وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی
معاونت سلامت

برنامه غربالگری نوزادان
(برنامه G6PD)

متمـــم ۱

(شامل استانداردهای آزمایشگاهی G6PD و
نمودار های غربالگری کمبود G6PD
و فرایند ثبت و گزارش دهی شناسایی بیماران مبتلا به کمبودG6PD)

مرکز مدیریت بیماریها
اداره ژنتیک

نقش آزمایشگاه در برنامه غربالگری کمبود آنزیم G6PDدر نوزادان

ویرایش اول

مقدمه:

آنزیم Glucose 6 phosphate dehydrogenase در تمامی سلولهای بدن فعالیت داشته و بخش اول چرخه هگزوز مونو فسفات را کاتالیز می نماید.این مرحله منجر به تولید یک مول NADPH می گردد.

کمبود G6PD شایعترین آنزیموپاتی در دنیا می باشد .بیماری X linked بوده بیش از ۴۰۰ تایپ مختلف آن در دنیا شناسایی شده است. نشانه های بالینی بیماری هتروژن بوده به اشکال مختلفی مانند همولیز وابسته به دارو ، همولیز بدنبال عفونت ، فاویسم ، زردی نوزادان و آنمی مزمن همولیتیک غیر اسفروسیتی دیده می شود.

روند انجام نمونه گیری :

خونگیری در فاصله ۳ تا ۵ روز بعد از تولد و بر اساس روش استانداردکمیته ملی استاندارد آزمایشگاههای بالینی (NCCLS*) و مطابق باروش نمونه گیری دستورالعمل آزمایشگاهی غربالگری PKU ، انجام میشود .

نگهداری نمونه :

نمونه ها بدون اینکه با یکدیگر یا سایر مواد تماس یابند در دمای یخچال نگهداری می شوند. در مورد مدت زمان نگهداری نمونه ها اختلاف نظر وجود دارد . ولی بنظر می رسدلازم است نمونه ها در طی ۵روز از زمان نمونه گیری آزمایش شوند تا از افت کاذب آنزیم جلوگیری گردد.

روشهای آزمایشگاهی بررسی آنزیم G6PD

بررسی آنزیم G6PD به دو روش **کیفی** و**کمی** انجام می گردد. اساس هر یک از این روشها ذیلا توضیح داده می شود.

Fluorescent spot test (روش کیفی)

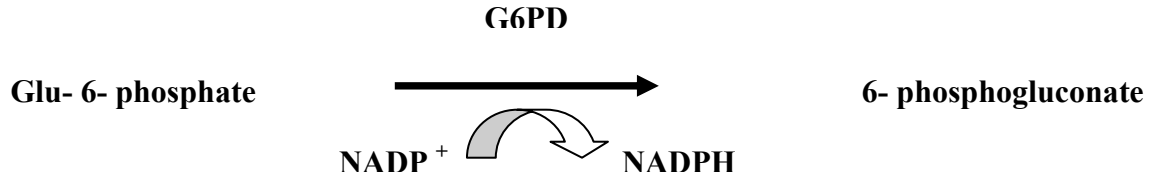
دراین روش کیفی که عموما برای غربالگری استفاده می شود ، $NADP^+$ تحت تاثیر G6PD و 6-PGD تبدیل به NADPH می شود . ایجاد NADPH منجر به ایجاد نور فلورسنتی می شود که بوسیله لامپ UV قابل مشاهده است.شدت فلورسانس با میزان آنزیم G6PD ارتباط دارد و بهمین دلیل نمونه های دارای مقادیر کافی G6PD زیر لامپ UV از فلورسانس قوی برخوردار می باشند، درحالیکه نمونه های فاقد آنزیم هیچ فلورسانسی نشان نمی دهند. افرادهتروزیگوت نتایج بینابینی با فلورسانس (شدت فلورسانس کمتر از افراد طبیعی) خواهند داشت.

محدودیتهای روش : *بسیاری از بیماران هتروزیگوت به این روش شناسایی نمیشوند.

*همولیز اخیر(بعلت افزایش رتیکولوسیتها) و وجود لکوسیتوز (تعداد لکوسیتها بیش از $۱۲*۱۰^۹$ در لیتر)نیز باعث اخذ کاذب نتیجه طبیعی می شود .

اندازه گیری G6PD بصورت کمی

اساس آزمایش در این روش، واکنش شیمیایی زیر می باشد. در صورت وجود مقادیر کافی G6PD ، واکنش انجام و تولید **NADPH** بصورت افزایش جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر قابل شناسایی خواهد بود .



انتخاب روش آزمایشگاهی برنامه کشوری غربالگری کمبود G6PDدر ایران

۱-غربالگری

در ایران باتوجه به توصیه بسیاری از مراجع بین المللی و بادر نظر گرفتن سهولت انجام ، روش Fluorescent spot test به عنوان روش غربالگری در کشور انتخاب شده است.

برای انجام آزمایش، از نمونه لکه خون خشک شده برروی فیلتر کاغذی Dried blood spot (DBS) مطابق با دستورالعمل نمونه گیری استفاده می گردد.

پس از انجام آزمایش ،مشاهده فلورسانس قوی زیر لامپ UV نشانگر کفایت آنزیم می باشد در حالیکه عدم وجود فلورسانس بیان کننده نقص در آنزیم است.کمبود نسبی آنزیم می تواند منجر به ایجاد فلورسانس ضعیف گردد.

در هریک از دو حالت اخیر (کمبود کامل یا نسبی آنزیم) لازم است ضمن بررسی شرایط نوزادو نتایج کنترلها درهمان سری کاری ،مجددا نمونه باروش فلورسنت آزمایش گردد.درصورت اخذ نتیجه مشابه ، لازم است آزمایش تائیدی (بروش کمی) برروی خون تام در ۱۲۰ روزگی انجام شود.

خلاصه مراحل انجام آزمایش غربالگری

نمونه مورد نیاز :	**خون مویرگی گرفته شده برروی فیلتر S&S903**
کیت وابزار مورد نیاز :	**لامپUV**
	سایر مواردمندرج در دستورالعمل کیت
	کیت مورد تایید طرح
متدآزمایش :	Fluorescent spot test
روش انجام آزمایش :	**روش انجام آزمایش مطابق دستورالعمل کیت**
نتیجه مورد انتظار در افراد طبیعی :	**مشاهده فلورسنت قوی زیر لامپ UV**

۲-تایید تشخیص با روش کمی

از نوزادانی که در مرحله غربالگری ، مشکوک به کمبود کامل یا نسبی آنزیم باشند، در ۱۲۰ روزگی ،نمونه گیری وریدی بعمل آمده و بررسی تکمیلی آنزیمG6PD با استفاده از روش کمی، انجام می پذیرد.

خلاصه مراحل انجام آزمایش تاییدی

نمونه مورد نیاز : خون تام وریدی همراه با ضد انعقاد

کیت وابزار مورد نیاز : دستگاه تجزیه گر خودکار یا فتومتر مجهز به سیستم UV

سمپلر

کنترل

سایرموارد لازم براساسSOP

متدآزمایش : کینتیک

Cut off : با توجه به محدوده مرجع کیت

تضمین کیفیت در آزمایشگاه غربالگری G6PD

علاوه بررعایت تمامی موارد مندرج در بخش تضمین کیفیت مندرج در بخش تضمین کیفیت در آزمایشگاه غربالگری PKU باید موارد زیر را نیز در نظر گرفت.

در مورد اندازه گیری G6PDنیز در روش فلورسنت حتما باید در هر سری کاری از کنترلهای مثبت و منفی استفاده نمودتا هرگونه خطا در هر بخش از آزمایش ،قبل از گزارش نتیجه بیمار شناسایی و رفع گردد.مشاهده فلورسنت توسط افراد با تجربه از خطای کاری می کاهد.

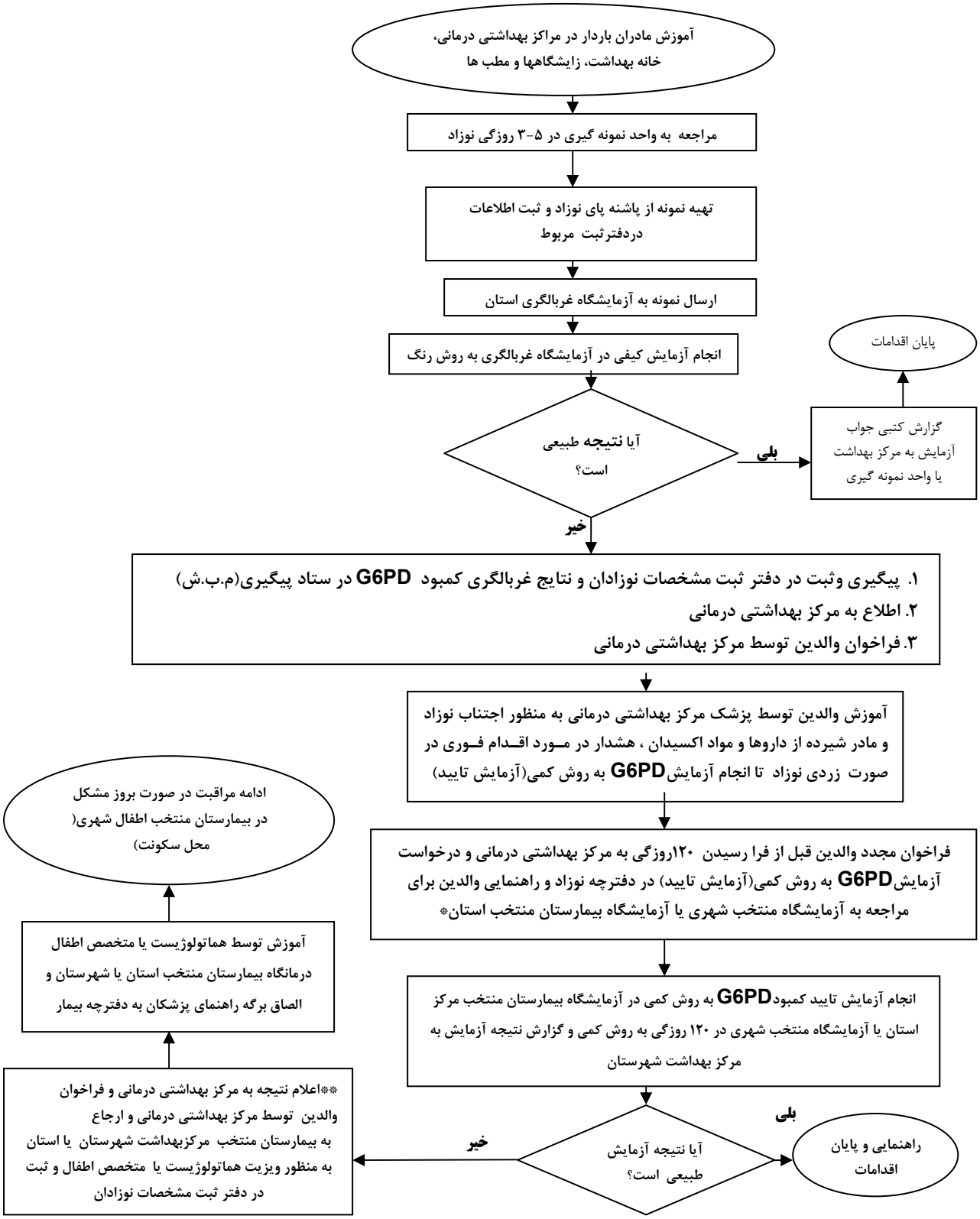
در مورد اندازه گیری کمی که در ۱۲۰ روزگی انجام می شود باید به قابلیت عملکرد کیت خصوصا میزان تکرارپذیری و درستی نتایج که برحسب CV% و% Bias بیان می‌شود ، توجه داشت. ازنظر مراجع بین المللی مقدار خطای مجازبرای اندازه‌گیری کمی G6PD برابر با 38/5% میباشد ، این مقدار خطا بدین معناست که اگر مقدار

واقعی G6PD در نمونه‌ای ۱۰mg/dl باشد ، در بهترین شرایط که تمامی منابع ایجاد خطا تحت کنترل است ، نتایج ممکن است در محدوده mg/dl ۶٫۲-۱۳٫۸ قرائت گردد.

Reference:

1. Norbert W. Tietz: Fundamentals of clinical chemistry. W.B. SANDERS COMPANY.,2006
2. *Semiquantitative screening test for G6PD deficiency detects severe deficiency but misses a substantial proportion of partially-deficient females Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2003 Jun;34(2):405-14*
3. Evaluation of the blue formazan spot test for screening glucose 6 phosphate dehydrogenase deficiency. **1:** Int J Hematol. 1999 Jun;69(4):234-6
4. www.rddiagnostics.com/**g6pd**_faq.htm
5. Current databases on biologic variation: pros, cons and progress." Scand J Clin Lab Invest 1999;59:491-500.

نمودار غربالگری کمبود G6PD



* چنانچه افراد ساکن مرکز استان هستند می توانند مستقیما" به آزمایشگاه منتخب استان مراجعه نمایند.

**در مراکز استانی ترجیحا" بیمارستان منتخب تعیین شده دارای بخش هماتولژی باشد و یک هماتولوژیست به عنوان پزشک متخصص برنامه تعیین گردد. در صورت عدم وجود بخش هماتولوژی در بیمارستان مرکز استان، بیمارستانی که دارای بخش تخصصی اطفال است به عنوان بیمارستان منتخب تعیین شود. و درمانگاه هماتولوژی (یا اطفال) برای انجام وظایف فوق توجیه شوند.

بیمارستان های دارای بخش نوزادان در شهر باید نسبت به طرح توجیه شده و فرم لیست خطی را در اختیار داشته باشند تا در صورت مراجعه نوزادان تکمیل و درموعد مقرر به مرکز بهداشت ارسال نمایند.

نمودار فرایند ثبت و گزارش دهی شناسایی بیماران مبتلا به کمبود G6PD

نمودار ۱ :

ثبت و گزارشدهی بیمارانی که قبلا" شناسایی شده (یا هنگام بستری در بیمارستان تشخیص داده می شوند)ومجددا"به بیمارستان مراجعه و بستری می شوند و علت بستری عوارض بیماری است.

نمودار۲:

بعد از تشخیص کمبودG6PDدر نوزاد ثبت و گزارش دهی اطلاعات مطابق نمودار زیر انجام میشود.

*این فرم در تمام بیمارستان های تخصصی اطفال و بیمارستانهای دارای بخش هماتولوژی تکمیل می شود. براساس دستور معاونت سلامت هر بیمارستان باید یک فرد را برای جمع آوری و ارسال فرم های اطلاعاتی بیماریهای غیر واگیر تعیین شود. که می توان از آن در این برنامه بهره گرفت.