازی 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 شده و روش مورد استفاده برای سنجش مقادیر کالیبراتور DBS همگی می‌تواند بر نتایج سنجش تأثیر بگذارد.

صرف نظر از روش مورد استفاده، سنجش اسیدهای آمینه پلاسما باید با دقت قابل قبولی انجام گردد. ضریب تغییرات درون آزمایشگاهی (Coefficient variation; CV) برای فنیل آلانین تقریباً ۵ درصد است. چنان که انتظار می‌رود، تغییرات بین آزمایشگاهی بیشتر است و بر اساس داده‌های شبکه تحقیقات اروپایی در بیماری‌های متابولیک ارثی (ERNDIM) و طرح کنترل کیفی خارجی کمی اسیدهای آمینه پلاسما (EQA)، در غلظت ۳۵۵ میکرومول در لیتر CV برابر با ۹/۵ درصد در نظر گرفته شده است که این را می‌توان عمدتاً به تفاوت در استاندارد سازی در آزمایشگاه‌های مختلف مرتبط دانست. به طور کلی، یک کالیبراتور برای استاندارد کردن تست استفاده می‌شود. در حال حاضر از یک کالیبراتور مرجع تأیید شده مانند محلول TraceCert از سیگما 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 سنجش فنیل آلانین در نمونه DBS و پلاسما

بخش وسیعی از مطالعاتی که ارتباط افزایش سطح فنیل آلانین با بروز پیامدهای عصبی نامطلوب را در بیماران مبتلا به PKU ارزیابی می‌کنند، بر اساس سنجش غلظت فنیل آلانین در پلاسما می‌باشند و مقدار آن اساس محدوده درمانی هدف توصیه شده را تشکیل می‌دهند. با این حال، دستورالعمل‌های نظارت بیماری PKU بر غلظت فنیل آلانین در خون اشاره می‌کنند و هیچ تمایزی بین دو نوع نمونه پلاسمایی و DBS قائل نمی‌شود. همچنین اطلاعاتی در مورد مناسب‌ترین نوع نمونه ارائه نمی‌دهند. غلظت فنیل آلانین DBS نسبت



❑ 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 $MU \pm$ 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 $\pm ۱۰,۵$ درصد). با این حال، این محدوده غلظت شامل تنوع به دلیل عوامل پیش از اندازه‌گیری مانند تفاوت در تکنیک‌های جمع‌آوری 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

به پلاسما زمانی که هر دو با استفاده از روش یکسان اندازه‌گیری 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 تأکید 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



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 فنیل آلانین 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 فنیل آلانین 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 2.77×1.96) 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، جمع‌آوری 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 اندازه‌گیری

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 اندازه‌گیری، 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 بین‌المللی 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



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

■ ایجاد اهداف بهینه آنالیتیکال برای سنجش های فنیل آلانین

متأسفانه، یک رویکرد ساده برای ایجاد اهداف بهینه آنالیتیکال جهت آنالیت هایی که در آزمایشگاه بالینی سنجش می شوند وجود ندارد. TAE (total allowable error) یک آزمایش از راه های تعیین این اهداف می باشد. TAE یک آزمایش به حداکثر خطای قابل تحمل برای یک آزمایش گفته می شود که موجب تأثیر معنی دار بر تصمیم گیری بالینی نگردد (۱۴). TAE به استفاده بالینی از نتیجه آزمایش و تنوع بیولوژیکی ذاتی آنالیت بستگی دارد و از تجزیه و تحلیل مطالعاتی که تأثیر بالینی عملکرد تست را ارزیابی می کنند، استخراج می شود. TAE ۱۸ درصد و بایاس ۱۰٫۴ درصد برای فنیل آلانین با استفاده از داده های مربوط به تغییرات بیولوژیکی اسیدهای آمینه در پلاسما از افراد بالغ سالم محاسبه شده است. خطای کل (TE) تست های فنیل آلانین را می توان با استفاده از فرمول های زیر محاسبه کرد:

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

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

داده های 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 آزمایش هایی که عملکرد اجرایی را ارزیابی می کنند، بدتر از بیمارانی که فنیل آلانین کمتر از ۴۰۰ میکرومول در لیتر داشتند، عمل کردند؛ بنابراین ضروری است که آزمایشگاه ها 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 ($360/40 \times 100$) تجاوز کند. این به طور قابل توجهی کمتر از TAE ۱۸٫۲ درصد است که توسط تنوع بیولوژیکی به دست می آید. با این حال، مشخص شده است که استفاده از تغییرات بیولوژیکی برای استخراج TAE می تواند منجر به تخمین بیش از حد شود ($60/360 \times 100$) و نزدیک تر به TAE ۱۸٫۲ درصد است که توسط تنوع بیولوژیکی به دست می آید؛ بنابراین، هنگام مقایسه نتایج آزمایش فنیل آلانین بیمار با محدوده های 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 نمونه های 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 نمونه های DBS دارد. غلظت فنیل آلانین در DBS کوچک تر نسبت به نمونه های DBS بزرگ تر به طور قابل توجهی کمتر است. اگر یک نمونه خون حاوی فنیل آلانین با غلظت ۳۶۰ میکرومول در لیتر، روی کاغذ صافی در حجم های مختلف (۱۰۰-۱۰ میکرولیتر) قرار داده شود، میانگین غلظت واقعی فنیل آلانین در این نمونه ها 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



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



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.

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

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, Szönyi 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, Raftegar 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.