

Utilização prevista

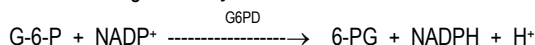
Para a determinação cinética quantitativa de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) no sangue a 340 nm. Apenas para utilização em diagnóstico *in vitro*. **Rx Only**

Relevância clínica¹

Os ensaios de G6PD são normalmente realizados para determinar a deficiência de G6PD, muito comum em todo o mundo. Foi determinado que a deficiência de G6PD nos glóbulos vermelhos é a base de certas anemias hemolíticas induzidas por medicamentos. Este tipo de suscetibilidade à hemólise induzida por medicamentos é muitas vezes chamado "sensibilidade à primaquina", porque os estudos que levaram à sua caracterização foram realizados durante as investigações das propriedades hemolíticas deste composto antimalárico.

Resumo

A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD, D-glicose-6-fosfato: oxidorreductase, EC 1.1.1.49) catalisa a primeira etapa da derivação da pentose-fosfato, oxidando a glicose-6-fosfato (G-6-P) a 6-fosfogluconato (6-PG) e reduzindo o NADP a NADPH. Este procedimento é uma modificação dos métodos espectrofotométricos de Kornberg e Horecker² e de Lohr e Waller³, envolvendo a seguinte reação:



A nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP) é reduzida por G6PD na presença de G-6-P. A taxa de formação de NADPH é proporcional à atividade de G6PD e é medida com espectrofotômetro como aumento da absorvância a 340 nm. A produção de um segundo equivalente molar de NADPH por 6-fosfogluconato desidrogenase eritrocitária (6-PGDH) de acordo com a reação:



é evitada através da utilização de maleimida, um inibidor de 6-PGDH.

Reagentes

Reagente R1 de G6PD: O reagente reconstituído irá conter NADP, 1,5 mM, e maleimida, 12 mM. Contém ainda tampão, estabilizador e agente lisante.

Reagente R2 de G6PD: Glicose-6-fosfato, 1,05 mM, tampão e sal de magnésio. Azida de sódio adicionada como conservante.

Reagente de lise de G6PD: Triton X-100, 0,05% v/v. Para utilização com aplicações de analisador discreto.

Precauções

- Estes reagentes destinam-se apenas a diagnóstico *in vitro*.
- Devem ser seguidas as precauções normais de manuseamento de reagentes de laboratório. Elimine os resíduos em conformidade com todas as leis locais, estaduais e federais.
- O Reagente R1 é NOCIVO. Pode causar sensibilização pela inalação e pelo contacto com a pele. Use vestuário de proteção adequado.
- O Reagente R2 contém azida de sódio, que pode reagir com canalização de chumbo e cobre e formar azidas de metal altamente explosivas. Evite a acumulação de azidas.

Preparação dos reagentes

- O reagente R1 é preparado através da reconstituição com o volume de água desionizada indicado no rótulo do frasco ou na folha de aplicação. Agite cuidadosamente e inverta várias vezes para dissolver os conteúdos. Aguarde 2-3 minutos e misture novamente. **NOTA:** Para a utilização manual, consulte as instruções de preparação do reagente indicadas na secção "PROCEDIMENTO MANUAL".
- O reagente R2 é fornecido pronto a utilizar.

Armazenamento e estabilidade

- Por abrir, os frascos de reagente R1 e o reagente R2 são armazenados a 2-8°C. Mantêm-se estáveis até à data de validade indicada nos rótulos.

- O reagente R1 reconstituído mantém-se estável durante 8 horas à temperatura ambiente (18-26°C) ou durante 5 dias refrigerado (2-8°C).

Colheita e armazenamento de amostras

- Recomenda-se que a colheita de amostras seja realizada de acordo com o documento NCCLS M29-T2.
- O sangue total colhido em EDTA, heparina ou ácido citrato dextrose (ACD) é satisfatório.^{4,8}
- O G6PD dos glóbulos vermelhos mantém-se estável no sangue total durante uma semana quando refrigerado (2-8°C), mas é instável em hemólises de glóbulos vermelhos.⁹
- Não é recomendável congelar o sangue.⁴
- Uma vez que a atividade é apresentada em termos de gramas de hemoglobina ou número de glóbulos vermelhos, a concentração de hemoglobina ou a contagem de glóbulos vermelhos deve ser determinada antes de realizar o ensaio de G6PD. A integridade dos eritrócitos colhidos no ACD é preservada mesmo após um armazenamento prolongado, de modo que a obtenção de contagens precisas de glóbulos vermelhos geralmente não representa qualquer problema.⁶ No entanto, as contagens de glóbulos vermelhos de amostras colhidas em heparina tornam-se pouco fiáveis após cerca de 2 dias.⁶ Por esse motivo, relativamente às amostras heparinizadas, é preferível apresentar os resultados em termos de concentração de hemoglobina.

Substâncias interferentes

- O cobre inibe completamente a G6PD a uma concentração de 100 umol/L e os iões de sulfato (0,005 mol/L) reduzem os níveis observados de atividade de G6PD.¹⁰
- Sabe-se que determinados medicamentos e outras substâncias influenciam os níveis de G6PD circulantes.¹¹
- Os reticulócitos têm níveis de G6PD mais elevados do que os glóbulos vermelhos maduros. Recomenda-se que os ensaios não sejam realizados após uma crise hemolítica grave, pois os níveis de G6PD podem aparecer erradamente elevados. Nestas condições, a deteção de uma deficiência pode exigir estudos familiares. O teste pode ser realizado depois de o nível de glóbulos vermelhos maduros ter regressado ao normal.
- Em circunstâncias normais, a contribuição dos leucócitos, plaquetas e soro para a atividade é relativamente pequena. No entanto, em casos de anemia extrema, contagem de glóbulos brancos muito elevada ou níveis muito baixos de atividade de G6PD nos glóbulos vermelhos, a contribuição para o total obtido nestas condições pode ser significativa. Consulte a secção "Utilização de amostras sem camada leucocitária".

Aplicações de analisadores automatizados

Estão disponíveis procedimentos de aplicação para diversos instrumentos automatizados. Contacte o Departamento de Assistência Técnica da Pointe Scientific (1-800-445-9853) para mais informações.

Materiais fornecidos

Consulte a secção "Reagentes"

Materiais necessários, mas não fornecidos

- Espectrofotômetro com capacidade de medição a 340 nm com compartimento de cuvete com temperatura controlada (pode ser utilizado um banho-maria ou uma incubadora em alternativa).
- Dispositivos de pipetagem para distribuição dos volumes necessários para o ensaio
- Cuvetes com propriedades óticas adequadas para utilização a 340 nm
- Equipamento e reagentes para determinar a concentração de hemoglobina ou realizar uma contagem de glóbulos vermelhos. A Pointe Scientific disponibiliza o número de catálogo H7504 para a determinação de hemoglobina.

Conjunto de Reagentes de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase Pointe

Procedimento manual

Prepare o reagente de trabalho R1 adicionando lise como diluente em vez de DH₂O. Adicione o volume indicado no frasco de R1. Este reagente pode agora ser utilizado conforme indicado a seguir. **NOTA: Não utilize DH₂O para reconstituir o frasco de R1 para o procedimento manual.**

A temperatura da reação deve ser mantida a 37°C ou outra temperatura constante (consulte a secção “Correção da temperatura”).

1. Prepare a mistura de reação:
 - a. Adicione 1,0 mL de Reagente R1 a uma cuvete rotulada.
 - b. Adicione 0,01 mL de sangue e misture bem para suspender completamente os eritrócitos. Deixe repousar à temperatura ambiente (18-26°C) durante 5-10 minutos.
 - c. Adicione 2,0 mL de Reagente R2 e misture cuidadosamente invertendo o frasco várias vezes. Prossiga para o passo 2.
2. Coloque a cuvete num compartimento de cuvete com temperatura constante ou em banho-maria e incube durante aproximadamente 5 minutos.
3. Leia e registre a absorvância (A1) do TESTE a 340 nm vs. água. (Se for utilizado banho-maria ou uma incubadora, coloque novamente a cuvete nos mesmos.)
4. Passados exatamente 5 minutos, leia e registre a absorvância (A2).
5. Para determinar a atividade de G6PD, consulte a secção “Cálculos”.

Calibração

O procedimento é padronizado com base na capacidade de absorção milimolar de NADPH, que é de 6,22 a 340 nm. A medição da taxa de aumento da absorvância (ΔA) a 340 nm serve para quantificar a atividade enzimática.

Controlo da qualidade

A fiabilidade dos resultados do teste deve ser monitorizada utilizando materiais de controlo com valores conhecidos em cada ensaio. Recomenda-se que cada laboratório estabeleça a sua própria frequência de determinação de controlo.

Cálculos

$$\Delta A \text{ por min} = \frac{A_2 - A_1}{5}$$

A atividade de G6PD pode ser expressa em U/g de hemoglobina (Hb) ou em U/10¹² de eritrócitos (RBC).

$$\begin{aligned} \text{G6PD (U/g Hb)} &= \Delta A \text{ por min} \times \frac{100 \times 3,01}{0,01 \times 6,22 \times \text{Hb (g/dL)}} \times \text{FCT} \\ &= \Delta A \text{ por min} \times \frac{4839}{\text{Hb (g/dL)}} \times \text{FCT} \end{aligned}$$

Em que: 100 = Fator para converter a atividade para 100 mL
 3,01 = Volume de reação total (mL)
 0,01 = Volume de amostra (mL)
 6,22 = Capacidade de absorção milimolar de NADPH a 340 nm
 Hb (g/dL) = Concentração de hemoglobina de cada amostra
 FCT = Fator de correção de temperatura (1 a 37°C)
 ou $\text{G6PD (U/10}^{12}\text{RBC)} = \frac{\Delta A \text{ por min} \times 3,01 \times 10^{12} \times \text{FCT}}{0,01 \times 6,22 \times (\text{N} \times 10^6) \times 1000}$

Em que: 3,01 = Volume de reação total (mL)
 10¹² = Fator para expressar a atividade em 10¹² células
 0,01 = Volume de amostra (mL)
 6,22 = Capacidade de absorção milimolar de NADPH a 340 nm
 N x 10⁶ = Contagem de glóbulos vermelhos (glóbulos vermelhos/mm³) determinada para cada amostra
 1000 = Conversão da contagem de glóbulos vermelhos de mm³ para mL
 FCT = Fator de correção de temperatura (1 a 37°C)

Esta equação reduz-se a:

$$\text{G6PD (U/10}^{12}\text{RBC)} = \Delta A \text{ por min} \times \frac{48390}{\text{N}} \times \text{FCT}$$

Em que: N = Contagem de glóbulos vermelhos dividida por 10⁶
 FCT = Fator de correção de temperatura (1 a 37°C)

Exemplo:

O ensaio de uma amostra que tinha uma contagem de glóbulos vermelhos de 4,6 x 10⁶/mm³ e uma concentração de hemoglobina de 15,2 g/dL resultou numa ΔA por min a 37°C de 0,028.

$$\text{G6PD (U/g Hb)} = 0,028 \times \frac{4839}{15,2} = 8,9$$

$$\text{G6PD (U/10}^{12}\text{RBC)} = 0,028 \times \frac{48390}{4,6} = 295$$

NOTA: Se a ΔA por min for superior a 0,060, repita a determinação utilizando 5 μL de sangue e multiplique os resultados por 2.

Utilização de amostras sem camada leucocitária

Em circunstâncias normais, a contribuição dos leucócitos, plaquetas e soro para a atividade de G6PD é relativamente pequena. No entanto, conforme descrito por Echler¹² e outros¹³, é possível conseguir uma medição mais precisa da atividade de G6PD nos glóbulos vermelhos, especialmente na presença de anemia e/ou leucocitose, utilizando amostras sem camada leucocitária para o ensaio. Deste modo, em caso de obtenção de um valor “borderline” com sangue total, pode ser necessário repetir o ensaio numa amostra sem camada leucocitária.

Correção de temperatura

Quando a temperatura é de 37°C, não é necessário qualquer fator de correção de temperatura (FCT) nos cálculos. Se o ensaio for realizado a outra temperatura, é necessário utilizar um FCT.¹⁴

Temperatura da cuvete	FCT
25°C	1,98
30°C	1,37

Definição de unidade

Uma Unidade Internacional (U) é a quantidade de atividade de G6PD que converte 1 micromole de substrato por minuto nas condições especificadas neste folheto.

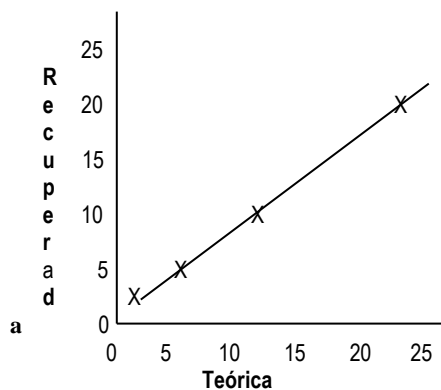
Valores esperados¹

Um intervalo de referência recomendado para G6PD medida a 37°C é:
 12,1 ± 2,09 U/g Hb
 351 ± 60,6 U/10¹² RBC

Os valores de recém-nascidos podem ser um pouco mais elevados. Recomenda-se vivamente que cada laboratório estabeleça o seu próprio intervalo esperado.

Características de desempenho

Intervalo do ensaio: A atividade de G6PD máxima que pode ser medida por este procedimento é aproximadamente 21,0 U/g Hb ou 609 U/10¹² RBC.



Conjunto de Reagentes de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase Pointe

HORIBA Instruments Incorporated

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

HORIBA
Medical

Dados observados	Resultado teórico	Porcentagem de recuperação
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%

Precisão: Foram realizados estudos de precisão num Roche Cobas Mira seguindo as diretrizes constantes do documento NCCLS EP5-T2.¹⁵ Os dados são apresentados em unidades que um analisador automatizado produzirá para a atividade de G6PD (U/L). Recomenda-se vivamente que a precisão do ensaio seja verificada em cada analisador antes da utilização.

No mesmo dia (n=20)

Média	D.P.	C.V.
257	23,7	9,2%
658	18,3	2,8%
1939	48,0	2,5%

Entre dias (n=20)

Média	D.P.	C.V.
269	30,8	11,4%
700	28,7	4,1%
2014	43,0	2,1%

Sensibilidade: Assumindo que o limite de sensibilidade representa uma alteração na absorvância a 340 nm de 0,001 por minuto, é possível detetar uma atividade de G6PD de 0,4 U/g Hb ou 11 U/10¹² RBC utilizando este procedimento (assumindo uma concentração de hemoglobina de 12,0 g/dL e uma contagem de glóbulos vermelhos de 4,5 x 10⁶/mm³).

Especificidade: A oxidação do glicose-6-fosfato pela G6PD é específica. Qualquer formação não específica de NADPH devido à oxidação de outros substratos por enzimas endógenas ocorre durante o período de pré-incubação. A 6-fosfogluconato desidrogenase é completamente inibida pela maleimida no sistema de reagente.

Correlação: Um estudo de comparação entre o método da Pointe Scientific e o da Sigma Diagnostics resultou numa equação de regressão linear com $y = 0,97x + 0,07$ e um coeficiente de correlação de 0,994.

Bibliografia

- 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 Tech38:454, 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", 2nd Edition, 1992.

Legenda dos símbolos

Utilizar até (AAAA-MM-DD)	LOT Lote e código
REF Número de catálogo	Fabricante
IVD Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>	Limite de temperatura
Consulte as instruções de utilização	Rx Only: Utilização apenas mediante receita médica
Marcação CE	EC REP Representante autorizado na Comunidade Europeia

REF G7583 Fabricado por HORIBA Instruments Incorporated-Pointe Brand 5449 Research Drive Canton, MI 48188 2°C

Fabricado por HORIBA Instruments Incorporated – Pointe Brand
5449 Research Drive, Canton, MI 48188

Representante Europeu Autorizado:
Obelis s.a.

Boulevard Général Wahis 53

1030 Brussels, BÉLGICA

Tel.: (32)2.732.59.54 Fax: (32)2.732.60.03 e-mail: mail@obelis.net



Certificada para executar reagentes

Os reagentes Pointe são certificados para serem fabricados de acordo com parâmetros especificados. Qualquer produto de reagente Pointe que não cumpra as especificações até à data de validade indicada será regularizado imediatamente sem quaisquer custos.

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