اندازه گیری فعالیت G-6-PD به روش فلئورسانت لکه ای

(G-6-PD, Fluorescent Spot Test)

مقدمه :

نقص آنزیم G-6-PD با روشهای زیادی قابل تشخیص است. ولی تست فلئورسانت لکه ای (Fluorescent Spot Test) بعنوان اختصاصی ترین (Specificity = 99%) و قابل اعتماد ترین آنها معرفی شده است (1). امتیاز این روش در قابلیت استفاده آن در حجم بسیار کم خون (۱۰ میکرولیتر یا یک قطره خون خشک شده روی کاغذ صافی مخصوص) می باشد. نتایج منفی کاذب در این تست بسیار نادر و کمتر از دو در هزار بوده (2) و مثبت کاذب نیز فقط بعد از خونریزیهای شدید که تعداد گلبولهای قرمز جوان افزایش می یابد دیده میشود.

اصول آزمایش :

آنزیم G-6-PD در محیط تامپونی مناسب باعث احیای NADP و تبدیل آن به NADPH می گردد. NADPH بوجود آمده زیر لامپ ماوراء بنفش (UV) با طول موج ۳۶۵ نانومتر ایجاد فلئورسانس می کند. شدت این فلئورسانس در خون افراد سالم زیاد و در خون بیماران مبتلا به نقص آنزیم G-6-PD کم و یا منفی است.

$$\text{Glucose-6-phosphate+ NADP} \xrightarrow{\text{G-6-PD}} \text{6-phosphogluconte + NADPH}$$

(Nonfluorescent) (Fluorescent)

وسایل مورد نیاز

- سمپلر ۱۰ و ۲۰و ۱۰۰ میکرولیتری
- لوله های پلاستیکی ۶۰×۱۲ یا لوله های مناسب دیگر
- لامپ فلئورسانت با طول موج ۳۶۵ نانومتر *
- کارت خونی ** (برای تهیه خون از پاشنه پای نوزادان) - قابل تهیه از شرکت

معرفها :

- محلول تامپون شماره (۱)
- سوبسترا شماره (۲)
- کاغذ صافی مخصوص (برای مشاهده لکه فلئورسانس)

آماده سازی معرفها :

۵ میلی لیتر از محلول تامپون (شماره ۱) را به دقت در داخل ویال معرف سوبسترا (شماره ۲) ریخته و درب آن را محکم ببندید. ویال را به آهستگی تکان دهید تا معرف کاملاً حل شود. معرف تهیه شده در حرارت ٤ تا ٨ درجه یخچال حداقل ده روز پایدار خواهد بود. در صورت نیاز میتوان برای هر تست 100 µl از آنرا درون لوله های کوچک در بسته تقسیم کرده و حداقل یک سال بصورت یخ زده در فریزر نگهداری نمود.

تهیه نمونه خون :

الف : خون تام : هر نوع خون تهیه شده در مواد ضد انعقاد (EDTA ، هپارین ، سیترات و یا ACD) قابل استفاده می باشد.

ب : دیسک خونی : با کمک پانچر (کاغذ سوراخ کن)، دیسکی به قطر ۵ میلی متر از روی کارت خونی جدا کنید. این دیسک حاوی حدود 10µl خون خواهد بود.

روش آزمایش :

۱- ۱۰۰ میکرولیتر از معرف را در یک لوله کوچک پلاستیکی و یا در صورت استفاده از میکروپلیت، در یک حفره آن بریزید.

۲- یک دیسک از کارت خونی یا ۱۰ میکرولیتر خون تام را به آن اضافه کنید و مختصری تکان دهید تا خون وارد معرف شود.

توجه : در این مرحله از خونهائیکه هماتوکریت آنها کمتر از (۲۸٪>) و یا بالاتر از (٦٠٪<) است ، بجای 10 µl به ترتیب 20µl و یا 5 µl بر دارید.

۳ - لوله حاوی معرف و خون را ۱۵ دقیقه بحال خود در حرارت اطاق قرار دهید.

٤- با سمپلر ۲۰ میکرولیتری یک قطره از این مخلوط را روی کاغذ صافی موجود در کیت بچکانید و صبر کنید تا بخودی خود کاملاً خشک شود.

۵- لکه خشک شده را زیر نور لامپ فلئورسانت بررسی نمائید.

گزارش نتیجه :

بازتاب نوری	فعالیت آنزیمی
فلئورسانس قوی	کافی (Sufficient)
فلئورسانس ضعیف	ضعیف نسبی(Partially deficient)
فلئورسانس منفی	بسیار ضعیف(Severely deficient)

تفسیر :

نمونه های طبیعی خون با بیش از ۸۰٪ گلبول سالم، دارای فلئورسانس قوی و خونهای کمتر از ٤٠٪ گلبول سالم فاقد فلئورسانس می باشد . در محدوده بینابینی، شدت فلئورسانس به تناسب متفاوت خواهد بود(2). از نقطه نظر فعالیت آنزیمی، نمونه هائیکه دارای فعالیتی برابر ۹ واحد در گرم هموگلوبین یا بیشتر می باشند دارای فلئورسانس قوی و نمونه های کمتر از ۳ واحد، فاقد فلئورسانس خواهند بود.

کنترل کیفی :

برای اطمینان از کیفیت کار معمولاً همراه هر سری آزمایش، از یک خون سالم و در صورت امکان نیز از خون یک بیمار استفاده می شود. خون سالمی که در محلول ACD (نمونه بانک خون) نگهداری می شود. از این نظر مناسب بوده و تا یک ماه قابل مصرف می باشد. بمنظور آشنا شدن چشم با فلئورسانت لکه ای وبالا بردن مهارت کارشناس در تغییر کیفیت شدت فلئورسانس و یا شدت بیماری پیشنهاد میگردد که :

الف : سه نمونه خون دارای فعالیت آنزیمی کافی، ضعیف نسبی و بسیار ضعیف را به ترتیب زیر تهیه نمائید.

۱- خون فرد سالمی با هموگلوبین ١٤تا ١٥ گرم درصد را بعنوان نمونه طبیعی انتخاب کنید، فعالیت آنزیمی این نمونه حدود صد در صد (کافی) و فلئورسانس آن قوی خواهد بود.

۲- بخشی از این خون را در لوله سر بسته ای بمدت ۲۰ دقیقه داخل بن ماری در دمای ۵۶ درجه حرارت دهید. این نمونه راکه فعالیت آنزیمی آن بسیار ضعیف شده و فاقد فلئورسانس می باشد بعنوان منفی (بسیارضعیف) بکار گیرید.

۳- با اختلاط حجم مساوی از خونهای بند ۱ و ۲ نمونه ای با ۵۰٪ فعالیت آنزیمی تهیه کنید. این نمونه را نیز که فلئورسانس ضعیف دارد بصورت نمونه (ضعیف نسبی) انتخاب نمائید.

ب : هر سه نمونه فوق را کنار هم آزمایش و شدت فلئورسانس آنها را بررسی کنید.

ج : در صورت لزوم می توانید با مخلوط کردن حجم مساوی از خونهای بند۱و۳ و همچنین حجم مساوی از خونهای بند۲و۳ به ترتیب نمونه هائی با فعالیت آنزیمی حدود ۷۵٪و ۲۵٪ نیز تهیه نموده و شدت فلئورسانس آنهارا مقایسه کنید.

موارد استفاده :

چون بیش از نیمی از پرقان نوزادان به نقص آنزیم G-6-PD مربوط می گردد(3)، بنابراین تست G-6-PD در طب کودکان مورد توجه زیادی میباشد. بطوریکه در بعضی از کشورها برای پیشگیری از بروز Kernicterus و مراقبت از بحرانهای همولیتیکی مبتلایان، اجرای تست غربالگری نوزادان اجباری شده است . این برنامه از سال ۱۹۸۳ در کمیته تحقیق بهداشت عمومی جامه اقتصادی اروپا به تصویب (4) رسیده و مورد اجرا در آمده است.

* لامپ فلئورسانت، کارت خون بالانست استاندارد در نمایندگیهای شرکت کیمیا پژوهان موجود است.

** برای تهیه کارت خونی، بعد از پاک کردن موضع با الکل، توسط لانست استاندارد، شکاف کوچکی به عمق ۱/۵ میلی متر در نوک انگشت، یا لاله گوش بزرگسالان و یا پاشنه پای نوزادان بوجود آورید. اولین قطره خون را با گاز استریل پاک کنید و قطره دوم را مستقیماً روی ((کارت خونی)) طوری بچکانید که بصورت دایره ای پخش شده و پشت آنرا نیز بپوشاند. صبر کنید تا در محیط عاری از گرد و غبار و بدور از رطوبت و یا حرارت زیاد (حداقل ۳ ساعت) کاملاً خشک شود.

هشدارهای توصیه ای :

- معرف ها حاوی سدیم آزاید میباشند بنابراین از تماس آن با پوست و چشم یا دهان خودداری گردد.
- هنگام کار با محصول حتماً از دستکش استفاده شود

References:

1. Wolf BHM Weaning RS et al, Clin Chim Acta(1987) 168,129
2. Missiou- Tsagaraki S, J Pediatr(1991) 119,293
3. Doxiadis SP,Fssas PH, Valaes T, Lancet(1960) 2, 44
4. Bartsocas Ch;Red Cell enzymopathies and Screening Of EEC Workshop, London March1983. In:Screening and Management of Potentially Treatble Genetic Metabolic Disorders, Benson PE (ed), Lonaon, MTP Press (1983).

- در صورت مشاهده هرگونه مشکل در محصول لطفاً با شماره تلفن کارخانه (بخش کنترل کیفی، داخلی ۱۶) تماس حاصل فرمائید.

کیلومتر ۲۲ جاده مخصوص کرج- پشت نفت پارس (سرخه حصار)- خیابان کیمیاپژوهان- پلاک۱۳ . تلفن: ٤-٤٦٨٤٩٤٥١ فکس: ٤٦٨١٠٢٨٤