

Uso previsto

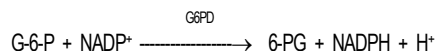
Para la determinación cuantitativa y cinética de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) en sangre a 340 nm. Sólo para diagnóstico *in vitro*. **Rx Only**

Importancia clínica¹

Los ensayos de G6PD se realizan con mayor frecuencia para determinar la deficiencia de G6PD, que es ampliamente prevalente en todo el mundo. Se ha determinado que la deficiencia de G6PD en los glóbulos rojos es la base de ciertas anemias hemolíticas inducidas por fármacos. A menudo, este tipo de susceptibilidad a la hemólisis inducida por fármacos se denomina "sensibilidad a la primaquina" porque los estudios que condujeron a su caracterización se realizaron durante las investigaciones de las propiedades hemolíticas de este compuesto antipalúdico.

Resumen

La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD, D-glucosa-6-fosfato: oxidoreductasa, EC 1.1.1.49) cataliza el primer paso en la derivación de las pentosas fosfato, oxidando la glucosa-6-fosfato (G-6-P) a 6-fosfogluconato (6-PG) y realizando la reducción de NADP a NADPH. Este procedimiento es una modificación de los métodos espectrofotométricos de Kornberg y Horecker² y de Lohr y Waller³, que implica la siguiente reacción:



La nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP) es reducida por la G6PD en presencia de G-6-P. La tasa de formación de NADPH es proporcional a la actividad de G6PD y se mide espectrofotométricamente como un aumento en la absorbancia a 340 nm. La producción de un segundo equivalente molar de NADPH por 6-fosfogluconato deshidrogenasa de eritrocitos (6-PGDH) según la reacción:



se previene mediante el uso de maleimida, un inhibidor de 6-PGDH.

Reactivos

Reactivo R1 de G6PD: El reactivo reconstituido contiene NADP, 1,5 mM y maleimida, 12 mM. También contiene disolución amortiguadora, estabilizador y agente lisante.

Reactivo R2 de G6PD: Glucosa-6-fosfato, 1,05 mM, disolución amortiguadora y sal de magnesio. Azida sódica añadida como conservante.

Reactivo de lisis de G6PD: Tritón X-100, 0,05% v/v. Para uso con aplicaciones de analizador discreto.

Precauciones

- Estos reactivos están indicados exclusivamente para el diagnóstico *in vitro*.
- Deben respetarse las precauciones normales para la manipulación de reactivos de laboratorio. Elimine los desechos, respetando todas las leyes locales, estatales y nacionales.
- El reactivo R1 es NOCIVO. Posibilidad de sensibilización por inhalación y en contacto con la piel. Use ropa de protección adecuada.
- El reactivo R2 contiene azida sódica que puede reaccionar con tuberías de plomo y cobre, formando azidas metálicas altamente explosivas. Evite la acumulación de azida.

Preparación de los reactivos

- El reactivo R1 se prepara, reconstituyéndolo con el volumen de agua desionizada indicado en la etiqueta del vial o en la ficha de aplicación. Agite suavemente e invierta varias veces para disolver el contenido. Espere 2-3 minutos y mezcle nuevamente. **NOTA:** Para uso manual, véanse las instrucciones de preparación de reactivos de la sección "PROCEDIMIENTO MANUAL".
- El reactivo R2 se suministra listo para usar.

Conservación y estabilidad

- Cuando no están abiertos, los viales de reactivo R1 y el reactivo R2 se almacenan a una temperatura de 2-8°C. Se mantienen estables hasta la fecha de caducidad que figura en las etiquetas.
- El reactivo R1 reconstituido se mantiene estable durante 8 horas a temperatura ambiente (18-26°C) o 5 días refrigerado (2-8°C).

Extracción y almacenamiento de muestras

- Se recomienda que las muestras se extraigan de conformidad con el documento NCCLS M29-T2.
- La sangre total extraída en EDTA, heparina o ácido-citrato-dextrosa (ACD) es satisfactoria.^{4,8}
- La G6PD de glóbulos rojos se mantiene estable en sangre total durante una semana refrigerada (2-8°C), pero es inestable en hemolizados de glóbulos rojos.⁹
- No se recomienda congelar la sangre.⁴
- Dado que la actividad se indica en términos de gramos de hemoglobina o número de glóbulos rojos, la concentración de hemoglobina o el recuento de glóbulos rojos deben determinarse antes de realizar el ensayo de G6PD. La integridad de los eritrocitos extraídos en ACD se conserva incluso después de un almacenamiento prolongado, por lo que la obtención de recuentos de glóbulos rojos precisos no suele plantear ningún problema.⁶ Sin embargo, los recuentos de glóbulos rojos en muestras extraídas en heparina son poco fiables después de, aproximadamente, 2 días.⁶ Por tanto, para muestras heparinizadas, los resultados se indican mejor en términos de concentración de hemoglobina.

Sustancias interferentes

- El cobre inhibe por completo la G6PD a una concentración de 100 μmol/L y los iones de sulfato (0,005 mol/L) disminuyen los niveles observados de actividad de la G6PD.¹⁰
- Se sabe que ciertos fármacos y otras sustancias influyen en los niveles circulantes de G6PD.¹¹
- Los reticulocitos tienen niveles más altos de G6PD que los glóbulos rojos maduros. Se recomienda que los ensayos **no** se realicen después de una crisis hemolítica grave, ya que pueden dar falsos niveles altos de G6PD. En esas condiciones, la detección de la deficiencia puede requerir estudios familiares. La prueba se puede realizar después de que el nivel de glóbulos rojos maduros haya vuelto a la normalidad.
- En circunstancias normales, la actividad aportada por leucocitos, plaquetas y suero es relativamente pequeña. Sin embargo, en casos de anemia extrema, recuentos de glóbulos blancos muy elevados o niveles muy bajos de actividad de G6PD en glóbulos rojos, la contribución en el total realizado en estas condiciones puede ser significativa. Véase la sección "Uso de muestras sin capa leucocitaria".

Aplicaciones de analizador automatizado

Existen procedimientos de aplicación para diversos instrumentos automatizados. Póngase en contacto con el departamento de Servicio Técnico Científico de Pointe (+1-800-445-9853) para obtener más información.

Materiales suministrados

Véase el apartado "reactivos"

Material necesario no suministrado

- Espectrofómeto capaz de medir a 340 nm con compartimento de cubeta de temperatura controlada (en su lugar, se puede usar un baño María o una incubadora)
- Dispositivos de pipeteo para la entrega de volúmenes requeridos para el ensayo
- Cubetas con propiedades ópticas adecuadas para su uso a 340 nm
- Equipos y reactivos para determinar la concentración de hemoglobina o realizar un recuento de glóbulos rojos. Pointe Scientific ofrece el número de catálogo H7504 para la determinación de hemoglobina.

Conjunto de reactivos de deshidrogenasa Glucosa-6-fosfato Pointe

Procedimiento manual

Prepare el reactivo R1 de trabajo, añadiendo lisante como diluyente en lugar de DH₂O. Añada el volumen indicado en el vial R1. Este reactivo ya está listo para utilizar como se indica a continuación. **NOTA:** No utilice DH₂O para reconstituir el vial de R1 para el procedimiento manual.

La temperatura de la reacción debe mantenerse a 37°C u otra temperatura constante (véase la sección "Corrección de la temperatura").

- Prepare la mezcla de reacción:
 - En una cubeta etiquetada, añada 1,0 mL de reactivo R1.
 - Añada 0,01 mL de sangre y mezcle bien para suspender completamente los eritrocitos. Deje reposar a temperatura ambiente (18-26°C) durante 5-10 minutos.
 - Añada 2,0 mL de reactivo R2 y mezcle suavemente, invirtiendo varias veces. Continúe con el paso 2.
- Coloque la cubeta en un compartimento de cubetas a temperatura constante o en un baño María e incube durante, aproximadamente, 5 minutos.
- Lea y registre la absorbancia (A1) de la PRUEBA a 340 nm frente al agua. (Si usa un baño María o una incubadora, vuelva a colocar la cubeta).
- Exactamente 5 minutos después, lea y registre la absorbancia (A2).
- Para determinar la actividad de G6PD, véase la sección "Cálculos".

Calibración

El procedimiento está estandarizado en base a la absortividad milimolar de NADPH, que es de 6,22 a 340 nm. La medición de la tasa de aumento de la absorbancia (ΔA) a 340 nm sirve para cuantificar la actividad enzimática.

Control de calidad

La fiabilidad de los resultados de las pruebas debe supervisarse mediante el uso de materiales de control con valores conocidos dentro de cada ejecución. Se recomienda que cada laboratorio establezca su propia frecuencia de determinación de control.

Cálculos

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

La actividad de G6PD se puede expresar en U/g de hemoglobina (Hb) o en U/10¹² de eritrocitos (RBC).

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

Donde: 100 = Factor para convertir la actividad a 100 mL
3,01 = Volumen total de reacción (mL)
0,01 = Volumen de muestra (ml)
6,22 = Absortividad milimolar de NADPH a 340 nm
Hb (g/dL) = Concentración de hemoglobina para cada muestra
TCF = Factor de corrección de temperatura (1 a 37°C)

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

Donde: 3,01 = Volumen total de reacción (mL)
10¹² = Factor para expresar actividad en 10¹² células
0,01 = Volumen de muestra (ml)
6,22 = Absortividad milimolar de NADPH a 340 nm
N x 10⁶ = Recuento de glóbulos rojos (glóbulos rojos/mm³) determinado para cada muestra
1000 = Conversión de recuento de glóbulos rojos de mm³ a mL
TCF = Factor de corrección de temperatura (1 a 37°C)

Esta ecuación se reduce a:

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

Donde: N = recuento de glóbulos rojos dividido por 10⁶
TCF = factor de corrección de temperatura (1 a 37°C)

Ejemplo:

El ensayo de una muestra que tenía un recuento de glóbulos rojos de 4,6 x 10⁹/mm³ y una concentración de hemoglobina de 15,2 g/dL dio como resultado una ΔA por min a 37°C de 0,028.

$$\text{G6PD (U/g Hb)} = 0,028 \times \frac{48,390}{15,2} = 8,9$$

$$\text{G6PD (U/10}^{12}\text{ RBC)} = 0,028 \times \frac{48,390}{4,6} = 295$$

NOTA: Si ΔA por min es superior a 0,060, repita la determinación con 5 μ l de sangre y multiplique los resultados por 2.

Uso de muestras sin capa leucocitaria

En circunstancias normales, la actividad de G6PD aportada por leucocitos, plaquetas y suero es relativamente pequeña. Sin embargo, como informaron Echler¹² y otros¹³, se puede lograr una medición más precisa de la actividad G6PD de los glóbulos rojos, especialmente, en presencia de anemia y/o leucocitosis, mediante el uso de muestras de sangre sin capa leucocitaria para el ensayo. Por tanto, en caso de que se obtenga un valor límite con sangre total, puede justificarse el hecho de repetir el ensayo en una muestra sin capa leucocitaria.

Corrección de temperatura

Cuando la temperatura es de 37°C, no se requiere factor de corrección de temperatura (TCF) en los cálculos. Si el ensayo se realiza a otra temperatura, debe usarse un TCF.¹⁴

Temperatura de la cubeta	TCF
25°C	1,98
30°C	1,37

Definición de unidad

Una Unidad Internacional (U) es la cantidad de actividad de G6PD que convertirá 1 micromol de sustrato por minuto en las condiciones especificadas en este prospecto.

Valores esperados¹

Un rango de referencia recomendado para G6PD medido a 37°C es:

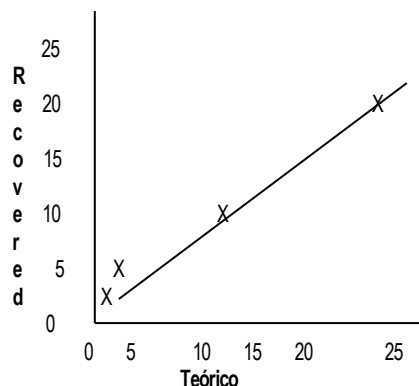
$$12,1 \pm 2,09 \text{ U/g Hb}$$

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

Los valores para los recién nacidos pueden variar un poco más. Se recomienda encarecidamente que cada laboratorio establezca su propio rango esperado.

Características de rendimiento

Rango del ensayo: La actividad máxima de G6PD que puede medirse mediante este procedimiento es de, aproximadamente, 21,0 U/g Hb o 609 U/10¹² RBC.



Conjunto de reactivos de deshidrogenasa Glucosa-6-fosfato Pointe

HORIBA Instruments Incorporated

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

HORIBA
Medical

Datos observados	Resultado teórico	Porcentaje de recuperación
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%

Precisión: Los estudios de precisión se realizaron en un Roche Cobas Mira, siguiendo las directrices del documento NCCLS EP5-T2.¹⁵ Los datos se presentan en las unidades que producirá un analizador automatizado para la actividad de G6PD (U/L). Se recomienda encarecidamente verificar la precisión del ensayo en cada analizador antes de su uso.

Intraserial (n=20)		
Media	D.S.	C.V.
257	23,7	9,2%
658	18,3	2,8%
1939	48,0	2,5%

Día a día (n=20)		
Media	D.S.	C.V.
269	30,8	11,4%
700	28,7	4,1%
2014	43,0	2,1%

Sensibilidad: Suponiendo que el límite de sensibilidad represente un cambio en la absorbancia a 340 nm de 0,001 por minuto, se puede detectar una actividad de G6PD de 0,4 U/g Hb o 11 U/10¹² RBC, usando este procedimiento (suponiendo una concentración de hemoglobina de 12,0 g/dL y un recuento de glóbulos rojos de 4,5 x 10⁶/mm³).

Especificidad: La oxidación de glucosa-6-fosfato por G6PD es específica. Cualquier formación no específica de NADPH debido a la oxidación de otros sustratos por enzimas endógenas ocurre durante el período de preincubación. La maleimida en el sistema reactivo inhibe completamente la 6-fosfogluconato deshidrogenasa.

Correlación: Un estudio de comparación entre el método de Pointe Scientific y el de Sigma Diagnostics dio una ecuación de regresión lineal con $y = 0,97x + 0,07$ y un coeficiente de correlación de 0,994.

Referencias

- 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. En 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", 2nd Edition, 1992.

Clave de símbolo

Usar antes de (AAAA-MM-DD)	LOT Lote y código de lote
REF Número de catálogo	Fabricante
IVD Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>	Limitación de temperatura
Consultar instrucciones de uso	Rx Only: Venta exclusiva con receta médica
Marca CE	Representante autorizado en la Comunidad Europea

REF G7583

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

2°C - 8°C **IVD**

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

Representante Europeo Autorizado:

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



Certificado para emplear reactivos

Los reactivos Pointe están certificados para ser fabricados de acuerdo con los parámetros especificados. Cualquier producto de reactivo Pointe que no cumpla con las especificaciones hasta la fecha de vencimiento indicada se reparará de inmediato sin cargo.

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