

# Glucose-6-phosphate dehydrogenase

Enzymatic-UV

## Quantitative determination of G-6-PDH IVD

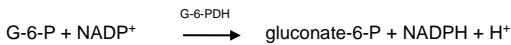
Store at 2-8°C

### INTENDED USE

For the quantitative *in vitro* determination of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase in erythrocytes.

### PRINCIPLE OF THE METHOD<sup>1,2,3</sup>

The enzyme activity is determined by measurement of the rate of absorbance change at 340 nm due to the reduction of NADP<sup>+</sup>.



### CLINICAL SIGNIFICANCE

G-6PDH deficiency is one of the most common human enzyme deficiencies, and it is estimated to affect more than 400 million people worldwide. Although most of the enzyme-deficient subjects are asymptomatic, deficient individuals may show episodic hemolytic anemia induced by infections or certain drugs and a spontaneous chronic nonspherocytic hemolytic anemia.

### REAGENTS

<b>R 1</b> Buffer	Triethanolamine pH 7,6 EDTA	31,7 mmol/L 3,2 mmol/L
<b>R 2</b>	NADP	0,34 mmol/L
<b>R3</b> Substrate	Glucose-6-phosphate	0,58 mmol/L
<b>R4</b>	Digitonin	
<b>OPTIONAL</b>	G-6-PDH 2 levels control ref.1002520	

### PRECAUTIONS

- **R2, R3, Control:** H302-Harmful if swallowed. H412-Harmful to aquatic life with long lasting effects.

Follow the precautionary statements given in MSDS and label of the product.

### PREPARATION

- **R1 - R4** Ready to use.

- **R2 - R3** Reconstitute the contents of each bottle with 2 mL of redistilled water.

### STORAGE AND STABILITY

R1 and R4 are stable until the expiration date on the label when stored tightly closed at 2-8°C, protected from light and contaminations prevented during their use. R2 and R3 are stable for 4 weeks at 2-8°C. Do not use reagents over the expiration date.

### ADDITIONAL EQUIPMENT

- Spectrophotometer or colorimeter measuring at 340 nm.
- Thermostatic bath at 37° C (± 0,1°C)
- Matched cuvettes 1,0 cm light path.
- General laboratory equipment <sup>(Note 1)</sup>.

### SAMPLES

- Erythrocytes: Preparation: Wash 0,2 ml of blood with 2 mL aliquots of 0,9% NaCl solution. Centrifuge after each wash for 10 min at around 3000 rpm. Repeat 3 times. Suspend the washed centrifuged erythrocytes in 0,5 mL of R4 and let stand for 15 min at +4°C and then centrifuge again. Use the supernatant in the assay within 2 hours.

### PROCEDURE

- Assay conditions:  
Wavelength: .....340nm  
Cuvette: .....1 cm light path  
Constant temperature .....37°C
- Adjust the instrument to zero with distilled water.
- Pipette into a test tube <sup>(Note 2)</sup>.

	Sample
Reagent 1 (µL)	1000
Reagent 2 (µL)	30
Haemolysate (µL)	15

4. Mix, incubate at 37°C for 5 minute.

5. Add:

	Sample
Reagent 3 (µL)	15

6. Mix, read initial absorbance and start timer simultaneously. Read again after 1, 2 and 3 minutes.

### CALCULATIONS

To calculate the G-6-PDH activity use the following calculations:  
 mU/erythrocytes per mL blood\* = 33650 x ΔA 340 nm/min  
 mU/erythrocytes per mL blood\* = 60571 x Δ A Hg 365 nm/min  
 mU/erythrocytes per mL blood\* = 34304 x Δ A Hg 334 nm/min

\*G-6-PDH activity is expressed as mU/10<sup>9</sup> erythrocytes or as mU/g haemoglobin. To calculate G-6-PDH activity as mU/10<sup>9</sup> erythrocytes for comparison with the normal value, divide the calculated activity (mU/erythrocytes per mL blood) with the RBC's count per mL.

To calculate G-6-PDH activity as mU/g haemoglobin use the following equation:

$$\text{G-6-PDH mU/gHb} = \frac{\text{mU.erythrocytes per mL} \times 100}{\text{Hb (g/dL)}}$$

$$\begin{aligned} 100 &= \text{Factor to convert from mL to dL} \\ \text{Hb (g/dL)} &= \text{Haemoglobin concentration determined for each specimen} \end{aligned}$$

### Temperature Correction

Please note that the below temperature correction may be used for patient samples only.

When the temperature is 37°C, no temperature correction factor (TCF) is required. If results for patient samples are reported at a temperature other than 37°C, a TCF must be used.

Cuvette Temperature (°C)	TCF
25	2.076
30	1.515

### QUALITY CONTROL

Control sera are recommended to monitor the performance of assay procedures: G-6-PDH 2 levels control ref.1002520.

If control values are found outside the defined range, check the instrument, reagents and technique for problems.

Each laboratory should establish its own Quality Control scheme and corrective actions if controls do not meet the acceptable tolerances.

### REFERENCE VALUES

In erythrocytes: 245 - 299 mU/10<sup>9</sup> erythrocytes (37°C).

6,97 – 20,5	U/g Hb (37°C)	Blood Haemoglobin (g/dL)
		Adult Males 13 - 18
		Adult Females 11 - 16
		Newborns 14 - 23

These values are for orientation purpose; each laboratory should establish its own reference range.

### PERFORMANCE CHARACTERISTICS

**Measuring range:** From *detection limit* of 154 U/L to *linearity limit* of 4000 U/L. If the results obtained were greater than linearity limit, using 0,2 mL of haemolysate with 1,8 mL of NaCl 9g/L and repeat the assay. Then multiply the result by 10.

#### Precision:

	Intraserie (n=20)		Interserie (n=20)	
Media (U/L)	730	1460	730	1460
SD	30,95	70,52	47,09	76,61
CV (%)	4,24	4,83	6,45	5,11

**Sensitivity:** 1 U/L = 0,000077 (A)

**Accuracy:** Results obtained using SPINREACT reagents (y) did not show systematic differences when compared with other commercial reagents (x).

The results obtained using 50 samples were the following:

Correlation coefficient (r)<sup>2</sup>: 0,9807.

Regression equation: y = 1,0069x + 47,644.

The results of the performance characteristics depend on the analyzer used.

### INTERFERENCES

Reticulocytes have higher G-6-PDH levels than mature red cells. Therefore, it is not recommended that this assay be performed after a severe hemolytic crisis, since G-6-PDH levels may appear falsely elevated. Testing may be more helpful after the level of mature red cells have returned to normal.

### NOTES

- In order to avoid contamination it is recommended to use disposable material.
- Use clean disposable pipette for its dispensation.
- SPINREACT has instruction sheets for several automatic analyzers.**

### BIBLIOGRAPHY

- Kornberg, A. *et al.*, Methods in Enzymology 1, Academic Press, New York, 1955; p.323.
- Makarem, A., Clinical Chemistry-Principles and Techniques. 2<sup>nd</sup> Ed. R.F. Henry, D. C. Cannon, J.W. Winkelman, Editors. Harper and Row, Hagerstown [MD], 1974; 1128-1135.
- Lohr GW, Waller HD: Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. Methods of Enzymatic Analysis, 3<sup>rd</sup> Edition - Verlag Chemie, Wehnhheim: 1974; p. 636.

### PACKAGING

Ref: 1001420

Cont.

R1: 1 x 100 mL, R2: 1 x 2 mL,  
R3: 1 x 2 mL, R4: 1 x 20 mL

# Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

Enzimático-UV

## Determinación cuantitativa de G-6-PDH IVD

Conservar a 2-8°C

### USO PREVISTO

Para determinación cuantitativa *in vitro* de Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en eritrocitos.

### PRINCIPIO DEL MÉTODO<sup>1,2,3</sup>

La actividad enzimática se determina midiendo el cambio de absorbancia a 340 nm debido a la reducción de NADP<sup>+</sup>.



### SIGNIFICADO CLÍNICO

La deficiencia de G-6PDH es una de las deficiencias de enzimas humanas más comunes, y afecta a más de 4 millones de personas en el mundo. Aunque la mayoría de sujetos con deficiencia enzimática son asintomáticos, los individuos con deficiencia pueden mostrar anemia hemolítica episódica inducida por infecciones o ciertos medicamentos, y una anemia hemolítica esferocítica crónica.

### REACTIVOS

<b>R 1</b> Tampón	Trietanolamina pH 7,6 EDTA	31,7 mmol/L 3,2 mmol/L
<b>R 2</b>	NADP	0,34 mmol/L
<b>R3</b> Sustrato	Glucosa-6-fosfato	0,58 mmol/L
<b>R4</b>	Digitonina	
<b>OPCIONAL</b>	Control G-6-PDH 2 niveles ref. 1002520	

### PRECAUCIONES

- **R2, R3, Control:** H302-Nocivo en caso de ingestión. H412-Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos. Seguir los consejos de prudencia indicados en la FDS y etiqueta del producto.

### PREPARACION

- **R1 - R4** Listos para su uso.  
- **R2 - R3** Reconstituir el contenido de cada frasco con 2 mL de agua destilada.

### CONSERVACION Y ESTABILIDAD

R1 y R4 son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial, cuando se mantienen los frascos bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita su contaminación. R2 y R3 son estables durante 4 semanas a 2-8 °C. No usar reactivos fuera de la fecha indicada.

### MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 340 nm.
- Baño termoestable a 37°C (± 0,1°C)
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio (Nota 1).

### MUESTRAS

- Eritrocitos: Preparación: Limpiar 0,2 mL de sangre con alícuotas de 2 mL de solución 0,9 % NaCl. Centrifugar después de cada lavado durante 10 min a 3000 rpm. Repetir 3 veces. Suspender los eritrocitos centrifugados limpios en 0,5 mL de R4 y dejar reposar durante 15 min a +4°C, entonces volver a centrifugar. Usar en el ensayo el sobrenadante en el periodo de 2 horas.

### PROCEDIMIENTO

- Condiciones del ensayo:  
Longitud de onda: ..... 340 nm  
Cubeta: ..... 1 cm paso de luz  
Temperatura constante: ..... 37°C
- Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
- Pipetear en una cubeta (Nota 2):

	Muestra
Reactivo 1 (µL)	1000
Reactivo 2 (µL)	30
Hemolizado (µL)	15

4. Mezclar e incubar 5 minutos a 37°C.

5. Añadir:

	Muestra
Reactivo 3 (µL)	15

6. Mezclar, leer la absorbancia inicial y poner en marcha el cronómetro simultáneamente. Leer de nuevo la absorbancia tras 1, 2 y 3 minutos.

### CÁLCULOS

Para calcular la actividad de G-6-PDH usar las fórmulas siguientes:  
 $\text{mU/eritrocitos por mL sangre}^* = 33650 \times \Delta A_{340} \text{ nm/min}$   
 $\text{mU/eritrocitos por mL sangre}^* = 60571 \times \Delta A_{\text{Hg } 365} \text{ nm/min}$   
 $\text{mU/eritrocitos por mL sangre}^* = 34304 \times \Delta A_{\text{Hg } 334} \text{ nm/min}$

La actividad de G-6-PDH se expresa como mU/10<sup>9</sup> eritrocitos o como mU/g hemoglobina. Para calcular la actividad de G-6-PDH como mU/10<sup>9</sup> eritrocitos, para comparar con el valor normal, dividir la actividad calculada (mU/eritrocitos por mL sangre) por la cantidad de hematíes por mL.

Para calcular la actividad de G-6-PDH como mU/g hemoglobina utilizar las siguientes ecuaciones:

$$\text{G-6-PDH mU/gHb} = \frac{\text{mU.eritrocitos per mL} \times 100}{\text{Hb (g/dL)}}$$

$$\frac{100}{\text{Hb (g/dL)}} = \frac{\text{Factor para convertir mL a dL}}{\text{Concentración de hemoglobina determinada para cada muestra}}$$

### Corrección de temperatura

La siguiente corrección de temperatura se debe usar únicamente para muestras de pacientes. Cuando la temperatura es 37°C, no se requiere ningún factor de corrección de la temperatura (TCF).

Temperatura cubeta (°C)	TCF
25	2.076
30	1.515

### CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados:

Control G-6-PDH 2 niveles ref. 1002520.

Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, se debe revisar el instrumento, los reactivos y la técnica.

Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias.

### VALORES DE REFERENCIA

En eritrocitos: 245 - 299 mU/10<sup>9</sup> eritrocitos (37°C).

6,97 – 20,5 U/g Hb (37°C)

	Hemoglobina en sangre (g/dL)
Hombres adultos	13 - 18
Mujeres adultas	11 - 16
Bebés	14 - 23

Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

### CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

**Rango de medida:** Desde el límite de detección 154 U/L hasta el límite de linealidad 4000 U/L.

Si la concentración de la muestra es superior al límite de linealidad, utilizar 0,2 mL de hemolisado con 1,8 mL de NaCl 9g/L y repetir el ensayo. Luego multiplicar el resultado por 10.

### Precisión:

	Intraserie (n=20)		Interserie (n=20)	
	Media (U/L)	730	1460	730
SD	30,95	70,52	47,09	76,61
CV (%)	4,24	4,83	6,45	5,11

**Sensibilidad:** 1U/L= 0,000077 (A)

**Exactitud:** Los reactivos SPINREACT (y) no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales (x).

Los resultados obtenidos con 50 muestras fueron los siguientes:

Coefficiente de regresión (r)<sup>2</sup>: 0,9807.

Ecuación de la recta de regresión: y= 1,0069x + 47,644.

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

### INTERFERENCIAS

Los reticulocitos tienen mayores niveles de G-6-PDH que los hematíes maduros. Por tanto, no se recomienda realizar el ensayo después de una crisis hemolítica severa, puesto que los niveles de G6-PDH pueden aparecer falsamente incrementados.

### NOTAS

- A fin de evitar contaminaciones se recomienda utilizar material desechable.
- Usar puntas de pipeta desechables limpias para su dispensación.
- SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.**

### BIBLIOGRAFÍA

- Kornberg, A. et al., Methods in Enzymology 1, Academic Press, New York, 1955; p.323.
- Makarem, A., Clinical Chemistry-Principles and Techniques. 2nd Ed. R.F. Henry, D. C. Cannon, J.W. Winkelman, Editors. Harper and Row, Hagerstown [MD], 1974; 1128-1135.
- Lohr GW, Waller HD: Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. Methods of Enzymatic Analysis, 3rd Edition - Verlag Chemie, Wehnhelm: 1974; p. 636.

### PRESENTACIÓN

Ref: 1001420

Cont.

R1: 1 x 100 mL, R2: 1 x 2 mL,  
R3: 1 x 2 mL, R4: 1 x 20 mL

# Glucose-6-fosfato deshidrogenase

Enzimático-UV

## Determinação quantitativa de G-6-PDH IVD

Conservar a 2 – 8 °C

### UTILIZAÇÃO PREVISTA

Para a determinação quantitativa *in vitro* da Glucose-6-fosfato deshidrogenase em eritrócitos.

### PRINCÍPIO DO MÉTODO<sup>1,2,3</sup>

A atividade enzimática é determinada medindo a alteração na absorvância a 340 nm devido à redução de NADP<sup>+</sup>.



### SIGNIFICADO CLÍNICO

A deficiência de G-6PDH é uma das deficiências de enzimas humanas mais comuns e afeta mais de 4 milhões de pessoas em todo o mundo. Embora a maioria dos indivíduos com deficiência enzimática sejam assintomáticos, os indivíduos com deficiência podem apresentar anemia hemolítica episódica induzida por infecções ou determinados medicamentos, e uma anemia hemolítica esferocítica crônica.

### REAGENTES

<b>R 1</b> Tampão	Trietanolamina pH 7,6 EDTA	31,7 mmol/L 3,2 mmol/L
<b>R 2</b>	NADP	0,34 mmol/L
<b>R3</b> Substrato	Glucose-6-fosfato	0,58 mmol/L
<b>R4</b>	Digitonina	
<b>OPCIONAL</b>	Controlo G-6-PDH 2 níveis ref. 1002520	

### PRECAUÇÕES

- **R2, R3, Controlo:** H302-Nocivo por ingestão. H412-Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.  
Seguir os conselhos de prudência dados em SDS e etiqueta.

### PREPARAÇÃO

- **R1 - R4** Prontos a utilizar.  
- **R2 - R3** Reconstituir o conteúdo de cada frasco com 2 ml de água destilada.

### CONSERVAÇÃO E ESTABILIDADE

R1 e R4 são estáveis até à data de validade indicada no rótulo do frasco, quando os frascos são mantidos bem fechados a 2 – 8 °C, protegidos da luz e se evita a sua contaminação. R2 e R3 são estáveis durante 4 semanas a 2 - 8 °C. Não utilizar reagentes que tenham excedido a data de validade indicada.

### MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro ou analisador para leituras a 340 nm.
- Banho termostaticável a 37 °C ( $\pm 0,1$  °C)
- Cuvetes de 1,0 cm de caminho de luz.
- Equipamento de laboratório geral <sup>(Nota 1)</sup>.

### AMOSTRAS

- Eritrócitos: Preparação: Limpar 0,2 ml de sangue com alíquotas de 2 ml de solução de NaCl 0,9 %. Centrifugar após cada lavagem durante 10 min a 3000 rpm. Repetir 3 vezes. Suspender os eritrócitos centrifugados limpos em 0,5 ml de R4 e deixar repousar durante 15 min a +4 °C, em seguida, voltar a centrifugar. Utilizar no ensaio o sobrenadante no período de 2 horas.

### PROCEDIMENTO

- Condições do ensaio:  
Comprimento de onda: ..... 340 nm  
Cuvete: ..... 1 cm caminho de luz  
Temperatura constante: ..... 37 °C
- Ajustar o espectrofotómetro a zero com água destilada.
- Pipetar numa cuvette<sup>(Nota 2)</sup>:

	Amostra
Reagente 1 (µL)	1000
Reagente 2 (µL)	30
Hemolizado (µL)	15

- Misturar e incubar durante 5 minutos a 37 °C.
- Adicionar R3.

	Amostra
Reagente 3 (µL)	15

- Misturar, ler a absorvância inicial e colocar o cronómetro em funcionamento simultaneamente. Ler novamente a absorvância após 1, 2 e 3 minutos.

### CÁLCULOS

Para calcular a atividade de G-6-PDH utilizar a seguinte fórmula:  
 $\text{mU/eritrócitos por ml de sangue}^* = 33650 \times \Delta A_{340} \text{ nm/min}$   
 $\text{mU/eritrócitos por ml de sangue}^* = 60571 \times \Delta A_{\text{Hg } 365} \text{ nm/min}$   
 $\text{mU/eritrócitos por ml de sangue}^* = 34304 \times \Delta A_{\text{Hg } 334} \text{ nm/min}$

A atividade de G-6-PDH é expressa como mU/10<sup>9</sup> eritrócitos ou como mU/g hemoglobina. Para calcular a atividade de G-6-PDH como mU/10<sup>9</sup> eritrócitos, para comparar com o valor normal, dividir a atividade calculada (mU/ eritrócitos por mL de sangue) pela quantidade de hemácias por mL.

**Para calcular a atividade de G-6-PDH como mU/g hemoglobina Use a seguinte equação:**

$$\text{G-6-PDH mU/gHb} = \frac{\text{mU.eritrócitos por mL} \times 100}{\text{Hb (g/dL)}}$$

$$\begin{aligned} 100 &= \text{Fator para converter mL em dL} \\ \text{Hb (g/dL)} &= \text{Concentração de hemoglobina determinada para cada amostra} \end{aligned}$$

### Correção da temperatura

A correção da temperatura seguinte deve utilizar-se unicamente para amostras de doentes. Quando a temperatura for de 37 °C, não é necessário nenhum fator de correção da temperatura (TCF).

Temperatura da cuvete (°C)	TCF
25	2,076
30	1,515

### CONTROLO DE QUALIDADE

É conveniente analisar juntamente com as amostras, soros controlo avaliados: Controlo G-6-PDH 2 níveis ref. 1002520. Se os valores obtidos se encontrarem fora do intervalo de tolerância, devem-se rever o instrumento, os reagentes e a técnica. Cada laboratório deve dispor do seu próprio Controlo de Qualidade e estabelecer ações corretivas no caso de os controlos não estarem de acordo com as tolerâncias aceitáveis.

### VALORES DE REFERÊNCIA

Em eritrócitos: 245 - 299 mU/10<sup>9</sup> eritrócitos (37 °C).

6,97 – 20,5 U/g Hb (37 °C)

	Hemoglobina no sangue (g/dL)
Homens adultos	13 - 18
Mulheres adultas	11 - 16
Bebés	14 - 23

Estes valores são indicativos. É recomendável que cada laboratório estabeleça os seus próprios valores de referência.

### CARACTERÍSTICAS DO MÉTODO

**Intervalo de medição:** Desde o *limite de deteção* 154 U/L até ao *limite de linearidade* 4000 U/L.

Se a concentração da amostra for superior ao limite de linearidade, utilizar 0,2 mL de hemolizado com 1,8 mL de NaCl 9g/L e repetir o ensaio. Em seguida, multiplique o resultado por 10.

### Precisão:

	Intra-série (n=20)		Inter-série (n=20)	
	Média (U/L)	SD	CV (%)	
Média (U/L)	730	1460	730	1460
SD	30,95	70,52	47,09	76,61
CV (%)	4,24	4,83	6,45	5,11

**Sensibilidade:** 1U/L = 0,000077

**Exatidão:** Os reagentes SPINREACT (y) não apresentam diferenças sistemáticas significativas quando comparados com outros reagentes comerciais (x).

Os resultados obtidos com 50 amostras foram os seguintes:

Coefficiente de regressão (r<sup>2</sup>): 0,9807.

Equação da reta de regressão:  $y = 1,0069x + 47,644$ .

As características do método podem variar em função do analisador utilizado.

### INTERFERÊNCIAS

Os reticulócitos têm níveis de G-6-PDH superiores aos das hemácias maduras. Como tal, não se recomenda realizar o ensaio após uma crise hemolítica grave, uma vez que os níveis de G6-PDH podem aparecer falsamente aumentados.

### NOTAS

- A fim de evitar a contaminação, recomenda-se a utilização de material descartável.
- Utilizar pontas de pipetas descartáveis limpas para sua dispensa.
- O SPINREACT tem instruções para vários analisadores automáticos.**

### BIBLIOGRAFIA

- Kornberg, A. et al., Methods in Enzymology 1, Academic Press, New York, 1955; p.323.
- Makarem, A., Clinical Chemistry-Principles and Techniques. 2nd Ed. R.F. Henry, D. C. Cannon, J.W. Winkelman, Editors. Harper and Row, Hagerstown [MD], 1974; 1128-1135.
- Lohr GW, Waller HD: Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. Methods of Enzymatic Analysis, 3rd Edition - Verlag Chemie, Wehheim: 1974; p. 636.

### APRESENTAÇÃO

Ref: 1001420

Cont.

R1: 1 x 100 mL, R2: 1 x 2 mL,  
R3: 1 x 2 mL, R4: 1 x 20 mL