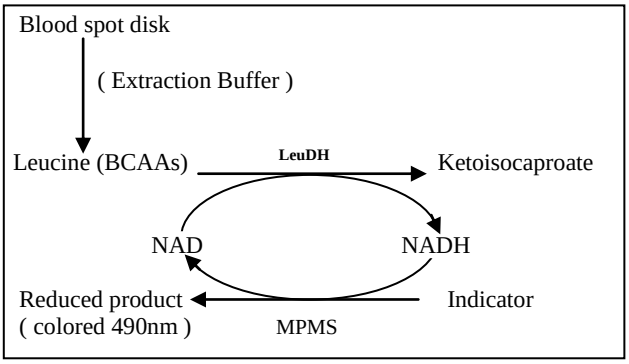
Neonatal MSUD

اندازه گیری لوسین و اسیدهای آمینه شاخه دار در خون نوزادان

مقدمه :

بیماری شربت افرا " MSUD " یکی از اختلالات متابولیکی در متابولیسم اسیدهای آمینه شاخه دار لوسین ، والین و ایزولوسین (BCAAs) است که بعلت کمبود یا فقدان آنزیم " dehydrogenase Branched-chain α-ketoacid " بوجود می آید. افزایش اسیدهای آمینه لوسین ، ایزولوسین و والین همراه با مشتقات کتونی آن در خون باعث ظهور علایم بیماری می گردد. با توجه به اینکه تشخیص سریع این بیماری در مراحل اولیه به درمان قطعی بیمار کمک می نماید، جوامع پزشکی جهان، غربالگری (Screening) نوزادان را در بدو تولد توصیه کرده و به مرحله اجرا در آورده اند. کیت MSUD - NEO اختصاصا" به منظور اندازه گیری لوسین ، والین و ایزولوسین خون تهیه شده است. سنجش اسیدهای آمینه فوق در این کیت بر اساس بهره گیری از آنزیم لوسین دهیدروژناز (LeuDH) به صورت شکل زیر انجام می گیرد. به دلیل اختصاصی بودن آنزیم ، عوامل خارجی یا مصرف آنتی بیوتیک توسط نوزاد تاثیری در نتیجه آزمایش ندارد.



والین ، لوسین و ایزولوسین استخراج شده از خون خشک شده روی دیسک کاغذی در اثر آنزیم LeuDH و در حضور NAD اکسید شده ، به Ketoisocaproate تبدیل میگردد. NADH بوجود آمده در این واکنش همزمان اندیکاتور را احیاء کرده و برنگ صورتی مایل به قرمز تبدیل می کند. این تغییر رنگ در طول موج ٤٩٠ نانومتر اندازه گیری می شود.

روش تهیه و نگهداری نمونه :

سنجش والین ، لوسین و ایزولوسین روی لکه خونی که از پاشنه پای نوزاد تهیه و بر کاغذ صافی مخصوص" کارت گاتری" S&S NO 903) خشک می شود انجام می گیرد. خونگیری معمولا" در فاصله ٢٤ تا ٧٢ ساعت بعد از تولد به ترتیب زیر و بر اساس روش استانداردی که توسط کمیته ملی استاندارد آزمایشگاه های بالینی (NCCLS) ارائه شده است انجام می گیرد. برای این منظور ، خون مورد نیاز از حاشیه کناری پاشنه پای نوزاد تهیه می شود.

١ -پاشنه پا را قبلا" با یک دستمال یا حوله ولرم (حرارت ٤٠ تا ٤١ درجه) گرم کنید تا جریان خون در محل افزایش یابد.

٢ -قبلا' محل لانست و اطراف آن را با ایزوپروپانل ٧٠ درصد به خوبی پاک نموده و صبر کنید تا در جریان هوا کاملا" خشک شود.

٣ -با استفاده از دستکش استریل یکبار مصرف و به کمک یک لانست که طول سوزن آن حداکثر ٢/٤ میلی متر تجاوز نکند ، ضربه یکنواخت و آرامی به موضع خونگیری وارد کنید تا خون براحتی جاری شود.

٤ -قطره اول را با گاز استریل تمیز کرده و سپس فشار های متناوب و مختصری که به پاشنه وارد می شود ، قطره بزرگی شکل میگیرد . کاغذ صافی را به قطره خون نزدیک کرده و آن را به مرکز دایره بچکانید با یک تکنیک صحیح می توان چهار دایره روی کاغذ صافی را پر نمود. توجه کنید سطح دوایر خونی به هیچ وجه با دست ، حتی با دستکش لمس نشود. همچنین مراقب باشید که در هنگام خونگیری هیچ خراش یا پارگی روی کاغذ بوجود نیاید.

٥ -کارت خونی را بصورت افقی روی پایه ای مسطح قرار دهید ، به طوریکه لکه خون با جایی تماس پیدا نکند. تقریبا" سه ساعت وقت لازم است تا لکه های خون در حرارت ١٥ تا ٢٥ درجه اطاق کاملا" خشک شود. در این مدت باید از قرار دادن کارتهای خونی در جریان هوای آلوده به دود و گرد و غبار و همچنین از گذاشتن آنها در معرض حرارت و تابش مستقیم خورشید جدا" خودداری نمود.

٦ -هر یک از نمونه ها را جداگانه و به ضمیمه فرم مشخصات نوزاد در پاکتی قرار دهید. احتیاط کنید که خون یک نمونه با خون نمونه دیگر در تماس نباشد. بدین ترتیب جابجایی و حمل و نقل نمونه های خون به آزمایشگاه بدون آسیب دیدگی انجام می گیرد.

٧ -کارتهای خونی را می توان برای یک هفته در پاکتهای مقاوم به رطوبت نگهداری نمود. لکه های خون در پاکتهای پلاستیکی زیپ دار و حاوی سیلیکاژل در حرارت ٤ تا ٨ درجه یخچال تا دو ماه و در فریزر (٢٠- درجه) به مدت طولانی پایدار خواهد ماند. نمونه های کنترل و استاندارد را نیز باید در پاکتهای آلومینیمی مخصوص خود که در داخل کیت قرار داده شده است حفظ نمود تا کیفیت آنها در طول مدت کاربری صدمه نبینند.

مواد و وسایل داخل کیت :

١) پلیت استخراج (میکروپلیت ٩٦ خانه مخصوص استخراج فنیل آلانین از لکه خون خشک شده)	١ عدد
٢) پلیت شفاف فتومتری (میکروپلیت ٩٦ خانه)	١ عدد
٣) معرف شماره (١) ، تامپون استخراج (Extraction Buffer)	٢٠ میلی لیتر
٤) معرف شماره (٢) ، سوبسترا	٦ میلی لیتر
٥) معرف شماره (٣) ، آنزیم فنیل آلانین دهیدروژناز در محیط تامپونه	٦ میلی لیتر
٦) معرف شماره (٤) ، محلول رنگزا	٦ میلی لیتر
٧) نوار های کاغذ صافی با لکه های خونی استاندارد حاوی پنج غلظت و لکه های خونی جهت کنترل (لکه کنترل) در دو غلظت در محدوده غلظت نرمال و آنرمال ، خشک شده بر کاغذ صافی مخصوص (Schleicher & Schuell NO 903) (0 , 3.75 , 7.5 , 15 , 30 mg / dl, Whole Blood)	دو عدد
مقادیر ارزشی کنترل ها بر روی لکه کنترل درج گردیده است.	
معرفها در یخچال ٤ تا ٨ درجه تا تاریخ مصرف (قید شده در برچسب) پایدار باقی میماند.	

کیلومتر ٢٢ جاده مخصوص کرج- پشت نفت پارس (سرخه حصار)- خیابان کیمیاپژوهان- پلاک١٣ . تلفن: ٤-٤٦٨٤٩٤٥١ فکس: ٤٦٨١٠٢٨٤

روش کار :

۱ -یک دیسک خونی به قطر ۵ میلی متر از نمونه های بیمار ، کنترل و استاندارد را به درون حفره های میکروپلیت " مخصوص استخراج " بیاندازید. **بهتر است که هر نمونه به صورت دوبله آزمایش شود.** پایه ای مناسب در داخل بن ماری قرار دهید (جا لوله ایی که بطور واژگون در داخل بن ماری قرار داده شده و از سطح آب بالاتر می باشد) بن ماری را روشن نموده پس از رسیدن دمای آب داخل بن ماری به ۹۵-۹۰ درجه , پلیت حاوی نمونه ها ، کنترل و استاندارد ها را بر روی پایه داخل بن ماری قرار دهید. درب بن ماری را بآرامی ببندید (**مراقب باشید که قطرات آب به داخل حفره ها نچکد**) ۱۰ دقیقه صبر کنید تا لکه خون بر کاغذ تثبیت شود.

۲ -به هر یک از حفره ها ۱۵۰ میکرولیتر از معرف شماره (۱) " تامپون استخراج " بریزید تا والین، لوسین و ایزولوسین خون وارد محیط شود. **دقت کنید که تامپون روی دیسکها را کاملا" بپوشاند و از تشکیل حباب هوا در حفره ها جلوگیری شود.**

۳ -روی پلیت را با سرپوش مخصوص (چسب پلیت) بپوشانید و مدت ۶۰ دقیقه با سرعت مناسب با شیکر نوسانی تکان دهید.

(در صورتیکه عمل تثبیت لکه در مرحله اول بدرستی انجام شده باشد محلول استخراج کاملا" شفاف دیده می شود).

٤ -۱۰۰ میکرولیتر از محلول استخراج شده از نمونه ها را به حفره های هم شماره خود در میکروپلیت شفاف منتقل کنید.

۵ -متناسب با نیاز ، حجم مساوی از معرف ۲ و ۳ و ٤ را مخلوط کنید.

این مخلوط فقط ۵ دقیقه پایدار میباشد.

۶ -۱۵۰ میکرولیتر از این مخلوط را به درون هر حفره بریزید.

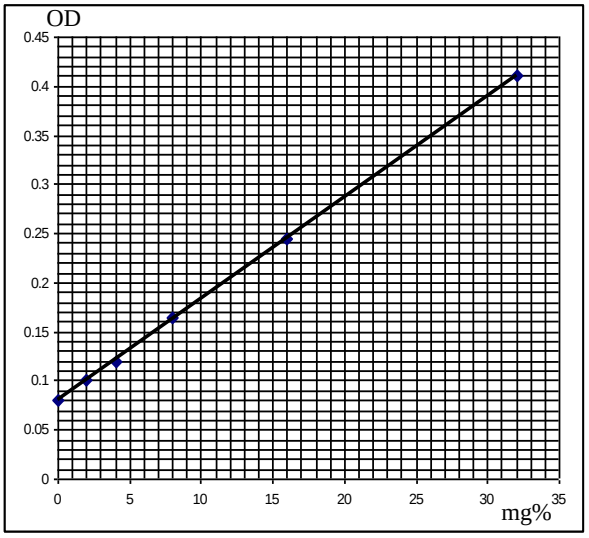
۷ -روی پلیت را پوشانده و بمدت ۶۰ دقیقه با سرعت مناسب ، با شیکر نوسانی تکان دهید تا واکنش تکمیل شود.

۸ -جذب نوری را در فاصله ۱۰ دقیقه در طول موج ٤۹۰ نانومتر (فیلتر رفرانس ۶۳۰ نانومتر) اندازه گیری کنید.

محاسبه نتیجه آزمایش :

با رسم منحنی استاندارد (غلظت در مقابل جذب نوری) ، نمونه های مجهول را تعیین مقدار کنید.

منحنی استاندارد به صورت شکل زیر می باشد.



محدوده طبیعی (حد رفرانس) :

غلظت طبیعی لوسین در نمونه خون نوزاد سالم کمتر از 4 mg/dl می باشد. (< 4 mg / dl)

جهت تایید نهایی بیماری شربت افرا در نوزاد باید اندازه گیری کمی اسید های آمینه لوسین و ایزولوسین و والین به روش HPLC انجام گیرد. از نوزادانی که لوسین آنها بیش از حد طبیعی است ، باید خونگیری تجدید و آزمایش تکرار شود.

نکته : لازم است که برای هر سری آزمایش ، منحنی استاندارد جدیدی رسم و نمونه های بیمار با آن مقایسه گردد.

کارآیی کیت :

❖**دقت(Precision)** : دقت درون سیستمی (Intra assay precision) حاصل از انجام ۲۰ تست تکراری برای دو غلظت مختلف 4.7 mg/dl و 8.5mg/dl به صورت زیر می باشد.

غلظت مورد انتظار	± SD	CV %
4.7 mg / dl	0.4	9
8.5 mg / dl	0.4	4.5

❖**دقت بین سیستمی (Inter assay precision)** : نتایج حاصل از ۸ بار تکرار دوبله در غلظت های معین 1mg/dl و 6mg/dl به صورت زیر می باشد.

غلظت مورد انتظار	± SD	CV %
4.7 mg / dl	0.5	11.8
8.5 mg / dl	0.9	10.8