

## Przeznaczenie

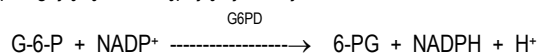
Do ilościowego, kinetycznego oznaczania dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej (G6PD) we krwi przy długości fali 340 nm. Wyłącznie do diagnostyki in vitro. **Rx Only**

## Znaczenie kliniczne<sup>1</sup>

Testy G6PD są najczęściej wykonywane w celu określenia niedoboru G6PD, który jest szeroko rozpowszechniony na całym świecie. Stwierdzono, że niedobór G6PD w krwinkach czerwonych jest podstawą niektórych anemii hemolitycznych wywołanych lekami. Ten rodzaj podatności na hemolizę indukowaną lekami jest często nazywany „wrażliwością na prymachinę”, ponieważ badania, które doprowadziły do jej scharakteryzowania, przeprowadzono podczas badań właściwości hemolitycznych tego związku przeciwmalarycznego.

## Streszczenie

Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa (G6PD, D-glukozy-6-fosforan: oksydoreduktaza, EC 1.1.1.49) katalizuje pierwszy etap przetwarzania pentozofosforanu, utleniając glukozy-6-fosforan (G-6-P) do 6-fosfoglukonian (6-PG) i redukowanie NADP do NADPH. Procedura ta jest modyfikacją metod spektrofotometrycznych Kornberga i Horeckera<sup>2</sup> oraz Lohra i Wallera<sup>3</sup>, polegającą na następującej reakcji:



Fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NADP) jest redukowany przez G6PD w obecności G-6-P. Szybkość tworzenia NADPH jest proporcjonalna do aktywności G6PD i jest mierzona spektrofotometrycznie jako wzrost absorpcji przy 340 nm. Wytwarzanie drugiego równoważnika molowego NADPH przez dehydrogenazę 6-fosfoglukonianu erytrocytów (6-PGDH) zgodnie z reakcją:



zapobiega się przez stosowanie maleimidu, inhibitora 6-PGDH.

## Odczynniki

**Odczynnik G6PD R1:** Rozpuszczony odczynnik będzie zawierał 1,5 mM NADP i 12 mM maleimid. Zawiera również bufor, stabilizator i środek lizujący.

**Odczynnik G6PD R2:** glukozy-6-fosforan, 1,05 mM, bufor i sól magnezowa. Azydek sodu dodany jako środek konserwujący.

**Odczynnik do lizy G6PD:** Triton X-100, 0,05% obj./obj. Do użytku z analizatorami dyskretnymi.

## Środki ostrożności

- Odczynniki te są przeznaczone wyłącznie do diagnostyki in vitro.
- Należy przestrzegać zwykłych środków ostrożności obowiązujących przy obchodzeniu się z odczynnikami laboratoryjnymi. Utylizować odpady zgodnie z lokalnymi, stanowymi i federalnymi przepisami.
- Odczynnik R1 jest SZKODLIWY. Może powodować uczulenie w przypadku wdychania i kontaktu ze skórą. Nosić odpowiednią odzież ochronną.
- Odczynnik R2 zawiera azydek sodu, który może reagować z ołowianymi i miedzianymi instalacjami rurowymi, tworząc wysoce wybuchowe azydki metali. Unikaj gromadzenia się azydku.

## Przygotowanie odczynnika

- Odczynnik R1 przygotowuje się przez rozpuszczenie w objętości wody dejonizowanej wskazanej na etykiecie fiolki lub ulotce aplikacyjnej. Delikatnie wiruj i odwróć kilka razy, aby rozpuścić zawartość. Odczekaj 2-3 minuty i ponownie wymieszaj. UWAGA: W przypadku użycia

ręcznego zapoznaj się z instrukcjami przygotowania odczynników w części „PROCEDURA MANULANA”.

- Odczynnik R2 jest dostarczany w stanie gotowym do użycia.

## Przechowywanie i stabilność odczynnika

- Gdy nieotwarte fiolki z odczynnikami R1 i odczynnikami R2 są przechowywane w temperaturze 2-8°C. Są stabilne do daty ważności podanej na etykiecie.
- Rozpuszczony odczynnik R1 jest stabilny przez 8 godzin w temperaturze pokojowej (18-26°C) lub 5 dni w lodówce (2-8°C).

## Pobieranie i przechowywanie próbek

- Zaleca się pobieranie próbek zgodnie z dokumentem NCCLS M29-T2.
- Krew pełna pobrana na EDTA, heparynę lub kwas-cytrynian-dekstrozę (ACD) jest zadowalająca.<sup>4-8</sup>
- G6PD krwinek czerwonych jest stabilny w pełnej krwi przez tydzień w lodówce (2-8°C), ale jest niestabilny w hemolizatach krwinek czerwonych.<sup>9</sup>
- Nie zaleca się zamrażania krwi.<sup>4</sup>
- Ponieważ aktywność jest podawana w gramach hemoglobiny lub liczbie krwinek czerwonych, przed wykonaniem testu G6PD należy oznaczyć stężenie hemoglobiny lub liczbę krwinek czerwonych. Integralność erytrocytów pobranych na ACD jest zachowana nawet po dłuższym przechowywaniu, więc uzyskanie dokładnej liczby krwinek czerwonych zwykle nie stanowi problemu.<sup>6</sup> Jednak liczba krwinek czerwonych w próbkach pobranych na heparynę staje się niewiarygodna po około 2 dniach.<sup>6</sup> Tak więc w przypadku próbek heparynizowanych: wyniki najlepiej przedstawia się w odniesieniu do stężenia hemoglobiny.

## Substancje interferujące

- Miedź całkowicie hamuje G6PD w stężeniu 100 umol/L, a jony siarczanowe (0,005 mol/L) zmniejszają obserwowany poziom aktywności G6PD. 10
- Wiadomo, że niektóre leki i inne substancje wpływają na poziom G6PD.<sup>11</sup> we krwi
- Retikulocyty mają wyższy poziom G6PD niż dojrzałe krwinki czerwone. Zaleca się, aby nie wykonywać testów po ciężkim przełomie hemolitycznym, ponieważ poziomy G6PD mogą wydawać się fałszywie podwyższone. W tych warunkach wykrycie niedoboru może wymagać badań rodzinnych. Badanie można wykonać po powrocie do normy poziomu dojrzałych krwinek czerwonych.
- W normalnych warunkach aktywność leukocytów, płytek krwi i surowicy jest stosunkowo niewielka. Jednak w przypadkach skrajnej niedokrwistości, znacznie podwyższonej liczby białych krwinek lub bardzo niskich poziomów aktywności G6PD w krwinkach czerwonych, udział w sumie uzyskanej w tych warunkach może być znaczny. Patrz rozdział „Stosowanie próbek bez kożuszka Buffy-Coat”.

## Aplikacja na analizatory automatyczne

Procedury aplikacyjne są dostępne dla różnych przyrządów automatycznych. Aby uzyskać więcej informacji, skontaktuj się z Działem Obsługi Technicznej Pointe Scientific (1-800-445-9853)..

## Materiały wymagane

Patrz rozdział „odczynniki”.

## Materiały wymagane, niedostarczane

- Spektrometr zdolny do pomiaru przy długości fali 340 nm z komorą kuwety z kontrolowaną temperaturą (zamiast tego można użyć łaźni wodnej lub inkubatora)
- Urządzenia do pipetowania do dostarczania objętości wymaganych do testu
- Kuwety o właściwościach optycznych odpowiednich do użycia przy 340 nm

# Pointe Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Reagent Set

4. Sprzęt i odczynniki do oznaczania stężenia hemoglobiny lub wykonywania zliczania krwinek czerwonych. Pointe Scientific oferuje numer katalogowy H7504 do oznaczania hemoglobiny.

## Procedura manualna

Przygotuj odczynnik roboczy R1, dodając liżę jako rozcieńczalnik zamiast DH2O. Dodać objętość podaną na folcie R1. Tego odczynnika można teraz używać w sposób opisany poniżej. **UWAGA:** Nie używać DH2O do rekonstrukcji fiolki R1 do procedury ręcznej.

Temperaturę reakcji należy utrzymywać na poziomie 37°C lub innej stałej temperaturze (patrz rozdział „Korekta temperatury”).

1. Przygotuj mieszaninę reakcyjną
  - a. Do oznaczonej kuwety dodaj 1,0 ml Odczynnika R1.
  - b. Dodać 0,01 ml krwi i dokładnie wymieszać do całkowitego zawieszenia erytrocytów. Odstawić w temperaturze pokojowej (18-26°C) na 5-10 minut.
  - c. Dodać 2,0 ml odczynnika R2 i delikatnie wymieszać, kilkakrotnie obracając. Przejdź do kroku 2.
2. Umieścić kuwetę w bloku grzewczym o stałej temperaturze lub w łaźni wodnej i inkubować przez około 5 minut.
3. Odczytać i zapisać absorbancję (A1) TESTU przy 340 nm względem wody. (Jeżeli używasz łaźni wodnej lub inkubatora, włóż z powrotem kuwetę.)
4. Dokładnie 5 minut później odczytaj i zapisz absorbancję (A2).
5. Aby określić aktywność G6PD, zapoznaj się z sekcją „Obliczenia”..

## Kalibracja

Procedura jest standaryzowana na podstawie milimolarnej absorpcji NADPH, która wynosi 6,22 przy 340 nm. Pomiar szybkości wzrostu absorbancji ( $\Delta A$ ) przy 340 nm służy do ilościowego określenia aktywności enzymatycznej.

## Kontrola jakości

Wiarygodność wyników badań należy monitorować za pomocą materiałów kontrolnych o znanych wartościach w każdym przebiegu. Zaleca się, aby każde laboratorium ustaliło własną częstotliwość oznaczania kontroli.

## Obliczenia

$$\Delta A \text{ na min} = \frac{A2 - A1}{5}$$

Aktywność G6PD można wyrazić jako U/g hemoglobiny (Hb) lub U/10<sup>12</sup> erytrocytów (RBC).

$$\begin{aligned} \text{G6PD (U/g Hb)} &= \Delta A \text{ na min} \times \frac{100 \times 3.01}{0.01 \times 6.22 \times \text{Hb (g/dl)}} \times \text{TCF} \\ &= \Delta A \text{ na min} \times \frac{4839}{\text{Hb (g/dl)}} \times \text{TCF} \end{aligned}$$

Gdzie: 100 = Współczynnik do przeliczenia aktywności na 100 ml  
3.01 = Całkowita objętość reakcji (ml)  
0.01 = Objętość próbki (ml)  
6.22 = Milimolowa absorpcja NADPH przy 340 nm  
Hb (g/dl) = Stężenie hemoglobiny dla każdej próbki  
TCF = Współczynnik korekcji temperatury (1 przy 37°C)

$$\text{lub } \text{G6PD (U/10}^{12}\text{RBC)} = \frac{\Delta A \text{ na min} \times 3.01 \times 10^{12} \times \text{TCF}}{0.01 \times 6.22 \times (\text{N} \times 10^6) \times 1000}$$

Gdzie: 3.01 = Całkowita objętość reakcji (ml)  
10<sup>12</sup> = Faktor do wyrażania aktywności na 10<sup>12</sup> komórek  
0.01 = Objętość próbki (ml)  
6.22 = Milimolowa absorpcja NADPH przy 340 nm  
N x 10<sup>6</sup> = Liczba krwinek czerwonych (czerwone krwinki/mm<sup>3</sup>) określona dla każdej próbki  
1000 = Konwersja liczby krwinek czerwonych z mm<sup>3</sup> na ml

TCF = Współczynnik korekcji temperatury (1 przy 37°C)

To równanie sprowadza się do:

$$\text{G6PD (U/10}^{12}\text{ RBC)} = \Delta A \text{ na min} \times \frac{48,390}{\text{N}} \times \text{TCF}$$

Gdzie: N = liczba krwinek czerwonych podzielona przez 10<sup>6</sup>  
TCF = Współczynnik korekcji temperatury (1 przy 37°C)

Przykład:

Analiza próbki, która miała liczbę czerwonych krwinek 4.6 x 10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup> i stężenie hemoglobiny 15.2 g/dl dała w 37°C  $\Delta A$  na min = 0.028.

$$\text{G6PD (U/g Hb)} = 0.028 \times \frac{4839}{15.2} = 8.9$$

$$\text{G6PD (U/10}^{12}\text{ RBC)} = 0.028 \times \frac{48,390}{4.6} = 295$$

UWAGA: Jeśli  $\Delta A$  na minutę jest większe niż 0,060, powtórz oznaczenie używając 5  $\mu$ l krwi i pomnóż wynik przez 2.

## Użycie próbki wolnej od „Buffy-Coat”

W normalnych warunkach aktywność G6PD wnoszona przez leukocyty, płytki krwi i surowicę jest stosunkowo niewielka. Jednak, jak donosi Echler<sup>12</sup> i inni<sup>13</sup>, dokładniejszy pomiar aktywności G6PD w krwinkach czerwonych, zwłaszcza w obecności niedokrwistości i/lub leukocytozy, można osiągnąć, stosując do testu próbki krwi pozbawione kożuszka leukocytarne. Zatem w przypadku wartości granicznej uzyskanej z krwi pełnej uzasadnione może być powtórzenie oznaczenia na próbce wolnej od kożuszka leukocytarne.

## Korekcja temperatury

Gdy temperatura wynosi 37°C, w obliczeniach nie jest wymagany współczynnik korekcji temperatury (TCF). Jeśli test jest wykonywany w innej temperaturze, należy użyć TCF.<sup>14</sup>

Temperatura kuwety	TCF
25°C	1.98
30°C	1.37

## Definicja jednostki

Jedna jednostka międzynarodowa (U) to taka ilość aktywności G6PD, która przekształci 1 mikromol substratu na minutę w warunkach określonych w tej ulotce..

## Wartości oczekiwane<sup>1</sup>

Zalecany zakres odniesienia dla G6PD mierzonego w temperaturze 37°C to:

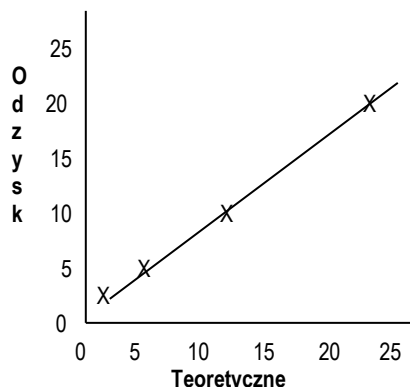
$$12.1 \pm 2.09 \text{ U/g Hb}$$

$$351 \pm 60.6 \text{ U/10}^{12}\text{ RBC}$$

Wartości dla noworodków mogą być nieco wyższe. Zdecydowanie zaleca się, aby każde laboratorium ustaliło swój własny oczekiwany zakres.

## Charakterystyka testu

**Zakres testu:** Maksymalna aktywność G6PD, którą można zmierzyć za pomocą tej procedury, wynosi około 21,0 U/g Hb lub 609 U/10<sup>12</sup> RBC.



# Pointe Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Reagent Set

HORIBA Instruments Incorporated

5449 Research Drive, Canton, MI 48188  
Phone: 734-487-8300; (800) 445-9853



Dane zaobserwowane	Wynik teoretyczny	Odzysk procentowy
2.78 U/g Hb	2.78 U/g Hb	100.0%
5.29 U/g Hb	5.56 U/g Hb	95.1%
10.80 U/g Hb	11.12 U/g Hb	97.1%
20.69 U/g Hb	22.24 U/g Hb	93.0%

**Precyzja:** Badania precyzji przeprowadzono na Roche Cobas Mira zgodnie z wytycznymi zawartymi w dokumencie NCCLS EP5-T2.15 Dane przedstawiono w jednostkach, które zautomatyzowany analizator wygeneruje dla aktywności G6PD (U/L). Zdecydowanie zaleca się sprawdzenie precyzji testu na każdym analizatorze przed użyciem.

#### W ciągu dnia (n=20)

Średnia	S.D.	C.V.
257	23.7	9.2%
658	18.3	2.8%
1939	48.0	2.5%

#### Z dnia na dzień (n=20)

Średnia	S.D.	C.V.
269	30.8	11.4%
700	28.7	4.1%
2014	43.0	2.1%

**Czułość:** Zakładając, że granica czułości reprezentująca zmianę absorbancji przy 340 nm wynoszącą 0,001 na minutę, przy użyciu tej procedury można wykryć aktywność G6PD wynoszącą 0,4 U/g Hb lub 11 U/1012 RBC (zakładając stężenie hemoglobiny 12,0 g/dl i liczba krwinek czerwonych 4,5 x 10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>).

**Swoistość:** Utlenianie glukozy-6-fosforanu przez G6PD jest specyficzne. Każde niespecyficzne tworzenie NADPH w wyniku utleniania innych substratów przez enzymy endogenne zachodzi w okresie preinkubacji. Dehydrogenaza 6-fosfoglukonianu jest całkowicie hamowana przez maleimid w układzie odczynników.

**Korelacja:** badanie porównawcze metody Pointe Scientific i Sigma Diagnostics dało równanie regresji liniowej z  $y = 0,97x + 0,07$  i współczynnikiem korelacji 0,994.

#### Piśmiennictwo

- Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Tietz Textbook of Clinical Chemistry, W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 1645-1650, 1999.
- Kornberg, A., Horecker, B.L.: Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. IN Methods in Enzymology. S.P. Colowick, N.O. Kaplan, Editors, Vol. I, Academic Press, New York, p 323, 1955.
- Lohr, G.W., Waller, H.D.: Glucose-6-phosphate Dehydrogenase. IN Methods of Enzymatic Analysis. H.U. Bergmeyer, Editor, Academic press, New York, p. 636, 1974.
- Kachmar, J.F., Moss, D.W.: Enzymes. IN Fundamentals of Clinical Chemistry. N.W. Tietz, Editor. Saunders, Philadelphia, pp. 666-672, 1976.
- WHO Technical Report Series No. 366, Standardization of Procedures for the study of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase, 1967.
- Lowe, M.L., Stella, A.F., Mosher, B.S., Gin, J.B., Demetriou, J.A.: Microfluorometry of Glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate Dehydrogenase in red cells. Clin Chem 18:440, 1972.
- Bishop, C.: Assay of glucose-6 phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.49) and Glucose-6-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.44) in red cells. J Lab Clin Med 68:149, 1966.
- Beutler, E., Blume, K.G., Kaplan, C., Lohr, W., Ramont, B., Valentine, W.N.: International committee for standardization in haematology:

Recommended screening test for glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD). Bri J of Haem. 43:469-477, 1979.

- Stiene, E.A.: Red Cell Enzyme Deficiencies: A Review: Am J Med Tech 38:454, 1972.
- Boulard M, Blume KG, Beutler E. The effects of copper on red cell enzyme activities. J. Clin Invest, 51, 459 (1972)
- Young, D.S., Pestaner, L.C., Gibberman, V.: Effects of drugs on clinical laboratory tests. Clin Chem 21: 302D, 1975.
- Echler, G.: Determination of glucose-6-phosphate dehydrogenase. Am J Med Technol 49:259, 1983.
- Morelli, A., Benatti, U., Lenzerini, L., Sparatore, B. et al: The interference of leukocytes and platelets with measurement of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity of erythrocytes with low activity variants of the enzyme. Blood 58: 642, 1981.
- Beutler, E., et al, International Committee for Standardization in Haematology: Recommended methods for red-cell enzyme analysis. Br. J. Haematol., 35:331-340, 1977.
- NCCLS document "Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices", 2<sup>nd</sup> Edition, 1992.

#### Symbole

Zużyć do (RRRR-MM-DD)	Numer LOT
Numer katalogowy	Producent
Wyłącznie do diagnostyki <i>in vitro</i>	Zakres temperatur
Zapoznaj się z instrukcją użytkownika	<b>Rx Only:</b> Wyłącznie do profesjonalnego użytku
Znak CE	Autoryzowany przedstawiciel na Europę

G7583 Wyprodukowano przez HORIBA Instruments Incorporated-Pointe Brand 5449 Research Drive Canton, MI 48188 2°C

Manufactured by HORIBA Instruments Incorporated – Pointe Brand  
5449 Research Drive, Canton, MI 48188

European Authorized Representative:

Obelis s.a.  
Boulevard Général Wahis 53  
1030 Brussels, BELGIUM  
Tel: (32)2.732.59.54 Fax:(32)2.732.60.03 email: mail@obelis.net



#### Certyfikacja

Odczynniki Pointe są certyfikowane do produkcji zgodnie z określonymi parametrami. Każdy odczynnik Pointe, który nie spełnia specyfikacji w podanym terminie ważności, zostanie natychmiast i bezpłatnie wymieniony.

Rev. 06/23 P803-G7583-02-PL