



Review Article

The Effects of Pre-analytical Variables on the Diagnosis of Inborn Errors of Metabolism; A Review Study

Armin Mokhtariye^{1,2,3}, Abdol-Reza Varasteh^{2,3,4}, Sima Marzban³, Fatemeh Keyfi^{2,3,*}

¹ Department of Clinical Biochemistry, Medical School, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

² Department of Medical Laboratory Sciences, Varastegan Institute for Medical Sciences, Mashhad, Iran

³ Division of Metabolic Disorders, Pardis clinical and Genetic Laboratory, Mashhad, Iran

⁴ Immunobiochemistry Laboratory, Allergy Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

* **Corresponding author:** Fatemeh Keyfi, Department of Medical Laboratory Sciences, Varastegan Institute for Medical Sciences, Mashhad, Iran. Tel: +98 51-35091160, E-mail: keifyf@varastegan.ac.ir

DOI: 10.21859/nkjmd-100311

How to Cite this Article:

Mokhtariye A, Varasteh AR, Marzban S, Keyfi F. The Effects of Pre-analytical Variables on the Diagnosis of Inborn Errors of Metabolism; A Review Study. *J North Khorasan Univ Med Sci.* 2018;**10**(3): 67-72. DOI: 10.21859/nkjms-100311

Received: 13 Jan 2018

Accepted: 08 May 2018

Keywords:

Pre-analytical Errors
Metabolic Disorders
Mass Spectrometry
Gas Chromatography

Abstract

Introduction: Quantitative metabolite profiling in biological samples has the potential to reflect physiological status and to identify disease associated disorders in metabolic pathways. This approach is hindered by a wide range of pre-analytical variables. Pre-analytical variables account for 32-75% of laboratory errors, which includes the time from when the test is ordered by the physician until the sample is ready for analysis. The aims of this study was to evaluate the pre-analytical errors in diagnostic methods of inherited metabolic disorders.

Methods: In this study, 35 articles with the key words Pre-analytical Errors, Metabolic disorders, Samples, Mass Spectrometry, and Gas Chromatography were searched in PubMed, Google Scholar, and Scopus databases from the year 1987 to 2018.

Results: There are some less controllable sources of pre-analytical errors that can strongly influence the reliability of test results in inborn errors of metabolism. These primarily include specimen collection, handling samples and physiological variables such as the effect of lifestyle, diet, stress, age, gender, positional effects, and endogenous variables such as drugs and circulating antibodies.

Conclusions: As pre-analytical sources of variation can produce unpredictable and unfavorable impacts on the wellbeing of patients, a reduction in laboratory testing errors play a significant role in assessing and quality improvements. In this respect, good quality specimens, resulting from proper training and knowledge about effective factors on laboratory results, are essential for minimizing errors and optimizing resource utilization and whole patient management process to assure accurate diagnosis.



تأثیر متغیرهای قبل از آزمایش بر تشخیص اختلالات متابولیسم مادرزادی؛ یک مطالعه مروری

آرمین مختاریه^۱، عبدالرضا وارسته^۲، سیما مرزبان^۳، فاطمه کیفی^۴ ^{۱۰.۳۰۲} ^{۱۰.۴۰۳} ^{۱۰.۳۰۲} ^{۱۰.۳۰۲}^۱ گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران^۲ گروه علوم آزمایشگاهی، مرکز آموزش عالی علوم پزشکی وارستگان، مشهد، ایران^۳ آزمایشگاه پاتوبیولوژی و ژنتیک پردیس، مشهد، ایران^۴ مرکز تحقیقات آلرژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران

* نویسنده مسئول: فاطمه کیفی، گروه علوم آزمایشگاهی، مرکز آموزش عالی علوم پزشکی وارستگان، مشهد، ایران. تلفن:

keifyf@varastegan.ac.ir، ایمیل: ۰۵۱۳۵۰۹۱۱۶۰

DOI: 10.21859/nkjms-100311

چکیده

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۲/۱۸

واژگان کلیدی:

خطاهای قبل از انجام آزمایش

اختلالات متابولیک مادرزادی

طیف سنجی جرمی

کروماتوگرافی گازی

مقدمه: بررسی پروفایل متابولیت‌ها در نمونه‌های بیولوژیکی منعکس کننده وضعیت فیزیولوژیکی و شناسایی اختلالات مرتبط با مسیرهای متابولیکی می‌باشد. متغیرهای قبل از انجام آزمایش حدود ۳۲ تا ۷۵ درصد از خطاهای آزمایشگاهی را شامل می‌شود و از زمان درخواست آزمایش توسط پزشک تا آماده شدن نمونه برای آنالیز را در بر می‌گیرد. هدف این مطالعه بررسی اثر متغیرهای قبل از انجام آزمایش در تکنیک‌های تشخیصی اختلالات متابولیسمی مادرزادی می‌باشد.

روش کار: در این مطالعه ۳۵ مقاله با واژگان کلیدی خطاهای قبل از انجام آزمایش، اختلالات متابولیک مادرزادی، نمونه، طیف سنجی جرمی، کروماتوگرافی گازی در پایگاه‌هایی نظیر PubMed، scholar و Scopus از سال ۱۹۸۷ تا کنون بررسی گردید.

یافته‌ها: تعداد زیادی از خطاهای قبل از انجام آزمایش وجود دارند که می‌تواند به طور جدی اعتبار نتایج را در اختلالات متابولیک مادرزادی تحت تأثیر قرار دهد. این خطاها در درجه اول شامل جمع‌آوری نمونه، بررسی نمونه و متغیرهای فیزیولوژیک شامل شیوه زندگی، رژیم غذایی، استرس، سن، جنس، موقعیت اجتماعی و متغیرهای خارجی شامل داروها و آنتی‌بادی‌های مورد استفاده می‌باشد. **نتیجه گیری:** با توجه به اینکه متغیرهای قبل از انجام آزمایش می‌تواند اثرات غیرقابل پیش بینی و نامطلوب روی سلامت بیمار داشته باشد، کاهش در این خطاها نقش مهمی در برنامه ارزیابی و بهبود کیفیت ایفا خواهد نمود. بدین منظور نمونه با کیفیت مناسب که نتیجه آموزش مناسب و آگاهی از فاکتورهای مؤثر بر نتایج آزمایشگاهی می‌باشد، جهت به حداقل رساندن خطاها و بهینه سازی استفاده از منابع، کیفیت نتایج و در نهایت بهبود کل فرآیند مدیریت بیمار و اطمینان از تشخیص دقیق ضروری می‌باشد.

مقدمه

متابولیسم: متابولیسم اصطلاحی است که برای اشاره به مواردی از قبیل تبدیل متقابل ترکیبات شیمیایی در بدن، مسیرهای مورد استفاده توسط مولکول‌های مختلف، ارتباطات این مسیرها و مکانیسم تنظیم جریان متابولیت در این مسیرها بکار می‌رود. برای درک ناهنجاری‌های زمینه‌ای بیماری‌ها، نیاز به شناخت متابولیسم طبیعی است. متابولیسم طبیعی شامل سازگاری با دوره‌های گرسنگی، فعالیت، حاملگی و شیردهی می‌باشد. در بدن انسان سوخت متابولیک مورد نیاز، در سرتاسر روز نسبتاً ثابت می‌باشد. اکثر افراد سوخت متابولیک روزانه مورد نیاز خود را به صورت دو یا سه وعده غذایی دریافت می‌کنند، از این رو ذخیره‌سازی کربوهیدرات‌ها (گلیکوژن در کبد و عضله) و لیپیدها (تری‌آسیل گلیسرول در بافت چربی) در بین وعده‌های غذایی لازم است تا این ذخیره در زمان عدم مصرف غذا مورد استفاده قرار گیرد [۱]. وقتی دریافت مواد سوختی، بیش از مصرف انرژی باشد، قسمت مازاد مواد مصرفی اکثراً به شکل چربی ذخیره می‌شود. بعد از صرف یک غذای طبیعی، منبع فراوانی از کربوهیدرات‌ها در دسترس قرار می‌گیرد

[۲]. نظر به اینکه سوخت اکثر بافت‌ها گلوکز می‌باشد، در حالت ناشتا لازم است مصرف گلوکز در اغلب بافت‌های بدن کاهش یافته تا این سوخت بتواند در اختیار سیستم عصبی مرکزی (دارای وابستگی زیاد به گلوکز) و گلبول‌های قرمز (کاملاً وابسته به گلوکز) قرار گیرد. در این موارد، بافت‌های دیگر از سوخت‌های جایگزین نظیر اسیدهای چرب و اجسام کتون استفاده می‌کنند. با اتمام ذخایر گلیکوژن، اسیدهای آمینه حاصل از نوسازی پروتئینی و گلیسرول حاصل از لیپولیز برای گلوکونئوزنر مورد استفاده قرار می‌گیرند [۲].

بیماری‌های متابولیک مادرزادی: بیماری‌های متابولیک مادرزادی اختلالاتی هستند که در آن‌ها برخی از مسیرهای متابولیسم طبیعی به علت نقص‌های ژنتیکی مسدود می‌شوند. متابولیسم پروسه‌ای است که به وسیله آن بدن غذای مصرف شده را تجزیه و تبدیل به انرژی می‌نماید. بنابراین افراد مبتلا به بیماری‌های متابولیک، هنگام تجزیه غذاها و تبدیل آن‌ها به انرژی، دچار مشکل می‌شوند [۳]. نقص‌های ژنتیکی به علت موتاسیون ژن‌های کدکننده پروتئین‌هایی با عملکرد

مناسب که در نتیجه آموزش مناسب و آگاهی از فاکتورهای مؤثر بر تست‌های آزمایشگاهی می‌باشد، جهت به حداقل رساندن خطاها و بهینه سازی استفاده از منابع، ارتقاء کیفیت نتایج و در نهایت بهبود فرایند اطمینان از تشخیص دقیق ضروری می‌باشد. در نتیجه مدیریت متغیرهای قبل از انجام آزمایش در آزمایشات فاکتوری بسیار مهم جهت اطمینان از نتایج دقیق است [۸، ۱۰].

روش کار

در این مطالعه ۳۵ مقاله با واژگان کلیدی خطاهای قبل از انجام آزمایش، اختلالات متابولیک مادرزادی، نمونه، طیف سنجی جرمی، کروماتوگرافی گازی در پایگاه‌هایی نظیر PubMed، scholar و Scopus از سال ۱۹۸۷ تاکنون بررسی گردید.

یافته‌ها

متغیرهای قبل از انجام آزمایش در بررسی اختلالات آمینواسیدها: اختلال در سوخت و ساز آمینواسیدها عمدتاً به دلیل نقص یک آنزیم خاص در یک مسیر خاص رخ می‌دهد و به دنبال آن برخی مواد (سبسترها) در خون افزایش یافته و در ادرار دفع می‌شود و از طرفی محصول آنزیمی در خون کاهش یافته و ادامه مسیر بلوکه می‌گردد [۱۳-۱۵]. جهت بررسی آمینواسیدهای خون نمونه پلاسمای هپارینه نمونه مناسبی است و در صورتی که این نمونه در دسترس نباشد می‌توان از پلاسمای EDTA دار استفاده شود [۱۶-۱۸]. سرم نمونه مناسبی برای آنالیز آمینواسیدها در نظر گرفته نمی‌شود؛ چون که معمولاً نمونه‌های سرم در دمای اتاق لخته می‌شوند و در طی پروسه‌ای منجر به تولید اورنی‌تین از دامیناسیون آرژنین توسط آرژینیناز در گلبول‌های قرمز، آزادسازی الیگوپپتیدها و از دست رفتن سولفور آمینواسیدها (کاهش آمینواسیدهای گوگردی) می‌شود. اکثر آمینواسیدها در سرم بیشتر از پلاسما هستند [۱۹]. نمونه خون لکه‌گذاری شده روی کارت نیز نمونه مناسبی جهت بررسی آمینواسیدهای خونی است. نمونه‌های لکه‌گذاری شده و خشک شده روی کاغذ بایستی به آزمایشگاه در دمای محیط منتقل شود. پلاسما بایستی فوراً از سلول‌های خونی جدا شود و برای نگهداری کمتر از ۴ ساعت در یخچال و بیشتر از آن در فریزر -۲۰- نگهداری شود. نمونه‌ها بایستی روی یخ گذاشته و به محل انجام آزمایش منتقل شود و در دمای فریزر نگهداری شود. نگهداری نمونه در -۲۰- درجه برای دو ماه و در -۸۰- درجه برای زمان‌های طولانی‌تر بایستی صورت بگیرد. بایستی در نظر داشت که ممکن است گلوتامین و آسپارژین به تدریج در نمونه‌های فریز شده (همراه با افزایش گلوتامات و آسپاراتات) کاهش یابند [۲۰].

از آنجایی که محتویات سلول‌های خونی بسیار بیشتر از پلاسما می‌باشد، جداسازی پلاسما در دمای اتاق ممکن است تغییرات چشمگیری در مقدار آمینواسیدها داشته باشد. تحت اثر نفوذ آنزیم آرژنیناز، آرژنین تبدیل به اوره و اورنی‌تین می‌گردد. بنابراین کاهش سطح آرژنین و افزایش سطح اورنی‌تین در زمانی که جداسازی پلاسما از سلول‌های خونی با تأخیر صورت بگیرد دیده خواهد شد. افزایش چشمگیری از هوموسیستئین نیز در مواردی که تأخیر در جداسازی پلاسما وجود دارد گزارش شده است [۱۹]. نمونه پلاسما نباید همولیز باشد؛ چرا که

آنزیمی خاص، کوفاکتور آنزیم یا سبب اختلال در انتقال دهنده‌های آنزیمی در دو طرف غشا ایجاد می‌شوند [۴]. در این بیماری‌ها امکان دارد که بیش از یک مرحله آنزیمی، تحت تأثیر قرار گیرد. در بدن انسان، آنزیم‌های متعددی وجود دارند. هنگامی که یکی از این آنزیم‌ها به درستی فعالیت نکند، پروسه تجزیه یک ماده غذایی، آهسته و یا کاملاً متوقف می‌شود. انسداد مسیرهای متابولیک باعث تجمع سوبسترا قبل از محل انسداد یا نقص محصول بعد از محل انسداد، می‌گردد. علت بروز علائم بالینی در این بیماری‌ها، نقص محصول یا مسمومیت ناشی از تجمع مواد واسطه است. بیماری‌های متابولیک مادرزادی به صورت ژنتیکی و با الگوی توارث اتوزوم مغلوب یا الگوی وابسته به X به ارث می‌رسند. هم‌اکنون در بدن انسان تعداد بیماری‌های شناخته شده‌ای که می‌توان آن‌ها را به عنوان نقص‌های ارثی متابولیسم در نظر گرفت، بالغ بر ۵۰۰ نوع بیماری است. به طور کلی بیماری‌های متابولیک به گروه‌های اختلالات اسیدهای ارگانیک، اختلالات اسیدهای چرب، اسیدوز لاکتیک اولیه، اختلالات اسیدهای آمینه، اختلالات سیکل اوره، اختلالات متابولیسم کربوهیدرات‌ها، بیماری‌های ذخیره لیپوزوم، اختلالات پراکسی‌زومی، اختلالات در سنتز استروئیدها (هایپرپلازی مادرزادی آدرنال) و اختلالات متابولیسم فلزات تقسیم‌بندی می‌شود [۲، ۵].

متغیرهای مؤثر بر بیماری‌های متابولیک مادرزادی: اساساً خطاها در آزمایشگاه‌ها به سه نوع خطای قبل از انجام آزمایش (شامل: جمع آوری نمونه، انتقال و پردازش نمونه)، خطای حین انجام آزمایش (انجام آزمایشات) و خطای بعد از انجام آزمایش (ارسال گزارش آزمایش، تداخلات، پیگیری بیمار، انجام مجدد آزمایش و...) تقسیم‌بندی می‌شوند [۶، ۷]. متغیرهای قبل از انجام آزمایش: متغیرهایی هستند که از زمان درخواست آزمایش توسط پزشک تا آماده‌سازی نمونه جهت آنالیز را شامل می‌شود. حدود ۳۲ الی ۷۵ درصد خطاها در این مرحله قرار می‌گیرند [۸، ۹]. منابع خطاهای قبل از آزمایش متعددی وجود دارد که به طور جدی می‌تواند نتایج آزمایشگاهی را تحت تأثیر قرار دهد و از آن جایی که به سختی توسط آزمایشگاه قابل تشخیص است و ممکن است نتیجه آزمایش را به شدت تحت تأثیر خود قرار دهد، بایستی با آن‌ها آشنا شد. این متغیرها شامل درخواست آزمایش، شناسایی بیمار، جمع آوری نمونه، انتقال نمونه و پردازش و آماده سازی نمونه‌ها می‌باشد [۸، ۱۰، ۱۱].

این خطاها شامل مراحل جمع آوری نمونه (حجم نمونه بهینه، نمونه همولیتیک، نمونه لیپمیک و زرد، زمان جمع آوری نمونه، مدت زمان ناشتایی)، بررسی نمونه (معیارهای مربوط به پایداری نمونه شامل انتقال و ذخیره) لیبل گذاری نمونه (شماره پذیرش اشتباه، پاک شدن شماره پذیرش و شماره پذیرش ناخوانا) و متغیرهای فیزیولوژیک شامل شیوه زندگی، رژیم غذایی، استرس، سن، جنس، موقعیت اجتماعی و متغیرهای خارجی شامل داروها و آنتی‌بادی‌های مورد استفاده و شرایط انتقال خون می‌باشد [۱۲].

اهمیت خطاهای قبل از انجام آزمایش در اختلالات متابولیکی: با توجه به اینکه متغیرهای قبل از آزمایش می‌توانند اثرات غیرقابل پیش‌بینی و نامطلوب روی تشخیص و نهایتاً درمان بیمار داشته باشند، کاهش در این خطاها نقش مهمی در برنامه ارزیابی و بهبود کیفیت آزمایشگاه‌های تشخیص طبی ایفا خواهد نمود. بدین منظور جمع‌آوری نمونه با کیفیت

دمای اتاق به آزمایشگاه انجام دهنده ارسال شود [۱۹]. مایع آمینوتیک می‌تواند برای تشخیص قبل از تولد اختلالات مادرزادی متابولیسم قابل استفاده باشد. در حالی که نمونه ادرار کمتر مورد استفاده قرار می‌گیرد. غربالگری پس از مرگ می‌تواند با نمونه روی کارت و یا نمونه صفراوی انجام شود [۲۵].

جهت تفسیر مناسب نتایج آزمایش، اطلاعات بالینی و سایر اطلاعات شامل سن، جنس، رژیم غذایی، داروهای درمانی و شجره خانوادگی مورد نیاز است [۱۳].

متغیرهای قبل از انجام آزمایش در بررسی اختلالات ارگانیک اسیدها: این بیماری‌ها به علت نقص در متابولیسم پروتئین‌ها، چربی‌ها یا کربوهیدرات‌ها ایجاد شده و با اسیدوز متابولیک همراه با کتوزیس، همراه با افزایش سطح لاکتات و افزایش سطح خفیف آمونیاک مشخص می‌شوند [۲۶]. نمونه مورد نیاز جهت تجزیه و تحلیل ارگانیک اسیدها، با استفاده از کروماتوگرافی گازی، ادرار می‌باشد. نمونه ادرار بایستی به صورت رندوم یا به صورت زمان‌دار مشخص (برای مثال ۲۴ ساعته) جمع آوری شود. نمونه ادرار بایستی در ظروف تمیز و بدون نگهدارنده جمع آوری شود [۲۷، ۲۸]. در صورتی که تجزیه و تحلیل و آنالیز به سرعت انجام می‌شود نیازی به فریز کردن نمونه نیست. اما در صورتی که قرار است آزمایش در آزمایشگاه دیگری انجام شود بایستی نمونه ادرار در کنار یخ خشک منتقل شود و به صورت یخ زده نگهداری شوند و در صورتی که نمونه ادرار در ۲۰- درجه ذخیره شود، نمونه ارگانیک اسید در آن تا چندین سال پایدار است. در حالت ایده آل نمونه‌های ادرار به مدت ۲۴ ساعت در دمای یخچال (نه دمای اتاق) قابل نگهداری هستند. در صورتی که انجماد قابل انجام نبود و یا یخ خشک در دسترس نبود از برخی نگهدارنده‌ها مثل سدیم آزید - تیمول و یا کلروفرم می‌تواند جهت جلوگیری از رشد باکتری‌ها استفاده نمود [۱۹]. لازم به ذکر است که بررسی ارگانیک اسیدها روی نمونه مایع آمینوتیک در دمای اتاق تا هفت روز دارای پایداری است [۲۵].

نمونه‌گیری در طول ناشتایی و بحران متابولیکی اغلب ارزشمندتر است، چرا که در بیشتر مواقع متابولیت‌ها انتخابی دفع می‌شوند. دو عامل می‌تواند دفع ارگانیک اسیدها را افزایش دهد؛ اول، افزایش دفع غیراختصاصی در برخی شرایط مانند مصرف داروها، رژیم‌های خاص و شرایط فیزیولوژیکی خاص و دوم، ممکن است به دلیل متابولیسم باکتری‌ها ایجاد شود؛ بطور مثال در عفونت‌های روده‌ای دفع غیرطبیعی d-لاکتات، متیل مالونات، پاراهیدروکسی فنیل استات و... دیده می‌شود [۲۶]. بهتر است نمونه بدست آمده در طول زمان حاد بیماری و عدم جبران سوخت و ساز جمع‌آوری شود؛ چرا که وقتی بیمار به ظاهر نرمال باشد سطح متابولیت‌های غیرطبیعی اغلب نزدیک به نرمال شده و در ادرار کاهش می‌یابند [۱۹].

نمونه ادرار در کارتهای کاغذی که خشک شده باشد قابل استفاده است، که بایستی خشک شده و در دمای اتاق به آزمایشگاه ارسال شود. در موارد نادر، به جای ادرار می‌توان از پلاسما، هیپارینه، مایع مغزی نخاعی، و یا مایع زجاجیه استفاده نمود [۲۹]. نمونه‌های پلاسما، CSF و مایع زجاجیه بایستی سریعاً فریز شوند. مصرف برخی از دارو منجر به تغییر در ارگانیک اسیدها می‌شود؛ به طور مثال مصرف والپروئیک اسید منجر به افزایش دفع ادراری ۳-هیدروکسی ایزو والرات، ۵-هیدروکسی

محتوای آمینواسیدها در پلاسما نسبت به گلبول‌های قرمز تفاوت خیلی زیادی دارد و آنزیم‌های زیادی در متابولیسم آمینواسیدها در گلبول قرمز شرکت می‌کنند که منجر به تغییر مقدار اصلی آمینواسیدها در پلاسما می‌شود. در نمونه‌های همولیز تغییرات قابل توجهی در مقادیر آمینواسیدها به چشم می‌خورد؛ به طور معمول در نمونه همولیز میزان گلايسين، تورين و آسپاراتات افزایش و میزان آرژینين و سيستين کاهش می‌یابد. فرد مورد آزمایش حداقل یک هفته سابقه انتقال خون نداشته باشد [۱۹].

از آنجایی که مصرف غذا (بویژه رژیم‌های پروتئینی) منجر به افزایش برخی آمینواسیدها در خون می‌شود؛ پیشنهاد می‌گردد که نمونه ناشتای ۱۲ ساعته برای بالغین جمع‌آوری گردد و بایستی نمونه‌گیری در نوزادان ۲ تا ۳ ساعت بعد از صرف شیر صورت گیرد [۲۱]. جهت بررسی آمینواسیدهای ادرار جمع‌آوری ادرار رندوم (بدون نگهدارنده) کافی است و جمع‌آوری ادرار ۲۴ ساعت (نگهداری در یخچال در طول جمع‌آوری) به ندرت نیاز است. نمونه ادرار بایستی فاقد آلودگی مدفوعی (دارای متابولیت‌های دفعی آمینواسیدها است) باشد. نمونه ادرار با آلودگی باکتریایی فاقد اعتبار است؛ چرا که منجر به تغییر pH محیط و تغییر آمینواسیدها می‌شود. نمونه ادرار بایستی به سرعت مخلوط شده و فریز شود تا از کاهش آمینواسیدها جلوگیری شود [۱۹]. مصرف برخی داروها ممکن است منجر به تغییر سطح آمینواسیدهای پلاسمایی شود، به طور مثال مصرف والپروات سدیم منجر به افزایش آرژینین پلاسمایی می‌شود.

متغیرهای قبل از انجام آزمایش در بررسی اختلالات آسیل کارنیتین: پروتئین کارنیتین پالمیتوئیل ترانسفراز تیپ یک (CPT-I) در غشای خارجی میتوکندری، ترانسپورتر کارنیتین یا آسیل کارنیتین ترانس لوکاز (CACT) و پروتئین کارنیتین پالمیتوئیل ترانسفراز تیپ دو (CPT-II) در غشای داخلی میتوکندری وظیفه انتقال آسیل کوآ به داخل میتوکندری از طریق تبدیل به آسیل کارنیتین را دارند. نقص در عملکرد هر کدام از پروتئین‌های مربوطه، منجر به افزایش آسیل کارنیتین‌ها می‌گردد [۲۲، ۲۳]. نمونه ترجیحی برای افراد دارای علامت و بدون علامت پلاسما، هیپارینه و یا سرم است. برخی از آزمایشگاه‌ها از نمونه جمع‌آوری شده روی کارت و آنالیز با استفاده از دستگاه اسپکترومتری جرمی استفاده می‌کنند که می‌تواند رویکرد جدیدی جهت انتقال راحت‌تر نمونه به آزمایشگاه‌های انجام دهنده آزمایش باشد [۱۹].

از آنجایی که آسیل کارنیتین‌ها ناپایدارند، نمونه سرم یا پلاسما بایستی به سرعت از سلول‌های خونی جدا و فریز شود. ذخیره سازی طولانی مدت در دمای اتاق منجر به کاهش شدید آسیل کارنیتین به همراه تخریب زنجیره‌های کوتاه آسیل کارنیتین می‌شود. در صورتی که نمونه‌ها در ۸۰- ذخیره می‌شوند به طور نامحدود پایداری دارند. شاهد معتبری جهت تغییرات روزانه آسیل کارنیتین نیست، بنابراین در هر زمان از روز می‌توان نمونه را جمع‌آوری نمود. اما سطح آسیل کارنیتین در سنین مختلف، متفاوت است. بهتر است که نمونه ناشتا جمع‌آوری گردد و نمونه‌های جمع‌آوری شده بایستی ظرف ۲۴ الی ۴۸ ساعت به همراه با یخ خشک به آزمایشگاه انجام دهنده آزمایش ارسال شود [۲۴]. نمونه‌هایی که روی کارتهای کاغذی لکه گذاری می‌شوند بایستی در

دایره‌ها ریخته شود، افزایش مقدار خون منجر به افزایش اندکی در فعالیت آنزیم‌ها می‌گردد. بایستی در نظر داشت که بیمار حداقل از سه روز قبل از نمونه‌گیری، انتقال خون نداشته باشد [۳۴، ۳۱]. بهترین دما جهت خشک شدن نمونه روی کارت، ۴ درجه است و با افزایش دما تا ۴۵ درجه فعالیت آنزیم‌ها به شدت کاهش می‌یابد. جهت نگهداری نمونه‌ها، در دمای اتاق یک هفته و در دمای یخچال یا فریزر تا ۶ ماه فعالیت آنزیم پایداری دارد. نمونه DBS نباید در رطوبت و دمای بالا قرار بگیرد چرا که منجر به کاهش فعالیت آنزیم‌ها می‌گردد [۳۴].

این نمونه کاملاً حساس، قابل اطمینان و ارزان است. از طرف دیگر با وجود این نوع نمونه، ارسال آن به سایر آزمایشگاه‌ها بسیار راحت است. بهتر است که نمونه در پاکت پلاستیکی (نه کاغذی) که دارای محافظ است به آزمایشگاه انجام دهنده آزمایش ارسال شود. در صورتی که نمونه‌ها در کیسه پلاستیکی با نم‌گیر در دمای ۲۰- درجه قرار بگیرند تا ۶ ماه پایداری دارند [۳۵]. در بررسی آنزیم‌های لیوزومی گاه‌ها فعالیت چندین آنزیم همزمان کاهش می‌یابد که معمولاً ناشی از مشکلات قبل آزمایش مانند افزایش دمای نمونه است، در نتیجه آگاهی داشتن نسبت به این شرایط، میزان مثبت کاذب در پنل‌های غربالگری لیوزومی را کاهش می‌دهد.

بحث

مرحله قبل از انجام آزمایش، مهم‌ترین مرحله آزمایشگاهی بوده و می‌تواند برای سلامتی بیمار شرایط بحرانی و حاد ایجاد کند. مراحل انجام آزمایش و بعد از انجام آزمایش نیز وابستگی زیادی به کیفیت صحت نمونه ارائه شده (قبل انجام آزمایش) دارند. به عبارت دیگر پرسنل آزمایشگاه که در جمع آوری نمونه همکاری می‌کنند بر روی گزارش آزمایشات بیمار تأثیر مستقیم دارند؛ بنابراین افراد جمع آوری کننده نمونه، بایستی خطاهای وابسته به آزمایش که نتایج غیرواقعی را ایجاد می‌کنند را به طور کامل شناخته و سعی بر حذف آن‌ها داشته باشند. همچنین به دلیل اهمیت خطاهای قبل از انجام آزمایش در تفسیر آزمایشات غربالگری متابولیکی، بایستی این مشکلات در نتایج گزارش و در تفسیر آن در نظر گرفته شود.

نتیجه‌گیری

در این مقاله روش‌ها و انطباقات جهت جلوگیری و شناسایی خطاهای قبل از انجام آزمایش آورده شده که می‌تواند منجر به کاهش چشمگیر اشتباهات آزمایشگاهی و تفسیر آن‌ها شود.

استون و ۷-هیدروکسی استون، دی‌کربوکسیلیک اسیدها و به مقدار کمتر هگزانویل گلايسين و تیگلایل گلايسين می‌شود [۳۰]. متغیرهای قبل از انجام آزمایش در بررسی اختلالات کربوهیدرات‌ها: این گروه از بیماری‌ها یک گروه ناهمگن را تشکیل می‌دهند که به علت ناتوانی در متابولیزه شدن برخی از قندها، اختلال در سنتز گلیکوژن یا اختلال در گلوکونوژنز ایجاد می‌شوند. این بیماری‌ها ممکن است که با علایمی همچون هیپوگلیسمی، هپاتواسپلنومگالی، اسیدوز لاکتیک یا کتوزیس بروز کنند [۳].

جهت بررسی اولیه اختلالات متابولیسم کربوهیدرات‌ها، از آزمایشات کیفی مانند بررسی حضور یا عدم حضور قند در ادرار با روش کروماتوگرافی لایه نازک استفاده می‌شود. نمونه ادرار رندوم مناسب بوده و پس از جمع‌آوری بایستی سریعاً در یخچال نگهداری شود. پایداری آن در دمای یخچال حدود ۲ هفته و در دمای فریزر تا ۲ ماه است. نمونه بایستی حداکثر تا یک ساعت به آزمایشگاه انجام دهنده ارسال گردد. نمونه ادرار نیاز به دیپروتئینه کردن ندارد و می‌توان مستقیماً مورد استفاده قرار بگیرد.

در پنل‌های غربالگری نوزادان نیز برخی آنزیم‌های مسیرهای متابولیسم کربوهیدرات‌ها به صورت کمی بررسی می‌شود. در این موارد، نمونه لکه خون خشک شده روی کارت بسیار مناسب است [۳۱]. آنزیم‌های مورد بررسی، در مقابل دما و رطوبت و آلودگی‌های باکتریال غیرفعال شده و در آزمایشات غربالگری نتایج مثبت کاذب ایجاد می‌کنند؛ پس بایستی نمونه لکه خون در دمای اتاق (یا کمتر) نگهداری و حمل شود. افراد مورد غربالگری بایستی حداقل در طی سه ماهه گذشته خون دریافت نکرده باشند، چرا که ممکن است منجر به منفی کاذب گردد [۲].

متغیرهای قبل از انجام آزمایش در بررسی اختلالات آنزیم‌های لیوزومی: علت ایجاد این بیماری‌ها، تجمع گلیکوپروتئین‌ها، گلیکولیپیدها یا گلیکوز آمینوگلیکان‌ها، در لیوزوم بافت‌های مختلف به علت نقص در آنزیم‌های متفاوت مسیر است. این بیماری‌ها اغلب در اواخر دوران کودکی، نه به وسیله یافته‌های آزمایشگاهی، بلکه به وسیله ارگانومگالی، چهره خشن و تخریب بافت عصبی بروز می‌کنند [۳۲].

نمونه لکه خون خشک شده روی کارت (DBS: Dried Blood Spots) نمونه مناسبی جهت آنالیز آنزیم‌های لیوزومی است. نمونه‌هایی که با خون حاوی ضدانعقاد EDTA روی کارت ریخته شوند فعالیت آنزیم بالاتری را نسبت به خون بدون ضد انعقاد روی کارت دارند. از طرف دیگر با توجه به اینکه خون بایستی در حجم مشخص در مرکز

References

- McNab BK. On the utility of uniformity in the definition of basal rate of metabolism. *Physiol Zool*. 1997;70(6):718-20. [pmid: 9361146](#)
- Clarke A. A clinical guide to inherited metabolic disease 2005.
- Vernon HJ. Inborn Errors of Metabolism: Advances in Diagnosis and Therapy. *JAMA Pediatr*. 2015;169(8):778-82. [doi: 10.1001/jamapediatrics.2015.0754](#) [pmid: 26075348](#)
- Reijngoud DJ. Flux analysis of inborn errors of metabolism. *J Inher Metab Dis*. 2018;41(3):309-28. [doi: 10.1007/s10545-017-0124-5](#) [pmid: 29318410](#)
- Saudubray JM, Sedel F, Walter JH. Clinical approach to treatable inborn metabolic diseases: an introduction. *J Inher Metab Dis*. 2006;29(2-3):261-74. [doi: 10.1007/s10545-006-0358-0](#) [pmid: 16763886](#)
- Gimenez-Marin A, Rivas-Ruiz F, Perez-Hidalgo Mdel M, Molina-Mendoza P. Pre-analytical errors management in the clinical laboratory: a five-year study. *Biochem Med (Zagreb)*. 2014;24(2):248-57. [doi: 10.11613/BM.2014.027](#) [pmid: 24969918](#)
- Plebani M, Carraro P. Mistakes in a stat laboratory: types and frequency. *Clin Chem*. 1997;43(8 Pt 1):1348-51. [pmid: 9267312](#)
- Narayanan S, Guder WG. Preanalytical variables and their influence on the quality of laboratory results. *J Int Federat Clin Chem*. 2001;13.

9. Tapper MA, Pethick JC, Dilworth LL, McGrowder DA. Pre-analytical Errors at the Chemical Pathology Laboratory of a Teaching Hospital. *J Clin Diagn Res.* 2017;11(8):BC16-BC8. doi: 10.7860/JCDR/2017/30159.10378 pmid: 28969112
10. Sharma P. Preanalytical variables and laboratory performance. *Indian J Clin Biochem.* 2009;24(2):109-10. doi: 10.1007/s12291-009-0021-2 pmid: 23105818
11. Carraro P, Plebani M. Errors in a stat laboratory: types and frequencies 10 years later. *Clin Chem.* 2007;53(7):1338-42. doi: 10.1373/clinchem.2007.088344 pmid: 17525103
12. Chhillar N, Khurana S, Agarwal R, Singh NK. Effect of pre-analytical errors on quality of laboratory medicine at a neuropsychiatry institute in north India. *Indian J Clin Biochem.* 2011;26(1):46-9. doi: 10.1007/s12291-010-0082-2 pmid: 22211013
13. Cespedes N, Valencia A, Echeverry CA, Arce-Plata MI, Colon C, Castineiras DE, et al. Reference values of amino acids, acylcarnitines and succinylacetone by tandem mass spectrometry for use in newborn screening in southwest Colombia. *Colomb Med (Cali).* 2017;48(3):113-9. doi: 10.25100/cm.v48i3.2180 pmid: 29213153
14. Pakula MM, Maier TJ, Vorup-Jensen T. Insight on the impacts of free amino acids and their metabolites on the immune system from a perspective of inborn errors of amino acid metabolism. *Expert Opin Ther Targets.* 2017;21(6):611-26. doi: 10.1080/14728222.2017.1323879 pmid: 28441889
15. Naylor EW, Chace DH. Automated tandem mass spectrometry for mass newborn screening for disorders in fatty acid, organic acid, and amino acid metabolism. *J Child Neurol.* 1999;14 Suppl 1(1_suppl):S4-8. doi: 10.1177/0883073899014001021 pmid: 10593560
16. Xia T, Gao S, Shu C, Wen Y, Yun Y, Tao X, et al. Analysis of amino acids in human blood using UHPLC-MS/MS: Potential interferences of storage time and vacutainer tube in pre-analytical procedure. *Clin Biochem.* 2016;49(18):1372-8. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2016.09.018 pmid: 27693603
17. Kimura T, Noguchi Y, Shikata N, Takahashi M. Plasma amino acid analysis for diagnosis and amino acid-based metabolic networks. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2009;12(1):49-53. doi: 10.1097/MCO.0b013e3283169242 pmid: 19057187
18. Chuang CK, Lin SP, Lin YT, Huang FY. Effects of anticoagulants in amino acid analysis: comparisons of heparin, EDTA, and sodium citrate in vacutainer tubes for plasma preparation. *Clin Chem.* 1998;44(5):1052-6. pmid: 9590384
19. Bennett MJ. Follow-up testing for metabolic diseases identified by expanded newborn screening using tandem mass spectrometry: National Academy of Clinical Biochemistry; 2009.
20. Schaefer A, Piquard F, Haberey P. Plasma amino-acids analysis: effects of delayed samples preparation and of storage. *Clin Chim Acta.* 1987;164(2):163-9. pmid: 3594909
21. Felig P, Owen OE, Wahren J, Cahill GF. Amino acid metabolism during prolonged starvation. *Journal of Clinical Investigation.* 1969;48(3):584-94. pmid: PMC535724
22. Rubio-Gozalbo ME, Bakker JA, Waterham HR, Wanders RJ. Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency, clinical, biochemical and genetic aspects. *Mol Aspects Med.* 2004;25(5-6):521-32. doi: 10.1016/j.mam.2004.06.007 pmid: 15363639
23. Van Hove JL, Zhang W, Kahler SG, Roe CR, Chen YT, Terada N, et al. Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency: diagnosis by acylcarnitine analysis in blood. *American Journal of Human Genetics.* 1993;52(5):958-66. pmid: PMC1682046
24. Costa CC, de Almeida IT, Jakobs C, Poll-The BT, Duran M. Dynamic changes of plasma acylcarnitine levels induced by fasting and sunflower oil challenge test in children. *Pediatr Res.* 1999;46(4):440-4. doi: 10.1203/00006450-199910000-00013 pmid: 10509365
25. Hasegawa Y, Iga M, Kimura M, Shigematsu Y, Yamaguchi S. Prenatal diagnosis for organic acid disorders using two mass spectrometric methods, gas chromatography mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005;823(1):13-7. doi: 10.1016/j.jchromb.2005.04.020 pmid: 15908288
26. Vaidyanathan K, Narayanan MP, Vasudevan DM. Organic Acidurias: An Updated Review. *Indian Journal of Clinical Biochemistry.* 2011;26(4):319-25. doi: 10.1007/s12291-011-0134-2 pmid: PMC3210240
27. Keyfi F, Talebi S, Varasteh AR. Methylmalonic Acidemia Diagnosis by Laboratory Methods. *Rep Biochem Mol Biol.* 2016;5(1):1-14. pmid: 28070528
28. Jones PM, Bennett MJ. Urine organic acid analysis for inherited metabolic disease using gas chromatography-mass spectrometry. *Methods Mol Biol.* 2010;603:423-31. doi: 10.1007/978-1-60761-459-3_41 pmid: 20077094
29. Jenkins N, Black M, Schneider HG. Simultaneous determination of voriconazole, posaconazole, itraconazole and hydroxy-itraconazole in human plasma using LCMS/MS. *Clin Biochem.* 2018;53:110-5. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2018.01.004 pmid: 29325818
30. Price KE, Pearce RE, Garg UC, Heese BA, Smith LD, Sullivan JE, et al. Effects of Valproic Acid on Organic Acid Metabolism in Children: A Metabolic Profiling Study. *Clinical pharmacology and therapeutics.* 2011;89(6):867-74. doi: 10.1038/clpt.2011.47 pmid: PMC3822904
31. de Castilhos CD, Mezzalana J, Goldim MP, Coelho JC. Influence of pre-analytical factors on alpha-galactosidase A, arylsulfatase B and alpha-glucosidase activities measured on dried blood spots on filter paper. *Clin Biochem.* 2011;44(10-11):922-6. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2011.03.138 pmid: 21531218
32. Ceci R, Francesco PN, Mucci JM, Cancelarich LN, Fossati CA, Rozenfeld PA. Reliability of enzyme assays in dried blood spots for diagnosis of 4 lysosomal storage disorders. *Adv Biol Chem* 2011;01(03):58-64. doi: 10.4236/abc.2011.13008
33. Kishnani PS, Amartino HM, Lindberg C, Miller TM, Wilson A, Keutzer J. Methods of diagnosis of patients with Pompe disease: Data from the Pompe Registry. *Mol Genet Metab.* 2014;113(1-2):84-91. doi: 10.1016/j.ymgme.2014.07.014 pmid: 25085280
34. Duffey TA, Bellamy G, Elliott S, Fox AC, Glass M, Turecek F, et al. A tandem mass spectrometry triplex assay for the detection of Fabry, Pompe, and mucopolysaccharidosis-I (Hurler). *Clin Chem.* 2010;56(12):1854-61. doi: 10.1373/clinchem.2010.152009 pmid: 20940330
35. Muller KB, Rodrigues MD, Pereira VG, Martins AM, D'Almeida V. Reference values for lysosomal enzymes activities using dried blood spots samples - a Brazilian experience. *Diagn Pathol.* 2010;5:65. doi: 10.1186/1746-1596-5-65 pmid: 20920262