تحقیقی

مقایسه روش‌های فلورسانت نقطه‌ای، دکولوراسیون و اندازه‌گیری کمی آنزیمی در تشخیص نقص در عملکرد آنزیمی گلوکز-٦- فسفات دهیدروژناز نوزادان

دکتر مهرنوش کوثریان[۱]، دکتر محمدرضا مهدوی*[۲]، حسین جلالی[۳]، پیام روشن[٤]

۱- استاد، گروه بیماری‌های کودکان، مرکز تحقیقات تالاسمی، پژوهشکده هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران. ۲- استادیار، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران. ۳- دانشجوی دکتری پژوهشی تالاسمی، مرکز تحقیقات تالاسمی، پژوهشکده هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران.
٤- کارشناس ارشد ایمنی‌شناسی، گروه پژوهشی سینای مهر ساری.

چکیده

زمینه و هدف : *برنامه غربالگری کشوری برای شناسایی نوزادان مبتلا به نقص در عملکرد آنزیمی گلوکز-٦- فسفات دهیدروژناز (G6PD) قادر نیست تمامی مبتلایان را شناسایی کند. این مطالعه به منظور مقایسه روش‌های فلورسانت نقطه‌ای، دکولوراسیون و اندازه‌گیری کمی آنزیمی در تشخیص نقص عملکردی G6PD نوزادان انجام شد.*

روش بررسی : *در این مطالعه توصیفی نمونه‌های خون بندناف ۳٦٥ نوزاد بلافاصله پس از تولد جمع‌آوری و تست دکولوراسیون، اندازه‌گیری کمی آنزیمی و تست DNA انجام گردید. نوزادان مورد مطالعه وارد برنامه غربالگری کشوری G6PD شدند که در آن تست فلورسانت نقطه‌ای روی نمونه‌های پاشنه پا و در روز سوم الی پنجم پس از تولد صورت می‌پذیرد. در تمامی نوزادان تست اندازه‌گیری کمی به‌عنوان استاندارد طلایی در نظر گرفته شد. براساس نتایج تست اندازه‌گیری کمی آنزیمی، نوزادان با فعالیت آنزیمی کمتر از ۲۰ درصد میانگین فعالیت آنزیمی به‌عنوان بیمار کامل و نوزادان با فعالیت آنزیمی ٦۰- ۲۰ درصد میانگین فعالیت آنزیمی به‌عنوان بیمار جزیی تقسیم‌بندی شدند.*

یافته‌ها : *تست فلورسانت نقطه‌ای ۱۳ مورد را شناسایی کرد که همگی آنها پسر بودند. تست دکولوراسیون ۱۸ پسر و یک دختر را به‌عنوان بیمار شناسایی کرد. تست اندازه‌گیری کمی آنزیمی نیز موفق به شناسایی ۱۹ بیمار پسر و ۲۸ بیمار دختر (۲٦ نفر با نقص آنزیمی جزیی و ۲ نفر با نقص آنزیمی کامل) شد. آنالیز DNA نیز ۱٤ نوزاد پسر را در حالت همی‌زیگوت و ۳٤ دختر را به صورت هتروزیگوت شناسایی کرد.*

نتیجه‌گیری : *تست فلورسانت نقطه‌ای دارای حساسیت لازم برای شناسایی تمامی نوزادان نیست. لذا توصیه می‌گردد تا از روش اندازه‌گیری کمی به‌عنوان روش جایگزین استفاده گردد.*

کلید واژه‌ها : *G6PD ، تست فلورسانت نقطه‌ای ، تست دکولوراسیون، تست اندازه‌گیری کمی آنزیمی ، تست DNA*

* نویسنده مسؤول : دکتر محمدرضا مهدوی ، پست الکترونیکی info@fajrlaboratory.com
نشانی : ساری، ابتدای بلوار کشاورز، ساختمان دکتر دادخواه، آزمایشگاه تشخیص پزشکی فجر، تلفن ۳۳٤۱۱۱۰۳-۰۱۱، نمابر ۳۳۲۹۲۹۲۹
وصول مقاله : ۱۳۹۳/۳/۱۹ ، اصلاح نهایی : ۱۳۹۳/۱۰/۲۲ ، پذیرش مقاله : ۱۳۹٤/۲/۱۳

مقدمه

براساس گزارشات سازمان بهداشت جهانی، نرخ شیوع نقص در عملکرد آنزیم گلوکز ۶- فسفات دهیدروژناز در ایران ۱۴/۹-۱۰ درصد است (۱) و بیشترین فراوانی در استان‌های شمالی (۱۶/۴-۸/۶ درصد)، جنوب شرق (۱۹/۳ درصد) و جنوب ایران (۱۲ درصد در شیراز) گزارش شده است (۲). سازمان بهداشت جهانی در کشورهایی با نرخ شیوع نقص عملکردی آنزیم G6PD در بیش از ۵-۳ درصد جمعیت مردان؛ غربالگری تمامی نوزادان را به منظور شناسایی افراد مبتلا به این بیماری وابسته به جنس مغلوب توصیه می‌کند (۱). طبق گزارشات قبلی فراوانی این بیماری در ایران بالاتر از گستره ذکر شده است (۳و۴). از آنجایی که این نقص آنزیمی در چندین کشور در حال توسعه بالا است؛ یافتن یک روش آزمایشگاهی ساده و ارزان که بتواند افراد در معرض خطر را شناسایی کند؛ می‌تواند بسیار حائز اهمیت باشد.

به منظور غربالگری نوزدان مبتلا به این نقص آنزیمی تست‌های مختلفی وجود دارد تست‌های Methemoglobin Reduction، دکلوروزاسیون و تست فلورسانت نقطه‌ای (FST) در کشورهای مختلف برای این منظور استفاده می‌شوند. تمامی این تست‌ها،

Archive of SID
www.SID.ir

نیمه‌کمی بوده و افراد را به دو دسته طبیعی و غیرطبیعی از لحاظ نقص در آنزیم G6PD دسته‌بندی می‌کنند. در ایران تست فلورسانت نقطه‌ای که در ابتدا توسط Beutler شرح داده شده بود؛ مورد استفاده قرار می‌گیرد (۵).

برنامه کشوری به منظور غربالگری نقص عملکردی آنزیم G6PD روی تمامی نوزادان زنده متولد شده از خرداد ماه ۱۳۸۵ انجام می‌شود. به منظور غربالگری ابتدا نمونه خون پاشنه پا از تمامی نوزادان در روز ۳ الی ۵ بعد از تولد جمع‌آوری می‌گردد و تست FST بر روی آن انجام می‌شود. سپس یک تست تاییدی کمی که سطح آنزیم فعال خون را اندازه‌گیری (QEA) می‌کند؛ در روز ۱۲۰ بعد از تولد روی نمونه‌های مثبت انجام می شود (۸-۶). در مطالعات قبلی، ما نتایج سه سال غربالگری را منتشر نمودیم و نتایج حاصل نشان داد که امکان دارد روش مورد استفاده تعدادی از نوزادان را شناسایی نکند (۹). لذا این مطالعه به منظور مقایسه روش‌های فلورسانت نقطه‌ای، دکولوراسیون و اندازه‌گیری کمی آنزیمی در تشخیص نقص عملکردی G6PD نوزادان انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی روی ۳۶۵ نوزاد (۱۷۴ پسر و ۱۹۱ دختر) متولد شده در بیمارستان امیرمازندرانی شهرستان ساری طی سال ۱۳۹۲ انجام شد. والدین همه نوزادان شرکت کننده در مطالعه اعلام رضایت نمودند تا از نمونه‌های خون فرزندانشان در انجام طرح‌های تحقیقاتی استفاده گردد.

نمونه‌های خون بندناف بعد از تولد از سمت جفت جمع‌آوری گردید و تست‌های دکولوراسیون، اندازه‌گیری کمی آنزیمی و آنالیز DNA روی نمونه‌ها انجام شد. سپس نوزادان وارد برنامه کشوری غربالگری G6PD (تست فلورسانت نقطه‌ای) شدند که در مراکز بهداشت انجام می‌شد و از نمونه‌های خون پاشنه پا در روز سوم لغایت پنجم پس از تولد برای تشخیص بیماران G6PD استفاده می‌شد.

برای انجام تست نیمه کمی دکولوراسیون از یک کیت تجاری (صبا آزمون، ایران) استفاده شد.

به‌منظور اندازه‌گیری کمی سطح آنزیم G6PD از کیت تجاری شرکت بهار افشان (ساخت ایران) استفاده گردید که سطح دقیق فعالیت آنزیم G6PD را بر حسب واحد در هر گرم هموگلوبین (U/g Hb) نشان می‌دهد.

برای انجام بررسی‌های مولکولی، DNA ژنومی تمامی نوزادان از خون بندناف با استفاده از روش استاندارد فنل- کلروفرم استخراج گردید. سپس از روش PCR-RFLP برای شناسایی ۳ جهش شایع در منطقه با نام‌های Mediterranean (563 C→T)، Chatham (1003 G→A) و Cosenza (1376 G→C) استفاده شد. برای شناسایی این جهش‌ها به ترتیب آنزیم‌های محدود کننده MboII، BstXI و Bsu36I استفاده شدند. محصولات حاصل از هضم آنزیمی بر روی ژل آگارز ۳درصد لود شدند و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید زیر نور UV آنالیز شدند.

تست فلورسانت نقطه‌ای بر روی تمامی نمونه‌ها به‌عنوان بخشی از برنامه غربالگری کشوری در آزمایشگاه رفرانس دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شد. نمونه‌های مورد استفاده، یک قطره خون پاشنه پا بود که بر روی کاغذهای خاص پانچ شده بود. برای انجام تست از کیت تجاری کیمیا پژوهان (ساخت ایران) استفاده شد و تست براساس راهنمای موجود در کیت انجام گردید.

در همه نوزادان تست اندازه‌گیری کمی فعالیت آنزیمی به‌عنوان تست استاندارد طلایی در نظر گرفته شد.

براساس نتایج تست اندازه‌گیری کمی آنزیمی، نوزادان با فعالیت آنزیمی کمتر از ۲۰درصد میانگین فعالیت آنزیمی به‌عنوان بیمار کامل و نوزادان با فعالیت آنزیمی ۶۰-۲۰ درصد میانگین فعالیت آنزیمی به‌عنوان بیمار جزیی تقسیم‌بندی شدند.

نوزادان با فعالیت آنزیمی کمتر از ۹/۶ U/g Hb به عنوان افراد با نقص آنزیمی کامل و نوزادان با فعالیت آنزیمی بین ۹/۶-۲۸/۸ U/g Hb به عنوان نوزادان با نقص آنزیمی جزیی طبقه‌بندی شدند.

حساسیت، اختصاصیت، positive predictive value (PPV) و negative predictive value (NPV) هر تست در مقایسه با استاندارد طلایی بررسی شدند.

یافته‌ها

میانگین فعالیت آنزیم گلوکز ۶- فسفات دهیدروژناز در نوزادان با نتیجه منفی تست دکولوراسیون، ۱۱/۷±۴۸ U/g Hb بود.

براساس نتایج تست فلورسانت نقطه‌ای، ۱۳نوزاد پسر دارای نقص آنزیمی بودند (۱۱/۴۱-۳/۵۹ : 95% CI ، ۷/۵درصد).

تست دکولوراسیون موفق به شناسایی ۱۸ مورد در پسران شد (۱۴/۸۲-۵/۷۸ : 95% CI ، ۱۰/۳درصد).

روش اندازه‌گیری کمی آنزیمی ۱۹ نوزاد پسر را به‌عنوان بیمار کامل شناسایی کرد (۱۵/۵۳-۶/۲۷ : 95% CI، ۱۰/۹ درصد).

تست DNA نشان داد ۱۴ نوزاد پسر دارای یک جهش در ژن G6PD هستند.

هیچ نوزاد دختری با استفاده از تست فلورسانت نقطه‌ای به‌عنوان بیمار شناسایی نشد. در حالی که تست دکولوراسیون دو نفر را به‌عنوان بیمار شناسایی کرد (۲/۴۸-۰/۲۸ : 95% CI ، ۱/۱ درصد).

در روش اندازه‌گیری کمی ۲۸ نوزاد دختر به‌عنوان بیمار مبتلا به نقص عملکردی آنزیم G6PD شناسایی شدند که از این تعداد ۲۶ نوزاد دارای نقص آنزیمی جزیی و ۲ نوزاد دارای نقص کامل

www.SID.ir

جدول ۱ : مقایسه قدرت تشخیصی تست‌های فلورسانت نقطه‌ای و دکولوراسیون برای نقص عملکردی آنزیم G6PD در مقایسه با تست اندازه‌گیری کمی به عنوان استاندارد طلایی در نوزادان پسر و دختر

نوزادان	متغیرها	تست فلورسانت نقطه‌ای	تست دکولوراسیون
پسر	مثبت واقعی	۱۳ از ۱۹	۱۸ از ۱۹
	منفی واقعی	۱۵۵ از ۱۵۵	۱۵۵ از ۱۵۵
	مثبت کاذب	صفر از ۱۵۵	صفر از ۱۵۵
	منفی کاذب	۶ از ۱۹	۱ از ۱۹
	حساسیت تست	۶۸ درصد	۹۵ درصد
	اختصاصیت تست	۱۰۰ درصد	۱۰۰ درصد
	Positive predictive value	۱۰۰ درصد	۱۰۰ درصد
	Negative predictive value	۹۶ درصد	۹۹ درصد
دختر	مثبت واقعی	۲ از ۲۸	۰ از ۲۸
	منفی واقعی	۱۶۳ از ۱۶۳	۱۶۳ از ۱۶۳
	مثبت کاذب	صفر از ۱۶۳	صفر از ۱۶۳
	منفی کاذب	۲۶ از ۲۸	۲۸ از ۲۸
	حساسیت تست	۷ درصد	۰ درصد
	اختصاصیت تست	۱۰۰ درصد	۱۰۰ درصد
	Positive predictive value	۱۰۰ درصد	۰ درصد
	Negative predictive value	۸۶ درصد	۸۵ درصد

آنزیمی بودند. دو نوزاد با شناسایی نقص کامل آنزیمی، با تست دکولوراسیون نیز شناسایی شده بودند.

تست DNA نشان داد ۳۴ نوزاد دختر هتروزیگوت برای یکی از سه جهش بررسی شده بودند (۱۲/۳۸-۲۳/۲۲ : CI 95%، ۱۷/۸ درصد). در بین جهش‌های یافت شده، جهش مدیترانه‌ای دارای بیشترین (۲۴ مورد) فراوانی بود (۱۷-۸ : CI 95%، ۱۲/۵ درصد).

جهش Chatham دارای دومین فراوانی (۷ مورد) بود (۶/۴-۱ : CI 95%، ۳/۷ درصد). جهش Cosenza نیز کمترین فراوانی (۳ مورد) را داشت (۳/۴-۰/۲ : CI 95%، ۱/۶ درصد).

جدول یک قدرت تشخیصی تست‌های فلورسانت نقطه‌ای و تست دکولوراسیون را در مقایسه با روش اندازه‌گیری کمی به‌عنوان استاندارد طلایی نشان می‌دهد.

بحث

مطالعه حاضر نشان داد تست فلورسانت نقطه‌ای قادر به شناسایی هیچیک از نوزادان دختر مبتلا نیست که این یک نقطه ضعف حیاتی برای تست به حساب می‌آید. اگرچه بیماری نقص آنزیمی G6PD یک بیماری وابسته به جنس مغلوب است؛ اما تمامی مبتلایان به این بیماری پسر نیستند و درصدی از دختران را نیز مبتلا می‌کند. در دخترانی که هوموزیگوت و یا هتروزیگوت مرکب برای جهش‌های مختلف بیماری هستند و همچنین دخترانی که مبتلا به سندرم ترنر هستند و دارای جهش در ژن G6PD نیز هستند؛ بیماری به همان شدتی که در پسران مبتلا بروز پیدا می‌کند؛ تظاهر می‌یابد. در دختران هتروزیگوت، بیماری نقص آنزیمی G6PD به‌علت پدیده لیونیزاسیون (غیر فعال شدن کروموزوم X) با شدت‌های متفاوتی بروز پیدا می‌کند.

مطالعه ما نشان داد در حدود ۱۸ درصد از جمعیت دختران در استان مازندران ناقل یکی از سه جهش شایع بررسی شده هستند. اگرچه همگی آنها مستعد بروز همولیز نیستند؛ اما آنها ناقل جهش‌های بیماری‌زا بوده و بیماری می‌توانند در فرزندان پسرآنها بروز پیدا کند. بنابراین هر تستی که بتواند دختران ناقل را شناسایی کند؛ برای برنامه غربالگری مناسب‌تر خواهد بود. اولین بررسی ما بر روی ۱۰۰۰ نوزاد با استفاده از روش فلورسانت نقطه‌ای که در مطالعه حاضر صحت آن مورد ارزیابی قرار گرفت؛ نشان داد ۳ درصد از بیماران مبتلا به نقص آنزیمی G6PD دختر هستند (۳).

مطالعات مختلفی به بررسی فراوانی شیوع این بیماری در استان مازندران پرداخته اند. در مطالعه زاهد پاشا و همکاران (۱۰) روی نمونه خون بندناف ۱۰۰۰ کودک با استفاده از تست فلورسانت نقطه‌ای؛ ۱۲/۵ درصد از نوزادان پسر در استان مازندران مبتلا به این نوع از نقص آنزیمی بودند. در مطالعه هاشمی و همکاران در شهرستان آمل فراوانی این بیماری با استفاده از تست فلورسانت نقطه‌ای ۱۱/۲ درصد در پسران و ۱/۴ درصد در دختران گزارش شد (۱۱). فراوانی این بیماری در مطالعه احمدی و قاضی‌زاده در شهرستان ساری ۱۳/۶ درصد گزارش شد (۱۲).

در برنامه غربالگری کشوری بعد از بررسی ۱۱۵۶۲۲ نوزاد که ۵۱/۴درصد از آنان پسر بودند؛ مشخص شد نقص در عملکرد آنزیم G6PD در ۶/۱ درصد از نوزادان وجود دارد و نسبت پسران به دختران مبتلا ۶/۱ به ۱ بود. به عبارت دیگر ۸۶/۱ درصد از مبتلایان پسر و ۱۳/۹درصد دختر بودند(۹). مطالعه ما نشان داد درصد زیادی از نوزادان که اغلب آنان دختران مبتلا به نقص آنزیمی جزیی

Archive of SID
www.SID.ir

هستند؛ طی فرآیند غربالگری شناسایی نمی‌شوند و فراوانی نوزادان مبتلا بالاتر از مقداری است که قبلاً گزارش شده است.

مطالعه حاضر نشان داد روش نیمه کمی دکولوراسیون بر روی نمونه‌های خون بندناف نسبت به روش فلورسانت نقطه‌ای بر روی نمونه‌های خون پاشنه پا به منظور شناسایی مبتلایان به نقص آنزیمی G6PD از صحت عملکرد بالاتری برخوردار است (حساسیت ۹۵درصد در برابر ۶۸درصد در شناسایی نوزادان پسر مبتلا). با این وجود تست دکولوراسیون نتوانست ۵ درصد از مبتلایان به نقص کامل آنزیمی را شناسایی کند و همانند روش فلورسانت نقطه‌ای قادر به شناسایی هیچیک از دختران مبتلا به نقص آنزیمی جزیی نبود.

روش اندازه‌گیری کمی آنزیمی توانست ۶۰درصد از نوزادان هتروزیگوت را تشخیص دهد و در حدود ۴۰درصد از نمونه‌هایی که توسط تست DNA هتروزیگوت تشخیص داده شدند؛ با استفاده از روش اندازه‌گیری کمی آنزیمی طبیعی گزارش شدند. این نوزادان به خاطر پدیده لیونیزاسیون و بیان بیشتر ژن سالم در معرض خطر کمتری برای بروز همولیز قرار دارند. از سوی دیگر در ۶ نفر از ۲۱ نوزادی که با استفاده از روش اندازه‌گیری کمی بیمار کامل تشخیص داده شدند؛ با استفاده از تست DNA جهش‌های شایع یافت نشدند که احتمالاً دارای سایر جهش‌های نادری هستند که در این مطالعه بررسی نشدند.

در مطالعه کهن و همکاران بیمارانی که بعد از شروع برنامه غربالگری به خاطر همولیز حاد (فاویسم) در بیمارستان بستری شدند؛ بررسی گردیدند. آنها از روش نورسنجی کمی با استفاده از کیت Sigma (ساخت آمریکا) به شناسایی بیماری نقص آنزیمی G6PD پرداختند. نتایج نشان داد تقریباً ۸۰درصد از نوزادان بستری به‌دلیل بیماری نقص آنزیمی G6PD، اشتباهاً به وسیله روش فلورسانت نقطه‌ای سالم تشخیص داده شده بودند (۱۳). این گزارش نتایج بررسی ما مبنی بر این که تست فلورسانت نقطه‌ای مورد استفاده در برنامه غربالگری قادر به شناسایی تعداد زیادی از نوزادان مبتلا به نقص آنزیمی نیست را تایید می‌کند.

در مطالعه Ainoon و همکاران روی جمعیت مالایی در مالزی تست فلورسانت نقطه‌ای مورد استفاده در غربالگری تنها قادر به شناسایی ۷/۵ درصد از نمونه‌های هتروزیگوت بود. در حالی که تست اندازه‌گیری کمی ۵۳ درصد (۳۵ از ۶۷ نفر) از دختران هتروزیگوت را شناسایی نمود (۳۱ نفر به عنوان نقص جزیی و ۴ نفر به‌عنوان نقص کلی آنزیمی). در مطالعه حاضر هیچیک از نوزادان دختر هتروزیگوت با استفاده از روش فلورسانت نقطه‌ای شناسایی نشدند. در حالی که ۶۰ درصد از آنها (دختران هتروزیگوت) با استفاده از تست اندازه‌گیری کمی آنزیمی تشخیص داده شدند (۱۴). در مقایسه با نتایج مطالعه ذکر شده تست فلورسانت نقطه‌ای در مطالعه حاضر قادر به شناسایی هیچیک از بیماران هتروزیگوت نبود. در حالی که در هر دو مطالعه تست اندازه‌گیری کمی آنزیمی توانست نسبت زیادی از هتروزیگوت‌ها را تشخیص دهد. بنابراین تست اندازه‌گیری کمی آنزیمی به منظور استفاده در برنامه غربالگری مناسب‌تر است.

Wang و همکاران نیز به منظور شناسایی تستی که قادر به پیش‌بینی هیپربیلی روبینمیا باشد؛ به مقایسه نتایج سه تست مبادرت ورزیدند. مطالعه مذکور روی ۷۵ نوزاد دارای هیپربیلی‌روبینمیا شدید و ۱۲۵ نوزاد سالم صورت پذیرفت. برای همه نوزادان تست‌های FST، اندازه‌گیری کمی آنزیمی و تست DNA انجام شد. تست FST ۲۷ نوزاد را بیمار تشخیص داد که همگی آنها دارای سطح آنزیمی پایین‌تر از طبیعی بودند. تست اندازه‌گیری کمی با cut off ۸/۵ U/g Hb ۳۹ نوزاد را به‌عنوان بیمار تشخیص داد و با استفاده از تست DNA نیز در ۲۷ نفر جهش مربوطه شناسایی شد. نتایج پژوهش مذکور نشان داد تست اندازه‌گیری کمی آنزیمی مناسب‌تر از سایر تست‌ها به منظور پیشگویی هیپربیلی‌روبینمیای شدید است (۱۵). مطالعه حاضر نیز نتایج مطالعه ذکر شده را تایید می‌نماید.

در مطالعه Reclos و همکاران کارایی برنامه غربالگری در شناسایی بیماران دارای نقص آنزیمی جزیی G6PD با استفاده از روش اندازه‌گیری کمی آنزیمی به‌عنوان استاندارد طلایی در یونان بررسی شد. تست فلورسانت نقطه‌ای ۳/۲ درصد و تست اندازه‌گیری کمی آنزیمی ۵/۵ درصد از نوزادان را به‌عنوان بیمار شناسایی کرد. با استناد به نتایج آن بیماری تست فلورسانت نقطه‌ای درصد قابل‌ملاحظه‌ای از نوزادان دختر دارای نقص جزیی آنزیمی را تشخیص نداد و توصیه شد تا تست فلورسانت نقطه‌ای با تست مطمئن‌تری مانند تست اندازه‌گیری کمی آنزیمی جایگزین گردد (۱۶).

ایرانپور و همکاران نیز نتایج برنامه غربالگری در استان اصفهان را منتشر کردند که در آن از تست اندازه‌گیری کمی آنزیمی (کیت GAMMA ساخت بلژیک) به منظور اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم G6PD در ۲۵۰۱ نوزاد استفاده گردید. در استان اصفهان فراوانی بیماری در نوزادان ۳/۲درصد و نسبت نوزادان مبتلای پسر به دختر ۵/۵ به ۱ گزارش شد. البته بیماران به دو گروه بیماران با نقص کامل و نقص جزیی آنزیمی طبقه‌بندی نشده بودند. میانگین فعالیت آنزیم G6PD در نوزادان برابر با ۱۲ U/g Hb ±۳۵/۱ بود و نوزادانی با فعالیت آنزیمی پایین‌تر از ۶/۴ U/g Hb به‌عنوان بیمار در نظر گرفته شدند. (۱۷). البته می‌بایست مد نظر داشت تعیین حد نصاب فعالیت طبیعی آنزیمی برای تست‌های اندازه‌گیری کمی فعالیت

www.SID.ir

Archive of SID

آنزیمی در هر جمعیت می‌بایست به‌طور جداگانه محاسبه گردد که این می‌تواند دلیلی بر اختلاف در حد نصاب طبیعی فعالیت آنزیمی در دو مطالعه باشد. در مطالعه مشابه دیگری در تایلند Nantakomol و همکاران به مقایسه نتایج تست‌های فنوتیپی (فلورسانت نقطه‌ای، تست methemoglobin reduction، تست اندازه‌گیری کمی آنزیمی و تست سیتوشیمیایی) و تست DNA که ۵ جهش شایع در منطقه را شناسایی می‌نماید؛ پرداختند. در آن مطالعه تست‌های فلورسانت نقطه‌ای و methemoglobin reduction توانست تمام پسران مبتلا و دختران دارای نقص کامل آنزیمی که هوموزیگوت برای جهش‌ها بودند را به درستی تشخیص دهد. همچنین این تست‌ها توانست ۵۰ درصد از دختران هتروزیگوت را نیز شناسایی کند (۱۸). اگرچه در آن مطالعه تست سیتوشیمیایی توانست هتروزیگوت‌ها را با دقت بیشتری شناسایی کند؛ ولی تست اندازه‌گیری کمی آنزیمی نیز قادر بود تا ۸۳درصد از تمامی مبتلایان را شناسایی کند. بخشی از این مطالعه که در خصوص فلورسانت نقطه‌ای است؛ مطابق با نتایج مطالعه حاضر نیست و می‌تواند به خاطر وجود تفاوت در اجرای تست باشد که منجر به ایجاد حساسیت متفاوت در تست می‌شود.

براساس نتایج مطالعه حاضر قویاً پیشنهاد می‌گردد تا تست فلورسانت نقطه‌ای مورد استفاده در برنامه غربالگری با تست مطمئن‌تری مانند اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی جایگزین گردد که قادر است تمامی مبتلایان به نقص کامل آنزیمی و اغلب مبتلایان به نقص جزیی آنزیمی G6PD را شناسایی کند.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که تست فلورسانت نقطه‌ای دارای حساسیت لازم برای شناسایی تمامی نوزادان نیست.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی (شماره ۷۰-۹۱) مصوب معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران بود و با حمایت مالی آن معاونت محترم به انجام رسید.

References

1. WHO. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. WHO Working Group. Bull World Health Organ. 1989; 67(6):601-11.

2. Farhud DD, Yazdanpanah L. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) Deficiency. Iranian J Publ Health, 2008; 37(4): 1-18.

3. Mahdavi MR, Kosaryan M, Mortazavi A, Sangsefidi SH. [The screening of G6PD deficiency in newborns of Sari, 1996]. J Mazandaran Univ Med Sci. 1997; 8: 22-4. [Article in Persian]

4. Zahedpasha Y, Ahmadpour M, Zahedpasha A. [Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency]. J Babol Univ Med Sci. 2006; 8(1): 122-14. [Article in Persian]

5. Orkin SH, Nathan DG, Ginsburg D, Look AT, Fisher DE, Lux S. Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood. 7th. Philadelphia: Saunders Company. 2009; pp: 883-907.

6. Beutler E. Study of glucose-6-phosphate dehydrogenase: history and molecular biology. Am J Hematol. 1993 Jan;42(1):53-8.

7. Beutler E. G6PD deficiency. Blood. 1994 Dec; 84(11):3613-36.

8. Beutler E, Vulliamy TJ. Hematologically important mutations: glucose-6-phosphate dehydrogenase. Blood Cells Mol Dis. 2002 Mar-Apr; 28(2):93-103.

9. Kosaryan M, Nasehi MM, Karami H, Parsaii MR, Mahdavi MR, Zakizadeh R, Shahmohammadi S. Neonatal screening for G6PD deficiency in Mazandaran Province, Iran 2007-2010. Iran J Blood Cancer. 2010; 2(4):113-16.

10. ZahedPasha Y, Ahmad Pour M, ZahedPasha A. [Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency]. J Babol Univ Med Sci. 2006; 8(1): 114-22. [Article in Persian]

11. Hashemi SA, Zahed Pasha Y, Haji Ahmadi M, Alaei B. [Prevalence of G6PD deficiency among primary school students in Amol]. J Babol Univ Med Sci. 2005; 7(1): 52-6. [Article in Persian]

12. Ahmadi A, Ghazizadeh Z. Evaluation of neonatal hyperbilirubinemia at Mazandaran Province of Iran in 2004-2007: prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Research Journal of Biological Sciences. 2008; 3(8): 934-9.

13. Cohan N, Karimi M, Khalili AH, Falahzadeh MH, Samadi B, Mahdavi MR. The efficacy of a neonatal screening programme in decreasing the hospitalization rate of patients with G6PD deficiency in southern Iran. J Med Screen. 2010;17(2):66-7. doi: 10.1258/jms.2010.009105.

14. Ainoon O, Alawiyah A, Yu YH, Cheong SK, Hamidah NH, Boo NY, et al. 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.

15. Wang FL, Boo NY, Ainoon O, Wong MK. Comparison of detection of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency using fluorescent spot test, enzyme assay and molecular method for prediction of severe neonatal hyperbilirubinaemia. Singapore Med J. 2009 Jan; 50(1):62-7.

16. Reclos GJ, Hatzidakis CJ, Schulpis KH. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency neonatal screening: preliminary evidence that a high percentage of partially deficient female neonates are missed during routine screening. J Med Screen. 2000; 7(1):46-51.

17. Iranpour R, Hashemipour M, Talaei SM, Soroshnia M, Amini A. Newborn screening for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Isfahan, Iran: a quantitative assay. J Med Screen. 2008; 15(2):62-4.

18. Nantakomol D, Paul R, Palasuwan A, Day NP, White NJ, Imwong M. Evaluation of the phenotypic test and genetic analysis in the detection of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Malar J. 2013 Aug; 12:289. doi: 10.1186/1475-2875-12-289.

Archive of SID

www.SID.ir

Original Paper

Comparison of fluorescent spot test, decolorization test and quantitative enzyme assay in detection of G6PD enzyme deficiency

Kosaryan M (M.D)[1], Mahdavi MR (Ph.D)*[2], Jalali H (M.Sc)[3], Roshan P (M.Sc)[4]

[1]Professor, Department of Pediatrics, Thalassemia Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. [2]Assistant Professor, Department of Laboratory Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. [3]Ph.D Candidate by Research in Thalassemia, Thalassemia Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. [4]M.Sc in Immunology, Sina Mehr Research Center, Sari, Iran.

Abstract

Background and Objective: The national screening program for G6PD enzyme deficiency is not able to detect all affected neonates. This study was done to compare the fluorescent spot test (FST), decolorization test, and quantitative enzyme assay (QEA) for detecting G6PD enzyme deficiency in neonates.

Methods: In this descriptive study, cord blood samples of 365 neonates were collected. Decolorization test, QEA and DNA test was done for each sample. All of the neonates were tested by FST as a part of national screening program on heel-prick blood sample collected on day 3–5 after birth. QEA was considered as the gold standard. According to QEA test results, neonates with <20% and 20–60% of mean normal enzyme activity were considered as total deficient and partial deficient, respectively.

Results: Fluorescent spot test detected 13 male neonates with G6PD enzyme deficiency while decolorization test identified 18 male and 1 female neonates. Using QEA, 19 of male and 28 of female neonates with G6PD enzyme deficiency (26 cases with partial and 2 cases with total deficiency) were diagnosed. DNA analysis detected 34 female case as heterozygote and 14 male neonates as hemizygote for the disease.

Conclusion: Fluorescent spot test do not have required sensitivity for screening of neonates with G6PD enzyme deficiency. QEA test is recommended to replace the fluorescent spot test in national screening program.

Keywords: G6PD enzyme deficiency, Fluorescent spot test, Decolorization test, Quantitative enzyme assay, DNA test

*** Corresponding Author: Mahdavi MR (Ph.D), E-mail: info@fajrlaboratory.com**

Received 9 Jun 2014 **Revised** 12 Jan 2015 **Accepted** 3 May 2015

Cite this article as: Kosaryan M, Mahdavi MR, Jalali H, Roshan P. [Comparison of fluorescent spot test, decolorization test and quantitative enzyme assay in detection of G6PD enzyme deficiency]. J Gorgan Uni Med Sci. 2015; 17(3): 108-113. [Article in Persian]

Archive of SID
www.SID.ir