

G6PDH-GLUCOSE 6 PHOSPHATE DEHYDROGENASE

Per uso diagnostico in *Vitro*

DETERMINAZIONE QUANTITATIVA CINETICA UV del G6PDH su SANGUE INTERO con Analizzatore MINDRAY BS-300



(20x3 mL) 285 test

REF NAGP68905

I. DESTINAZIONE D'USO

Il glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PDH) è un enzima nella via dei pentosi fosfati. Il G6PDH converte il glucosio-6-fosfato in 6-phosphoglucono-d-lattone ed è l'enzima limitante di questa via metabolica che fornisce energia riducente alle cellule mantenendo il livello del coenzima NADPH. La NADPH, a sua volta mantiene la fornitura di glutazione ridotto nelle cellule, che viene utilizzato per assorbire i radicali liberi che causano danni ossidativi. La via G6PDH / NADPH è l'unica fonte di glutazione ridotto nei globuli rossi (eritrociti). Il ruolo dei globuli rossi come portatori di ossigeno li espone a un rischio sostanziale di danni da radicali liberi ossidanti tranne che per l'effetto protettivo di G6PDH/NADPH/glutazione. Le persone con deficit di G6PDH sono quindi a rischio di anemia emolitica in stati di stress ossidativo. Lo stress ossidativo può derivare da infezioni e da esposizione chimica per farmaci e alcuni alimenti. Le fave, ad esempio, contengono alti livelli di vicina e divicina, convicina e isouramide, ognuno dei quali sono ossidanti. Quando tutto il glutazione ridotto rimanente viene consumato, gli enzimi e le altre proteine (compresa l'emoglobina) vengono successivamente danneggiati dagli ossidanti, portando uno squilibrio elettrolitico e deposizione di proteine nelle membrane dei globuli rossi. I globuli rossi danneggiati vengono fagocitati e tolti dalla circolazione nella milza. L'emoglobina è metabolizzata a bilirubina (causando ittero ad alte concentrazioni). I globuli rossi raramente si disintegrano in circolazione, così l'emoglobina è raramente eliminata direttamente dal rene; ma ciò può verificarsi in casi gravi, causando insufficienza renale acuta. La deficienza di G6PDH in via alternativa provoca l'accumulo di glucosio e quindi vi è un aumento di prodotti finali glicati. La carenza causa anche una riduzione di NADPH che è necessario per la formazione di ossido nitrico (NO).

II. PRINCIPIO

La glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PDH) catalizza il primo step dello shunt pentoso fosfato, ossidando il glucosio-6-fosfato (G-6-P) a 6-fosfogluconato (6-PG) e riducendo NADP a NADPH.

L'incremento dell'assorbanza del NADPH, per la riduzione del NADP, è proporzionale all'attività della G6PDH nel campione.

III. PRECAUZIONI D'USO

1. Questo prodotto è stato formulato per uso diagnostico in vitro.
2. Una variazione proporzionale dei volumi di reazione non modifica il risultato.
3. NON miscelare tra loro Reagenti da diversi lotti di produzione.
4. Per concentrazioni di G6PDH maggiori di 3200 U/L, usare metà del volume del campione e moltiplicare il risultato x 2.
5. Oltre alle eventuali indicazioni di rischio, il Reagente contiene conservanti (sodio azide o altri), la cui concentrazione totale è inferiore ai limiti riportati nelle Dir. 67/548/CEE e 88/379/CEE e relative modifiche per la classificazione, etichettatura ed imballaggio di preparati pericolosi (Reagenti). Tuttavia si raccomanda di manipolare i reagenti con cautela, evitandone l'ingestione ed il contatto con gli occhi, la pelle e le mucose; di seguire quindi le norme di buona pratica di laboratorio nell'utilizzo di questi materiali. Nelle schede di sicurezza vengono descritte le procedure operative per la manipolazione di questo prodotto. Le schede di sicurezza vengono fornite su richiesta.

ATTENZIONE!

- A) Le applicazioni su analizzatori di routine possono essere totalmente diverse da quanto sviluppato come determinazione manuale; inoltre le procedure sono specifiche per ciascun analizzatore.
- B) Elevata attenzione deve essere data alle sostanze interferenti: rame e solfati sono forti inibitori. Alcuni farmaci ed altre sostanze potrebbero influenzare i livelli od il dosaggio di G6PDH (cfr Bibliografia 2).
- C) Il Reagente deve essere impiegato SOLO per l'uso indicato, da personale esperto e addestrato, seguendo le norme della buona pratica di laboratorio.
- D) La diagnosi clinica non può essere fatta correttamente usando il risultato di un solo test, ma deve essere fatta integrando criticamente i risultati di diversi test di laboratorio con differenti dati clinici.
- E) Il reagente contiene inibitori della 6PGD, che potrebbe formare una molecola di NADPH in aggiunta, per ogni molecola di 6-fosfogluconato formata.
- F) I Reticolociti hanno livelli più alti di G6PDH rispetto ai globuli rossi maturi; non è consigliabile effettuare il saggio dopo una grave crisi emolitica, dal momento che la G6PDH può apparire falsamente elevata.
- G) Se il rapporto ($\Delta A_s/\text{min}$) è molto basso, è possibile aumentare il volume del campione e naturalmente il volume del controllo.
- H) Per poter effettuare il dosaggio di G6PDH su sangue intero è necessario preparare l'emolisato utilizzando il kit **REF** NAGB1129 (la procedura è dettagliata nella rispettiva Istruzione per l'Uso)
- I) **IL G6PDH è veramente instabile negli emolisati. Dopo 20/30 minuti dalla diluizione (vedere PRETRATTAMENTO CAMPIONI per il REF NAGB1129) potrebbero comparire dei precipitati probabilmente dovuti alla variabilità biologica del campione dei pazienti.**
- J) Prima di determinare il G6PDH nel sangue intero è necessario calcolare il seguente parametro:
- la concentrazione di emoglobina in g/dL, per esprimere l'attività G-6-PDH come U/g di emoglobina.
- K) Una serie di fattori, quali la temperatura ambientale, la temperatura dei reagenti di lavoro, l'accuratezza dei lavaggi e il tipo di spettrofotometro, possono influire sulle prestazioni del test.
- L) La curva di calibrazione deve essere sempre ripetuta ad ogni cambio di lotto del Reagente e/o del calibratore.
- M) Per la manipolazione dei Reagenti devono essere osservate le precauzioni normalmente adottate in laboratorio. Tutti i calibratori e controlli vanno considerati come campioni umani, quindi potenzialmente infettivi; devono quindi essere adottate tutte le misure di protezione adeguate allo scopo di evitare ogni tipo di potenziale rischio biologico.

IV. REAGENTI E MATERIALI FORNITI

Composizione del kit:

REF	NAGP68905
R1 - BUFFER	Tampone Good modificato > 20 mmol/L
R2 - NADP	NADP >0.19 mmol/L
R3 - G6P (PRONTO ALL'USO)	G-6-P >0.1 g/L NaN ₃ < 0.1%
	1 x 20 mL
	20 x 1 mL
	1 x 40 mL

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

Normale attrezzatura da laboratorio.
Micropipette in grado di erogare da 3 a 1000 μL .
Puntali monouso per micropipette.

Provette in vetro trasparente per la diluizione dei campioni.
 Acqua distillata, Calibratori e Controlli
 Spettrofotometro od analizzatore automatico di chimica clinica.

REAGENTI AUSILIARI PER IL CONTROLLO QUALITA'

Per garantire l'adeguata prestazione del test utilizzare i seguenti kit (vedere le relative informazioni d'uso (IFU)):

- G6PDH-RED CELL LYSING (only for automation) **REF NAGB1129**
- G6PDH CONTROLS SET **REF NAG6CON**
- G6PDH CALIBRATORS **REF NAG6CAL3**

La curva di calibrazione deve essere sempre ripetuta ad ogni cambio di lotto del Reagente e/o del calibratore.

V. CONSERVAZIONE E STABILITÀ

I reagenti chiusi sono stabili fino alla data di scadenza indicata sulle etichette, se conservati a 2-8°C nel loro contenitore primario integro, se non esposti a fonti termiche e/o variazioni di pressione. In caso di danneggiamento del contenitore primario provvedere allo smaltimento.

VI. PREPARAZIONE DEL REAGENTE DI LAVORO

Dissolvere un vial di **R2 - NADP** con 1 mL di **R1 - BUFFER**, mescolare gentilmente evitando la formazione di schiuma. Portare i Reagenti alla temperatura di lavoro prima dell'uso. Chiudere immediatamente dopo l'impiego. I prodotti vanno manipolati in modo adeguato, tale da evitare ogni contaminazione.

L'uso non competente ci solleverà da ogni responsabilità.

VII. STABILITÀ DEL REAGENTE DI LAVORO

Il reagente di lavoro è stabile 5 giorni a 2-8°C.

VIII. CAMPIONI

- Sangue intero con ACD (Acido-Citrato-Destrosio), EDTA o eparina.

Raccolta dei campioni in accordo con CLSI (NCCLS) (cfr Bibliografia 3).

Il G6PDH dei globuli rossi è stabile nel sangue intero per una settimana a 2-8°C, ma instabile nell'emolisato dei globuli rossi. E' sconsigliato il congelamento del sangue (cfr. Bibliografia 1 e 4).

Dal momento che l'attività è riportata come numero di globuli rossi o grammi di emoglobina, questi due valori devono essere determinati prima del saggio della G6PDH. Il più accurato conteggio di globuli rossi nel tempo è con gli eritrociti in ADC, dovuto ad una maggiore integrità degli eritrociti in esso che in altri mezzi. (cfr Bibliografia 5).

IX. SMALTIMENTO DEI MATERIALI

Per lo smaltimento dei Reagenti attenersi agli ordinamenti locali vigenti.

X. PROCEDURA ANALITICA PER SANGUE INTERO su SPETTROFOTOMETRO MANUALE

Prima di determinare la G6PDH è necessario calcolare:

1) la concentrazione di emoglobina in g/dL, per esprimere l'attività G6PDH come U/g di emoglobina.

- Lunghezza d'onda: 340 nm (334-365 nm)
- Cammino ottico: 1 cm
- Lettura: contro aria o acqua distillata
- Temperatura: 37°C
- Metodo: cinetico
- Reazione: 10 + 2 + 5 minuti
- Rapporto campione/reagente: 1/100/200

Portare i reagenti alla temperatura di lavoro prima dell'uso.

Pipettare nelle provette o nelle cuvette così etichettate: **S:** Campione, **ST:** Calibratori (**R1** ed **R2** **REF NAG6CAL3**):

	S	ST-R1	ST-R2
REAGENTE DI LAVORO	1000 µL	1000 µL	1000 µL
Campione	10 µL	---	---
Calibratore R1	---	10 µL	---
Calibratore R2	---	---	10 µL

Mescolare gentilmente e incubare per 10 minuti a 37°C. Aggiungere:

R3 - G6P	2000 µL	2000 µL	2000 µL
-----------------	---------	---------	---------

Mescolare gentilmente. Esattamente 2 min. dopo, fare la **PRIMA** lettura del campione (As1) e dei calibratori (Ast1-R1) e (Ast1-R2).

Ripetere la **SECONDA** lettura dopo 5 minuti per il campione (As2) e per i calibratori (Ast2-R1) e (Ast2-R2).

Determinare la differenza di assorbanza per il campione e per i calibratori:

$$\Delta As = As2 - As1$$

$$\Delta Ast-R1 = Ast2-R1 - Ast1-R1$$

$$\Delta Ast-R2 = Ast2-R2 - Ast1-R2$$

ATTENZIONE!

Il kit è sperimentato per spettrofotometro manuale e per sistemi HITACHI, COBAS e MINDRAY.

Le applicazioni su analizzatori automatici possono essere totalmente diverse da quanto sviluppato come determinazione manuale.

XI. VALORI DI RIFERIMENTO SANGUE INTERO (cfr Bibliografia 1)

Valori normali G6PDH: 12.1 ± 2.09 U/g Hb

I valori per i neonati possono essere un po' più elevati.

Poiché i valori normali dipendono dall'età, dal sesso, dalla dieta, dall'area geografica e da altri fattori, ogni laboratorio deve stabilire i propri valori normali per questa procedura.

XII. CALCOLO

Riportare per ogni Calibratore i valori di ΔAst per costruire la curva di calibrazione.

La curva di calibrazione deve essere sempre ripetuta ad ogni cambio di lotto, del reagente e/o del calibratore.

Riportare ogni valore di Δ As trovato sulla Curva di Calibrazione per determinare la concentrazione in U/L a 37°C dei Controlli e dei campioni analizzati.

Considerando il valore di Emoglobina Totale (TOTAL Hb) di ogni campione, espresso in g/dL, applicare la formula

$$G6PDH \text{ (U/g Hb)} = \frac{G6PDH \text{ (U/L, 37°C)}}{\text{TOTAL Hb (g/dL)} \times 10}$$

dove "10" è il moltiplicatore che trasforma g/dL in g/L di Emoglobina Totale (TOTAL Hb).

ESEMPIO

Saggio di un campione che ha una concentrazione di emoglobina pari a 12.47 g/dL e G6PDH (U/L, 37°C) = 773.

$$G6PDH \text{ (U/g emoglobina)} = \frac{773}{12.47 \times 10} = 6.20$$

XIII. PRESTAZIONI ANALITICHE (validate su MINDRAY BS300)

Le prestazioni del Reagente **G6PDH - GLUCOSE 6 PHOSPHATE DEHYDROGENASE** sono state sperimentate con un analizzatore MINDRAY BS300. I dati, pur rappresentando le caratteristiche del prodotto, potrebbero variare per ogni singolo laboratorio e per i diversi analizzatori.

Limitazioni del metodo: non sono conosciute limitazioni.

Linearità del metodo: per concentrazioni di G6PDH maggiori di 3200 U/L, usare metà del volume del campione e moltiplicare il risultato x 2.

Sensibilità del metodo (LoD) : il limite di sensibilità, ovvero la concentrazione minima che può essere distinta dallo zero è 27 U/L.

Interferenze: cfr Bibliografia punto 2.

Criterio delle prove di interferenza: recupero $\pm 10\%$ del valore iniziale. Non si sono osservate interferenze su campioni con:

- bilirubina totale fino a 40 mg/dL;
- lipemia [Intralipid ®] fino a 4000 mg/dL;
- acido ascorbico fino a 50 mg/dL.

Precisione nella serie: determinata su 20 replicati di due campioni.

I risultati ottenuti sono i seguenti:

Campione	Media (U/L) $\pm 2s$	CV%
Umano 1	191 ± 8	2.1
Umano 2	1375 ± 19	0.7

Precisione tra le serie: determinata per 5 giorni su 20 replicati al giorno per due campioni.

I risultati ottenuti sono i seguenti:

Campione	Media (U/L) $\pm 2s$	CV%
Umano 1	191 ± 7	1.9
Umano 2	1379 ± 19	0.7

Accuratezza: un gruppo di 20 sieri è stato testato con questa procedura ed usando un reagente simile disponibile in commercio. Il confronto ha dato i seguenti risultati:

Regressione lineare $y = 1.0007x + 15$

Coefficiente di correlazione $r = 0.9997$ n = 20

XIV. BIBLIOGRAFIA

1. Textbook of Clinical Chemistry, Ed. by N.W. Tietz, W.B. Saunders Co., Philadelphia (1999).
2. Young D.S., Effect of drugs on Clinical Lab. Test, 5th Ed. AACC Press (2000).
3. CLSI(NCCLS) GP44-A4/H18-A4: Proc. for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common lab. Tests
4. Beutler E. et al., Brit. J. Haem. 43, 469 (1979).
5. Lowe M.L. et al., Clin. Chem. 18, 440 (1972).
6. Pinto P.V.C. et al., J. Clin. Invest. 45, 823 (1966).

 IVD	Dispositivo medico-diagnostico in vitro		Limiti di temperatura	 LOT	Codice del lotto (XXX)		Fabbricante		Mantenere asciutto	 NON STERILE	Non sterile
 i	Consultare le istruzioni per l'uso		Utilizzare entro (anno/mese)	 REF	Numero di catalogo		Non riutilizzare		Fragile, maneggiare con cura		Tenere lontano dal calore

CONFEZIONE

R1 - BUFFER

R2 - NADP

R3 - G6P

Istruzioni per l'uso

 REF NAGP68905

1 x 20 mL

20 x 1 mL

1 x 40 mL

1 pz

Codice Ramo CND W0103010401



Meridian Healthcare srl

Via Caronda, 446 SC/A - 95129 Catania - Italy
 Tel. +39 095 725 68 69 - Fax: +39 095 725 44 54
 info@meridianhealthcare.it
 www.meridianhealthcare.it

