

# MBK G-6PD

Test chimico per la rilevazione *in vitro* dell'attività del Glucosio-6 Fostato Deidrogenasi su globuli rossi emolisiati.

RDM:



Codice 96MB100-10

Confezione 10 test

## USO PREVISTO

Test chimico a lettura visiva per la rilevazione qualitativa dell'attività enzimatica del G6PD su sangue umano come ausilio nella diagnosi della carenza di G6PD.

## SOMMARIO

La carenza di Glucosio-6-fostato deidrogenasi è una malattia genetica che può causare anemia emolitica quando persone con la malattia vengono a contatto con farmaci, cibo e altre sostanze che causano stress ossidativo. La carenza di G6PD è il difetto enzimatico più comune al mondo.

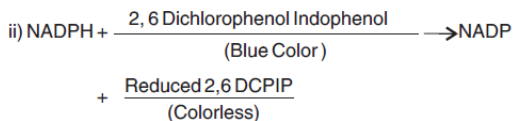
La diagnosi di carenza di G6PD è importante nel trattamento della malattia poiché molti farmaci antiossidanti quali i farmaci antimalarici, sulfamidici e acido ascorbico causano anemia emolitica specie in pazienti con carenza di G6PD. Pertanto si raccomanda di testare la carenza di G6PD nei pazienti prima di un trattamento con farmaci ossidanti, soprattutto in pazienti affetti da malaria per evitare gravi anemie emolitiche.

## PRINCIPIO DEL TEST

In caso di carenza genetica di G6PD, condizione nota come *favismo*, la prima reazione della via del pentosio fosfato non è svolta efficientemente, per cui si crea una carenza di NADPH. Da ciò deriva l'impossibilità di riportare ogni volta il glutatione della perossidasi in forma ridotta, cosicché diventa difficile la detossificazione di specie reattive perossidanti come l'acqua ossigenata ed altri radicali derivanti da farmaci (antimalarici, sulfamidici) o anche da un agente tossico contenuto nelle fave, la **divicina**.

In caso di contatto con questi tossici, i soggetti favici, vengono esposti ad altissimo stress ossidativo, a cui vanno particolarmente soggette le membrane cellulari. Il danno maggiore è subito dagli eritrociti, i quali vanno incontro a lisi, con liberazione di emoglobina in circolo e conseguente possibilità di ittero: si ha una **crisi emolitica**. Per questo è importante che persone affette da favismo non vengano mai a contatto, né diretto né indiretto, con fave fresche, ed anche che non gli vengano somministrati determinati farmaci; nel caso ciò succedesse, la crisi emolitica scatenata potrebbe in breve condurre a morte.

Il Glucosio-6 Fostato Deidrogenasi presente nei globuli rossi emolisiati, agisce sul Glucosio-6 Fostato e riduce il NADP a NADPH che, grazie al PMS ( 5-metil fenazone solfato di metile ), riduce il 2,6-Diclorofenolo indofenolo di colore blu in una forma priva di colorazione. La velocità della decolorazione è proporzionale all'attività dell'enzima. La reazione può essere rappresentata come segue:



Rate of Decolorization  $\propto$  Activity of G-6PD

## COMPONENTI DEL KIT

- Reagente 1: Substrato - 10x0,5 ml.
- Reagente 2: Buffer, pH 8.5 - 6 ml.
- Reagente 3: Olio minerale - 20 ml.

## MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

- Cronometro
- Incubatore 37°C

## PRECAUZIONI E SICUREZZA

- Utilizzare vetreria pulita e asciutta.
- Per ottenere i migliori risultati, si consiglia di portare i reagenti a temperatura ambiente (da + 15 °C a +30 °C) prima dell'uso.
- Utilizzare campioni di sangue fresco poiché la refrigerazione riduce l'attività enzimatica.
- L'eparina non deve essere utilizzata come anticoagulante poiché interagisce con la reazione.

- Eseguire almeno un campione certamente normale durante il saggio.
- **Non agitare la fiala di reazione dopo l'aggiunta dell'olio minerale in quanto l'introduzione di aria favorisce la ricomparsa della colorazione blu e può portare a risultati erronei.**
- **Evitare l'esposizione del substrato alla luce diretta del sole, in quanto il substrato è fotosensibile.**
- **Non utilizzare il substrato se presenta condensa nel contenitore.**
- **Prima di rimuovere il tappo della fiala del substrato picchiare gentilmente il fondo della fiala tenendo il flacone verticalmente in caso gocce di substrato siano presenti sul collo della fiala.**
- Per uso diagnostico *in vitro* e solo per uso professionale.
- Leggere attentamente le istruzioni per l'uso prima di eseguire il test. Un uso improprio potrebbe dare luogo a risultati errati.
- Aprire la busta del dispositivo appena prima l'esecuzione del test.
- Non usare oltre la data di scadenza riportata sull'etichetta della confezione.
- Non usare reagenti provenienti da kit diversi.
- Indossare indumenti protettivi quali camici da laboratorio, guanti monouso. Lavarsi bene le mani dopo aver eseguito il test.
- Non mangiare, bere o fumare durante l'analisi.
- Manipolare tutti i campioni come fossero infettivi. Smaltire i campioni e i componenti del kit seguendo le buone regole del laboratorio.

## PREPARAZIONE DEI REAGENTI E ISTRUZIONI DI CONSERVAZIONE

Tutti i reagenti forniti sono pronti all'uso. Conservare i dispositivi test non ancora aperti a 2°C-8°C. Assicurarsi che i reagenti raggiungano la temperatura ambiente prima di essere utilizzati. Non congelare o esporre a temperature superiori a 30°C. Il reagente 3 può essere conservato a temperatura ambiente. La soluzione 1 va preparata prima dell'uso.

- Soluzione 1: prima dell'uso ricostituire una fiala di reagente 1 con 0,5 ml. di reagente 2.
- Reagente 3: pronto all'uso

## PROCEDIMENTO

### Fase 1: preparazione dell'emolisato

- In una provetta dispensare 2,5 ml. di acqua distillata.
- Aggiungere 0,05 ml. di sangue fresco.
- Miscelare bene e far riposare l'emolisato per 5 minuti a temperatura ambiente.

### Fase 2: dosaggio

1. Aggiungere 1 ml. di emolisato (Fase 1) alla cuvetta di Soluzione 1 e miscelare delicatamente.
2. Aggiungere immediatamente 2 ml. di Reagente 3.
3. Sigillare la cuvetta con un foglio di alluminio e incubare a bagnomaria o termostato a 37°C per 30-60 minuti.
4. Osservare per il tempo necessario il viraggio del colore dall'iniziale blu scuro a rosso amaranto. Monitorare fino ad un massimo di sei (6) ore ad intervalli di trenta (30) minuti.

## INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI: tempo di decolorazione o viraggio

**Soggetti normali:** il colore vira dal blu al rosso entro 30-60 minuti.

**Soggetti G6PD deficienti** (maschi eterozigoti e femmine omozigote):

- se il colore non vira entro 60 minuti il soggetto va considerato carente (deficiente).
- Se il colore vira dal blu al rosso dopo 140 minuti e fino a 24 ore il soggetto va considerato carente (deficiente).

## LIMITI

- Se il livello di emoglobina (Hb) è di molto inferiore a 15g/dL., la seguente tabella può essere utilizzata per determinare il volume appropriato di acqua distillata e sangue per preparare l'emolisato:

Hb (g/dL)	3	6	9	12	15
Volume di acqua distillata ml.	2.0	2.0	1.5	2.0	2.5
Volume di sangue	0.2	0.1	0.05	0.05	0.05









- Sangue con un elevato numero di reticolociti può generare falsi risultati normali anche se il soggetto è enzima carente.

- I Reticolociti contengono livelli più alti di G6PDH rispetto ai globuli rossi maturi; non è consigliabile eseguire il saggio dopo una grave crisi emolitica dal momento che la G6PDH può apparire falsamente elevata.
- Alcuni campioni possono raggiungere il punto di decolorazione o viraggio end point e poi ricolorarsi lentamente tornando al blu a causa di una riossidazione del colorante, in questo caso il paziente va considerato normale. E' quindi fondamentale monitorare la reazione ad intervalli di 30 minuti e fino ad un'ora per identificare un soggetto come normale.
- La variazione di colore va osservata nel liquido al di sotto dello strato di olio.

#### BIBLIOGRAFIA

- Ellis H.A. and Kirkman H. N., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 106 1607 (1961).
- Lubin B.H. and Oski F.A., J. Pediatr. 70, 788 (1967).
- S.K. Sood et.al., The Indian J.of Path. and Micro., 24, 89 (1981).

#### SIMBOLOGIA

	Attention, see instructions for use		Tests per kit		Authorized Representative
	For in vitro diagnostic use only		Use by		Do not reuse
	Store between 2-30°C		Lot Number		Catalog #
	Do not use if package is damaged				

#### PRODUTTORE

 **ARKRAY Healthcare Pvt. Ltd.**  
 Plot No. 336, 338, 340, Road No.3, G.I.D.C., Sachin 394 230 (Surat) INDIA.  
 Phone No.: 0261-6167777,  
 Fax: 0261-6167778,  
 E-mail: info@arkray.co.in  
 Web: www.arkray.co.in



#### DISTRIBUITO IN ITALIA DA

**MERIDIAN HEALTHCARE srl**  
 Via Caronda, 446 SC/A - 95100 CATANIA - ITALIA  
 Tel.: +39 095 7256869 Fax: +39 095 7254454  
 e-mail: info@meridianhealthcare.it  
 web: www.meridianhealthcare.it

