کیت آنزیماتیک پادتن علم (۹۶ تستی)

# Neonatal G6PD

موارد استفاده:
تعیین نیمه کمّی فعالیت آنزیماتیک G6PD در خون خشک شده "صرفاًجهت غربالگری نوزادان"

## I. مقدمه:

آنزیم G6PD (GLucose-6-phosphate dehydrogenase)، آنزیمی سیتوپلاسمیک است که اولین واکنش چرخه متابولیکی پنتوزفسفات را کاتالیز می نماید. در این واکنش هم زمان با اکسیداسیون گلوکز- ٦ فسفات به ٦ -فسفوگلوکونولاکتون، $NADP^+$ احیاء و به NADPH تبدیل می گردد[۱].
کمبود این آنزیم شایع ترین نقص آنزیمی ژنتیکی (وابسته به کروموزم X) می باشد . بیش از ٤٠٠ میلیون نفر در سراسر جهان به این کمبود با تظاهرات بالینی همولیز (وابسته به دارو، عفونت، فاوویسم و ...) مبتلا هستند[۲،۳،٤]. در غیاب فعالیت این آنزیم، همولیز حاصله باعث تولید "هم" می گردد ، "هم" تولید شده توسط آنزیم هموکسیژناز به بیلی وردین و سپس به بیلی روبین تبدیل می شود . با توجه به امکان بروز صدمات شدید نورولوژیکی حاصل از تجمع بیلی روبین غیر کونژوگه در مغز نوزاد مبتلا به یرقان ، نظیر کرون ایکتروز ، بررسی کمبـــود این آنـــزیم در نوزادان حائـز اهمیت می باشد. [٤]
با استفاده از کیت آنزیماتیک تعیین نیمه کمّی G6PD پادتن علم می توان با اندازه گیری این آنزیم از بروز تظاهرات بالینی حاصل از همولیز گلبولهای قرمز جلوگیری به عمل آورد .

## II. اصول اندازه گیری:

کیت اندازه گیری G6PD پادتن علم بر مبنای سنجش واکنش آنزیماتیک طراحی شده است. بدین منظور ابتدا دایره‌هایی به قطر ٥ میلیمتر از خون خشک شده بر روی فیلتر کاغذی را در داخل حفره‌های پلیت قرار داده سپس آب مقطر بر روی لکه‌های خونی اضافه می‌شود. بعد از طی زمان انکوباسیون، محلول همولیز حاصله به حفره‌های پلی استیرن جدید منتقل می‌شود. آنزیم استخراج شده از خون لیز شده در حضور کوآنزیم $NADP^+$، گلوکز ٦ فسفات را اکسید کرده و به ٦ فسفو گلوکونولاکتون تبدیل می کند . واکنش NADPH با نمک Tetrazolium باعث ایجاد رنگ آلبالویی می‌شود. شدت رنگ ایجاد شده با غلظت G6PD موجود در نمونه‌ها نسبت مستقیم دارد. شدت رنگ دهی با اسپکتروفتومتر مخصوص میکروپلیت در طول موج ٤٩٢ نانومتر با دیفرانسیل ٦٣٠ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. برای تعیین نیمه کمی فعالیت آنزیماتیک G6PD نمونه‌ها ابتدا منحنی جذب نوری استانداردها برحسب فعالیت آنزیماتیک G6PD آنها رسم و سپس فعالیت آنزیماتیک G6PD نمونه از روی منحنی استاندارد تعیین می‌شود.

## III. محتویات کیت:

محلول‌های این کیت(Cat.No.P-G6NII) برای انجام ٩٦ تست در نظر گرفته شده و تاریخ انقضای هر یک بر روی شیشه آن درج شده است. دمای مناسب برای نگهداری کیت ٨-٢ درجه سانتی‌گراد است.

١ . **پلیت**: ٢ عدد پلیت ٩٦ حفره‌ای خام

٢. **استانداردها**: ٤ لکه خون خشک شده بر روی کاغذ صافی ٩٠٣ حاوی G6PD .

٣. **کنترل**: یک لکه خون خشک شده بر روی کاغذ صافی ٩٠٣ حاوی G6PD.

٤. **بافر واکنش(Reagent buffer)**: ٢٥ میلی‌لیتر محلول حاوی سوبسترا، بافر PBS و نگهدارنده.

٥. **محلول حاوی کوآنزیم(CO-Enzyme solution)**: ٠/٦ میلی‌لیتر محلول حاوی $NADP^+$ و نگهدارنده.

## IV. وسایل مورد نیاز (این وسایل همراه کیت عرضه نمی‌شوند):

١. دستگاه اسپکتروفتومتر میکروپلیت با دامنه جذب نوری ٣-٠ در طول موج ٤٩٢ نانومتر با دیفرانسیل ٦٣٠ نانومتر
٢. میکروپیپت ٢٥، ٢٠٠ و ١٠٠٠ میکرولیتر و تیپ های یکبار مصرف.
٣. پانچر ٥ میلیمتری
٤. آب مقطر یا آب دیونیزه
٥. شیکر

## V. جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه‌ها:

برای انجام این آزمایش فقط از لکه خونی خشک شده می توان استفاده نمود.

نمونه مناسب برای اندازه‌گیری G6PD موجود در خون نوزاد، خون تام جذب شده بر روی کاغذ صافی ٩٠٣ شرکت Schleicher & Schuell است. نحوه نمونه‌گیری توصیه شده طبق گزارش NCCLS ، LA٤-A٢ به شرح زیر است[٥]:
- پاشنه پای نوزاد را با آب و صابون بشویید و خشک کنید. محل نمونه‌گیری با الکل ضدعفونی شود. Lancet را در پاشنه پا فرو برید، قطره اول را پاک کنید و قطره دوم خون را بر روی دایره نقش بسته بر روی کاغذ صافی ٩٠٣ بنشانید. خون جذب شده باید تمام دایره را بپوشاند. کاغذ را به‌صورت افقی بر روی سطح تمیز قرار دهید تا در مجاورت هوا و دور از نور مستقیم آفتاب خشک شود. بعد از ٣ ساعت لکه‌های خونی خشک شده، با رطوبت‌گیر در ٤ درجه سانتیگراد نگهداری شود. در این صورت نمونه ها به مدت ٢ روز قابل استفاده می باشد. در دمای ٢٠- درجه سانتیگراد نمونه ها دو هفته پایدار هستند.

## VI. روش کار:

قبل از شروع کار باید دمای تمامی محلولها به دمای اتاق برسد.

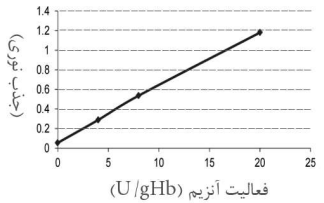
١. ابتدا دایره‌هایی به قطر ٥ میلیمتر از لکه‌های خون خشک شده ، استانداردها و کنترل‌ها جدا کنید (با پانچر مخصوص) و در حفره‌ها بیاندازید.
٢. به هر حفره ٣٠٠ میکرولیتر آب مقطر یا آب دیونیزه اضافه کنید. سپس با تکان دادن پلیت، محتویات حفره‌ها را به مدت ٣٠ ثانیه مخلوط نمائید.
٣. پلیت را ١ ساعت در یخچال (دمای ٨-٢ درجه سانتیگراد) قرار دهید.
٤. پس از انکوباسیون محلول همولیز را با ٥ بار پر و خالی کردن یکنواخت نمایید.
٥. ٢٥ میکرولیتر از محلول همولیز یکنواخت شده را به حفره خالی انتقال دهید. محلول خون لیز شده تا نیم ساعت قابل استفاده می باشد. نگهداری محلول به مدت طولانی تر باعث افت فعالیت آنزیماتیک می گردد.
٦. به هر حفره ٢٠٠ میکرولیتر محلول واکنش اضافه نمائید . برای تهیه این محلول به ازای هر رج ٢ میلی لیتر از بافر واکنش(Reagent buffer) را با ٥٠ میکرولیتر محلول حاوی کوآنزیم مخلوط نمائید. این محلول تا نیم ساعت بعد از ساخت قابل استفاده می باشد.
٧. پلیت را ١ ساعت در دمای اتاق بر روی شیکر قرار دهید. (بدون پوشش)
٨. میزان جذب نوری حفره‌ها را در طول موج ٤٩٢ نانومتر (با طول موج دیفرانسیل ٦٣٠ نانومتر) بخوانید.

## VII. محاسبه نتایج:

**١) محاسبه نیمه کمی:**
**پس از تعیین میزان جذب نوری استانداردها و نمونه‌ها و ترسیم منحنی، فعالیت آنزیماتیک G6PD لکه های خون خشک شده قابل محاسبه می باشد. در این منحنی که با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (قابل برنامه ریزی) و یا به صورت دستی ترسیم می‌شود، محور Y شاخص میزان جذب نور استانداردها و محور X شاخص فعالیت آنزیماتیک استانداردهای G6PD برحسب U/gHb است. نتایجی که در جدول زیر آمده، فقط مثال است و نباید برای تعیین فعالیت آنزیماتیک نمونه ها از آن استفاده شود.**

| فعالیت آنزیماتیک (G6PD U/gHb) | جذب نور | نمونه |
|---|---|---|
| ٠ | ٠/٠٥٤ | استاندارد A |
| ٤ | ٠/٢٨٨ | استاندارد B |
| ٨ | ٠/٥٣٦ | استاندارد C |
| ٢٠ | ١/١٨٠ | استاندارد D |
| ٤/٣ | ٠/٣٠٥ | لکه خونی |

**برای ترسیم منحنی از ارزش های مندرج بر روی برگه استانداردها استفاده کنید.**




به منظور کسب اطمینان از اعتبار نتیجه آزمایش نمونـــه هایی که درمحدوده Border line کیت قرار می گیرند، تکرار آزمایش روی همان نمونه و یا نمونه مجدد از بیمار توصیه می گردد.

ضمنا استفاده از روشهای تاییدی کمی با سایر کیتهای معتبر و بررسیهای مولکولی پیشنهاد می شود.

## VIII. مقادیر طبیعی:

با استفاده از ۷۸ لکه های خون تام نوزادان سه تا پنج روزه، مقادیر طبیعی فعالیت آنزیماتیک G6PD این نوزادان با کیت G6PD پادتن علم بررسی گردید. طبق نتایج بدست آمده، فعالیت آنزیماتیک متوسط G6PD در نوزادان ۱۲/٤ U/gHb با انحراف معیار ۳/۸ می باشد. میانگین فعالیت آنزیماتیک G6PD در نمونه لکه خون تام افراد بالغ ۹/۷U/gHb (n= ۸٦) با انحراف معیار ۲/۵ می باشد.
در مواردیکه فعالیت این آنزیم کمتر از ۲/٤ U/gHb باشد، فرد مبتلا به نوع کمبود حاد (Severe Deficient) و در مقادیر بین ۳/۵–۲/۵ U/gHb به کمبود نسبی آنزیم (Partial Deficient) است. (٦)

## IX. ویژگی‌های اختصاصی تست:

۱. حساسیت : به حداقل فعالیت آنزیماتیک G6PD که اختلاف جذب نور آن نسبت به جذب نور استاندارد صفر، معنی دار باشد حساسیت کیت گفته می شود. این مقدار برای کیت G6PD پادتن علم ۰/۵ U/gHb است.

۲. دقت: شاخص دقت کیت با مقایسه تکرار پذیری جواب ها به روش میان سنجی (Inter–assay) و درون سنجی(Intra–assay) تعیین شده است . برای این منظور ۳ نمونه ده بار در یک دوره آزمایش (درون سنجی) و یکبار در ده دوره آزمایش متفاوت (میان سنجی) تعیین فعالیت آنزیماتیک شده است . نتایج انحراف معیار (SD) و ضریب تغییرات (CV) در جدول آمده است.

جدول شاخص دقت

| درون‌سنجی | | | میان‌سنجی | | |
|---|---|---|---|---|---|
| ٪CV | SD | میانگین فعالیت آنزیماتیک U/gHb | ٪CV | SD | میانگین فعالیت آنزیماتیک U/gHb |
| ۳/۹٤ | ۰/۱۱ | ۲/۷۹ | ٦/۰ | ۰/۱ | ۱/٤ |
| ٦/٤۳ | ۰/٤۱ | ٦/٤٤ | ۷/٤ | ۰/۳ | ٤/٤ |
| ۳/۳ | ۰/۳۷ | ۱۱/۱ | ۸/۵ | ۰/۸ | ۹/۰ |

۳. صحت: برای بررسی صحت میزان فعالیت آنزیماتیک G6PD به دست آمده با کیت G6PD نوزادان پادتن علم، فعالیت آنزیماتیک G6PD تعدادی نمونه نرمال و غیر نرمال با کیت کمی G6PD شرکت Zentech (به روش Enzymatic Colorimetric) اندازه گیری شد. فعالیت آنزیماتیک G6PD، صد و هشتاد نمونه تصادفی با هر دو کیت اندازه گیری شد. در مقایسه نتایج به روش نیمه کمی، ضریب همبستگی ۰/۹۱ است.

٤. ریکاوری و رقت: ریکاوری به حالتی اطلاق می شود که با افزودن حجم معینی از یک محلول با غلظت بالا، به نمونه رقیق تر، افزایش غلظت حاصل شود. برای تعیین ریکاوری، چندین نمونه خون سیتراته با میزان فعالیت آنزیماتیک G6PD بالا به نمونه خون سیتراته که فعالیت آنزیماتیک پائینی دارد، افزوده شده است.
فعالیت آنزیماتیک G6PD این نمونه ها پس از لکه گذاری بر روی کاغذ صافی ۹۰۳ شرکت Schleicher & Schuell اندازه گیری شد.

در صد ریکاوری طبق فرمول زیر محاسبه می شود:

$$\frac{\text{فعالیت آنزیماتیک اندازه‌گیری شده (U/gHb)}}{\text{فعالیت آنزیماتیک پیش‌بینی شده (U/gHb)}} \times ۱۰۰$$

دامنه درصد ریکاوری بدست آمده از ٪۹۵/۵ تا ٪۱۰٤/۵ است.

جدول ریکاوری

| ریکاوری ٪ | فعالیت آنزیماتیک اندازه‌گیری شده U/gHb | فعالیت آنزیماتیک پیش‌بینی شده U/gHb | میزان افزوده شده µLit |
|---|---|---|---|
| – | ۱/۰ | – | – |
| ۹۹/۲ | ٦/۳۵ | ٦/٤ | ۲۵ |
| ۱۰٤/۵ | ۱۰/٤۵ | ۱۰ | ۵۰ |
| ۹۹/۷ | ۱٤/٤۵ | ۱٤/۵ | ۱۰۰ |
| ۹۵/۵ | ۱۸/۱۵ | ۱۹ | ۲۰۰ |

برای بررسی خطی بودن میزان فعالیت آنزیماتیک رقتهای G6PD بر روی منحنی چندین نمونه با فعالیت آنزیماتیک بالا، پس از رقیق شدن متوالی با استاندارد صفر، اندازه‌گیری شده و نتایج یک نمونه برای مثال در جدول زیر آورده شده است. دامنه درصد ریکاوری به‌دست آمده از ۱۰۰ تا ۱۰٦ است.

جدول رقت

| ریکاوری ٪ | فعالیت آنزیماتیک اندازه‌گیری شده (U/gHb) | فعالیت آنزیماتیک پیش‌بینی شده (U/gHb) | رقت |
|---|---|---|---|
| – | ۲۰ | – | – |
| ۱۰٦ | ۱۰/٦ | ۱۰ | ۱:۲ |
| ۱۰۰ | ۵/۰ | ۵/۰ | ۱:٤ |
| ۱۰٦ | ۲/٦۵ | ۲/۵ | ۱:۸ |
| ۱۰۰ | ۱/۲۵ | ۱/۲۵ | ۱:۱٦ |

**۵. میزان همبستگی بین دو روش کمی و نیمه کمـی شرکت پادتن علم :**

جهت بررسی میزان همبستگی بین دو روش کمی و نیمه کمی ، فعالیت آنزیماتیک G6PD ،٦۰ نمونه به دو روش اندازه گیری گردید .
ضریب همبستگی بین دو روش ۰/۹۹ می باشد .

## X. References

1. Yoshida, A. & Beutler, E. (1986). Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. n.p.: Academic Press, Inc.

2. Turan, Y.(2006). “Prevalence of Erytrocyte Glucose-6- Phosphate Dehydrogenase Deficiency in the Population of Western Turkey. Archive of Medical Reaserch:880-882

3. Scriver, C.R., et al. (1995). "Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency." In: The metabolic and molecular bases of inherited disease. 7th ed. n.p.: McGraw- Hill, Inc.:3367-98.

4. S.Behjati-Ardakani. (2007).”The association between G6PD Deficiency and total serum Bilirubin Level in Icteric Neonates”. Acta Medica Iranica:233-235

5. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Blood collection on filter paper for neonatal screening programs, approved standard, 4th ed. NCCLS Document LA4-A4 vol. 23, no. 21 (2003).

6. RZ. Azma. (2010).” G6PD Enzyme Activity in Normal Term Malaysian Neonates and Adults using a Osmmar2000-D Kit with HB Normalization.” vol 41,no.4

احتیاط!
با توجه به اینکه محلول‌های به‌کار رفته در این کیت‌ها حاوی مواد سمی مانند تیمروزال و مواد پروتئینی با منشا انسانی و حیوانی هستند، و اینکه با هیچ تستی نمی توان از عدم وجود ویروس‌هایی چون HIV، HBV، HCV در این محلول‌ها اطمینان کامل حاصل کرد، خواهشمند است هنگام کار احتیاط‌های لازم از جمله امتناع از خوردن و آشامیدن و سیگار کشیدن، استفاده از دستکش، خودداری از پیپت کردن با دهان و پرهیز از هرگونه تماس محلول با چشم و دست‌ها، رعایت شود.

Rev:.Jul 2020
تهران ، خیابان طالقانی غربی، خیابان شهید سرپرست (کیوان جنوبی)، پلاک ۲۶
تلفن: ۶۶۴۶۱۴۷۰ – ۶۶۴۶۱۰۶۱ تلفن و فکس: ۶۶۴۰۰۹۶۹