

Utilizarea prevăzută

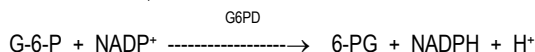
Pentru determinarea cantitativă, cinetică a glucozo-6-fosfat dehidrogenazei (G6PD) din sânge la 340 nm. Doar pentru diagnostic *in vitro*. **Rx Only**.

Semnificația clinică¹

Testele G6PD se efectuează de obicei pentru a determina deficitul de G6PD, care este larg răspândit în întreaga lume. S-a constatat că deficitul de G6PD din globulele roșii este baza pentru anumite anemii hemolitice induse de medicamente. Acest tip de susceptibilitate la hemoliză indusă de medicamente este numit deseori „sensibilitate la primachină” deoarece studiile care au dus la caracterizarea lui au fost făcute în timpul investigațiilor asupra proprietăților hemolitice ale acestui compus antimalaric.

Rezumat

Glucozo-6-fosfat dehidrogenaza (G6PD, D-glucoză-6-fosfat: oxidoreductaza, EC 1.1.1.49) catalizează prima etapă din șuntul pentozo-fosfat, oxidând glucozo-6-fosfat (G-6-P) la 6- fosfogluconat (6-PG) și reducând NADP la NADPH. Această procedură este o modificare a metodelor spectrofotometrice ale lui Kornberg și Horecker² și ale lui Lohr și Waller³, implicând următoarea reacție:



Nicotinamid adenin dinucleotid fosfatul (NADP) este redus de G6PD în prezența G-6-P. Viteza de formare a NADPH este proporțională cu activitatea G6PD și se măsoară spectrofotometric ca o creștere a absorbției la 340 nm. Producerea unui al doilea echivalent molar de NADPH de către 6-fosfogluconat dehidrogenază eritocitară (6-PGDH) conform reacției:



este prevenită prin utilizarea maleimidei, un inhibitor al 6-PGDH.

Reactivi

Reactiv G6PD R1: Reactivul reconstituit va conține NADP, 1,5 mM, și maleimidă, 12 mM. De asemenea, conține soluție tampon, stabilizator și agent de liză.

Reactiv G6PD R2: Glucozo-6-fosfat, 1,05 mM, soluție tampon și sare de magneziu. Azidă de sodiu adăugată drept conservant.

Reactiv de liză G6PD: Triton X-100, 0,05% v/v. Pentru utilizare cu aplicații discrete în analizoare.

Precauții

1. Acești reactivi sunt doar pentru diagnostic *in vitro*.
2. Trebuie respectate precauțiile normale pentru manipularea reactivilor de laborator. Eliminați deșeurile respectând toate reglementările locale, statale și federale.
3. Reactivul R1 este NOCIV. Poate cauza sensibilizare prin inhalare și contactul cu pielea. Purtați îmbrăcăminte de protecție adecvată.
4. Reactivul R2 conține azidă de sodiu, care poate reacționa cu cuprul sau plumbul, formând azide metalice foarte explozive. Evitați acumularea azidei.

Prepararea reactivului

1. Reactivul R1 se prepară prin reconstituire cu volumul de apă deionizată indicat pe eticheta flaconului sau pe fișa de aplicare. Rotiți și răsturnați ușor de mai multe ori pentru a dizolva conținutul. Așteptați 2-3 minute și amestecați din nou. **NOTĂ:** Pentru utilizarea manuală, consultați instrucțiunile de preparare a reactivului din secțiunea „PROCEDURĂ MANUALĂ”.
2. Reactivul R2 este furnizat gata de utilizare.

Depozitare și stabilitate

1. Cât timp sunt nedeschise, depozitați flacoanele de reactivi R1 și R2 la 2-8°C. Reactivii sunt stabili până la data de expirare indicată pe etichetă.
2. Reactivul reconstituit R1 este stabil timp de 8 ore la temperatura camerei (18-26°C) sau 5 zile la frigider (2-8°C).

Recoltarea și depozitarea specimenelor

1. Se recomandă ca recoltarea specimenelor să se realizeze conform documentului NCCLS M29-T2.
2. Sângele integral recoltat în EDTA, heparină sau acid-citrat-dextroză (ACD) este corespunzător.⁴⁻⁸
3. G6PD din globulele roșii este stabil în sângele integral timp de o săptămână dacă este depozitat la frigider (2-8°C), dar este instabil în hemolizatele de globule roșii.⁹
4. Congelarea sângelui nu este recomandată.⁴
5. Deoarece activitatea este raportată în termeni de grame de hemoglobină sau de număr de globule roșii, concentrația de hemoglobină sau numărul de globule roșii trebuie determinate înainte de efectuarea testului G6PD. Integritatea eritrocitelor colectate în ACD este păstrată chiar și după depozitare prelungită, astfel încât obținerea numărului precis de globule roșii nu prezintă de obicei nicio problemă.⁶ Cu toate acestea, numărul de globule roșii de pe speciimenele colectate în heparină devine nesigur după aproximativ 2 zile.⁶ Astfel, pentru probele heparinizate, rezultatele sunt cel mai bine raportate prin concentrația hemoglobinei.

Substanțe interferente

1. Cuprul inhibă complet G6PD la o concentrație de 100 umol/L, iar ionii sulfat (0,005 mol/L) scad nivelurile observate ale activității G6PD.¹⁰
2. Se știe că anumite medicamente și alte substanțe influențează nivelurile circulante ale G6PD.¹¹
3. Reticulocitele au niveluri mai mari de G6PD decât celulele roșii mature. Se recomandă ca testele **nu** să fie efectuate după o criză hemolitică severă, deoarece nivelurile G6PD pot apărea fals crescute. În aceste condiții, detectarea deficitului poate necesita studiarea istoricului familial. Testarea poate fi efectuată după ce nivelul celulelor roșii mature revine la normal.
4. În condiții normale, activitatea susținută de leucocite, trombocite și ser este relativ redusă. Cu toate acestea, în cazuri de anemie extremă, număr mare de globule albe sau, niveluri foarte scăzute de activitate a globulelor roșii G6PD, contribuția la totalul realizat în aceste condiții poate fi semnificativă. Consultați secțiunea „Utilizarea probelor fără strat leuco-trombocitar”.

Aplicații pentru analizoare automate

Procedurile aplicațiilor sunt disponibile pentru diverse instrumente automate. Contactați Departamentul de Asistență Tehnică al Pointe Scientific (1-800-445-9853) pentru mai multe informații.

Materiale furnizate

Consultați secțiunea „Reactivi”

Materiale necesare, dar nefurnizate

1. Spectrofotometru capabil să măsoare la 340 nm cu un compartiment cuvetă cu temperatură controlată (sau se poate folosi baia de apă sau incubatorul)
2. Dispozitive de pipetare pentru distribuirea volumelor necesare testului
3. Cuvete cu proprietăți optice adecvate pentru utilizare la 340 nm
4. Echipamente și reactivi pentru determinarea concentrației de hemoglobină sau a numărului de globule roșii. Pointe Scientific oferă produsul cu numărul de catalog H7504 pentru determinarea hemoglobinei.

Pointe Glucose-6-Phosphate Dehidrogenaze Set de reactivi

Procedură manuală

Preparați reactivul de lucru R1 adăugând agentul de liză ca diluant în loc de DH₂O. Adăugați volumul indicat pe flaconul R1. Acest reactiv poate fi acum utilizat conform indicațiilor de mai jos. **NOTĂ:** Nu utilizați DH₂O pentru a reconstitui flaconul R1 pentru procedura manuală.

Temperatura reacției trebuie menținută la 37°C sau la o altă temperatură constantă (consultați secțiunea „Corectarea temperaturii”).

1. Preparați amestecul de reacție:

- Într-o cuveta etichetată, adăugați 1,0 mL de reactiv R1.
- Adăugați 0,01 mL de sânge și amestecați bine pentru suspensia completă a eritrocitelor. Lăsați la temperatura camerei (18-26°C) timp de 5-10 minute.
- Adăugați 2,0 mL reactiv R2 și amestecați ușor, răsturnând flaconul de câteva ori. Continuați cu pasul 2.

2. Amplasați cuveta în compartimentul cuvetei cu temperatură constantă sau în baia de apă și incubați timp de aproximativ 5 minute.

3. Citiți și înregistrați absorbanta (A1) TESTULUI la 340 nm raportat la apă. (Dacă utilizați o baie de apă sau un incubator, amplasați din nou cuveta în acesta.)

4. După exact 5 minute, citiți și înregistrați absorbanta (A2).

5. Pentru a determina activitatea G6PD, consultați secțiunea „Calculare”.

Calibrarea

Procedura este standardizată pe baza absorbției milimolare a NADPH, care este 6,22 la 340 nm. Măsurarea vitezei de creștere a absorbției (ΔA) la 340 nm servește la cuantificarea activității enzimatice.

Controlul calității

Fiabilitatea rezultatelor testelor trebuie monitorizată prin utilizarea materialelor de control cu valori cunoscute în cadrul fiecărei procesări. Recomandăm insistent ca fiecare laborator să își stabilească propria frecvență de determinare a soluției de control.

Calculare

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

Activitatea G6PD poate fi exprimată ca U/g hemoglobină (Hb) sau ca U/10¹² eritrocite (RBC).

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

Unde: 100 = Factorul de conversie a activității în 100 mL

3,01 = Volumul total de reacție (mL)

0,01 = Volumul probei (mL)

6,22 = Absorbția milimolară a NADH la 340 nm

Hb (g/dL) = Concentrația hemoglobinei pentru fiecare specimen

TCF = Factorul de corecție a temperaturii (1 la 37°C)

$$\text{sau } \text{G6PD (U/10}^{12}\text{RBC)} = \frac{\Delta A \text{ per min} \times 3,01 \times 10^{12} \times \text{TCF}}{0,01 \times 6,22 \times (\text{N} \times 10^6) \times 1000}$$

Unde: 3,01 = Volumul total de reacție (mL)

10¹² = Factor pentru exprimarea activității în 10¹² celule

0,01 = Volumul probei (mL)

6,22 = Absorbția milimolară a NADH la 340 nm

N x 10⁶ = Numărul de globule roșii (globule roșii/mm³) determinat pentru fiecare specimen

1000 = Transformarea numărului de globule roșii din mm³ în mL

TCF = Factorul de corecție a temperaturii (1 la 37°C)

Această ecuație se reduce la:

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

Unde: N = numărul de globule roșii împărțit la 10⁶

TCF = Factorul de corecție a temperaturii (1 la 37°C)

Exemplu:

Testarea unui specimen care a avut un număr de globule roșii de 4,6 x 10⁶/mm³ și o concentrație de hemoglobină de 15,2 g/dL a avut ca rezultat o valoare ΔA per min la 37°C de 0,028.

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

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

NOTĂ: Dacă ΔA per min depășește 0,060, repetați măsurarea folosind 5 μ L sânge și înmulțiți rezultatele cu 2.

Utilizarea probelor fără strat leuco-trombocitar

În condiții normale, activitatea G6PD susținută de leucocite, trombocite și ser este relativ redusă. Cu toate acestea, conform raportării lui Echler¹² și alții¹³, o măsurare mai precisă a activității G6PD din globulele roșii, în special în prezența anemiei și/sau a leucocitozei, poate fi realizată prin utilizarea probelor de sânge fără strat leuco-trombocitar pentru analiză. Astfel, în cazul unei valori limită obținute cu sânge integral, poate fi justificată repetarea testului pe o probă fără strat leuco-trombocitar.

Corectarea temperaturii

Când temperatura este 37°C, nu este necesar niciun factor de corecție a temperaturii în calcule. Dacă testul se realizează la o altă temperatură, trebuie utilizat un TCF.¹⁴

Temperatura cuvetei	TCF
25°C	1,98
30°C	1,37

Definirea unității

O unitate internațională (U) este acea cantitate de activitate G6PD care va converti 1 micromol de substrat pe minut în condițiile specificate în acest prospect.

Valori așteptate¹

Intervalul de referință recomandat pentru G6PD măsurat la 37°C este:

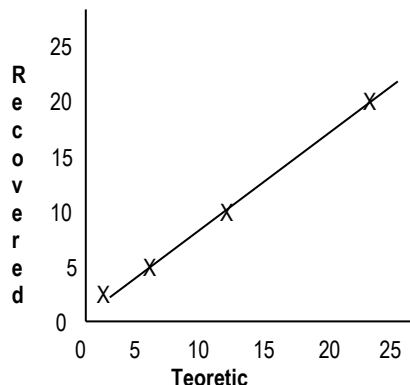
$$12,1 \pm 2,09 \text{ U/g Hb}$$

$$351 \pm 60,6 \text{ U/10}^{12}\text{ RBC}$$

Valorile pentru nou-născuți pot fi puțin mai mari. Recomandăm insistent ca fiecare laborator să își stabilească propriul interval așteptat.

Caracteristici de performanță

Interval test: Activitatea maximă a G6PD care poate fi măsurată prin această procedură este de aproximativ 21,0 U/g Hb sau 609 U/10¹² RBC.



Pointe Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Set de reactivi

HORIBA Instruments Incorporated

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

HORIBA
Medical

Date observate	Rezultat teoretic	Recuperare procentuală
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%

Precizie: S-au realizat studii de precizie pe un analizor Roche Cobas Mira în urma unei modificări a liniilor directe incluse în documentul NCCLS EP5-T2.¹⁵ Datele sunt prezentate în unități produse de un analizor automat pentru activitatea G6PD (U/L). Recomandăm insistent verificarea preciziei testului pe fiecare analizor înainte de utilizare.

În cursul zilei (n=20)

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

De la o zi la alta (n=20)

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

Sensibilitate: Presupunând că limita de sensibilitate reprezintă o modificare a absorbanței la 340 nm de 0,001 pe minut, o activitate G6PD de 0,4 U/g Hb sau 11 U/10¹² RBC poate fi detectată cu ajutorul acestei proceduri (presupunând o concentrație a hemoglobinei de 12,0 g/dL și un număr de globule roșii de 4,5 x 10⁶/mm³).

Specificitate: Oxidarea glucozo-6-fosfatului de către G6PD este specifică. Orice formare nespecifică de NADPH datorită oxidării altor substraturi de către enzimele endogene are loc în perioada de preincubare. 6-fosfogluconat dehidrogenaza este complet inhibată de maleimidă în sistemul reactiv.

Corelare: Un studiu comparativ între metoda Pointe Scientific și cea a Sigma Diagnostics a generat o ecuație de regresie liniară $y = 0,97x + 0,07$ și un coeficient de corelare de 0,994.

Referințe

- 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.
- Raportul Tehnic al OMS nr. 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.
- Documentul NCCLS „Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices”, Ed. a 2-a, 1992.

Legendă simboluri

A se utiliza până la (AAAA-LL-ZZ)	LOT Cod lot și serie
Număr catalog	Producător
Dispozitiv medical pentru diagnostic <i>in vitro</i>	Limită de temperatură
Consultați instrucțiunile de utilizare	
Rx Only: Numai pentru utilizare pe bază de prescripție medicală	
Marcaj CE	Reprezentant autorizat în Comunitatea Europeană

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

Produs de HORIBA Instruments Incorporated – Pointe Brand
5449 Research Drive, Canton, MI 48188

Reprezentant autorizat în Europa:

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



Certificat pentru efectuarea reactivilor

Reactivii Pointe sunt certificați ca fiind fabricați în conformitate cu parametrii specificați. Orice produs reactiv Pointe care nu îndeplinește specificațiile prin data de expirare indicată va fi remediat imediat fără niciun cost suplimentar.

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