G6PD (UV, Kinetic)

اطلاعات سفارش:

محتویات و بسته بندی:

نام کیت	شماره سفارش	محتویات	دستگاه
G6PD	613171	R1: 1 × 25 mL R2: 1 × 25 mL R3: 2 × 50 mL	MPR*

*MPR: Multi-Purpose Reagent

این کیت جهت اندازه گیری کمی فعالیت آنزیم G6PD (EC 1.1.1.49) با روش دستی و انواع دستگاه های اتوآنالایزر می باشد و محتویات آن باید فقط برای فعالیت های تشخیص آزمایشگاهی (IVD) مورد استفاده قرار گیرد.

مقدمه[1]:

کمبود آنزیم گلوکز 6 فسفات دهیدروژناز شایعترین اختلال آنزیمی وابسته به کروموزوم X (Xq28) در انسان می باشد که در نوزادان موجب زردی شدید و نیز بیلی روبین آنسفالوپاتی و عقب ماندگی ذهنی و مرگ می گردد. این آنزیم اولین آنزیم کلیدی در سنتز پنتوز فسفات است که در تولید NADPH دخالت دارد.

کمبود آنزیم می تواند موجب همولیز حاد در افرادی که در معرض استرس اکسیداتیو حاصل از عفونت ها، داروها، برخی مواد شیمیایی و دانه های باقلا قرار می گیرند شود.

کمبود آنزیم با سنجش فعالیت آن در گویچه های قرمز تشخیص داده می شود. این فعالیت باید زمانی اندازه گیری شود که اخیرا بیمار تزریق خون و حمله همولیتیک جدید نداشته باشد.

اصول[2,3]:

G6PD با فعالیت کاتالیتیکی خود گلوکز 6 فسفات را به 6 فسفو گلوکونات اکسید می کند و همزمان $NADP^+$ به NADPH احیا می شود.

$$G\text{-}6\text{-}P + NADP^+ \xrightarrow{G6PD} 6\text{-}PG + NADPH + H^+$$

فعالیت آنزیم از طریق ازدیاد جذب NADPH در 340 nm اندازه گیری می شود.

معرف:

معرف شماره 1 تامپون حاوی G6P

معرف شماره 2 تامپون حاوی NADP

معرف شماره 3 محلول لیز کننده

آماده سازی:

یک حجم از محلول معرف 1 را با یک حجم از محلول معرف 2 مخلوط کنید.

نگهداری و پایداری:

در صورت نگهداری در دمای 2-8 درجه سانتی گراد و محافظت از نور، کیت تا تاریخ انقضای ذکر شده بر روی جعبه پایدار است. معرف کاری پس از تهیه یک روز در دمای ^0C 25-20 و یک هفته در دمای ^0C 8-2 پایدار است.

بهداشت، ایمنی و دفع مواد زائد:

جهت حذف و دور ریز تمام پسماندها طبق الزامات قانونی و محلی عمل شود.

برای جلوگیری از آلودگی معرفها، از وسایل تمیز یا یکبار مصرف استفاده نمایید. هنگام کار از دستکش استفاده کنید. از تماس معرفها با پوست و چشم خودداری کرده و در صورت تماس، موضع را با آب شستشو دهید.

نمونه ها[4,5]:

خون تام حاوی EDTA، هپارین یا acid-citrate dextrose (ACD).

از آنجا که فعالیت آنزیم G6PD بر اساس غلظت هموگلوبین یا تعداد گلبول های قرمز گزارش می شود، باید غلظت هموگلوبین یا تعداد گلبول های قرمز قبل از انجام آزمایش G6PD مشخص شود.

آنزیم G6PD در گلبول های قرمز به مدت یک هفته در دمای ^0C 8-2 پایدار است.

به هیچ وجه نباید نمونه را فریز کرد.

پس از لیز شدن، نمونه لیز شده فاقد پایداری لازم جهت اندازه گیری فعالیت آنزیم G6PD می باشد و بایستی آزمایش در عرض 10 دقیقه انجام شود.

در نمونه حاوی ACD، پایداری اریتروسیت در مدت طولانی حفظ می شود و نتایج شمارش RBC به دست آمده از این نمونه ها در طولانی مدت (20 روز) از صحت کافی برخوردار است اما در نمونه های هپارینه و حاوی EDTA گلبول قرمز تا 2 روز پایدار است. به همین دلیل در صورت استفاده از نمونه های هپارینه بهتر است نتایج براساس هموگلوبین گزارش شود.

روش انجام آزمایش:

ابتدا 25 µL از خون تام را به نیم سی سی (500 µL) محلول لیز کننده (R3) اضافه کنید و 5 دقیقه در دمای اتاق قرار دهید تا همولیز کامل شود.

طول موج: 340 nm

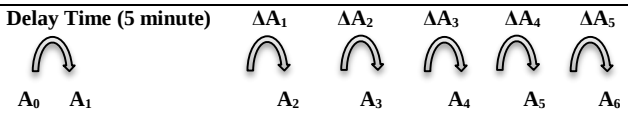
دما: 25/30/37 ^0C

قطر کووت: 1 cm

دستگاه را در مقابل بلانک صفر کنید

نمونه همولیز	20 µL
معرف کاری	250 µL

مخلوط کنید و 5 دقیقه صبر کنید. جذب نوری اول را تعیین نموده (A1)، اختلاف جذب نوری را پس از دقیقه اول (A2)، دوم (A3)، سوم (A4)، چهارم (A5)و پنجم (A6) هر دقیقه نسبت به دقیقه قبل به دست آورید.



کالیبراسیون:

این روش بر اساس جذب مولی NADPH در طول موج 340nm استاندارد شده است. اندازه گیری میزان افزایش جذب نوری (ΔA) در 340nm متناسب با فعالیت آنزیم می باشد.

محاسبات[6]:

$$\Delta A \text{ per min} = (\Delta A_1 + \Delta A_2 + \Delta A_3 + \Delta A_4 + \Delta A_5) / 5$$

فعالیت آنزیم G6PD را میتوان براساس U/g هموگلوبین و یا $U/10^{12}$ گلبول قرمز بیان کرد.

محاسبات بر اساس هموگلوبین:

$$\text{G6PD (U/g Hb)} = \Delta A \text{ per min} \times \frac{100 \times 270 \times 21}{20 \times 6.22 \times Hb(g/dl)} \times TCF$$

$$= (\Delta A \text{ per min} \times 4557) / Hb \times TCF$$

توضیحات:

100: Factor to convert activity to 100 ml
270: Total reaction volume (ml)
21: Dilution factor for lysis
20: sample volume (ml)
6.22: Milimolar absorptivity of NADPH at 340nm
Hb (g/dl): Hemoglobin concentration for each specimen
TCF: Temperature Correction Factor[6]:

Cuvette temperature	TCF
25°C	1.98
30°C	1.37
37°C	1

محاسبات بر اساس گلبول قرمز:

$$\text{G6PD (U/}10^{12}\text{RBC)} = \Delta A \text{ per min} \times \frac{270 \times 21 \times 10^{12}}{20 \times 6.22 \times (N \times 10^6) \times 1000} \times TCF$$

$$= (\Delta A \text{ per min} \times 45578) / N \times TCF$$

توضیحات:

270: Total reaction volume (ml)
21: Dilution factor for lysis
10^{12} : Factor for expressing activity in 10^{12} cells
20: sample volume (ml)
6.22: Milimolar absorptivity of NADPH at 340nm
$N \times 10^6$: Red cell count (red cells/mm^3) determined for each specimen
1000: Conversion of red cell count from mm^3 to ml
N: red cell count divided by 10^6

آدرس دفتر فروش:تهران، بلوار کشاورز، نبش خیابان قدس، شماره 41، طبقه پنجم. تلفن دفتر فروش: 02188954148-02188954156 نمابر:02188960464.
info@mancompany.com, www.mancompany.com

محاسبه فعالیت آنزیم در نمونه های غیر از Whole Blood که نیاز به انجام همولیز ندارند:

G6PD (U/L) = ΔA per min × 21704

مثال 1:

نتایج به دست آمده از آنالیز نمونه مربوط به یک بیمار به شرح زیر می باشد

RBC: $5.10 \times 10^6/\mu L$

Hb: 15.3 g/dL

ΔA per min at 37°C: 0.0651

G6PD (U/g Hb) = (0.0651 × 4557) / 15.3 = 19.4

G6PD ($U/10^{12}$RBC) = (0.0651 × 45758) / 5.10 = 581

مثال 2:

نتایج به دست آمده از آنالیز نمونه کنترل کیفی شرکت من (بدون نیاز به همولیز) به شرح زیر می باشد

Control low : ΔA per min at 37°C: 0.0331

Control high: ΔA per min at 37°C: 0.0790

G6PD (U/L) control low: 0.0331 × 21704 = 718 U/L

G6PD (U/L) control high: 0.0790 × 21704 = 1714 U/L

دامنه مرجع[7]:

برگرفته از کتاب Tietz, N.W., Clinical guide to laboratory tests

	U/g Hb (at 37°C)	$U/10^{12}$RBC(at 37°C)
Deficient	≤ 10.01	≤ 290
Intermediate	10.1 – 14.19	290 – 411
Sufficient	≥ 14.19	≥ 411

توصیه میگردد هر آزمایشگاه دامنه مرجع خود را تعیین کند.

کنترل کیفی:

جهت انجام کنترل کیفی داخلی توصیه می گردد از کنترل های تجاری

G6PD Control Low, REF: 613052

G6PD Control High, REF: 613053 که توسط شرکت من تامین می گردد استفاده شود.

ویژگی ها و کارآیی کیت:

محدوده اندازه گیری:

Measuring Range: 20 - 3000 U/L
Limit Of Blank (LOB): 0.000133 ΔA (2.8 U/L)
Limit Of Detection (LOD): 0.000204 ΔA (4.4 U/L)
Limit Of Quantification (LOQ): 0.0009 ΔA (19.5 U/L)

موارد بالاتر از 0.138 ΔA (3000 U/L) را به نسبت 1 قسمت از نمونه + 2 قسمت از کلرید سدیم 9 g/L رقیق نموده (1/3) و جواب آزمایش در عدد 3 ضرب شود.

(نتایج حاصله براساس دستگاه SELECTRA PROM می باشد)

دقت:

آزمایشها با استفاده از دستگاه اتوآنالایزر در دمای $37\ ^0C$ انجام شده است.

Within-run:

Level	n	Mean (U/L)	CV (%)
Low	20	717	0.4
High	20	1713	0.2

Between-run:

Level	n	Mean (U/L)	CV (%)
Low	20	726	1.3
High	20	1715	0.9

مقایسه روش ها:

در مقایسه انجام شده جهت ارزیابی کیت G6PD شرکت من (Y) با کیت تجاری G6PD (X) روش UV, Kinetic، بر روی40 نمونه بیمار با محدوده فعالیت 0.3-69.7 U/gHb نتایج زیر به دست آمده است:

Correlation Coefficient: (r)= 0.9985

Linear regression: Y= 0.9007 (x) + 0.43 mg/dL

ریکاوری:

نتایج به دست آمده از آزمون ریکاوری در محدوده 2.9 – 20.7 U/g Hb به شرح زیر می باشد:

Expected Data	Observed Data	Percent recovery
3.03 U/g Hb	2.9 U/g Hb	95.70%
4.4 U/g Hb	4.4 U/g Hb	100%
9.8 U/G Hb	9.4 U/g Hb	95.90%
15.6 U/g Hb	14.9 U/g Hb	95.70%
20.7 U/g Hb	20.7 U/g Hb	100%

عوامل مداخله گر:

کدورت:	کدورت ناشی از تری گلیسیرید تا غلظت 200 mg/dL باعث تداخل نمی شود.
بیلی روبین:	بیلی روبین تا غلظت 16 mg/dL باعث تداخل نمی شود.
گلوکز:	گلوکز تا غلظت 400 mg/dL باعث تداخل می شود.
هموگلوبین:	هموگلوبین تا غلظت 5g/L باعث تداخل نمی شود.
اسید آسکوربیک:	اسید اسکوربیک تا غلظت 20 mg/dL باعث تداخل نمی شود.

مراجع:

1. Burtis, C.A. & Ashwood, E.R.Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry, 5 thEd., (W.B. Saunders eds. Philadelphia USA), (1999), 1650-1645
2. Kornberg, A., Horecker, BL.: Glucose-6-phpsphate dehydrogenase. In metghods in enzymology. S.P. Colowick, n.O. Kaplan, Editors,col. I, academic press, New York, p323, 1995
3. Lohr G.W., waller, H.D.: Glucose-6-phpsphate dehydrogenase. In methods of enzymatic analysis. H.U. bergmeyer, editor, academic press, New York,p.636, 1974.
4. Tietz, N.W., Clinical guide to laboratory tests, 4rd Ed. (W.B. Saunders eds. Philadelphia USA), (2006), 444.
5. Beutler, E., Blume, K.G., Kaplan, C., Lohr, W., Ramont, B., Valentine, W.N.: International committee for standardization in hematology: Recommended screening test for G6PD. Bri J of haem, 43: 469-477, 1979.
6. Beutler, E., Et al, International committee for standardization in haematology: recommended method for red cell enzyme analysis. Br. J. Haematol., 35:331-340, 1977.
7. Tietz, N.W., Clinical guide to laboratory tests, 4rd Ed. (W.B. Saunders eds. Philadelphia USA), (2006), 456-457.

علائم:

	Temperature limitation	REF	Catalogue number
	Manufacture address		Expiration date
LOT	Batch code		Date of manufacture
IVD	In vitro diagnostic medical device	R1	Reagent 1
	Consult instruction for use	R2	Reagent 2

آدرس دفتر فروش:تهران، بلوار کشاورز، نبش خیابان قدس، شماره 41، طبقه پنجم. تلفن دفتر فروش: 02188954148-02188954156 نمابر:02188960464.
info@mancompany.com, www.mancompany.com