

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 isouramile, 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 ($\Delta A_s/min$) 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:

R1 - BUFFER Tampone Good modificato > 20 mmol/L

R2 - NADP NADP >0.19 mmol/L

PERICOLO

H302-H311-H411-EUH032-EUH208-

P273-P280-P312-P391

REF NAGP68905

1 x 20 mL

20 x 1 mL

R3 - G6P (PRONTO ALL'USO) G-6-P >0.1 g/L Na₃ < 0.1% 1 x 40 mL

INDICAZIONI DI PERICOLO

H302 - Nocivo se ingerito.

H311 - Tossico per contatto con la pelle.

H411 - Tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.

EUH032 - A contatto con acidi libera gas molto tossici.

EUH208 - Contiene Maleimmide. Può provocare una reazione allergica

CONSIGLI DI PRUDENZA

P273 - Non disperdere nell'ambiente.

P280 - Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.

P312 - In caso di malessere, contattare un CENTRO ANTIVELENI/un medico

P391 - Raccogliere il materiale fuoriuscito.

Contiene: azoturo di sodio, Maleimmide

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.

Calibratori e Controlli

Spettrofotometro od analizzatore automatico di chimica clinica.

REAGENTI AUSILIARI PER IL CONTROLLO QUALITÀ

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)

- TOTAL HEMOGLOBIN

- G6PDH CONTROLS SET

- G6PDH CALBRATORS

REF NAGB1129

REF NATHEMO395

REF NAG6CON

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 solleva 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 (7.9 – 16.3) 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.

Se per esempio, 12,1 U/g Hb corrisponde alla media della popolazione di riferimento e la poniamo 100%, si possono esprimere percentualmente i valori di normalità come segue: Valori normali G6PDH: 65%-135%

XII. CALCOLO

Riportare per ogni Calibratore i valori di ΔA_{st} 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 ΔA_s trovato sulla Curva di Calibrazione per determinare la concentrazione in U/L a 37°C dei Controlli e dei campioni analizzati.

Attività G6PDH (U/L, 37°C) Calcolo Manuale

RICORDARE di calcolare sempre $\Delta A/\text{minuto}$ ($\Delta A/\text{min}$).

$$\Delta A/\text{min} = (\text{SECONDA lettura} - \text{PRIMA LETTURA}) / 5$$

$$\text{G6PDH (U/L, 37°C)} = \Delta A/\text{min} \times (\text{Volume Totale} / \text{Volume Campione}) \times (1/\epsilon \cdot d) \times 1000$$

dove:

$$\text{Volume Totale} = (1 + 0,01 + 2) = 3,01\text{mL}$$

$$\text{Volume Campione} = 0,01\text{mL}$$

$$\epsilon = 6,3 = \text{assorbanza millimolare of NADPH at 340nm}$$

$$d = 1 \text{ cm} = \text{cammino ottico}$$

$$1000 = \text{Fattore per convertire attività a Litro}$$

$$\text{G6PDH (U/L, 37°C)} =$$

$$\Delta A/\text{min} \times (3,01/0,01) \times (1/6,3 \times 1) \times 1000 = \Delta A/\text{min} \times (301 \times 1000) / 6,3 = \Delta A/\text{min} \times (301000) / 6,3 = \boxed{\Delta A/\text{min} \times 47778}$$

Per esempio:

$$\text{PRIMA lettura} = 1,2000$$

$$\text{SECONDA lettura} = 1,2809$$

$$\Delta A/\text{min} = (1,2809 - 1,2000) / 5 = 0,0809/5 = 0,01618$$

$$\text{G6PDH (U/L, 37°C)} = \boxed{\Delta A/\text{min} \times 47778} = 0,01618 \times 47778 = 773 \text{ U/L (37°C)}$$

Attività del G6PDH (U/gr emoglobina, 37°C) – Calcolo manuale

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

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

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.

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

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 > 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:

$$\text{Regressione lineare} \quad y = 1.0007x + 15$$

$$\text{Coefficiente di correlazione} \quad r = 0.9997 \quad n = 20$$

XIV. BIBLIOGRAFIA

1. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, W.B. Saunders Co., Philadelphia (2012).
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 (Axxx)	Fabbricante
Consultare le istruzioni per l'uso		Utilizzare entro (anno/mese)	REF	Numero di catalogo	Non riutilizzare
Fragile, maneggiare con cura		Tenere lontano dal calore	Mantenere asciutto	Non sterile	



G6PDH-GLUCOSE 6 PHOSPHATE DEHYDROGENASE

For *in Vitro* Diagnostic use only**G6PDH QUANTITATIVE KINETIC UV ASSAY on WHOLE BLOOD with MINDRAY BS-300** ∇_{Σ} (20 x 3 mL) 285 tests**REF** NAGP68905

I. INTENDED USE

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) is an enzyme in the pentose phosphate pathway. G6PDH converts glucose-6-phosphate into 6-phosphoglucono-d-lactone and is the rate-limiting enzyme of this metabolic pathway that supplies reducing energy to cells by maintaining the level of the coenzyme NADPH. The NADPH in turn maintains the supply of reduced glutathione in the cells that is used to mop up free radicals that cause oxidative damage.

The G6PDH / NADPH pathway is the only source of reduced glutathione in red blood cells (erythrocytes). The role of red cells as oxygen carriers puts them at substantial risk of damage from oxidizing free radicals except for the protective effect of G6PDH/NADPH/glutathione. People with G6PDH deficiency are therefore at risk of hemolytic anemia in states of oxidative stress. Oxidative stress can result from infection and from chemical exposure to medication and certain foods. Broad beans, e.g., fava beans, contain high levels of vicine, divicine, convicine and isouramil, all of which are oxidants.

When all remaining reduced glutathione is consumed, enzymes and other proteins (including hemoglobin) are subsequently damaged by the oxidants, leading to electrolyte imbalance, cross-bonding and protein deposition in the red cell membranes. Damaged red cells are phagocytosed and taken out of circulation in the spleen. The hemoglobin is metabolized to bilirubin (causing jaundice at high concentrations). The red cells rarely disintegrate in the circulation, so hemoglobin is rarely excreted directly by the kidney; but this can occur in severe cases, causing acute renal failure.

Deficiency of G6PDH in the alternative pathway causes the buildup of glucose and thus there is an increase of glycated endproducts. The deficiency also causes a reduction of NADPH which is necessary for the formation of Nitric Oxide (NO).

II. PRINCIPLE

The Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PDH) catalyzes the first step in the pentose phosphate shunt, oxidizing Glucose-6-phosphate (G-6-P) to 6-phosphogluconate (6-PG) and reducing NADP to NADPH.

The increase of absorbance of NADPH, for reduction of NADP, is proportional to the activity of the G-6-PDH in the sample.

III. PRECAUTION FOR USE

1. This product has been formulated for *in vitro* diagnostic use.
2. A proportional variation of the reaction volumes does not change the result.
3. DO NOT mix Reagents from different Production lots.
4. For concentration of G6PDH higher than 3200 U/L, use half sample volume and multiply the result x 2.
5. In addition to the possible risk indications, the Reagent can contain preservatives (as sodium azide or others), which total concentration is lower than the limits mentioned in Dir. 67/548/CEE e 88/379/CEE and following modifications regarding classification, labelling and packaging of dangerous preparations (Reagents). However it is recommended to handle the reagents carefully, avoiding ingestion and contact with eyes, mucous membranes and skin; to use reagents according to good laboratory practice. On the material safety data sheet are detailed the operating procedures for the manipulation of this product. Material safety data sheet should be supplied on request.

ATTENTION!

A) Applications on routine analyzers may be totally different from what developed as manual determination; in addition the procedures are specific for each analyzer.

B) Very deep attention must be given to interfering substances: copper and sulfate are strong inhibitors. Certain drugs and other substances are able to influence levels of G6PDH (see References 2).

C) The reagent must be used ONLY for the intended destinations, by expert and trained people and in according to good laboratory practice.

D) The clinical diagnosis cannot be done correctly using the result of only one test, but have to be done integrating critically the results of different laboratory tests and clinical data.

E)) The reagent contains 6PGD inhibitors, which could form one molecule of NADPH in addition, for one molecule of 6- phosphogluconate formed.

F) Reticulocytes have higher G-6-PDH levels than mature Red Cells; it is not recommended to run the assay after a severe hemolytic crisis, since G-6-PDH may appear falsely elevated.

G) If (□As/min) are very, very low, may be possible increase the sample volume (and of course the Control volume).

H) For the determination of G6PDG on whole blood is necessary to prepare the hemolysate using the kit **REF** NAGB1129 (the procedure is detailed on the relative Information for Use).

I) **G6PDH is very unstable in hemolysates. 20/30 minutes after dilution (see SAMPLE PRETREATMENT NAGREF29) a precipitate may appear, probably due to the biological variability of the patient's sample.**

J) Before to test G6PDH on whole blood it is necessary to determine the following parameter:

- the concentration of Hemoglobin in g/dL, to express G6PDH activity as U/g of Hemoglobin.

K) A lot of factors, as ambient temperature, the working reagent temperature, wash accuracy and the type of spectrophotometer, may affect the tests performances.

L) The calibration curve has to be always repeated at each change of the lot of the Reagent and/or calibrator.

M) All the precautions normally used in the laboratory must be respected for reagents handling.

All the calibrators and controls must be considered as human sample, so potentially infectious; all the protection actions must be applied to avoid any potential biological risk.

IV. REAGENTS AND MATERIALS PROVIDED

Kit composition:

R1 - BUFFER Good Buffer modified > 20 mmol/L

R2 - NADP NADP >0.19 mmol/L

DANGER

H302-H311-H411-EUH032-EUH208-

P273-P280-P312-P391

REF NAGP668905
1 x 20 mL
20 x 1 mL



R3 - G6P (READY TO USE) G-6-P >0.1 g/L NaN₃ < 0.1% 1 x 40 mL



HAZARD STATEMENTS

- H302** - Harmful if swallowed.
H311 - Toxic in contact with skin.
H411 - Toxic to aquatic life with long lasting effects.
EUH032 - Contact with acids liberates very toxic gas.
EUH208 - Contains Maleimide. It can cause an allergic reaction

PRECAUTIONARY STATEMENTS

- P273** - Do not release into the environment.
P280 - Wear protective gloves / protective clothing / eye protection / face protection.
P312 - Call a POISON CENTER / doctor if you feel unwell
P391 - Collect spilled material.

Contains: sodium azide, Maleimide

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- | | |
|---|---|
| Normal laboratory equipment. | Transparent glass tubes for sample dilution. |
| Micropipettes to deliver from 3 to 1000 µL. | Calibrators and Controls |
| Disposable micropipettes tips. | Spectrophotometer or automatic analyser for Clinical Chemistry. |

AUXILIARY REAGENTS FOR QUALITY CONTROL

To grant the right performances use following kits (see the relative information for use (IFU)):

- | | |
|---|-----------------------|
| - G6PDH-RED CELL LYSING (only for automation) | REF NAGB1129 |
| - TOTAL HEMOGLOBIN | REF NATHEMO395 |
| - G6PDH CONTROLS SET | REF NAG6CON |
| - G6PDH CALIBRATORS | REF NAG6CAL3 |

The calibration curve has to be always repeated at each change of the lot of the Reagent and/or calibrator.

V. STORAGE AND STABILITY

The Reagents are stable up to the expiry date mentioned on the labels, if closed and stored at 2-8°C in their intact primary container; if not exposed to heat sources and/or pressure variations. In case of damaging of the primary container organize the waste disposal.

VI. PREPARATION OF THE WORKING REAGENT

Dissolve a vial of **R2 - NADP** with 1 mL of **R1 - BUFFER**, mix gently avoid foaming. Let the reagent reach the room temperature before use. Close immediately after handling. The Reagents have to be used correctly, to avoid contamination. An incompetent handling relieves us from any responsibility.

VII. STABILITY OF THE WORKING REAGENT

The working reagent is stable 5 days at 2-8°C.

VIII. SAMPLES

- Whole blood collected with EDTA, heparin or ACD (Acid-Citrate-Dextrose).
- Samples collection in compliance with CLSI (NCCLS) (see References 3).
- Red cell G6PDH is stable in whole blood for 1 week at 2-8°C, but is unstable in Red Cell hemolysate. Freezing of blood is not recommended. (see References 1 et 4).
- Since activity is reported as number of Red Cells or grams of Hemoglobin, these two ones have to be det. before G6PDH assay. The most accurate red cell counts in the time is with erythrocytes in ADC, due to longer integrity of erythrocytes in it than in other ones. (see References 5)

IX. WASTE DISPOSAL

Observe all federal, state and local environmental regulations for waste disposal.

X. ANALYTICAL PROCEDURE FOR WHOLE BLOOD ON MANUAL SPECTROPHOTOMETER

Before to test G6PDH it is necessary to determine:

- 1) the concentration of Hemoglobin in g/dL, to express G6PDH activity as U/g of Hemoglobin.
- Wavelength: 340 nm (334 - 365 nm)
 - Pathlength: 1 cm
 - Reading: against air or distilled water
 - Temperature: 37°C
 - Method: kinetic
 - Reaction: 10 + 2 + 5 minutes
 - Sample/reagent: 1/100/200

Let reagents reach the working temperature before use.

Pipette in a test tube or cuvette so labelled: S: Sample, ST: Calibrators (R1 and R2 **REF NAG6CAL3**)

	S	ST-R1	ST-R2
WORKING REAGENT	1000 µL	1000 µL	1000 µL
Sample	10 µL	---	---
Calibrator R1	---	10 µL	---
Calibrator R2	---	---	10 µL

Mix kindly and incubate for 10 minutes at 37°C. Then add:

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

Mix kindly. Exactly 2 minutes after, make the **FIRST** reading of the sample (As1) and calibrators (Ast1-R1) and (Ast1-R2). Repeat the **SECOND** readings after 5 minutes for the sample (As2) and calibrators (Ast2-R1) and (Ast2-R2).

Determine the diff. of absorbance for sample and calibrators:

$$\Delta A_s = A_{s2} - A_{s1} \qquad \Delta A_{st-R1} = A_{st2-R1} - A_{st1-R1} \qquad \Delta A_{st-R2} = A_{st2-R2} - A_{st1-R2}$$

ATTENTION!

The kit is tested for a manual spectrophotometer and for HITACHI, COBAS and MINDRAY systems. The applications on automatic analysers could be completely different by what has been developed as manual determination.



XI. REFERENCE VALUES FOR WHOLE BLOOD (see References 1)

Normal Values G6PDH: 12.1 (7.9 – 16.3) U/g Hb

Values for the newborns may range somewhat higher.

Since the normal values depend on age, sex, diet, geographic area and other factors, each laboratory should establish its own normal values for this procedure.

If, for example, 12.1 U / g Hb corresponds to the average of the reference population and we set it as 100%, the normality values can be expressed in percentage terms as follows: Normal values G6PDH: 65% -135%

XII. CALCULATION

Plot the Δ As values for each Calibrator to give a Calibration Line.

The Calibration Line has to be always repeated for each new lot of Reagent and/or Calibrators.

Plot each Δ As sample value found on the Calibration Line, to obtain its concentration in U/L at 37°C

G6PDH ACTIVITY (U/L - 37°C) Manual Calculation

REM to calculate always ΔA /minute (ΔA /min).

$$\Delta A/\text{min} = (\text{SECOND reading} - \text{FIRST reading}) / 5$$

$$\text{G6PDH (U/L, 37°C)} = \Delta A/\text{min} \times (\text{Total Volume}/\text{Sample Volume}) \times (1/\epsilon \text{ d}) \times 1000$$

$$\text{Total Volume} = (1 + 0,01 + 2) = 3,01\text{mL}$$

$$\text{Sample Volume} = 0,01\text{mL}$$

$$\epsilon = 6,3 = \text{millimolar absorptivity of NADPH at 340nm}$$

$$\text{d} = 1 \text{ cm} = \text{pathlength}$$

$$1000 = \text{Factor to convert activity to Liter}$$

$$\text{G6PDH (U/L, 37°C)} = \Delta A/\text{min} \times (3,01/0,01) \times (1/6,3 \times 1) \times 1000 = \Delta A/\text{min} \times (301 \times 1000) / 6,3$$

$$= \Delta A/\text{min} \times (301000) / 6,3 = \boxed{\Delta A/\text{min} \times 47778}$$

For instance:

$$\text{FIRST reading} = 1,2000$$

$$\text{SECOND reading} = 1,2809$$

$$\Delta A/\text{min} = (1,2809 - 1,2000) / 5 = 0,0809/5 = 0,01618$$

$$\text{G6PDH (U/L, 37°C)} = \boxed{\Delta A/\text{min} \times 47778} = 0,01618 \times 47778 = 773 \text{ U/L (37°C)}$$

G6PDH ACTIVITY (U/gr. Hemoglobin - 37°C) Manual Calculation

Considering the value of Total Hemoglobin (TOTAL Hb) of each sample, expressed as g/dL, apply the formula

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

where "10" is the multiplier that converts g/dL in g/L of Total Hemoglobin (TOTAL Hb).

EXAMPLE

Assay of a sample which had an hemoglobin concentration of 12.47 g/dL and G6PDH (U/L, 37°C) = 773.

$$\text{G6PDH (U/g Hemoglobin)} = \frac{773}{12,47 \times 10} = 6,20$$

XIII. ANALYTICAL PERFORMANCES (Validate on MINDRAY BS300)

The performances of the Reagent **G6PDH - GLUCOSE 6 PHOSPHATE DEHYDROGENASE** have been tested with a MINDRAY BS300 analyzer. The data, while representing the characteristics of the product, could be different for each laboratory and for different analyzers.

Method Limitations: are not know limitations.

Method Linearity: for concentration of G6PDH higher than 3200 U/L, use half sample volume and multiply the result x 2.

Method Sensitivity (LoD): the sensitivity limit, that is the minimum concentration that can be distinguished by zero, is 27 U/L.

Interferences: see References 2.

Interference test criterion: recovery \pm 10% of initial value. No interference found on samples with:

- total bilirubin up to 40 mg/dL;
- lipemia [Intralipid®] up to 4000 mg/dL;
- ascorbic acid up to 50 mg/dL.

Within-run Precision: determined on 20 replications of 2 samples.

The results obtained are following:

Sample	Mean (U/L) \square 2s	CV %
Human 1	191 \square 8	2.1
Human 2	1375 \square 19	0.7

Run-to-run Precision: determined for 5 days with 20 replications for each days, for two samples.

The results obtained are the following:

Sample	Mean (U/L) \square 2s	CV %
Human 1	191 \square 7	1.9
Human 2	1379 \square 19	0.7

Accuracy: a group of 20 sera has been tested using this procedure and using a similar reagent available on the market. The comparison gave these results:

$$\text{Linear regression equation } y = 1.0007x + 15$$

$$\text{Correlation coefficient } r = 0.9997 \text{ n} = 20$$

XIV. REFERENCES (see Italian version)

CONTENT

REF NAGP68905

R1 - BUFFER	1 x 20 mL
R2 - NADP	20 x 1 mL
R3 - G6P	1 x 40 mL
Instruction for use	1 item

In Vitro Diagnostic Medical Device	Temperature limitation	Batch code (AXXX)	Manufacturer
Consult instructions for use	Use by (year/month)	Catalogue number	Do not reuse
Keep dry	Non-sterile	Fragile, handle with care	Keep away from heat