प्रयोगिक नियमावली (मैनुअल)

ignou
THE PEOPLE'S
UNIVERSITY

ignou
THE PEOPLE'S
UNIVERSITY

इकाई 1 रक्त समूह प्ररूपण: मनुष्यों में एबीओ और आरएच (डी)रक्त समूह*

इकाई की रूपरेखा

1.0 परिचय

1.1 एबीओ रक्त समूह प्रणाली

1.2 आरएच रक्त समूह प्रणाली

1. 3 एबीओ और आरएच रक्त समूहों की फेनोटाइपिंग

1.3.1 आवश्यक सामग्री

1.3.2 3% आरबीसी (RBC) तैयार करना

1.3.3 एबीओ और आरएच रक्त समूहों की फेनोटाइपिंग

1.3.4 कमजोर डी फेनोटाइप का पता लगाना

1.3.4.1 आवश्यक सामग्री

1.3.4.2 प्रक्रिया

1.4 संदर्भ

अधिगम के उद्देश्य

इस इकाई को पढ़ने के बाद, आप सक्षम होंगे:

- रक्ताधान में एबीओ और आरएच रक्त समूहों के महत्व को स्पष्ट कर सकेंगे; तथा
- एबीओ और आरएच रक्त समूह प्रणाली के फेनोटाइपिंग का ज्ञान प्राप्त करेंगे जिसमें फॉरवर्ड और रिवर्स फेनोटाइपिंग शामिल है

1.0 परिचय

ब्लड ग्रुप के निर्धारण को ब्लड ग्रुप टाइपिंग ;प्ररूपणद्ध कहते हैं। रक्त समूह लाल रक्त कोशिका (आरबीसी) से बने एंटीजन होते हैं जिनमें रक्त प्रणाली होती है। आरबीसी का उपयोग करके रक्त समूहों का निर्धारण किया जाता है। इंटरनेशनल सोसाइटी ऑफ ब्लड ट्रांसफ्यूजन (**www.isbtweb.org**) की 30 जून, 2021 की रिपोर्ट के अनुसार, मनुष्यों में 43 रक्त समूहों की पहचान की गई है।

रक्त समूहों की जानकारी का उपयोग विभिन्न अनुप्रयोगों के लिए किया जाता है, जैसे कि आबादी और प्रवास के बीच आनुवंशिक संबंधों को जानने के एक उपकरण के रूप में, और आबादी की विशेषताओं और आबादी में विविधता की जांच करने के लिए।

मानव भिन्नता और उत्पत्ति की जांच, चिकित्सकीय रूप से महत्वपूर्ण रूपों का पता लगाने और नस्लीय पूर्वाग्रहों को खत्म करने में सहायता करती है। रक्त समूह टाइपिंग आरबीसी

*डॉ. एसएए सतीश, आनुवंशिकी एवं जैव प्रौद्योगिकी विभाग, उस्मानिया विश्वविद्यालय, हैदराबाद।
अनुवादक– डॉ. चित्रलेखा अंशु, फ्रीलांसर, नई दिल्ली

के एग्लूटीनेशन (क्लंपिंग) के सिद्धांत पर आधारित है जिसमें एंटीजन होता है (उदाहरण के लिए: ए या बी या एबी या आरएच (डी)) यह जब एंटीबॉडी के साथ प्रतिक्रिया करता है (उदाहरण के लिए: एंटी–ए या एंटी–बी या एंटी–एबी, एंटी आरएच (डी)) जो प्लाज्मा में मौजूद होता है, यह मोटे तौर पर एंटीजन और एंटीबॉडी के संबंधों का संकेत देता है। आरबीसी की क्लंपिंग संबंधित रक्त समूह की उपस्थिति को इंगित करता है। प्रत्येक व्यक्ति एक विशेष रक्त समूह के लिए केवल एक प्रकार का प्रतिजन और प्रतिरक्षी(एंटीबॉडी) वहन करता है।

एंटीजन एक पदार्थ है जो प्रतिरक्षा प्रतिक्रिया को प्रेरित करता है। रक्त समूहों के मामले में, एंटीजन पॉलीसेकेराइड या प्रकृति में प्रोटीन होते हैं जो ज्यादातर ऑटोसोम या सेक्स क्रोमोसोम (एक्स या वाई) पर स्थित जीन द्वारा एन्कोड किए जाते हैं। एंटीबॉडी प्लाज्मा सेल द्वारा निर्मित एक प्रोटीन है ,यह एंटीजन द्वारा प्रेरित प्रतिरक्षा प्रतिक्रिया के जवाब में एक विभेदित बी लिम्फोसाइट होता है। रक्त समूह एंटीबॉडी (प्राकृतिक रूप से पाए जाने वाले पदार्थ) जो प्लाज्मा में इम्युनोग्लोबुलिन एम अणुओं पर पाए जाते हैं मानव जीवन के पहले वर्ष में भोजन, बैक्टीरिया और वायरस के संपर्क में आने पर बनते हैं। शिक्षण उद्देश्यों के लिए, प्रयोगशालाओं में स्वैच्छिक दाताओं के आरबीसी और वाणिज्यिक एंटीबॉडी का उपयोग करके रक्त समूहों का निर्धारण किया जाता है। ब्लड बैंकों में, रक्त आधान से पहले, दाताओं और प्राप्तकर्ताओं / रोगियों दोनों के लिए रक्त समूह की टाइपिंग की जाती है जिसके लिए प्राप्तकर्ता के सीरम के साथ डोनर के आरबीसी का उपयोग भी किया जाता है, इस प्रक्रिया को क्रॉस मैचिंग (मिलान) के रूप में जाना जाता है। रक्त घटक (आरबीसी, प्लाज्मा और प्लेटलेट) के प्रकार की आवश्यकता के आधार पर विशेष रक्त घटक का आधान किया जाता ळें मनुष्यों में रक्त आधान के संबंध में, 9 रक्त समूह (Rh, ABO, MNS, Kidd, Kell, P, Lewis, Duffy and Lutheran) (आरएच, एबीओ, एमएनएस, किड, केल, पी, लुईस, डफी और लूथरन) रक्त घटक आधान के उद्देश्य से महत्वपूर्ण हैं। वर्तमान इकाई में, एबीओ और आरएच रक्त समूहों के निर्धारण का वर्णन किया गया है।

1.1 एबीओ रक्त समूह प्रणाली

1901 में, कार्ल लैंडस्टीनर ने ABO रक्त समूह प्रणाली के A, B, O की खोज की, जबकि AB रक्त समूह की खोज 1902 में डी कैस्टैलो और स्टेनी ने की थी। ABO प्रणाली के A, B और O रक्त समूहों की खोज के लिए कार्ल लैंडस्टीनर को वर्ष 1930 में फिजियोलॉजी या मेडिसिन में नोबेल पुरस्कार से सम्मानित किया गया था। एबीओ सिस्टम के लिए जीन क्रोमोसोम 9 पर स्थित होता है।

इस प्रणाली में चार रक्त समूह (ए, बी, एबी और ओ) होते हैं जो एंटीजन और एंटीबॉडी की उपस्थिति और अनुपस्थिति के आधार पर निर्धारित होते हैं। एंटीजन और एंटीबॉडी रक्त में मौजूद होते हैं (पूर्व लाल कोशिकाओं पर मौजूद होता है और बाद में रक्त प्लाज्मा में)। एंटीजन को ए और बी और एंटीबॉडी को एंटी–ए और एंटी–बी के रूप में नामित किया गया है। समूह ए के व्यक्ति में एंटीजन ए और एंटीबॉडी एंटी–बी होता है। ग्रुप बी के व्यक्ति में एंटीजन बी और एंटीबॉडी एंटी–ए होते हैं। समूह O के व्यक्तियों में दोनों प्रतिरक्षी(एंटीबॉडी) होते हैं और उनमें किसी प्रतिजन (एंटीजन) की कमी होती है जबकि समूह ।ठ के व्यक्तियों में दोनों प्रतिजन (एंटीजन) होते हैं लेकिन किसी प्रतिरक्षी(एंटीबॉडी) की कमी होती है।

O ब्लड ग्रुप वाले व्यक्ति सभी ब्लड ग्रुप वाले व्यक्तियों को रक्त घटक (ब्लड कंपोनेंट) (RBC, प्लाज्मा और प्लेटलेट्स) दान कर सकते हैं। A रक्त समूह के वाहक किसी भी रक्त घटक को A या AB को दान कर सकते हैं; B रक्त समूह के वाहक B और AB के वाहकों को रक्त घटक दान कर सकते हैं और AB रक्त समूह के व्यक्ति AB रक्त समूह के वाहकों को ही रक्त घटक दान कर सकते हैं। दूसरे शब्दों में, हम इसे इस प्रकार समझ सकते हैं कि A रक्त समूह के वाहक A और O रक्त समूहों के वाहकों से कोई भी रक्त घटक प्राप्त कर सकते हैं। बी ब्लड ग्रुप के वाहक बी और ओ ब्लड ग्रुप से ब्लड कंपोनेंट्स प्राप्त कर सकते हैं। O रक्त समूह के वाहक केवल O रक्त समूह से रक्त घटक प्राप्त कर सकते हैं, जबकि AB रक्त समूह के वाहक सभी रक्त समूहों A, B, AB और O से रक्त घटक प्राप्त कर सकते हैं। उपरोक्त स्पष्टीकरणों के आधार पर, हम यह निष्कर्ष निकाल सकते हैं कि, रक्त समूह O (–ve) एक सार्वभौमिक दाता है, रक्त समूह AB (+ve) एक सार्वभौमिक प्राप्तकर्ता है।

A, B और O नाम के तीन जीन इस प्रणाली को नियंत्रित करते हैं। ए और बी एलील सहाधिरोही (co-dominant) हैं और ए और बी दोनों ओ के लिए प्रभावशाली हैं जो रिसेसिव होता है। ABO का वंशानुक्रम मेंडेलियन पैटर्न का अनुसरण करता है। विश्व जनसंख्या में रक्त समूह O (63%) की आवृत्ति प्रमुख है, इसके बाद A (21%) और B (16%) आते हैं। भारतीय आबादी में 'बी' रक्त समूह की प्रबलता की विशेषता है (वेंकटरमण, 2012)। यूरोपीय लोगों में, रक्त समूह 'ए' प्रमुख है, एशिया में 'बी' और दक्षिण अमेरिका, साइबेरिया और स्विट्जरलैंड के कुछ क्षेत्रों में 'ओ' (फरहुद और येगनेह, 2013)। भारत में सैनिकों पर रक्त समूहों की पहली जांच 1919 में हिर्शफील्ड द्वारा की गई थी। एबीओ ब्लड ग्रुप मल्टीपल एलील्स का एक अच्छा उदाहरण है जिसे फेलिक्स बर्नस्टीन ने 1924 में खोजा था। एबीओ रक्त समूह मनुष्यों में किया गया पहला अध्ययन था जो बहुरूपता पर आधारित था और यह इस मार्कर(चिन्हकों) का डेटा था जिसका उपयोग उद्विकासवादी वृक्ष निर्माण के लिए किया गया था।

वाहकों में रोगों के प्रति संवेदनशीलता जांचने के लिए भी रक्त समूहों का भी अध्ययन किया गया है। उदाहरण के लिए, यह देखा गया कि 'O' रक्त समूह के वाहकों में अन्य रक्त समूहों के वाहकों की तुलना में गैस्ट्रिक और ग्रहणी (duodenal) संबंधी अल्सर, हैजा और अन्य प्रकार के दस्त विकसित होने का अधिक जोखिम पाया गया। A और B रक्त समूह के वाहकों में, A से अधिक B रक्त समूह वाहक हैजा के प्रति अधिक संवेदनशील पाए गए हैं। अन्य रक्त समूहों वाले लोगों की तुलना में ए और एबी के वाहकों को चेचक से संक्रमित होने का जोखिम अधिक देखा गया है। ए रक्त समूह के वाहकों को गैस्ट्रिक कैंसर के प्रति अतिसंवेदनशील पाया गया है (सरकार, 2012; डीन, 2015)। फोरेंसिक प्रयोगशालाओं में रक्त समूहों का उपयोग करके पितृत्व संबंधी विवादों को सुलझाया जाता है और संदिग्ध आपराधिक पहचान की पुष्टि की जाती है।

1.2 आरएच (Rh) रक्त समूह प्रणाली

Rh ब्लड ग्रुप की खोज 1940 में कार्ल लैंडस्टीनर और वेनर ने की थी। Rh फैक्टर की खोज के कारण इस ब्लड ग्रुप का नाम पड़ा। इस रक्त समूह के खोजकर्ताओं ने खरगोश में रीसस बंदर के आरबीसी को इंजेक्ट किया और इंजेक्शन की एक श्रृंखला के बाद, प्रतिरक्षित खरगोशों के प्लाज्मा ने न केवल रीसस बंदर और बल्कि मनुष्यों के भी आरबीसी के क्लंपिंग का कारण बना। तब से, Rh (D) प्रतिजन के लिए Rh कारक

नाम को बरकरार रखा गया। यह ब्लड ग्रुप एरिथ्रोब्लास्टोसिस फेटलिस से जुड़े होने के कारण भी चर्चा में आया, जो कि नवजातों की हीमोलिटिक बीमारी है। यह भ्रूण के डी एंटीजन के खिलाफ आरएच–(नकारात्मक) मां के प्लाज्मा में आईजीजी (IgG) एंटीबॉडी के उत्पादन के कारण होता है, जो भ्रूण में प्रसव के दौरान प्लेसेंटा के माध्यम से प्रवेश करता है और हेमोलिसिस का कारण बनता है, जिससे ज्यादातर दूसरी गर्भावस्था के दौरान एनीमिया और भ्रूण की मृत्यु तक हो जाती है। Rh रक्त समूह मनुष्यों में एक जटिल रक्त समूह है और इसमें 56 प्रतिजन(एंटीजन) होते हैं(www.isbtweb.org)। उनमें से D, C, E, c, और e (डीन, 2015) उल्लेखनीय हैं। ये एंटीजन क्रोमोसोम 1 पर स्थित आरएचडी (RHD) और आरसीएचई (RCHE) जीन द्वारा एन्कोडेड होते हैं। आरएचडी जीन आरएचडी एंटीजन को एनकोड करता है जबकि आरएचसीई जीन CE एंटीजन को अलग–अलग संयोजनों जैसे कि Cece, CE या cECx (RH9), Cw(RH8) और VS (RH20) में एन्कोड करता है। Rh (D) प्रतिजन के वाहकों को Rh+ (धनात्मक) कहा जाता है और जिनमें इसकी कमी होती है उन्हें Rh– (ऋणात्मक) कहा जाता है। Rh+ एशियाई लोगों में और Rh– कोकेशियान में प्रमुख है। एशियाई लोगों में सी और ई एंटीजन प्रमुख हैं; काले और कोकेशियान में सी और ई एंटीजन (डीन, 2015)। Rh प्रतिजन केवल RBC पर ही व्यक्त होते हैं।

1. 3 एबीओ और आरएच रक्त समूहों की फेनोटाइपिंग

रक्त समूहों का फेनोटाइपिंग या निर्धारण पोर्सिलेन टाइल/ग्लास स्लाइड/माइक्रोसेंट्रीफ्यूज ट्यूब/माइक्रोप्लेट पर किया जाता है। व्यावसायिक रूप से उपलब्ध एंटीसेरा का उपयोग करके रक्त समूहों का निर्धारण किया जाता है।

1.3.1 आवश्यक सामग्री

1. 3% लाल रक्त कोशिकाएं (वजन/मात्रा) (डब्ल्यू/वी)
2. 0.9% (डब्ल्यू/वी)स्लाइन
3. लैबटॉप सेंट्रीफ्यूज
4. पॉलीस्टाइनिन/ग्लास ट्यूब (5 mL)
5. माइक्रो/मिनी सेंट्रीफ्यूज
6. माइक्रोसेंट्रीफ्यूज ट्यूब (1 mL)
7. माइक्रोसेंट्रीफ्यूज ट्यूब (2 mL)
8. माइक्रोपिपेट्स (100 µl और 1 उस)
9. माइक्रोपिपेट टिप्स (100 µl और 1 उस)
10. वाणिज्यिक एंटीबॉडी (एंटीसेरा–ए, बी, एच और डी)
11. माइक्रोसेंट्रीफ्यूज ट्यूब स्टैंड
12. डबल आसुत(डिस्टिल्ड) जल
13. ग्लास बीकर
14. कांच की बोतल

1.3.2 3% आरबीसी (RBC) तैयार करना

1. एक 5mL शिरापरक रक्त (विनौस) वालेंटियर से लिया जाता है और निकाले गए रक्त को धीरे–धीरे 5mL फाल्कन ट्यूब या ग्लास ट्यूब की दीवारों के माध्यम से छोड़ा जाता है जिसमें थक्कारोधी (सोडियम साइट्रेट (160mg) या एथिलीन डायमाइन टेट्रा एसिटिक एसिड (10mg) या हेपरिन (75IU/एमएल) को मिलाकर 5 से 6 मिनट के लिए हथेली या बेंच पर ट्यूब को धीरे से घुमाकर अच्छी तरह मिलाएं।

2. लैबटॉप सेंट्रीफ्यूज में 1000 रेवोल्यूशन प्रति मिनट (आरपीएम) पर फाल्कन/ग्लास ट्यूब को सेंट्रीफ्यूज(अपकेंद्रित) करें ।

3. फाल्कन/ग्लास ट्यूब में सतह पर तैरनेवाले पदार्थ को 2mL माइक्रोसेंट्रीफ्यूज ट्यूबों में एकत्र कीजिए है।

4. 0.9% स्लनाइन (W/V) के 100mL को एक ग्लास बीकर में 900 मिलीग्राम सोडियम क्लोराइड (NaCl) मिलाकर तैयार किया जाता है जिसमें 100mL आसुत जल (डबल डिस्टिल्ड वाटर) होता है और जिसे कमरे के तापमान(रूम टैम्परेचर) पर कांच की बोतल में स्टोर किया जाता है।

5. फाल्कन/ग्लास ट्यूब जिसमें से सतह पर तैरनेवाला पदार्थ हटा दिया गया था, 1उस माइक्रोपिपेट के साथ 0.9% स्लाइन के 3.5mL मिलाइए।

6. लैबटॉप सेंट्रीफ्यूज में 3 मिनट के लिए 2500 आरपीएम पर फाल्कन/ग्लास ट्यूब को सेंट्रीफ्यूज करें। इस चरण को कई बार दोहराएं जब तक कि फाल्कन/ग्लास ट्यूब में सतह पर तैरनेवाला पदार्थ पारदर्शी दिखाई न देने लगे।

7. 3% RBC की 2mL मात्रा तैयार करने के लिए, RBL सस्पेंशन के 60µl को 2mL माइक्रोसेंट्रीफ्यूज ट्यूब में जोड़ा जाता है, जिसमें 1उस या 100µl माइक्रोपिपेट का उपयोग 1940µl 0.9% सेलाइन के साथ किया जाता है।

8. सामग्री को माइक्रोसेंट्रीफ्यूज ट्यूब में एस्पिरेटिंग और डिस्पेंसिंग द्वारा कई बार 2 mL माइक्रोसेंट्रीफ्यूज ट्यूब में 1 mL माइक्रोपिपेट के साथ मिलाइए।

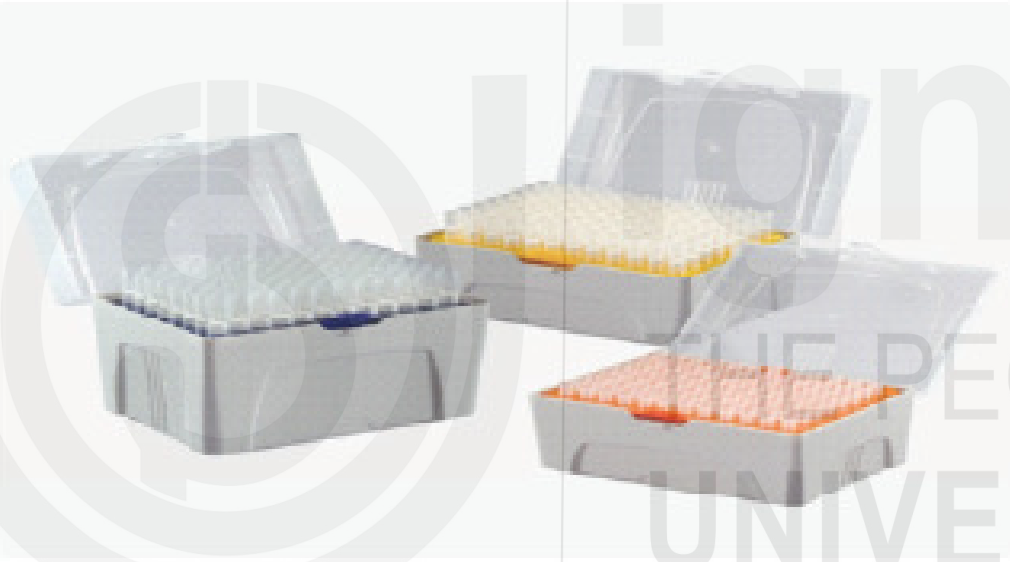
चित्र 1.1: लैबटॉप सेंट्रीफ्यूज
(स्रोत: https://www.biomall.in/product/labtop-cantrifuge-hc 25r-hc-25r)

चित्र 1.2: माइक्रो या मिनी सेंट्रीफ्यूज
(स्रोत: https://www.pipette.com/Microcentrifuges)

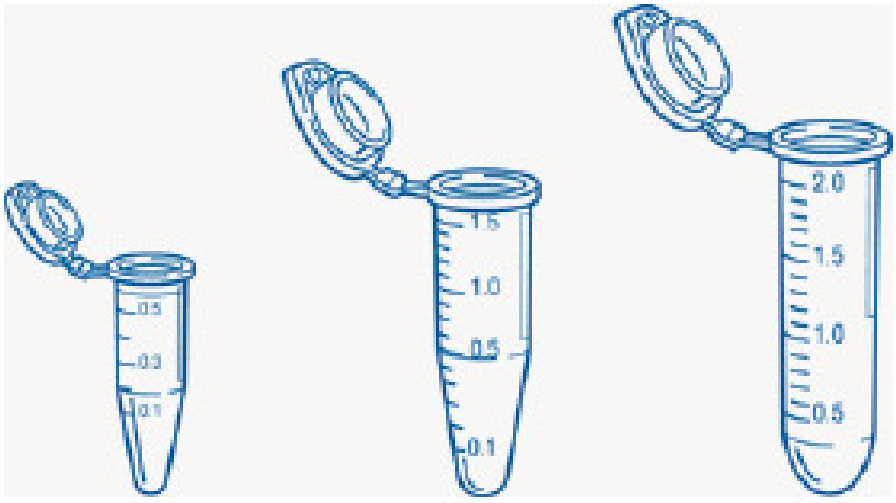
चित्र 1.3: पॉलीस्टाइरीन 5 mL ट्यूब
(स्रोत: https://www.intscientific.com/product/pbt081/)

चित्र 1.4: ग्लास ट्यूब (ऊपर)
(स्रोत: https://www.universalmedicalinc.com/13mm-x-75mm-5ml-test-tubes.html)

चित्र 1.5: चर आयतन माइक्रोपिपेट
(स्रोत: https://in.labbox.com/product/variable-volume-micropipette-easy-40-elite/)



चित्र 1.6: माइक्रोपिपेट बॉक्स टिप्स
(स्रोत: https://indolabutama.com/catalogue/pipette-tips/)



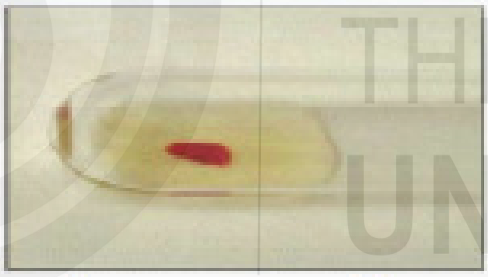
चित्र 1.7: माइक्रोसेंट्रीफ्यूज ट्यूब (स्रोत: Starlab.com)

1.3.3 एबीओ और आरएच रक्त समूहों की फेनोटाइपिंग

1. 4 माइक्रोसेंट्रीफ्यूज ट्यूब (1mL) लें और उन्हें A, B, H और D के रूप में लेबल करें।
2. प्रत्येक 4 माइक्रोसेंट्रीफ्यूज ट्यूब में 100µl एंटीसेरा– A, B, H और D को जोड़ें।
3. 4 माइक्रोसेंट्रीफ्यूज ट्यूबों में से प्रत्येक में 3% आरबीसी सस्पेन्शन के 100µl जोड़ें
4. माइक्रोसेंट्रीफ्यूज ट्यूबों को 1 मिनट के लिए मिनीसेंट्रीफ्यूज में 1000 आरपीएम पर सेंट्रीफ्यूज करें
5. माइक्रोसेंट्रीफ्यूज ट्यूबों में आरबीसी के एग्लूटीनेशन का बनना विशेष रक्त समूह की उपस्थिति को इंगित करता है। परिणामों की व्याख्या तालिका 1.1 में दर्शाई गई है।

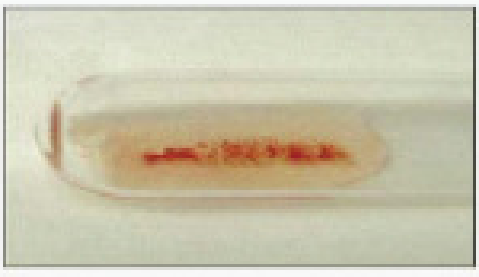
यदि A लेबल वाले माइक्रोसेंट्रीफ्यूज में समूहन (एग्लूटिनेशन) है, तो यह ए ब्लड ग्रुप है; यदि B लेबल वाली माइक्रोसेंट्रीफ्यूज ट्यूब में एग्लूटिनेशन है, तो यह बी ब्लड ग्रुप है; यदि A और B लेबल वाली माइक्रोसेंट्रीफ्यूज ट्यूब दोनों में एग्लूटिनेशन पाया जाता है तो इसे AB ब्लड ग्रुप माना जाता है और अगर H लेबल वाली ट्यूब में एग्लूटिनेशन है, तो यह O ग्रुप है।

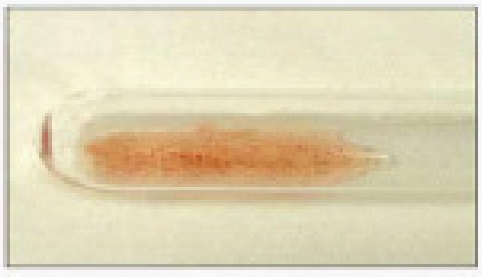
यदि D लेबल वाले माइक्रो सेंट्रीफ्यूज में एग्लूटिनेशन पाया जाता है, तो Rh (पॉजिटिव) ब्लड ग्रुप की उपस्थिति का संकेत मिलता है।



बड़े समूहन (क्लंप या एग्लूटिनेशन)

2 क्लंप





छोटे क्लंप(समूहन) या (एग्लूटिनेशन)

चित्र 1.8: समूहन की तीव्रता (स्रोत: NIB, Guidance manual, 2013)

तालिका 1.1: एबीओ प्रणाली के परिणामों की व्याख्या

ABO रक्त समूह			
एंटी–A	एंटी–B	एंटी–H	परिणाम
समूहन(एग्लूटिनेशन) उपस्थित	समूहन(एग्लूटिनेशन) अनुपस्थित	समूहन(एग्लूटिनेशन) अनुपस्थित	A रक्त समूह
समूहन(एग्लूटिनेशन) अनुपस्थित	समूहन(एग्लूटिनेशन) उपस्थित	समूहन(एग्लूटिनेशन) अनुपस्थित	B रक्त समूह
समूहन(एग्लूटिनेशन) उपस्थित	समूहन(एग्लूटिनेशन) उपस्थित	समूहन(एग्लूटिनेशन) अनुपस्थित	AB रक्त समूह
समूहन(एग्लूटिनेशन) अनुपस्थित	समूहन(एग्लूटिनेशन) अनुपस्थित	समूहन(एग्लूटिनेशन) उपस्थित	O रक्त समूह
Rh रक्त समूह			
एंटी–D			
समूहन(एग्लूटिनेशन) उपस्थित	Rh (पॉजिटिव)		
समूहन(एग्लूटिनेशन) अनुपस्थित	Rh (नेगेटिव)		

1.3.4 कमजोर डी (D) फेनोटाइप का पता लगाना

यदि किसी विशेष व्यक्ति की पहचान Rh– (नकारात्मक) के रूप में की जाती है, तो उस व्यक्ति में कमजोर D (Du)+(धनात्मक) प्रतिजन की उपस्थिति की संभावना होती है। यह पुष्टि करने के लिए कि क्या कमजोर D (Du)+ एंटीजन मौजूद है, अप्रत्यक्ष एग्लूटिनेशन टेस्ट किया जाता है।

1.3.4.1 आवश्यक सामग्री

1. एंटी ह्यूमन ग्लोब्युलिन
2. 0.9% सेलाइन
3. मिनी सेंट्रीफ्यूज / माइक्रोसेंट्रीफ्यूज
4. माइक्रोपिपेट (1एमएल)
5. माइक्रोपिपेट टिप्स (1एमएल)
6. वाटर बाथ
7. माइक्रोसेंट्रीफ्यूज ट्यूब स्टैंड
8. माइक्रोस्कोप

1.3.4.2 प्रक्रिया

1. 1.3.3 में वर्णित प्रक्रिया के अनुसार, आरएच–(नकारात्मक) के रूप में निर्धारित माइक्रोसेंट्रीफ्यूज ट्यूब (1 एमएल) को 30 मिनट के लिए वाटरबाथ (Water bath) में 37 डिग्री सेल्सियस पर इनक्यूबेट करें ।

2. माइक्रोसेंट्रीफ्यूज ट्यूब को 1 मिनट के लिए मिनीसेंट्रीफ्यूज में 1000 आरपीएम पर अपकेंद्रित(सेंट्रीफ्यूज) करें।

3. यदि RBC का जमाव देखा जाता है, तो इसे Rh+(धनात्मक) मानें। यदि कोई एग्लूटिनेशन नहीं है, तो आगे के चरणों के लिए बढ़ें।

4. 1ml माइक्रोपिपेट का उपयोग करके Rh– युक्त माइक्रोसेंट्रीफ्यूज ट्यूबों में 0.9% सेलाइन के 800µl मिलाए और मिनी सेंट्रीफ्यूज में 1000rpm पर सेंट्रीफ्यूज कर के माइक्रोसेंट्रीफ्यूज ट्यूब के सतह के तरल पदार्थ को हटा दें। इस चरण को तीन बार दोहराएं।

5. 1ml पिपेट के साथ माइक्रोसेंट्रीफ्यूज ट्यूब में 200µl एंटी ह्यूमन ग्लोब्युलिन मिलाइए।

6. धीरे से माइक्रोसेंट्रीफ्यूज ट्यूब को उंगली से टैप करके हिलाएं और प्रकाश या माइक्रोस्कोप की सहायता से आरबीसी के एग्लूटिनेशन की उपस्थिति की जांच करें।

7. यदि माइक्रोसेंट्रीफ्यूज ट्यूब में आरबीसी का एग्लूटिनेशन देखा जाता है, तो कमजोर D (Du) + की उपस्थिति की पुष्टि की जाती है और इसकी अनुपस्थिति में, इसे Rh– (नकारात्मक) के रूप में निर्धारित किया जाता है।

चित्र 1.9: वाटर बाथ (Water bath)
(स्रोत: https://en.wikipedia.org/wiki/Laboratory_water_bath#/media/File:Shaking_water_bath_2015.JPG)

चित्र 1.10: सूक्ष्मदर्शी (माइक्रोस्कोप)
(स्रोत: https://www.quirumed.com/ie/professional-binocular-microscope-achromatic.html)

1.4 संदर्भ

Dean, L. (2005). Blood groups and red cell antigens. National Center for Biotechnology Information (US). Chapter 5, The ABO blood group. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2267/

Farhud, D.D. Zarif Yeganeh, M. (2013). A brief history of human blood groups. Iran J Public Health. 42(1):1-6.

Guidance manual on ABO and Rh blood grouping (2013). National Institute of Biologicals, Ministry of Health and Family Welfare, Government of India. Available at http://nib.gov.in/guidance_document/Guidance_manucal_QC_ABO_Rh_blood_grouping_26_03_2013.pdf.

International society of Blood Transfusion. Available at(www.isbtweb.org)

Latheef, S.A.A. (2021). Determination of A1, A2, B, O, M, N and Rh Blood Groups. Unit 2 (Practical Manual), In Biological Diversity of Human Populations (BANC 107), IGNOU, Available athttp://egyankosh.ac.in/bitstream/123456789/73698/1/Unit-2.pdf

Sarkar, R.N (2012). Applications of genetic polymorphism. Unit 3. In Practising Anthropology (MANI-003), IGNOU. pp 28-39.

Venkatramana P. (2012). Human genetics and society. Unit2. In Practising Anthropology (MANI-003), IGNOU. pp 19-27.

इकाई 2 रंग दृष्टिहीनता (वर्णांधता)*

इकाई की रूपरेखा

2.0 परिचय

2.1 वर्णान्धता (कलर ब्लाइंडनेस) के प्रकार

2.1.1 मोनोक्रोमेसी

2.1.2 डाइक्रोमेसी

2.1.3 विषम ट्राइक्रोमेसी

2.2 वंशानुक्रम पैटर्न

2.3 इशिहारा टेस्ट

2.4 संदर्भ

अधिगम के उद्देश्य

इस इकाई को पढ़ने के बाद, आप सक्षम होंगे:

- विभिन्न प्रकार के वर्णांधता की व्याख्या कर सकेंगे;
- वर्णान्धता के वंशानुक्रम पैटर्न को स्पष्ट कर सकेंगे; तथा
- वर्णान्धता का पता लगाने की प्रक्रिया का वर्णन कीजिए।

2.0 परिचय

वर्णांधता (कलर ब्लाइंडनेस) कुछ रंगों में अंतर न कर पाने की शारीरिक विफलता है। वर्णांधता के लिए एक बेहतर शब्द है कलर विजन की कमी, क्योंकि ज्यादातर कलर ब्लाइंड (वर्णांध) लोग लाल, हरे या नीले रंग को छोड़कर रंगों की पहचान कर सकते हैं। सामान्य दृष्टि वाले व्यक्ति तीन प्राथमिक रंगों जैसे लाल, हरा और नीला को जोड़कर इन रंगों में अंतर कर सकते हैं। कभी–कभी, किसी व्यक्ति की इन रंगों में से किसी एक को समझने की शक्ति या तो सामान्य से कम होती है या पूरी तरह से खो जाती है, शायद ही कोई व्यक्ति पूरी तरह से रंगों के पहचान की भावना पूरी तरह से खोता हो। मनुष्य के लगभग बीस वर्ण लिंग से जुड़े वंशानुक्रम को प्रदर्शित करते हैं और उनके जीन ज्यादातर Y गुणसूत्र के बजाय X पर स्थित होते हैं।

यह स्थापित किया गया है कि रंग से जुड़ा दृष्टि दोष एक्स–लिंक्ड विशेषता के रूप में विरासत में मिला है, जिसमें सामान्य कलर विजन रंग के दृष्टि दोष पर हावी होता है।

सेक्स लिंक्ड इनहेरिटेंस का सबसे लोकप्रिय उदाहरण रेड–ग्रीन (R–G) कलर ब्लाइंडनेस है। सामान्य दृष्टि में तीन शंकु वर्णक या फोटोरिसेप्टर या ऑप्सिन, लघु (एस–नीला), लंबा (एल–लाल) और मध्य (एम–हरा) की उपस्थिति का योगदान होता है और उन्हें उनकी

*योगदानकर्ता– डॉ. पी. वेंकटरमना, मानवविज्ञान संकाय, सामाजिक विज्ञान विद्यापीठ, इग्नू, नई दिल्ली
अनुवादक– डॉ.चित्रलेखा अंशुजीलांसर, नई दिल्ली

संवेदनशीलता के आधार पर नामित किया जाता है। दृश्य प्रकाश में मध्य (हरा) और लघु (नीला) और लंबे (लाल) तरंग दैर्ध्य में रखे जाते हैं । इन फोटोरिसेप्टर को एन्कोड करने वाले जीन क्रोमोसोम 7 (एस) और एक्स क्रोमोसोम (एम और एल) पर स्थित होते हैं।

2.1 वर्णान्धता (कलर ब्लाइंडनेस) के प्रकार

कलर ब्लाइंडनेस तीन प्रकार का होता है मोनोक्रोमेसी, डाइक्रोमेसी और एनोमलस ट्राइक्रोमेसी। विभिन्न प्रकारों पर एक संक्षिप्त नोट नीचे प्रस्तुत किया गया है।

2.1.1 मोनोक्रोमेसी

इस प्रकार की वर्णांधता के वाहक को कोई रंग नहीं दिखता है और मोनोक्रोमेसी एक दुर्लभ घटना है।

यह दो प्रकार की होती है।

(i) विशिष्ट मोनोक्रोमेसीः यह शंकु के कैट आयन चैनल के अल्फा और बीटा सबयूनिट्स को संकेतीकृत करने वाले जीन में उत्परिवर्तन के कारण होता है। इस प्रकार के वर्णांधता के वाहकों में लाल रंग के प्रति असंवेदनशीलता, कम दृश्य तीक्ष्णता, आंखों का अनैच्छिक हिलना और चमक से रंग में अंतर होता है।

(ii) ब्लू मोनोक्रोमेसीः इस प्रकार की कलर ब्लाइंडनेस एल (लाल) या एम (हरा) की अनुपस्थिति और केवल एस (नीला) शंकु वर्णक की उपस्थिति की विशेषता होती है। इसमें वाहक वर्णांध होते हैं जोकि लाल रंग के प्रति बहुत संवेदनशील होते हैं, निस्टागमस (एक दृष्टि की स्थिति जिसमें आंखें दोहराव, अनियंत्रित गति करती हैं) में दृश्य तीक्ष्णता कम होती है।

2.1.2 डाइक्रोमेसी

डाइक्रोमेसी तीन प्रकार के शंकुओं में से एक की अनुपस्थिति या खराबी के कारण होता है। इसे आगे तीन प्रकारों में विभाजित किया गया है।

(i) प्रोटानोपिया (लाल रंग का अंधापन)ः इस प्रकार की वर्णांधता में, एल (लाल) शंकु वर्णक अनुपस्थित होता है, इस कारण लाल रंग के प्रति संवेदनशीलता कम हो जाती है और लाल, पीले और हरे, सफेद और हरे और बैंगनी और नीले रंग में अंतर करने में भ्रम होता है। लाल रंग का अंधापन पुरुषों में 1% और महिलाओं में 0.01% है।

(ii) ड्यूटेरानोपिया (हरा रंग का अंधापन)ः ड्यूटेरानोपिया में एम (हरा) शंकु वर्णक अनुपस्थित होता है जो पीले, लाल और हरे, और सफेद और हरे रंग के रंगों में अंतर करने में भ्रम उत्पन्न करता है। इस कारण रंगों को पहचानने की क्षमता कम हो जाती है। इस प्रकार के वर्णांधता की घटना प्रोटानोपिया के समान ही होती है।

(iii) ट्रिटेनोपिया (नीले रंग का अंधापन)ः ट्रिटेनोपिया में एस (नीला) शंकु वर्णक अनुपस्थित होता है जो नीले को नीले–हरे और हरे रंग के साथ, और सफेद को पीले रंग से भ्रमित करता है। इसमें रंग पहचानने की क्षमता में कमी देखी गई है। ब्लू कलर ब्लाइंडनेस की घटना 13,000 पुरुषों और महिलाओं में से 1 को होती है।

2.1.3 विषम ट्राइक्रोमेसी

विषम ट्राइक्रोमेसी का परिणाम तब होता है जब 3 शंकुओं में से एक ठीक से काम नहीं करता है। यह भी तीन प्रकार का होता है।

(i) प्रोटोनोमालीः प्रोटानोमेली की घटना पुरुषों में 1% और महिलाओं में 0.03% पाई गई है। इस स्थिति में शंकु अवशोषण स्पेक्ट्रम में प्रकाश का स्थानांतरण एल (लाल) से एस (नीला) में देखा जाता है जिस कारण लाल रंग की संवेदनशीलता कम हो जाती है और हरे, लाल और पीले रंग के रंग में अंतर करने में भ्रम होता है। इस विभेद में सफेद रंग हरे और असामान्य रंग के मिलान के रूप में भ्रम उत्पन्न करता है।

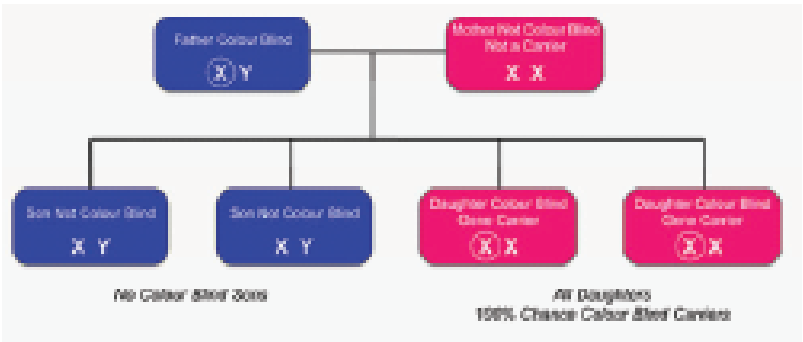
(ii) ड्यूटेरोनोमलीः इसमें प्रकाश के ड से स शंकु अवशोषण स्पेक्ट्रम में स्थानांतरण को नोट किया जाता है। सफेद रंग का हरे रंग के रूप में भ्रम होता है और पीले रंग में अंतर करने में विफलता होती है। लाल, हरे और असामान्य रंगों के मिलान में अंतर करने में अवरोध होता है (रंग मिलान में अतिरिक्त हरा जोड़ें, लाल + हरा = पीला)। पुरुषों में ड्यूटेरोनोमली की घटना 5% और महिलाओं में 0.35% पाई गई है। हरे रंग के प्रति संवेदनशीलता कम हो जाती है।

(iii) ट्रिटेनोमालीः एस शंकु वर्णक आंशिक रूप से लुप्त हो जाते हैं जिस कारण नीले रंग, और नीले–हरे और हरे रंग (कोल, 2007) में अंतर करने में कठिनता होती है। यह स्थिति बहुत कम देखी जाती है।

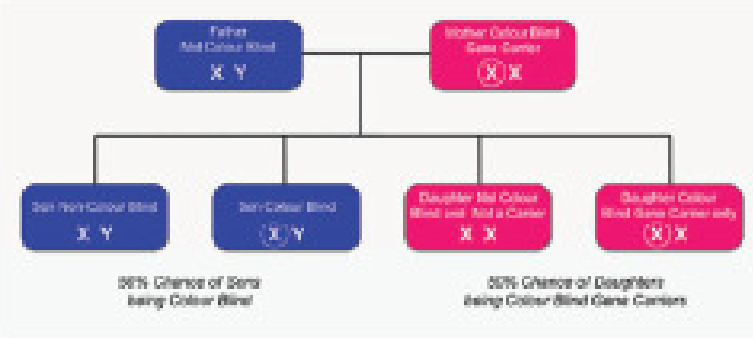
वर्णांधता (कलर ब्लाइंडनेस) मस्तिष्क, आंखों और तंत्रिकाओं की क्षति या बीमारियों (सिकल सेल एनीमिया, ऑप्टिक न्यूरिटिस, उच्च रक्तचाप, धब्बेदार अधः पतन, ग्लूकोमा और मधुमेह) या जीन कोडिंग ऑप्सिन, *GNAT2* (गुआनिन न्यूक्लियोटाइड–बाइंडिंग प्रोटीन G(t) सबयूनिट अल्फा–2, फॉस्फोडिएस्टरेज़, घक्रीय न्यूक्लियोटाइड गेटेड चैनल बीटा 3, *OPNISW* (ऑप्सिन 1, शॉर्ट वेव सेंसिटिव), *OPNILW* (ऑप्सिन 1, लॉन्ग वेव सेंसिटिव) और *OPNIMW* (ऑप्सिन 1, मीडियम वेव सेंसिटिव) जीन में उत्परिवर्तन के कारण होता या दवाओं के संपर्क (क्लोरोक्वीन, सिल्डेनाफिल, एथनब्युटोल, डिगॉक्सिन, तपेदिक रोधी दवाएं और बार्बिटुरेट्स) से होता है। ।

2.2 वंशानुक्रम पैटर्न

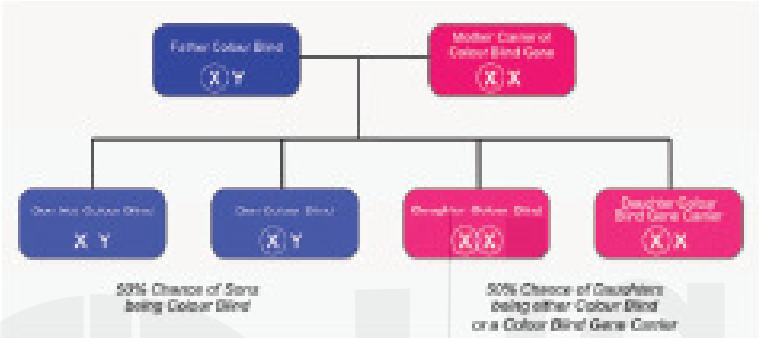
वर्णान्धता का वंशानुक्रम पैटर्न निम्नलिखित आकृतियों में प्रस्तुत किया गया है (चित्र 2.1 से 2.5)



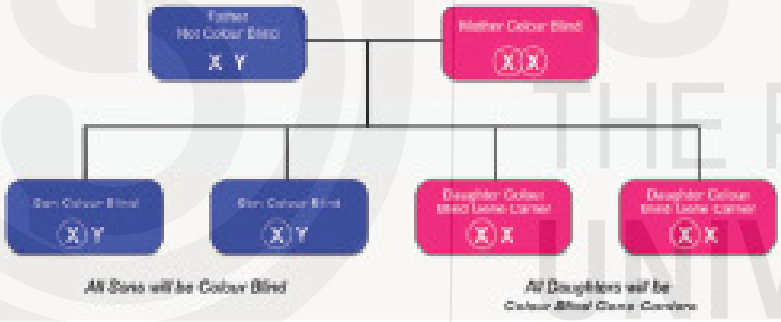
चित्र 2.1: यदि वर्णांध पुरुष गॉन कलर ब्लाइंड महिला से शादी करता है



चित्र 2.2: यदि गैर– वर्णान्ध पुरुष वर्णांध महिला (वाहक) से विवाह करता है



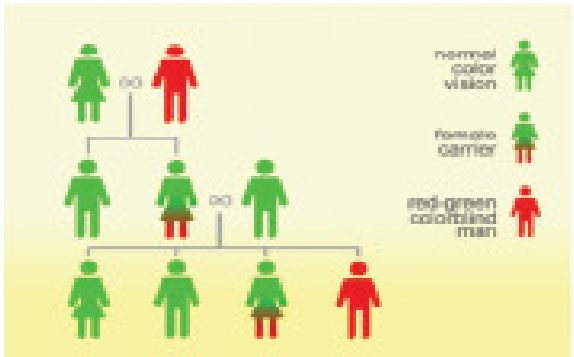
चित्र 2.3: यदि वर्णांध पुरुष वर्णांध महिला (कैरियर) से शादी करता है



चित्र 2.4: यदि गैर–वर्णान्ध व्यक्ति वर्णान्ध महिला से विवाह करता है

(स्रोत: https://www.colourblindawareness.org/colour-blindness/inherited-colour-vision-deficiency)

लाल–हरे रंग की वर्णान्धता का वंशानुक्रम पैटर्न चित्र 2.5 में आरेखीय रूप से दर्शाया गया है।



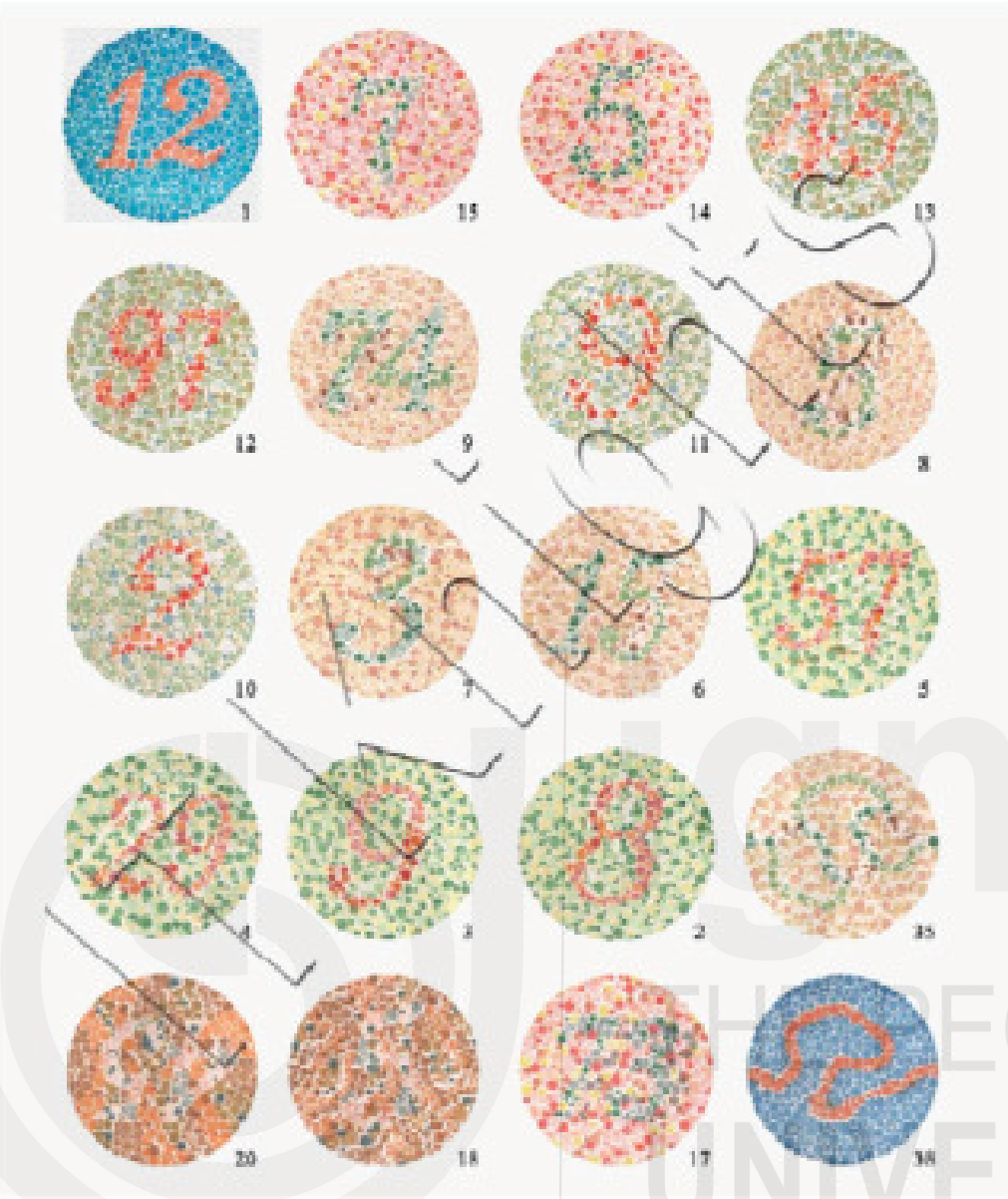
चित्र 2.5: लाल–हरा रंग अंधापन वंशानुक्रम पैटर्न (स्रोत: colblindor.com)

जब एक सामान्य महिला किसी वर्णान्ध पुरुष से विवाह करती है तो उसके सभी पुत्रों और पुत्रियों की रंग दृष्टि सामान्य होती है। लेकिन जब उसकी बेटियों की शादी सामान्य रंग दृष्टि वाले व्यक्ति से की जाती है तो कुछ वर्णान्ध पुत्र पाए जाते हैं। इसका अर्थ है कि सामान्य रंग दृष्टि वाली महिला, जिसका पिता वर्णान्ध है, जब बच्चों को जन्म देती है, तो उनमें से लगभग आधे पुत्रों के वर्णान्ध होने की संभावना होती है और अन्य आधे के सामान्य रंग दृष्टि वाले होने की संभावना होती है।

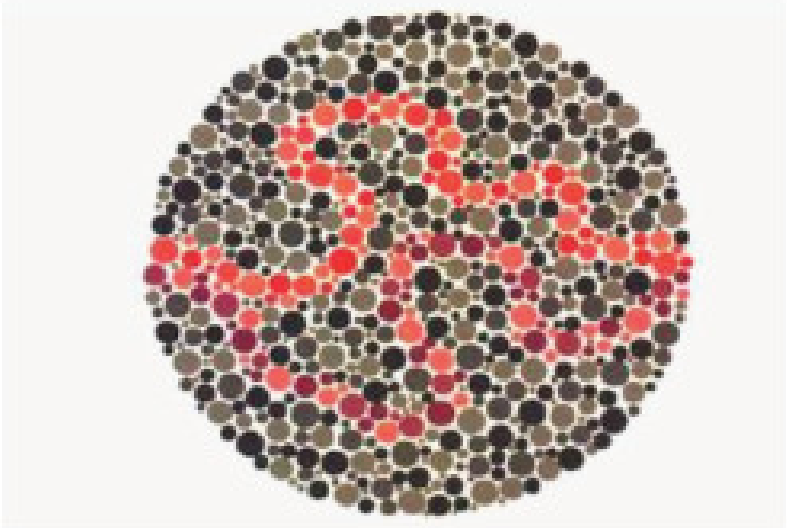
2.3 इशिहारा टेस्ट

रंग दृष्टि की कमी/रंग अंधापन का पता लगाने के लिए व्यापक रूप से उपयोग किया जाने वाला परीक्षण इशिहारा परीक्षण है। यह परीक्षण जापान के शिनोबू इशिहारा द्वारा विकसित किया गया था और 1929 से उपयोग में है। यह परीक्षण 5 साल के उम्र के प्रतिभागियों से शुरू किया जा सकता है और लाल–हरे रंग की वर्णांधता की जांच करने और प्रोटॉन और डुएटन दोषों के बीच अंतर करने के लिए उपयोग किया जाता है। व्यापक रूप से इस्तेमाल किया जाने वाला यह परीक्षण 38 प्लेट या चार्ट संस्करण (चित्र 2.6) को नियोजित करके किया जाता है। प्रत्येक प्लेट में अलग–अलग रंग के डॉट्स की पृष्ठभूमि के विपरीत अलग–अलग आकार के रंगीन डॉट्स में अंक मुद्रित होते हैं ताकि यह सुनिश्चित किया जा सके कि रंग दृष्टि की कमी वाले व्यक्ति या तो गलत तरीके से पढ़ते हैं, या आंकड़े पढ़ने में विफल होते हैं। 38 प्लेटों (चित्र 2.7) में से 1–25 प्लेटों में संख्याएँ होती हैं और यह साक्षरों के लिए होती हैं और 26–38 प्लेटों में घुमावदार रेखाएँ (चित्र 2.8) होती हैं जिनका उपयोग निरक्षरों के लिए किया जाता है। 38 प्लेटों में से, 1–21 प्लेटों का उपयोग करके, सामान्य और रंग दृष्टि की कमी वाले व्यक्तियों और डयूटन को विभेदित किया जा सकता है।

चित्र 2.6: इशिहारा–टेस्ट बुक (स्रोत: www.trishir.com)



चित्र 2.7: इशिहारा टेस्ट प्लेट्स (स्रोत: filebuzz.com)



चित्र 2.8: घुमावदार रेखाओं वाली इशिहारा प्लेट
(स्रोत: http://www.color-blindness.com/2012/10/22/#prettyPhoto[Ishihara38]/25/)

प्रक्रिया

1. प्लेट्स को प्रतिभागी की दृष्टि रेखा के समकोण पर लगभग 75 सेमी की दूरी पर एक कमरे में रखा जाता है जिसे दिन के उजाले में अच्छी तरह से व्यवस्थित किया जाता है।

2. प्रतिभागी को प्लेट संख्या 1–25 में अंकों को पढ़ने के लिए कहा जाता है और प्रत्येक पठन तीन सेकंड के भीतर पूरा किया जाना चाहिए।

3. प्रतिभागी के दृश्य दोष का आकलन करने के लिए ,प्रतिभागी द्वारा पहचाने गए अंकों का मिलान मानक तालिका (तालिका 2.1) से किया जाता है।

4. यदि प्रतिभागी 17 या अधिक प्लेटों को पढ़ने में सक्षम है, तो उसे सामान्य रंग दृष्टि के रूप में निरूपित किया जाता है। यदि प्रतिभागी 13 या उससे कम प्लेट पढ़ने में सक्षम है, तो उसे लाल–हरे रंग की दृष्टि की अक्षमता(कमी के रूप) में पहचाना जाता है।

5. प्लेट नंबर 18, 19, 20 और 21 में अंक 5, 2, 45 और 73 पढ़ने में सक्षम प्रतिभागी और तुलनात्मक रूप से प्लेट 14, 10, 13 और 17 को अधिक आसानी से अंक पढ़ने वाले प्रतिभागियों को असामान्य कहा जाता है।

6. प्रोटान और ड्यूटान प्रकार के रंग दृष्टि में अंतर करने के लिए, प्लेट्स 22,23, 24 और 25 को उपयोग किया जाता है।

7. यदि प्रतिभागी लाल अंक को पढ़ने में विफल रहता है, तो उसे प्रोटान कहा जाता है और यदि लाल–बैंगनी अंकों को पढ़ने में विफल रहता है तो उसे ड्यूटान के रूप में लेबल किया जाता है।

तालिका 2.1: सामान्य और रंग दृष्टि की कमी के अंतर के लिए मानदंड

प्लेट संख्या	सामान्य रंग दृष्टि	लाल–हरे (R–G) रंग की कमी	कुल वर्णांधता और असक्तता
1	12	12	12
2	8	3	X
3	6	5	X
4	29	70	X
5	57	35	X
6	5	2	X
7	3	5	X
8	15	17	X
9	74	21	X
10	2	X	X
11	6	X	X
12	97	X	X
13	45	X	X
14	5	X	X
15	7	X	X

16	16	X				X
17	73	X				X
18	X	5				X
19	X	2				X
20	X	45				X
21	X	73				X
		प्रोटान		ड्यूटान		
		प्रबल	हल्का	प्रबल	हल्का	
22	26	6	(2) 6	2	2 (6)	X
23	42	2	(4) 2	4	4 (2)	X
24	35	5	(3) 5	3	3 (5)	X
25	96	6	(9) 6	9	9 (6)	X

एक्स (x) = प्लेट नहीं पढ़ा; रिक्त स्थान = पढ़ना अनिश्चित है; कोष्ठक में अंक = पढ़ा जा सकता है लेकिन तुलनात्मक रूप से अस्पष्ट

उन विषयों (प्रतिभागियों) के लिए जो प्लेट संख्या 1–25 में अंकों को पढ़ने में असमर्थ हैं, प्लेट संख्या 26–38 का उपयोग किया जाता है और विषय को प्लेट पर दो एक्स के बीच की घुमावदार रेखाओं को नरम ब्रश से ट्रेस करने के लिए कहा जाता है। प्रत्येक प्लेट की ट्रेसिंग दस सेकंड के भीतर की जानी चाहिए। इनका विस्तृत विवरण इस प्रकार है (मसीन और चहल, 1996)।

प्लेट संख्या 26 और 27 दो एक्स(X') के बीच घुमावदार रेखा का पता लगाने में प्रयुक्त की जाती हैं जिसे सामान्य व्यक्ति बैंगनी और लाल रेखाओं के साथ ट्रेस करता है। प्रोटोनोपिया और प्रबल प्रोटोनोमेलिया के मामले में केवल बैंगनी रेखा का पता लगाया जाता है, और हल्के प्रोटोनोमेलिया के मामले में दोनों रेखाओं का पता लगाया जाता है लेकिन बैंगनी रेखा को फॉलो करना आसान होता है। ड्यूटेरोनोपिया और प्रबल ड्यूटेरानोमेलिया में केवल लाल रेखा का पता लगाया जाता है, और हल्के ड्यूटेरानोमेलिया के मामले में दोनों रेखाओं का पता लगाया जाता है किंतु इसमें लाल रेखा को फॉलो करना आसान होता है।

प्लेट संख्या 28 और 29 दो एक्स(X') के बीच घुमावदार रेखा का पता लगाने में लाल–हरे रंग की कमी वाले अधिकांश लोग लाइन के साथ ट्रेस करते हैं, लेकिन सामान्य और पूर्ण वर्णांध और कमजोरी वाले अधिकांश लोग लाइन का पालन करने में असमर्थ होते हैं।

प्लेट संख्या 30 और 31 दो एक्स(X') के बीच की घुमावदार रेखा को ट्रेस करने में सामान्य नीली हरी रेखा का पता लगाता है, लेकिन रंग दृष्टि की कमी वाले अधिकांश लोग रेखा का अनुसरण करने या सामान्य रेखा से भिन्न रेखा का अनुसरण करने में असमर्थ होते हैं।

प्लेट संख्या 32 और 33 दो एक्स(X') के बीच घुमावदार रेखा का पता लगाने में सामान्य नारंगी रेखा को ट्रेस है, लेकिन रंग दृष्टि की कमी वाले अधिकांश लोग रेखा का पालन करने में असमर्थ होते हैं या सामान्य से अलग रेखा का पालन नहीं कर पाते हैं।

प्लेट नंबर 34 और 35 दो एक्स(X') बीच सामान्य नीले–हरे और पीले हरे(येलोइस ग्रीन) रंग को जोड़ने वाली घुमावदार रेखा का पता लगाने में प्रयुक्त होती है। इसमें लाल–हरे रंग की कमी वाले लोग नीले हरे और बैंगनी रंग को जोड़ने वाली रेखा का पता लगाते हैं और पूर्ण वर्णांता और अक्षमता वाले लोग इस रेखा का पता लगाने में सक्षम नहीं होते हैं।

प्लेट नंबर 36 और 37 दो एक्स(X') के बीच घुमावदार रेखा का पता लगाने में, बैंगनी और नारंगी को जोड़ने वाली सामान्य रेखा का पता लगाने में प्रयुक्त होती है। लाल–हरे रंग की कमी वाले लोग बैंगनी और नीले हरे रंग को जोड़ने वाली रेखा का पता लगाते हैं, और पूर्ण वर्णांधता और अन्य अक्षमता वाले लोग इन रेखाओं को ट्रेस नहीं कर पाते हैं।

प्लेट नंबर 38 दो एक्स(X') के बीच घुमावदार रेखा का पता लगाने में प्रयुक्त होती है। सामान्य और रंग दृष्टि की कमी वाले दोनों ही रेखा का पता लगाने में सक्षम होते हैं।

सावधानियां:–

1. परीक्षण सीधे धूप या बिजली के प्रकाश में नहीं किया जाना चाहिए क्योंकि इससे रंग के सेड्स की उपस्थिति में परिवर्तन के कारण विसंगति पैदा हो सकती है।
2. जब उपयोग में न हो, तो टेस्ट प्लेट की किताब को बंद रखें क्योंकि सूर्य के प्रकाश के अनुचित संपर्क से प्लेटों का रंग फीका पड़ सकता है।
3. यदि यह संदेह है कि, विषय की ओर से जानबूझकर धोखा दिया जा रहा है तो प्लेटों के क्रम को बदलें।

अभ्यास करें: इशिहारा प्लेटों का उपयोग करने वाले प्रतिभागियों में जन्मजात मूल की रंग दृष्टि की कमी का आकलन करें।

2.4 संदर्भ

Cole, BL. (2007) Assessment of inherited colour vision defects in clinical practice. Clin Exp Optom, 90: 3: 157–175.

Bhasin, MK & Chahal, SMS (1996). A Laboratory Manual for Human Blood Analysis. Delhi: Kamla-Raj Enterprises.

Latheef SAA & P.Venkatramana. Colour blindness,Taste sensitivity. Module 7. Paper 13. Research methods and filed work.pp1-21. A module to UGC E-Pathashala, Dept. of Anthropology, ePg Pathashla, Anthropology.An MHRD project under its national mission through ICT.Available at: https://epgp.inflibnet.ac.in/Home/ViewSubject?catid=1

इकाई 3 ग्लूकोज–6–फॉस्फेट डिहाइड्रोजनेज की कमी (G6PD)*

इकाई की रूपरेखा

3.0 परिचय

3.1 G6PD की कमी के निदान की विधियां

3.1.1 रैपिड डायग्नोसिस टेस्ट (RDT)

3.1.1.1 सिद्धांत

3.1.1.2 उंगली में से केशिका रक्त निकालने के लिए आवश्यक सामग्री

3.1.1.3 केशिका रक्त निकालने में शामिल प्रक्रिया

3.1.1.4 रैपिड डायग्नोस्टिक टेस्ट के लिए आवश्यक सामग्री

3.1.1.5 प्रक्रिया

3.1.2 फ्लोरोसेंट स्पॉट टेस्ट (FST)

3.1.2.1 सिद्धांत

3.1.2.2 आवश्यक सामग्री

3.1.2.3 प्रक्रिया

3.1.3 डाई डीकोलाइजेशन स्क्रीन टेस्ट

3.1.3.1 सिद्धांत

3.1.3.2 आवश्यक सामग्री

3.1.3.3 प्रक्रिया

3.1.4 एक मात्रात्मक G6PD सब्सट्रेट की जांच

3.1.4.1 सिद्धांत

3.1.4.2 आवश्यक सामग्री

3.1.4.3 हेमोलिसेट्स की तैयारी

3.1.4.4 प्रक्रिया

3.2 संदर्भ

अधिगम के उद्देश्य

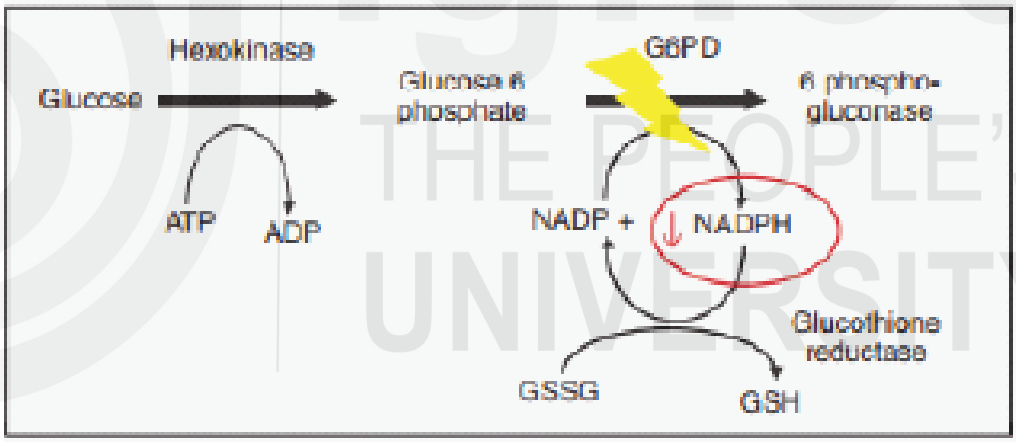
इस इकाई को पढ़ने के बाद, आप सक्षम होंगे:

- स्वास्थ्य और रोग में G6PD के महत्व को समझ सकेंगे
- G6PD की कमी के निदान के लिए उपयोग की जाने वाली विभिन्न विधियों को जान पाएंगे

*डॉ. एसएए सलीम, आनुवंशिकी एवं जैव प्रौद्योगिकी विभाग, उस्मानिया विश्वविद्यालय, हैदराबाद।
अनुवादक– डॉ.चित्रलेखा अंशु, प्रोफेसर, नई दिल्ली

3.0 परिचय

ग्लूकोज–6– फॉस्फेट डिहाइड्रोजनेज (EC1. 1. 1. 49) (G6PD) ऑक्सीडाइरेक्टेस के वर्ग से संबंधित एक एंजाइम है। G6PD जीन X गुणसूत्र की लंबी भुजा (q) पर स्थित होता है। G6PD जीन की लंबाई में 18.5 किलोबेस जोड़े होती है और इसमें 13 एक्सॉन होते हैं। यह एंजाइम मानव शरीर की सभी कोशिकाओं के कोशिका द्रव्य में अभिव्यक्त होता है। G6PD, पेंटोस फॉस्फेट (फॉस्फोग्लुकोनेट/हेक्सोज मोनोफॉस्फेट शंट) पाथवे (PPP) ग्लूकोज–6–फॉस्फेट के ऑक्सीकरण को 6 फॉस्फोग्लुकोनेट में उत्प्रेरित करता है और निकोटीनैमाइड एडेनिन डाइन्यूक्लियोटाइड फॉस्फेट (NADP) को निकोटिनमाइड एडेनिन डाइन्यूक्लियोटाइड फॉस्फेट हाइड्रोजन (NADPH) से घटाता है (चित्र 1)। पेंटोस फॉस्फेट पाथवे (PPP) एनएडीपीएच के उत्पादन के लिए आरबीसी में उपलब्ध एकमात्र तंत्र है। एनएडीपीएच को कम करने वाले सह–कारक के रूप में उपयोग करते हुए, ग्लूटाथियोन रिडक्टेस एंजाइम ऑक्सीकृत ग्लूटाथियोन (GSSG) को उसके कम रूप जीएसएच (GSH) में परिवर्तित कर देता है। कम ग्लूटाथियोन (जीएसएच) सुपरऑक्साइड (O_2-) और हाइड्रॉक्सिल रेडिकल (OH.) जैसे मुक्त कणों (अयुग्मित इलेक्ट्रॉनों) को साफ करके इलेक्ट्रॉन दाता के रूप में कार्य करते हुए आरबीसी को ऑक्सीडेटिव बलों से बचाता है। ग्लूटाथियोन के इस कार्य में कमी से आरबीसी की ऑक्सीडेटिव तनाव की संवेदनशीलता हो सकती है जिसके परिणामस्वरूप हेमोलिसिस और बाद में एनीमिया हो सकता है, अंत में प्रभावित व्यक्ति गंभीर से घातक स्थिति में जा सकता है।



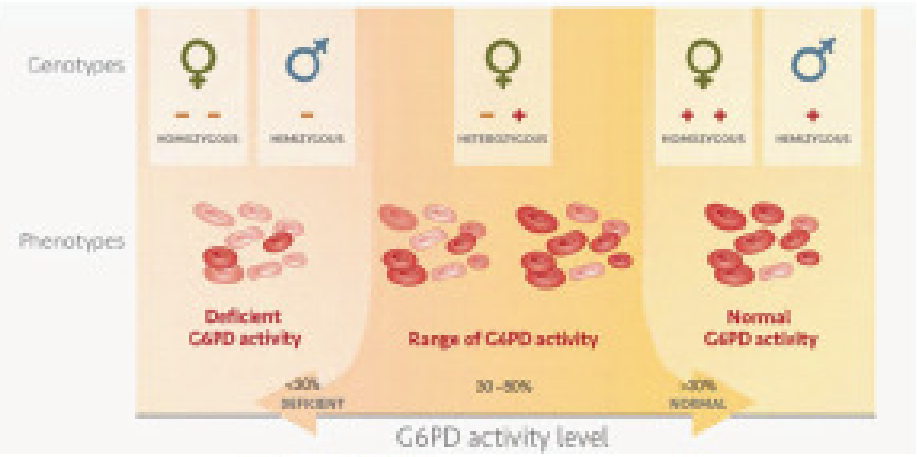
चित्र 3.1: पेंटोस फॉस्फेट पाथवे (स्रोत: डब्ल्यूएचओ आरबीटी गाइड, 2018)

G6PD की कमी G6PD जीन में उत्परिवर्तन के कारण होती है जिसके परिणामस्वरूप ज्यादातर एकल अमीनो एसिड प्रतिस्थापन होते हैं। G6PD जीन में उत्परिवर्तन एंजाइम की स्थिरता और उत्प्रेरक दक्षता को कम करता है। G6PD की कमी 1950 के दशक में वैज्ञानिक समुदाय के ध्यान में आई जब प्राइमाक्विन जैसी मलेरिया–रोधी दवा के प्रशासन ने हेमोलिटिक एनीमिया का कारण बना। भारत में, पहली बार बक्सी और उनके सहकर्मियों द्वारा 1963 में मुंबई के पारसी समुदाय में G6PD की कमी की सूचना दी गई थी। अब तक प्रोटीन कोडिंग क्षेत्रों, इंट्रोन्स 5′ और 3′ और अनट्रांसलेटेड क्षेत्रों में G6PD जीन में 217 उत्परिवर्तन रिपोर्ट किए गए हैं जो दुनिया भर में 400 मिलियन लोगों को प्रभावित कर रहे हैं। अफ्रीका, भूमध्यसागरीय, एशिया और मध्य पूर्व की आबादी में G6PD की कमी की उच्च आवृत्ति देखी गई। दुनिया भर में G6PD में सबसे आम उत्परिवर्तन(न्यूटेशन) G6PD भूमध्यसागरीय(मेडिटेरियन) और G6PD अफ्रीकी प्रकार

के हैं। G6PD की कमी की व्यापकता भारत के जाति, जनजातीय और जातीय समूहों में 0–27% के बीच थी। भारत में G6PD की कमी से जुड़े सबसे आम प्रकार G6PD भूमध्यसागरीय, G6PD केरल–कल्याण और G6PD ओडिशा के हैं। G6PD नीलगिरी, G6PD नमोरू, G6PD चट्टम, G6PD इंसुली, G6PD कोयम्बटूर, G6PD रोहिणी, G6PD जम्मू और G6PD जामनगर पाए गए वेरिएंट कम आवृत्ति के हैं।

विश्व स्वास्थ्य संगठन ने 1967 में लाल रक्त कोशिकाओं (RBC) में उनकी गतिविधि और उनसे संबंधित नैदानिक विशेषताओं के आधार पर G6PD की कमी से संबंधित प्रकारों को पांच वर्गों में वर्गीकृत किया। वे हैं: श्रेणी 1: गंभीर G6PD की कमी के साथ–साथ क्रोनिक नॉन–स्फेरोसाइटिक (गैर गोलाकार आरबीसी) हेमोलिटिक एनीमिया; श्रेणी 2: सामान्य G6PD गतिविधि का <10%; श्रेणी 3: सामान्य G6PD गतिविधि का 10-60%; श्रेणी 4: सामान्य G6PD गतिविधि का 60-100% ; और श्रेणी 5: सामान्य G6PD गतिविधि के स्तर से दोगुना। मलेरिया के स्थानिक क्षेत्रों में G6PD की कमी की उच्च आवृत्ति के कारण, G6PD की कमी वाले व्यक्तियों में मलेरिया संरक्षण की परिकल्पना को हरी झंडी दिखाई गई थी, लेकिन हाल ही में माबानेफो और उनके सहकर्मियों (2017) द्वारा किए गए मेटा–विश्लेषण से पता चला है कि G6PD एंजाइम की कमी वाले व्यक्तियों के बीच मलेरिया के खिलाफ सीधी सुरक्षा केवल अफ्रीकी देशों के लोगों और विषमयुग्मजी महिलाओं के बीच तक ही सीमित है।

G6PD की कमी एक x गुणसूत्र से जुड़ा विरासत में मिला विकार है। जैसा कि पुरुषों को एक एक्स गुणसूत्र विरासत में मिलता है, वे G6PD सामान्य या G6PD की कमी वाले हो सकते हैं। पुरुषों के बाद वाले समूह में, सामान्य G6PD गतिविधि का <10% देखा जाता है। महिलाओं में दो x गुणसूत्र होते हैं, वे विषमयुग्मजी, समयुग्मक कमी या समयुग्मजी सामान्य हो सकते हैं। समयुग्मजी कमी वाली महिला में सामान्य G6PD गतिविधि का 10% से कम और विषमयुग्मजी महिलाओं में सामान्य G6PD गतिविधि का 30%-80% माना जाता है। विषमयुग्मजी महिलाओं में, आधी कोशिकाएं एक कमी वाले रूप को व्यक्त करती हैं जबकि अन्य आधी कोशिकाएं एक्स गुणसूत्र के यादृच्छिक निष्क्रियता के कारण प्रकृतिकृत(वाइल्ड) प्रकार के एंजाइम का प्रदर्शन करती हैं। जिसके परिणामस्वरूप विषमयुग्मजी महिलाओं में G6PD का निदान चुनौतीपूर्ण है और G6PD की कमी वाली कोशिकाएं ऑक्सीकरण एजेंटों (दवाओं, बैक्टीरिया और वायरस) के लिए अतिसंवेदनशील होती हैं (चित्र 3.2)। G6PD की कमी वाले अधिकांश वाहकों में तब तक कोई लक्षण नहीं होते हैं जब तक कि वे हेमोलिसिस उत्प्रेरण एजेंटों (टाइफाइड बुखार, निमोनिया, साइटोमेगालोवायरस, हेपेटाइटिस वायरस ए और बी, फवा बीन्स का सेवन और मलेरिया–रोधी, जीवाणुरोधी और एनाल्जेसिक दवाओं का सेवन) के संपर्क में नहीं आते हैं, जो हेमोलिसिस का कारण बनते हैं। G6PD में अफ्रीकी प्रकार के उत्परिवर्तन के वाहकों में हेमोलिसिस की दवा से संबंधित प्रेरण (म्यूटेशन) देखा जाता है। G6PD जीन के श्रेणी1 आनुवंशिक वेरिएंट के वाहकों में क्रोनिक नॉन–स्फेरोसाइटिक (गैर गोलाकार आरबीसी) हेमोलिटिक एनीमिया के कारण लंबे समय तक रक्त आधान(ट्रांसफ्यूजन) की आवश्यकता होती है। G6PD और यूरिडीन डाइफॉस्फेट ग्लूकोरोनोसिल ट्रांसफेज I जीन में दोहरे म्यूटेंट के कारण नवजात शिशुओं में पीलिया रोग विकसित होता है।



चित्र 3.2: G6PD जीनोटाइप और फेनोटाइप (स्रोत: डब्लूएचओ आरडीटी गाइड, 2018)

3.1 G6PD की कमी के निदान की विधियां

हेमोलिसिस के जोखिम के कारण, G6PD की कमी वाले व्यक्तियों में रुग्णता और परिहार्य मृत्यु दर को रोकने और G6PD की कमी को ज्ञात करने के लिए स्क्रीनिंग की सिफारिश की जाती है। G6PD की कमी के निदान के लिए विभिन्न तरीकों का उपयोग किया जाता है जिनमें प्रमुख है फ्लोरोसेंट स्पॉट टेस्ट, डाई डीकोलाइज़ेशन, साइटोकेमिकल परख, रैपिड डायग्नोसिस टेस्ट (RDT), मात्रात्मक परख, एक मात्रात्मक G6PD सब्सट्रेट की जांच और आणविक परीक्षण (पीसीआर–प्रतिबंध खंड लंबाई बहुरूपता, सेंगर सिक्वेंसिंग (अनुक्रमण) और नेक्सट जनरेशन सिक्वेंसिंग)। प्रत्येक विधि के अपने गुण और दोष होते हैं। इस इकाई में, विश्व स्वास्थ्य संगठन (WHO, 2018) द्वारा अनुशंसित रैपिड डायग्नोसिस टेस्ट (RDT), फ्लोरोसेंट स्पॉट टेस्ट (FST), डाई डीकोलाइज़ेशन और G6PD मात्रात्मक एक सब्सट्रेट परख (रोपेर एवं अन्य, 2020) को G6PD की कमी के निदान के लिए वर्णित किया गया है। .

3.1.1 रैपिड डायग्नोसिस टेस्ट (RDT)

यह एक पार्श्व प्रवाह क्रोमैटोग्राफिक परीक्षण है जो उंगली में सुई चुभा कर केशिका रक्त पर G6PD की कमी का गुणात्मक पता लगाने के लिए उपयोग किया जाता है। नीचे वर्णित विधि 2018 में प्रकाशित विश्व स्वास्थ्य संगठन के रैपिड डायग्नोसिस टेस्ट पर गाइड पर आधारित है।

3.1.1.1 सिद्धांत

इस विधि में, बफर के बाद रक्त को प्लास्टिक कैसेट में रखे नाइट्रोब्लू टेट्राजोलियम इंप्रेग्नेटेड नाइट्रोसेल्यूलोज स्ट्रिप में जोड़ा जाता है और 10 मिनट के लिए इनक्यूबेट किया जाता है। रक्त में मौजूद G6PD नाइट्रोब्लू टेट्राजोलियम को फॉर्मेजोन में बदल देता है जो बैंगनी रंग का होता है। प्लास्टिक कैसेट में रंग की अनुपस्थिति को G6PD की कमी वाले नमूने के रूप में निर्धारित किया जाता है।

3.1.1.2 उंगली में से केशिका रक्त निकालने के लिए आवश्यक सामग्री

विसंक्रमित (स्टेराइल) दस्ताने की एक जोड़ी, एल्कोहल (70%-100%), विसंक्रमित (स्टेराइल) कपास ऊन, लैंसेट/स्टेराइल सुई, एक तेज डिस्पोजेबल कंटेनर, एक गैर–तेज डिस्पोजेबल बिन, पिपेट/कप/10µl माइक्रोपिपेट ।

3.1.1.3 केशिका रक्त निकालने में शामिल प्रक्रिया

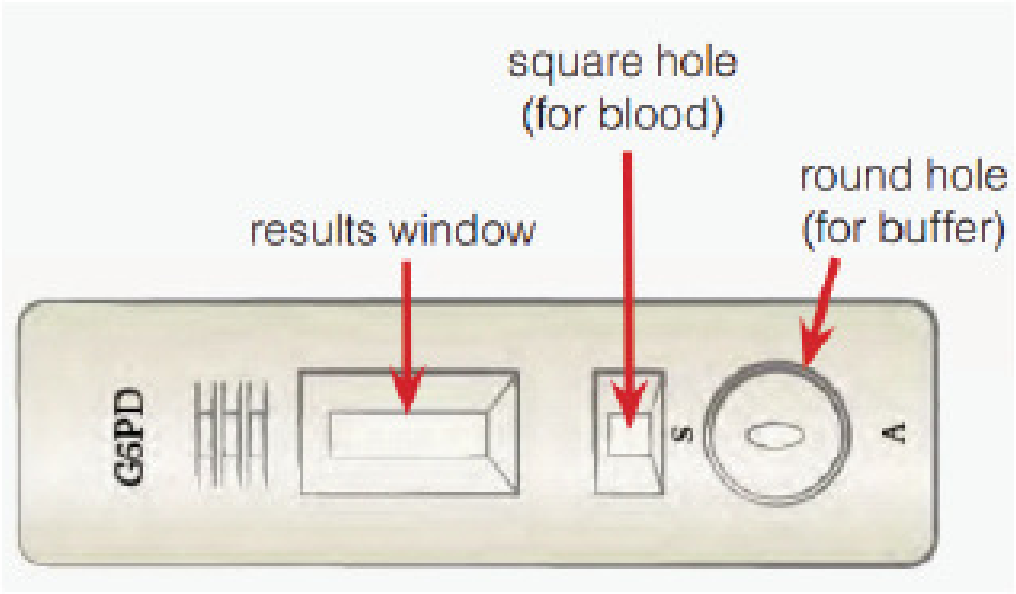
1. अपने हाथ धोएं और प्रत्येक स्वयंसेवक/रोगी के लिए एक नई जोड़ी दस्ताने की पहनें।
2. अंगूठे से चौथी उंगली चुनें। यदि कोई व्यक्ति दाएं हाथ का है तो असुविधा से बचने के लिए बाएं हाथ या इसके विपरीत चुनें
3. लुगदी (गेंद) और उंगलियों के किनारों को अल्कोहल स्वैब से पोंछ लें और इसे हवा में सूखने दें। लैंसेट या स्टेराइल सुई खोलें।
4. उँगलियों के बीच के हिस्से पर लैंसेट या स्टेराइल सुई से वार करें और उँगली के साथ चुमन की ओर दबाते हुए धीरे से उंगली के सिरे को नीचे की ओर धकेलें।
5. प्रयुक्त लैंसेट/स्टेराइल सुई को एक तेज डिस्पोसेबल कंटेनर में फेंक दें
6. रक्त की पहली बूंद को एक रोगाणुहीन रूई से पोंछ लें और उपयोग की गई रूई को गैर–तेज डिस्पोसेबल कंटेनर में फेंक दें
7. जब रक्त की एक अच्छी आकार की बूंद उंगली पर हो तो दूसरी रक्त बूंद को पिपेट या कप के रिम पर 2 µl के निशान तक इकट्ठा करें ।

3.1.1.4 रैपिड डायग्नोस्टिक टेस्ट के लिए आवश्यक सामग्री

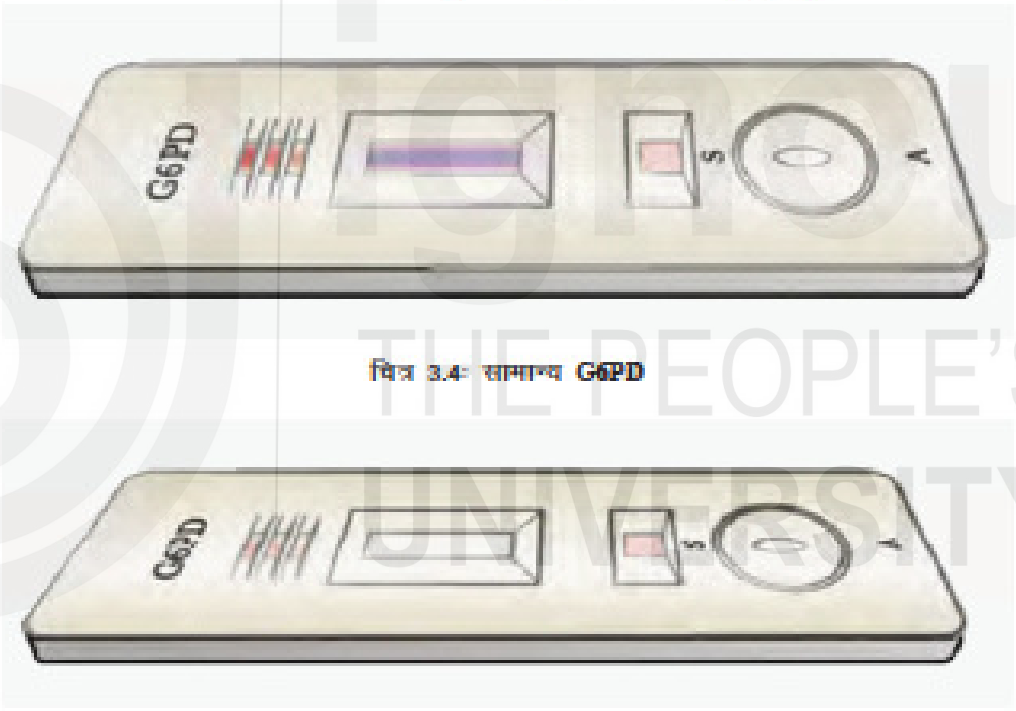
स्टेराइल दस्ताने की एक नई जोड़ी, टेस्ट कैसेट, G6PD परख बफर (निर्माता द्वारा प्रदान किया गया), घड़ी, पेंसिल, एक तेज डिस्पोजेबल कंटेनर और एक गैर–तेज डिस्पोजेबल बिन।

3.1.1.5 प्रक्रिया

1. परीक्षण पैकेज खोलें और अवशोषक थैले (desiccant sachet) को अलग करें ।
2. टेस्ट कैसेट पर स्वयंसेवी/रोगी का नाम पेंसिल से लिखें।
3. पिपेट या कप को लंबवत पकड़े हुए टेस्ट कैसेट के स्वयायर होल (एस) में रक्त डालें।
4. पिपेट या कप को नुकीले कंटेनर में डालें।
5. टेस्ट कैसेट के छेद में बफर की 2 बूंदें डालें।
6. सामग्री को टेस्ट कैसेट में 10 मिनट के लिए इनक्यूबेट करें।
7. उपयोग किए गए दस्ताने को नॉन–शार्प डिस्पोजेबल बिन में डाल दें
8. परीक्षण कैसेट में परिणाम पढ़ें। परीक्षण कैसेट में बैंगनी रंग की उपस्थिति सामान्य G6PD एंजाइम गतिविधि को दर्शाती है और यदि कोई रंग परिवर्तन नहीं होता या हल्का रंग G6PD की कमी को प्रदर्शित करता है और और रक्त का स्थानांतरण न होना अमान्य परिणाम की पुष्टि करता है।

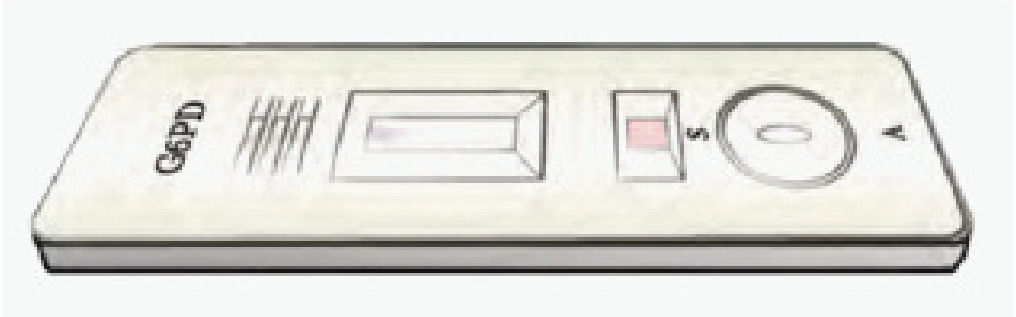


चित्र 3.3: टेस्ट कैसेट (स्रोत: डब्ल्यूएचओ आरडीटी गाइड, 2018)



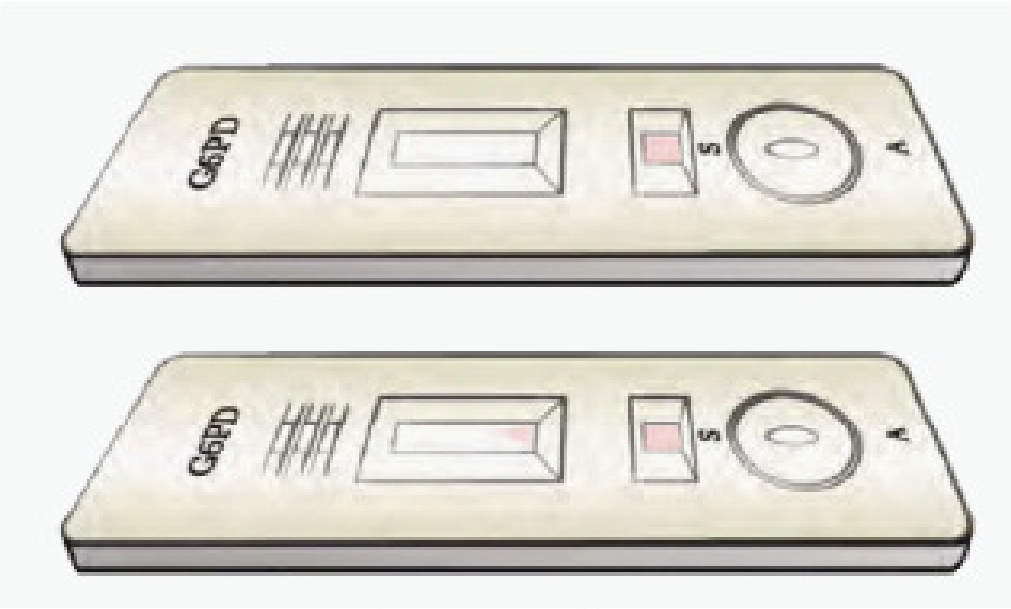
चित्र 3.4: सामान्य **G6PD**

3.5A



3.5B

चित्र **3.5A** और **3.5B**: **G6PD** की कमी



चित्र 3.6: असामान्य परिणाम

3.1.2 फ्लोरोसेंट स्पॉट टेस्ट (FST)

यह G6PD की कमी का पता लगाने के लिए व्यापक रूप से इस्तेमाल किया जाने वाला गुणात्मक परीक्षण है।

3.1.2.1 सिद्धांत

आरबीसी को नष्ट करने के लिए, रोगी/स्वयंसेवक के रक्त को ग्लूकोज–6–फॉस्फेट, गैर–फ्लोरोसेंट निकोटीनैमाइड एडेनिन डाइन्यूक्लियोटाइड फॉस्फेट (NADP) और डिटर्जेंट के प्रतिक्रिया मिश्रण के साथ मानक समय तक मिलाया जाता है फिर फिल्टर पेपर पर रखकर सुखाया जाता है और 350–420 एनएम के पराबैंगनी प्रकाश के अंतर्गत इसकी जांच की जाती है। NADPH के कारण तेज रोशनी की उपस्थिति की दर G6PD की गतिविधि के सीधे आनुपातिक होती है।

3.1.2.2 आवश्यक सामग्री

1. यूवी (UV) प्रकाश स्रोत (350–420nm)
2. थक्कारोधी Anticoagulated (एथिलीन डायमाइन टेट्रा एसिटिक एसिड (EDTA), सोडियम या पोटेशियम नमक, हेपरिन या साइट्रेट डेक्सट्रोज 25 डिग्री सेल्सियस पर 5 दिनों या 21 दिनों के लिए 4 डिग्री सेल्सियस या फिल्टर पेपर के सूखे रक्त धब्बे पर संग्रहीत किया जाता है। रक्त के नमूनों को सामान्य हीमोग्लोबिन की सीमा में लाने के लिए 0.9% सेलाइन के साथ रक्त के नमूनों (यदि उनमें हीमोग्लोबिन की उच्च सांद्रता होती है, यदि गर्भनाल रक्त का उपयोग किया जाता है) को पतला करें।
3. प्रतिक्रिया मिश्रण के 20 एमएल के लिए (β-NADP (7-5mmol/L)–2mL; ग्लूकोज–6–फॉस्फेट (10mmol/L)– 4mL; सैपोनिन(10g/L)– 4mL; Tris–HCl बफर (0-75mol/L) pH7-8–6mL; ऑक्सीकृत ग्लूटाथियोन (GSSG) (8mmol/L)–2mL; डबल डिस्टिल्ड वॉटर या अल्ट्रा–प्योर वॉटर–2mL)। 20mL का प्रतिक्रिया मिश्रण एक वर्ष के लिए–20 डिग्री सेल्सियस पर 1mL के 100 माइक्रोसेंट्रीफ्यूज

ट्यूबों में 0-2mL (200µl) की मात्रा में संग्रहीत होना चाहिए। प्रयोग शुरू करने से पहले, संग्रहीत माइक्रोसेंट्रीफ्यूज ट्यूबों को कमरे के तापमान तक पहुंचने तक रखें।

4. माइक्रोपिपेट (100 µl)

5. माइक्रोसेंट्रीफ्यूज ट्यूब (1mL)

3.1.2.3 प्रक्रिया

1. 0.2mL (200 माइक्रोल) प्रतिक्रिया मिश्रण वाले माइक्रोसेंट्रफ्यूज ट्यूब (1mL) में एंटीकोगुग्रेटेड रक्त के 20 माइक्रोल जोड़ें और सामग्री को माइक्रोपिपेट के साथ मिलाएं।

2. मिश्रित सामग्री की एक बूंद लें और ब्यूमन फिल्टर पेपर (नंबर 1) पर स्पॉट करें और इसे (इनक्यूबेट) 10 मिनट के लिए कमरे के तापमान पर रखें।

3. यूवी प्रकाश स्रोत के अन्तर्गत सूखे फिल्टर पेपर की जांच करें

4. NADPH के कारण सामान्य G6PD फ्लोरेस वाले नमूने में विलंबन या नमूने में फ्लोरेस की अनुपस्थिति को G6PD की कमी के रूप में माना जाता है।

3.1.3 डाई डीकोलाइज़ेशन स्क्रीन टेस्ट

यह एक गुणात्मक परीक्षण भी है जिसका उपयोग G6PD की कमी का पता लगाने के लिए किया जाता है।

3.1.3.1 सिद्धांत

रोगी/स्वयंसेवक के हीमोलिसेट प्रतिक्रिया मिश्रण के साथ इनक्यूबेटेड होता है जिसमें ग्लूकोज–6–फॉस्फेट, एनएडीपी, ट्रिस–एचसीएल और चमकदार क्रेसिल ब्लू (डाई) होते हैं। एनएडीपीएच के कारण प्रतिक्रिया मिश्रण में डाई के विरंगीकरण की दर आरबीसी में G6PD सामग्री के समानुपातिक होती है।

3.1.3.2 आवश्यक सामग्री

1. 24 घंटे के भीतर एकत्र किया गया एंटी कोएग्युलेटेड रक्त (EDTA),

2. हेमोलिसेट्स (रक्त का 20 µl + आसुत या अल्ट्राप्योर पानी का 1mL) 6 घंटे के भीतर तैयार किया गया हो,

3. सामान्य या कम G6PD गतिविधि के साथ नियंत्रण नमूना,

4. लिक्विड पैराफिन (कमरे के तापमान पर स्टोर करें),

5. β–NADP (0-7mmol/L)–1mL (–20°C पर स्टोर किया हुआ),

6. ग्लूकोज–6–फॉस्फेट (30mmol/L)–1mL,

7. बफर–डाई मिश्रण (Tris–HCl (0.7mol/L) pH 8.5, 320mg/L)–4.5 mL(–20°C पर स्टोर किया हुआ),

8. कार्य मिश्रण (एनएडीपी, जी6पी और बफर डाई मिश्रण मिलाएं),

9. वाटरबाथ,
10. माइक्रोपिपेट (1mL),
11. माइक्रोसेंट्रीफ्यूज ट्यूब (1mL),

अभिकर्मकों (एनएडीपी, जी6पी और बफर–डाई मिश्रण) को पिघलाएं और प्रयोग शुरू करने से पहले कमरे के तापमान पर लाएं।

3.1.3.3 प्रक्रिया

1. हीमोलिसेट (350 माइक्रोल) के परीक्षण और नियंत्रण के लिए, माइक्रोसेंट्रफ्यूज ट्यूब (1mL) में काम करने वाले मिश्रण के 0.65mL (650 माइक्रोन) मिलाएं। तरल पैराफिन की एक परत के साथ माइक्रोसेंट्रफ्यूज ट्यूबों के ढक्कन को कवर करें।
2. 2–माइक्रोसेंट्रीफ्यूज ट्यूबों को 37 डिग्री सेल्सियस पर वाटरबाथ में रखें और डाई के रंग बदलने पर ध्यान दें।
3. सामान्य G6PD गतिविधि युक्त नमूने(सैंपल) में डाई 35–60 मिनट के भीतर बदरंग होता है और G6PD की कमी वाले नमूने का रंग बदलने में डेढ़ घंटे से लेकर 24 घंटे तक का समय हो सकता है।

3.1.4 एक मात्रात्मक G6PD सब्सट्रेट की जांच

3.1.4.1 सिद्धांत

NADPH के गठन की दर G6PDH गतिविधि के समानुपाती होती है और इसे स्पेक्ट्रोफोटोमीटर में 320 एनएम पर अवशोषण में वृद्धि के रूप में मापा जाता है (ट्रिनिटी बायोटेक, 2013)।

3.1.4.2 आवश्यक सामग्री

1. एंटीकोआग्युलेटेड (ईडीटीए, हेपरिन और साइट्रेट डेक्सट्रोज) रक्त के नमूने 25 डिग्री सेल्सियस पर 5 दिनों तक या 21 दिनों के लिए 4 डिग्री सेल्सियस पर संग्रहीत किए जाते हैं
2. हेमोलिसिंग एजेंट (EDTA (27mmol/L) pH 7.0 और 0.7mmol/L 2–Mercaptoethanol) 100mg डिसोडियम EDTA सॉल्ट और 5µl 2–मर्कैप्टोएथेनॉल को 100 मिली पानी में मिलाकर तैयार किया जाता है और pH को 7 में HCl या NaOH के साथ एडजस्ट किया जाता है।)
3. हेमोलिसेट्स
4. Tris–HCl (0.1mol/L), EDTA (0.5 mmol/L) बफर pH 8.0
5. मैग्नीशियम क्लोराइड MgCl2 (100mmol/L)
6. एनएडीपी (212 pt/L)
7. ग्लूकोज–6–फॉस्फेट (6mmol/L)
8. लैपटॉप सेंट्रीफ्यूज (अपकेंद्रित्र)

9. सोडियम क्लोराइड (0.15mmol/L)
10. माइक्रोपिपेट (1mL)
11. माइक्रोसेंट्रीफ्यूज ट्यूब (2mL)
12. माइक्रोसेंट्रीफ्यूज स्टैंड
13. फाल्कन ट्यूब (5mL)
14. वाटरबाथ
15. यूवी स्पेक्ट्रोफोटोमीटर

3.1.4.3 हेमोलिसेट्स की तैयारी

इन्हें दो तरीकों से तैयार किया जाता है। पहली विधि में मिश्रित सेल्युलोज कॉलम का उपयोग करके सफेद कोशिकाओं और प्लेटलेट्स को हटाकर हेमोलिसेट्स तैयार किए जाते हैं। दूसरी विधि में, 5ml फाल्कन ट्यूब में मौजूद रक्त के प्लाज्मा और बफी कोट को 5 मिनट के लिए 1000rpm पर सेंट्रीफ्यूजेशन द्वारा हटा दिया जाता है, RBC में ठंडा सोडियम क्लोराइड (0.15mmol/L) मिलाया जाता है, 1000rpm पर सेंट्रीफ्यूज किया जाता है और सतह पर तैरनेवाला पदार्थ हटा दिया जाता है। यह चरण दो बार दोहराया जाता है। लाल रक्त कोशिका (RBC)को समान मात्रा में ठंडे सोडियम क्लोराइड (0.15mmol/L) में फिर से प्रसुप्त कर दिया जाता है। इस प्रलंबन या सस्पेंशन से, सेल सस्पेंशन के 02mL को माइक्रोपिपेट (1ml) के साथ पिपेट (बूंद–बूंद टपकाना) किया जाता है और 1.8ml हेमोलिसिंग एजेंट वाले माइक्रोसेंट्रीफ्यूज (2ml) में मिलाया जाता है। इस सेल सस्पेंशन को 10 मिनट के लिए बर्फ पर रखा जाता है और उपयोग करने से पहले मिलाया जाता है।

3.1.4.4 प्रक्रिया

1. यह जांच या तो 37°C या 30°C पर आयोजित की जानी चाहिए।
2. एक एमएल(mL) प्रतिक्रिया मिश्रण परीक्षण को क्युवेट में तैयार किया जाता है जिसे तालिका 1 में दिखाया गया है।
3. टेस्ट क्युवेट में, सब्सट्रेट (G6P) को छोड़कर सभी मिश्रण सामग्री को जोड़ा जाता है और 10 मिनट के लिए इनक्यूबेट किया जाता है।
4. परीक्षण क्युवेट में सब्सट्रेट जोड़ने के बाद यूवी स्पेक्ट्रोफोटोमीटर में 340 nm पर 10–15 मिनट के बाद अवशोषण को रिकॉर्ड करें।
5. परीक्षण प्रतिक्रिया से रिक्त स्थान का मान घटाएं।
6. पहले कुछ मिनटों के लिए अवशोषण शुरू में बढ़ता है, फिर रैखिक हो जाता है और अंत में घट जाता है क्योंकि परीक्षण क्युवेट में सब्सट्रेट को प्रयुक्त किया जाता है।
7. गणना के लिए 10 मिनट के अवशोषण डेटा का उपयोग किया जाता है। रिकॉर्ड किए गए बिंदुओं का उपयोग करके ग्राफ़ में सीधी रेखा खींचें फिर अवशोषण में वृद्धि पढ़ें और एक मिनट में वृद्धि प्राप्त करने के लिए 10 से विभाजित करें।

तालिका 3.1: परीक्षण की सामग्री और रिक्त प्रतिक्रिया मिश्रण

अभिकर्मक	परीक्षण Test(µl)	Blank(µl)
Tris-HCl (0.1mol/L), EDTA (0.5 mmol/L) cQj pH 8.0	100	100
मैग्नीशियमक्लोराइड MgCl2 (100mmol/L)	100	100
एनएडीपी (2mmol/L)	100	100
1:20 हेमोलिसेट	20	20
डबल डिस्टिल्ड वॉटर या अल्ट्राप्योर वॉटर	580	680
ग्लूकोज 6 फॉस्फेट	100	-

हेमोलिसेट में G6PD की गतिविधि की गणना NADPH संचय के परिवर्तन की प्रारंभिक दर से की जाती है।

IU/g हीमोग्लोबिन में एंजाइम गतिविधि = 340 एनएम/मिनट पर अवशोषण में परिवर्तन x कमजोर पड़ने वाला कारक x 100

6.22 Hb

Hb = हीमोग्लोबिन

6.22 = 340 एनएम. पर एनएडीपीएच का एमएमओएल विलुप्त होने का गुणांक मान प्रति 1012 कोशिकाओं या प्रति एमएल (mL) आरबीसी या प्रति g Hb या प्रति g Hb के रूप में व्यक्त किए जाते हैं।

लघुरूप

mmol = मिलीमोल; L = लीटर; g = ग्राम; mg = मिलीग्राम

3.2 संदर्भ

Frank, J.E. (2005). Diagnosis and management of G6PD deficiency. Am Fam Physician. 2005 Oct 1;72(7):1277-82.

Glucose -6-phosphate dehydrogenase. Clinical chemistry catalogue. Trinity Biotech, (2013). Available at https://www.trinitybiotech.com/area/g-6-pdh/.

World Health Organization; (2018). How to use a G6PD rapid diagnostic test (for detecting glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency): A guide for training at health facility level. Geneva.

Mbanefo, E.C. Ahmed, A.M. Titouna, A. Elmaraezy, A. Trang NT, Phuoc Long, N. Hoang Anh, N. Diem Nghi, T. The Hung, B. Van Hieu, M. Ky Anh, N. Huy, NT. Hirayama, K. (2017). Association of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency and Malaria: A Systematic Review and Meta-Analysis. Sci Rep. 2017 Apr 6;7:45963. doi: 10.1038/srep45963.

Mukherjee, M.B. Colah, R.B. Martin, S. Ghosh, K. (2015). Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency among tribal populations of India - Country scenario. Indian J Med Res. 2015 May;141(5):516-20. doi: 10.4103/0971-5916.159499.

Roper, D. Layton, M. Rees, D. Lambert, C. Vulliamy, T. De la Salle, B. D'Souza, C. (2020). British Society for Haematology. Laboratory diagnosis of G6PD deficiency. A British Society for Haematology Guideline. Br J Haematol. 189 (1):24-38.

Standardization of procedures for the study of glucose-6-phosphate dehydrogenase. Report of a WHO Scientific Group. World Health Organ Tech Rep Ser 1967; 366:1-53.

Tripathy, V. Reddy, B.M. (2007) . Present status of understanding on the G6PD deficiency and natural selection. J Postgrad Med. 53 (3):193-202.

ignou
THE PEOPLE'S
UNIVERSITY

इकाई 4 फेनिलथियोकार्बामाइड (पीटीसी) आस्वादन (चखने) की क्षमता*

इकाई की रूपरेखा

4.0 परिचय

4.1 तकनीक

4.2 प्रक्रिया

4.3 संदर्भ

अधिगम के उद्देश्य

इस इकाई को पढ़ने के बाद, आप सक्षम होंगे:

- हैरिस और कालमस द्वारा दी गई मात्रात्मक थ्रेशोल्ड विधि की चर्चा कर पाएंगे ; तथा
- पीटीसी स्वाद क्षमता के लिए अपनाई जाने वाली प्रक्रिया का वर्णन कर सकेंगे।

4.0 परिचय

फेनिलथियोकार्बामाइड (पीटीसी) को फेनिलथियोरिया या एन–फेनिलथियोरिया या 1–फेनिलथियोरिया या 1–फेनिल–2–थियोरिया के रूप में भी जाना जाता है, यह एक क्रिस्टलीय रासायनिक यौगिक है। यह रसायन थियोरिया के वर्ग से संबंधित है और इसके हाइड्रोजन परमाणुओं में से एक को फिनाइल समूह द्वारा प्रतिस्थापित किया जाता है। PTC का आणविक सूत्र $C_7H_8N_2S$ है और आणविक भार 152.22 है।

आर्थर फॉक्स ने 1931 में इस रसायन को संश्लेषित किया। मनुष्यों में इस रासायनिक पदार्थ का स्वाद लेने की क्षमता के संबंध में एक द्विरूपता देखी गई है। रक्त समूहों के बाद, पीटीसी स्वाद संवेदनशीलता मानव भिन्नता का अध्ययन करने के लिए व्यापक रूप से उपयोग किया जाने वाला एक आनुवंशिक मार्कर है। कुछ लोगों को इसका स्वाद नहीं मिल पाता है तो कुछ को यह बहुत कड़वा लगता है। जो लोग पीटीसी के स्वाद के प्रति संवेदनशील होते हैं उन्हें 'टेस्टर्स' कहा जाता है जबकि अन्य जो इसका स्वाद नहीं बता पाते हैं उन्हें 'नॉन टेस्टर्स' कहा जाता है। पीटीसी की स्वाद संवेदनशीलता यौवन के बाद विकसित होती है और मनुष्यों में उम्र के साथ घटती जाती है।

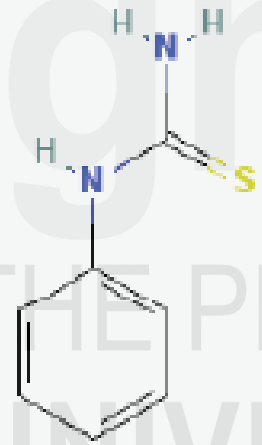
यह देखा गया है कि टेस्टर्स की तुलना में नॉन–टेस्टर्स के जीभ के अग्र भाग पर कवक के रूप में पैपिला का घनत्व अधिक होता है।

महिलाओं में पीटीसी की स्वाद संवेदनशीलता की सीमा न्यूनतम दिखाई देती है। पीटीसी की स्वाद संवेदनशीलता जीभ पर मौजूद कड़वे रिसेप्टर्स की उपस्थिति के कारण होती है।

*योगदानकर्ता– डॉ. पी. वेंकटरमना, मानवविज्ञान संकाय, सामाजिक विज्ञान विद्यापीठ, इग्नू, नई दिल्ली
अनुवादक– डॉ. चित्रलेखा अंशु, फ्रीलांसर, नई दिल्ली

ये रिसेप्टर्स जीन TSA2R38 द्वारा एन्कोडेड हैं जो क्रोमोसोम 7 पर स्थित होते हैं। G प्रोटीन के सक्रिय न होने की स्थिति में पीटीसी का स्वाद बताने में असमर्थता होती है। शोधकर्ताओं ने टेस्टर्स में पीएवी हैप्लोटाइप और नॉन–टेस्टर्स में एवीआई हैप्लोटाइप की पहचान की है।

भारतीय आबादी में टेस्टर्स की आवृत्ति 42% लेकर 68% तक है। आदिवासी और मध्य भारतीय आबादी में इसकी बारंबारता कम होती है। अधिक ऊंचाई पर रहने, मानसिक स्थिति, धूम्रपान, कॉफी/चाय का सेवन, मासिक धर्म चक्र, सिर में चोट, कान में संक्रमण, रसायनों का अंतर्ग्रहण, चयापचय संबंधी गड़बड़ी और विकिरण के संपर्क के कारण पीटीसी की स्वाद संवेदनशीलता में अवरोध पाया गया है। पीटीसी चखने की क्षमता एक आनुवंशिक विशेषता है जिसे एलील्स T और t की एक जोड़ी द्वारा नियंत्रित किया जाता है, जो बाद वाले पर हावी होता है। जीनोटाइप TT और Tt वाले व्यक्ति टेस्टर होते हैं और जीनोटाइप tt वाले लोग पीटीसी के लिए नॉन–टेस्टर्स होते हैं।



चित्र 4.1 फेनिलथियोकार्बामाइड की रासायनिक संरचना
(स्रोत: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phenylthiourea#section=2D-Structure)

4.1 तकनीक

पीटीसी की स्वाद संवेदनशीलता का परीक्षण सुपरथ्रेशोल्ड या थ्रेशोल्ड विधियों का उपयोग करके किया जा सकता है। थ्रेशोल्ड विधि सबसे कम सांद्रता पर स्वाद संवेदनशीलता का पता लगाती है जबकि उच्च सांद्रता पर परीक्षण की तीव्रता का पता लगाने के लिए रेटिंग पैमानों का उपयोग करते हुए सुपरथ्रेशोल्ड विधि का उपयोग किया जाता है। सुप्राथ्रेशोल्ड विधि की सीमाएं स्वाद संवेदनशीलता का पता लगाते समय सांद्रता और संवेदनशीलता परिवर्तन की एक श्रृंखला पर कई नमूनों को नियोजित करती हैं। हैरिस और कालमस (1949) द्वारा प्रदर्शित थ्रेशोल्ड विधि पीटीसी टेस्टर्स को नॉन–टेस्टर्स से अलग करने के लिए सबसे व्यापक रूप से इस्तेमाल किया जाने वाला प्रोटोकॉल है।

तालिका 4.1 पीटीसी स्वाद क्षमता परीक्षण के लिए सॉल्यूशन तैयार करना

सॉल्यूशन संख्या	PTC (mg/l)
1	1,300
2	650
3	325
4	162.5
5	81.25
6	40.63
7	20.32
8	10.16
9	5.08
10	2.54
11	1.27
12	0.64
13	0.32
14	0.16

इस विधि में, पहले 1 लीटर उबले हुए नल के पानी में 1.3 ग्राम फेनिलथियोकार्बामाइड घोलकर एक स्टॉक घोल तैयार किया जाता है और इसे सॉल्यूशन संख्या 1 के रूप में नामित किया जाता है। दिखाए गए स्टॉक तालिका 4.1 के अनुसार स्टॉक घोल से क्रमिक विलियन को निम्नानुसार बनाया जाता है। स्टॉक घोल (सॉल्यूशन संख्या 1) से 50 मिली लें और 50 मिली उबला हुआ नल का पानी डालें और अच्छी तरह मिलाएँ और इसे घोल नंबर 2 के रूप में लेबल करें। इस घोल से 50 मिली लें और 50 मिली उबला हुआ नल का पानी मिलाकर घोल नंबर 3 बनाएं। इसी तरह, सॉल्यूशन संख्या 1 से 14 तक क्रमिक रूप से तनु विलयनों की एक श्रृंखला तैयार की जाती है।

4.2 प्रक्रिया

घोल (सॉल्यूशन) चखने से पहले सब्जेक्ट(विषय) को मुंह धोने के लिए कहा जाना चाहिए। स्वाद 'थ्रेशोल्ड' का निर्धारण दो चरणों में होता है। पहले चरण में, उच्च तनुकृत विलयन (अर्थात घोल संख्या 14,13) से शुरू होकर और क्रमशः ऊपर की ओर, विषय को एक गिलास में कुछ मिलीलीटर तब तक दिया जाता है जब तक कि विषय पहले एक निश्चित स्वाद का अनुभव न कर ले। यह थ्रेशोल्ड के लिए एक अनुमानित वैल्यू प्रदान करता है। अधिकांश व्यक्तियों को किसी विशेष पीटीसी घोल (सॉल्यूशन) का स्वाद लेने के तुरंत बाद जीभ के पीछे कड़वा स्वाद का अनुभव होता है। हालांकि, कुछ विषयों को इस तरह के स्वाद का अनुभव कभी नहीं होता है और उन्हें 'नो–टेस्टर्स' कहा जाता है। चरण दो में, सब्जेक्ट को आठ टंबलर(पीपे/गिलास) दिए जाते हैं, चार टंबलर कुछ मिलीलीटर पानी (नियंत्रण) से भरे होते हैं और शेष चार चरण एक में निर्धारित किए गए सॉल्यूशन(घोल) के कुछ मिलीलीटर घोल से भरे होते हैं। इन टंबलरों को रैंडम ढंग से व्यवस्थित कर सब्जेक्ट को यह बताया जाता है कि चार गिलासों में सॉल्यूशन(घोल) है और अन्य चार में पानी है। फिर सब्जेक्ट को स्वाद लेने और उन्हें चार–चार के दो समूहों में अलग करने के लिए कहा जाता है। द्रव की मात्रा सीमित नहीं होती है आवश्यकता अनुसार यदि जरूरत हो तो परीक्षण के दौरान टंबलर को फिर से भर दिया जाता है। यदि विषय इन घोलों

को चार के दो समूहों में सही ढंग से अलग नहीं कर पाता है, तो अगला परीक्षण कम सान्द्रता के साथ तब तक दोहराया जाता है जबतक कि विषय इनका सही ढंग से विभेद न कर ले। यदि न्यूनतम सांद्रता पर पूरी तरह से सही उत्तर दिया जाता है उसे थ्रेशोल्ड के रूप में लिया जाता है। दूसरी ओर, यदि, विषय दो समूहों को सटीक रूप से अलग करने में असमर्थ है, तो परीक्षण में घोल की सांद्रता बढ़ाकर इसे तब तक दोहराया जाता है जब तक उस सांद्रता स्तर पर न पहंच जाए जिसपर सही उत्तर प्राप्त हो।

सावधानियां

1. उबला हुआ पानी (नल से) स्थानीय स्रोत से प्राप्त किया जाना चाहिए। जसका उपयोग घोल बनाने और नियंत्रण दोनों के लिए हो।
2. प्रत्येक प्रतिभागी को धूम्रपान और कॉफी/चाय पीने से परहेज करने को कहा जाता है क्योंकि यह स्वाद संवेदनशीलता में हस्तक्षेप करता है।
3. घोल को कमरे के तापमान पर बोतलों में संग्रहित किया जाना चाहिए ।

अभ्यास

थ्रेशोल्ड विधि द्वारा 20 व्यक्तियों के पीटीसी स्वाद थ्रेशोल्ड का मान ज्ञात करें।

4.3 संदर्भ

Bhasin, MK & Chahal, SMS (1996). A Laboratory Manual for Human Blood Analysis. Delhi: Kamla-Raj Enterprises.

Latheef SAA & P.Venkatramana. Colour blindness, Taste sensitivity. Module 7. Paper 13. Research methods and filed work.pp1-21. A module to UGC E-Pathshala, Dept. of Anthropology, ePg Pathshla, Anthropology. An MHRD project under its national mission through ICT. Available at: https://epgp.inflibnet.ac.in/Home/ViewSubject?catid=1

सुझाावित अध्ययन (SUGGESTED READINGS)

खंड 1: मानव जनसंख्या आनुवंशिकी का परिचय

Bhasin, M. K. & Chahal S. M. S. (1996). A Laboratory Manual for Human Blood Analysis. Delhi: Kamla-Raj Enterprises.

Cavalli-Sforza, L.L. & Bodmer, W.F (1971). The Genetics of Human Population, San Francisco: Freeman

Cummings M.R. (2011). Human Heredity: Principles and Issues. Ninth Edition. Brooks/Cole, Cengage Learning

Das, B. M. (2008). Outlines of Physical Anthropology. Delhi: Kitab Mahal.

Hemoglobinopathies: Current Practices for Screening, Confirmation and Follow-Up. Centre For Disease Control and Prevention, 2015.

Jurmain, R., Kilgore, L. & Trevathan, W. (2011). Essentials of Physical Anthropology. USA: Wadsworth.

Kimura, M. (1983). The Neutral Theory of Molecular Evolution. New York: Cambridge University Press.

Relethford, J.H. (2012). Human Population Genetics. (Vol. 7). New Jersey: John Wiley & Sons.

खंड 2: मानव आबादी की आनुवंशिक संरचना

Hartl, D.L., & Clark, A.G. (2007). Principles of Population Genetics. 4th Edition, Sunderland, Mass: Sinauer Associates.

Relethford, J.H. (2012). Human Population Genetics. (Vol. 7). John Wiley & Sons.

Wright, S. (1931). Evolution in Mendelian populations. Genetics, 16, pp 97.

Crow, J.F. and Kimura M. (1970). An Introduction to Population Genetics Theory. New Jersey: Blackburn Press.

Li, C.C. (1976). First Course in Population Genetics. USA: Boxwood Press.

Cavalli Sforza L.L. and Bodmer W.F. (1971). The Genetics of Human Populations. San Francisco. USA: W.H. Freeman,

Kimura, M. and G.H, Weiss. (1964). The Steppingstone Model of Population Structure and the Correlation with Distance. Genetics. 49:561-576.

Majumder, PP. (1993). Human Population Genetics. A centennial tribute to JBS Haldane. Ed. PP Majumder. New York: Plenum Press.

Malhotra, K.C. (1988). Statistical Methods in Human Population Genetics. Ed. KC Malhotra. Calcutta: Eka Press.

Dobzhansky, T. (1951). Genetics and The Origin of Species. New York: Columbia University Press.

Buss, D. M. (2004). Evolutionary Psychology: The New Science of the Mind. Allyn & Bacon.

Cavalli Sforza L.L. & Bodmer W.F. (1971). The Genetics of Human Populations. San Francisco. USA: W.H. Freeman,

Harrison, GA & Boyce, AJ (1972). The Structure of Human Populations. Clarendon Press: London

Shangvi L.D. (1966). Inbreeding in India. Eugenics Quarterly, 13:291-301.

Anstee DJ. (2010). The Relationship Between Blood Groups and Disease. Blood 2010;115 (23):4635-4643.

Buettner – Janusch J. (1973). Physical Anthropology: A perspective. New York: Wiley.

Relethford, J.H. (2002). The Human Species: An Introduction to Biological Anthropology. New York: McGraw-Hill Professional

प्रयोगिक नियमावली (मैनुअल)

Bhasin, M. K. & Chahal S. M. S. 1996. A Laboratory Manual for Human Blood Analysis. Delhi: Kamla-Raj Enterprises.

Mukherji, D, Mukherjee, D.P. & Bharathi, P. (2009). Laboratory Manual for Biological Anthropology. New Delhi: Asian Books Pvt Ltd.

ignou THE PEOPLE'S UNIVERSITY