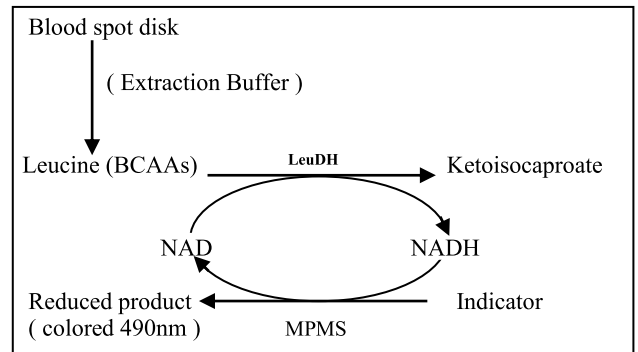


Neonatal MSUD

اندازه گیری لوسین و اسیدهای آمینه شاخه دار در خون نوزادان مقدمه :

بیماری شربت افرا " MSUD " یکی از اختلالات متابولیکی در متابولیسم اسیدآمینه های شاخه دار لوسین ، والین و ایزولوسین (BCAAs) است که باعث 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 علائم 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 اختصاصاً 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 تأثیری 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 رنگ صورتی مایل به قرمز تبدیل می کند. این تغییر رنگ در طول موج 490 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 معمولاً در فاصله 24 تا 72 ساعت بعد از تولد به ترتیب زیر و بر اساس روش استاندارد 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.

- 1- پاشنه پا را قبلاً با یک دستمال یا حوله ولرم (حرارت 40 تا 41 درجه) گرم کنید تا جریان خون در محل افزایش یابد.
- 2- قبلاً محل لانسست و اطراف آن را با ایزوپروپانل 70 درصد به خوبی پاک نموده و صبر کنید تا در جریان هوا کاملاً خشک شود.
- 3- با استفاده از دستکش استریل یکبار مصرف و به کمک یک لانسست که طول سوزن آن حداکثر 2/4 میلی متر تجاوز نکند ، ضربه یکنواخت و آرامی به موضع خونگیری وارد کنید تا خون براحتی جاری شود.
- 4- قطره اول را با گاز استریل تمیز کرده و سپس فشارهای 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 دواپر 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.
- 5- کارت خونی را بصورت افقی روی پایه ای مسطح قرار دهید ، به طوریکه لکه خون با جایی تماس پیدا نکند. تقریباً سه ساعت وقت لازم است تا لکه های خون در حرارت 15 تا 25 درجه اطاق کاملاً 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.
- 6- 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 جایجایی و حمل و نقل نمونه های خون به آزمایشگاه بدون آسیب دیدگی انجام می گیرد.
- 7- 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 4 تا 8 درجه یخچال تا دو ماه و در فریزر (20- درجه) به مدت طولانی پایدار خواهد ماند. نمونه های کنترل و استاندارد را نیز باید در پاکتهای آلومینیومی مخصوص خود که در داخل کیت قرار داده شده است حفظ نمود تا کیفیت آنها در طول مدت کاربری صدمه نبیند.

مواد و وسایل داخل کیت :

1 عدد	(1) پلیت استخراج (میکروپلیت 96 خانه مخصوص استخراج اسیدآمینه های شاخه دار از لکه خون خشک شده)
1 عدد	(2) پلیت شفاف فتومتری (میکروپلیت 96 خانه)
20 میلی لیتر	(3) معرف شماره (1) ، تامپون استخراج (Extraction Buffer)
5 میلی لیتر	(4) معرف شماره (2) ، سوپسترا
5 میلی لیتر	(5) معرف شماره (3) ، آنزیم لوسین دهیدروژناز در محیط تامپونه
5 میلی لیتر	(6) معرف شماره (4) ، محلول رنگزا
دو عدد	(7) نوارهای 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, 7.5, 15, 30 mg/dl Whole Blood) مقادیر ارزشی کنترل ها بر روی لکه کنترل درج گردیده است. معرفها در یخچال 4 تا 8 درجه تا تاریخ مصرف (قید شده در برچسب) پایدار باقی میمانند.