



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA**

**YVANNA LOUISE DI CHRISTINE OLIVEIRA DOS SANTOS**

**INTERFERENTES NA TÉCNICA QUANTITATIVA PARA DIAGNÓSTICO DA  
DEFICIÊNCIA DA GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE EM  
AMOSTRAS DE TRIAGEM NEONATAL**

**SÃO CRISTÓVÃO-SE**

**2016**

**YVANNA LOUISE DI CHRISTINE OLIVEIRA DOS SANTOS**

**INTERFERENTES NA TÉCNICA QUANTITATIVA PARA DIAGNÓSTICO DA  
DEFICIÊNCIA DA GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE EM  
AMOSTRAS DE TRIAGEM NEONATAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Departamento de Farmácia como parte das  
exigências à obtenção do título de bacharel  
em Farmácia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dulce Marta  
Schimieguel Mascarenhas Lima

**SÃO CRISTÓVÃO-SE**

**2016**

**YVANNA LOUISE DI CHRISTINE OLIVEIRA DOS SANTOS**

**INTERFERENTES NA TÉCNICA QUANTITATIVA PARA DIAGNÓSTICO DA  
DEFICIÊNCIA DA GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE EM  
AMOSTRAS DE TRIAGEM NEONATAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Departamento de Farmácia como parte das  
exigências à obtenção do título de bacharel  
em Farmácia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dulce Marta Schimieguel Mascarenhas Lima  
Universidade Federal de Sergipe

---

Prof. Dr. Silvio Santana Dolabella  
Universidade Federal de Sergipe

---

Dr. Fausto Góes Fontes Neto  
Hospital Universitário – Universidade Federal de Sergipe

**SÃO CRISTÓVÃO-SE**

2016

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, Pai amado e protetor que abriu todos os caminhos, forneceu conhecimento e colocou em minha vida todas as pessoas e oportunidades que me fizeram chegar até aqui. À espiritualidade amiga, que guiou meus passos e me mostrou que o amanhã é sempre uma nova oportunidade dada pelo Pai de melhorar.

A minha família. Minha amada vó-mãe que, mais que ninguém neste mundo, sabe das dificuldades que enfrentei, dia após dia, crise após crise de ansiedade, quilos após quilos perdidos. A minha irmã, que me deu os melhores conselhos e sem a qual eu nem seria farmacêutica, já que inspirada pela espiritualidade amiga me disse ‘Já pensou em fazer Farmácia?’. A ti também agradeço o maior presente que ganhei: meu lindo Gui, esse anjo que trouxe luz e alegria às nossas vidas, que sempre chegava aos domingos para me mostrar que a vida é muito mais que o computador e os incansáveis trabalhos acadêmicos. A minha mãe, que em curtos 12 anos me deu todo o exemplo e embasamento para que eu me tornasse alguém melhor e hoje, como um anjo, me acompanha em minha jornada.

Ao Grupo de Teatro 14:29 e Grupo Lumina. Minha família espiritual, onde encontrei pais, mães, irmãos, amigos que foram a minha sustentação quando tudo parecia desmoronar. Em especial ao meu pai Adelmo. Pai que a vida me deu para me ensinar que amor nunca é desnecessário.

A Daniel. Que tantas vezes me ajudou sem nem sequer saber o que estava fazendo. Que tantas vezes me ouviu ensaiar apresentações sobre temas que nunca tinha ouvido falar para no final dizer que tudo estava ótimo e ia dar certo. Agradeço a paciência, a compreensão e os anos de trabalho e companheirismo.

As Farmamigas, que foram essenciais nessa jornada. Tudo que enfrentamos juntas nos tornaram adultas e crescer ao lado de quaisquer pessoas não teria sido tão maravilhoso quanto compartilhar desses momentos com vocês.

A minha orientadora Dulce, que me deu essa incrível oportunidade de aprender, de crescer e me tornar mais forte. Com você aprendi muito mais que hematologia. Aprendi a nunca desistir dos meus objetivos, por maiores que sejam as dificuldades.

A Djane e toda equipe do Hospital Universitário, em especial a Flávia, Cida, Dayse e Cleide, que com os braços abertos me acolheram, me ensinaram e me tornaram parte deles. Os meses que convivi com vocês foram alguns dos melhores nos últimos 5 anos de graduação.

Que o Mestre Jesus abençoe a todos que me fizeram ser possível! Muita paz...

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Via de Embden-Meyerhof.....	02
Figura 2. Via da Hexose Monofosfato, Shunt da via de Embden-Meyerhof.....	04
Figura 3. Teste da Mancha Fluorescente durante observação em luz ultravioleta.....	07
Figura 4. Teste de Brewer.....	08
Figura 5. Método do ascorbato-cianeto.....	09
Figura 6. Esquema de detecção da deficiência de G6PD utilizando WST8/1-metoxi-PMS.....	09
Quadro 1. Classificação das variantes de glicose-6-fosfato desidrogenase.....	06

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,3-DPG	2,3 difosfoglicerato
6PGD	6-fosfogliconato desidrogenase
AHA	Anemia hemolítica aguda
ATP	Adenosina trifosfato
Bomba de K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup>	Bomba de sódio potássio
CNSHA	Anemia hemolítica não esferocítica congênita
CO	Monóxido de carbono
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Fe <sup>2+</sup>	Íon Ferroso
Fe <sup>3+</sup>	Íon Férrico
FST	Teste da mancha fluorescente
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
H <sup>+</sup>	Íon hidrogênio
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
Hb	Hemoglobina
Met-Hb	Meta-hemoglobina
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
O <sup>2-</sup>	Íon oxigênio
O <sub>2</sub>	Oxigênio molecular
PCR	Reação em cadeia da polimerase
WST 8/1-METOXI PMS	Metossulfato de [2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-dissulfofenil)-2H-tetrazólio]/1-metoxi fenazina

## SUMÁRIO

1 REVISÃO DA LITERATURA.....	01
1.1 ERITRÓCITOS, METABOLISMO E GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGE- NASE.....	01
1.2 DEFICIÊNCIA DE GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE.....	04
1.3 TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DE DEFICIÊNCIA DE G6PD.....	07
2 REFERÊNCIAS.....	12
3 CAPÍTULO 1.....	16
RESUMO.....	18
INTRODUÇÃO.....	19
MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	22
RESULTADOS.....	22
DISCUSSÃO.....	24
AGRADECIMENTOS.....	27
REFERÊNCIAS.....	28
4 ANEXOS.....	35

## **1- REVISÃO DE LITERATURA**

### **1.1- ERITRÓCITOS, METABOLISMO E GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE**

O eritrócito ou hemácia é uma célula sanguínea de linhagem mieloide cuja principal função é o transporte de oxigênio para os tecidos. A membrana dos eritrócitos é uma estrutura altamente dinâmica com uma organização estrutural ordenada de tal forma que permite a esta célula ser submetida a deformações necessárias para atravessar os vasos sanguíneos e executar sua função ao longo dos seus 120 dias de vida média (DA COSTA, 2013).

O oxigênio é transportado na hemácia ligado à hemoglobina, uma proteína tetramérica formada por um par de cadeias globínicas  $\alpha$  (ou  $\alpha$ -like) e um par de cadeias não- $\alpha$  ( $\beta$ -like), cada uma associada a um grupo heme. Concomitantemente, a hemoglobina remove o dióxido de carbono resultante do catabolismo celular, colaborando na manutenção do equilíbrio ácido-base (TEIXEIRA, 2014).

A degradação da hemácia ocorre no interior dos macrófagos do baço e medula óssea e é seguida pela liberação da hemoglobina. Os aminoácidos liberados por esta cadeia serão armazenados para produção de novas proteínas. A enzima heme oxigenase produz quantidades equimolares de biliverdina, monóxido de carbono (CO) e ferro férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Esta enzima tem um importante papel fisiológico protegendo as células da agressão oxidativa da porção heme livre. O  $\text{Fe}^{3+}$  liberado é estocado nas células reticuloendoteliais do fígado, baço e medula óssea, nas formas de ferritina e hemossiderina (PEREIRA e RAMOS, 2015).

Durante a maturação, os eritrócitos perdem seu núcleo, mitocôndrias, e outras organelas. Desta forma, eles são incapazes de realizar a fosforilação oxidativa e síntese de proteínas e lipídios. As vias metabólicas envolvidas na função e sobrevivência celular compreendem a glicólise anaeróbica não oxidativa, via das hexoses monofosfato e a via do metabolismo da glutatona (KORALKOVA, 2014).

A glicólise anaeróbica, denominada via de Embden-Meyerhof, é a única fonte de energia para as hemácias. Esta via transforma a glicose em piruvato e o reduz a lactato gerando adenosina trifosfato (ATP), que dirige o funcionamento adequado da bomba de  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  que, por sua vez, está envolvida na manutenção de flexibilidade e integridade da membrana dos eritrócitos. A glicólise anaeróbica é regulada por três passos limitantes

da velocidade: a ação catalítica da hexoquinase que converte glicose em glicose-6-fosfato, fosfofrutoquinase que converte frutose-6-fosfato em frutose-1,6-bifosfato, e piruvato quinase que converte fosfoenolpiruvato em piruvato (Figura 1) (KORALKOVA, 2014).

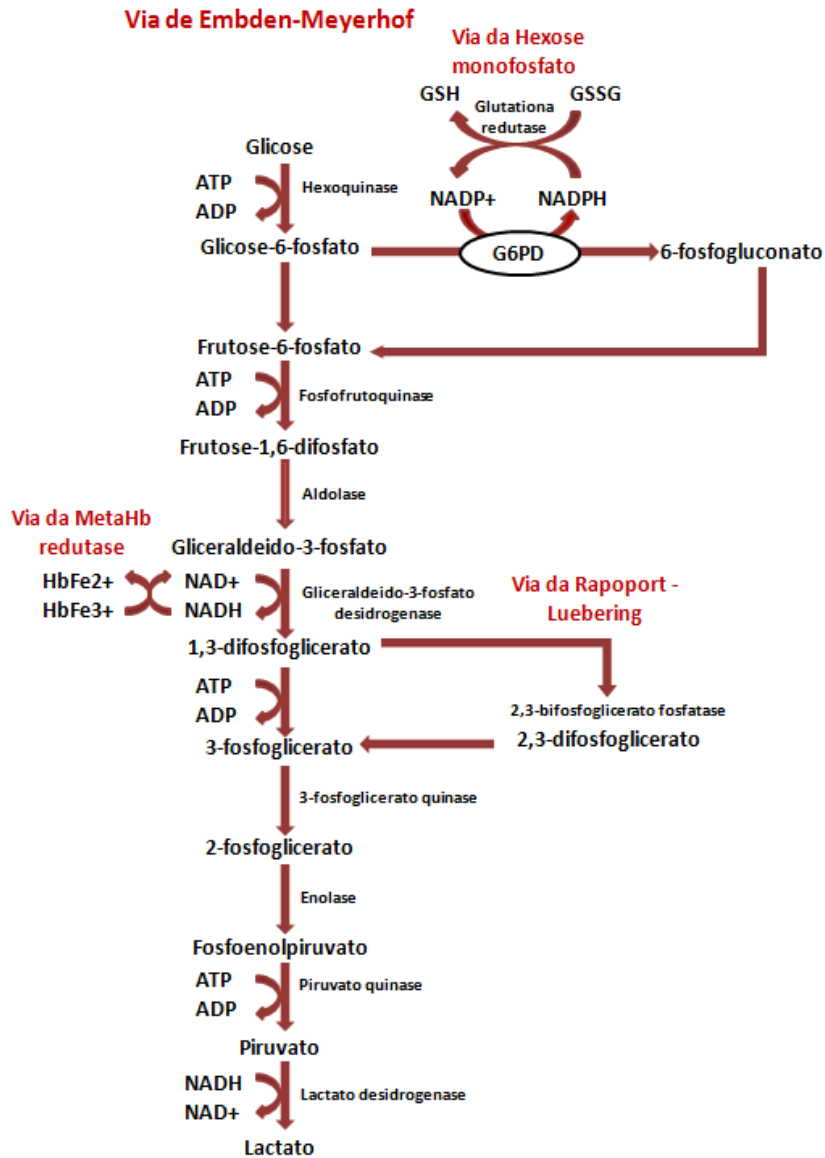


Figura 1 – Via de Embden-Meyerhof

A via de Rapoport-Luebering, a via de metahemoglobina redutase e a via fosfogluconato, ou via das pentoses, são desvios da via glicolítica. A via de Rapoport-Luebering é uma via alternativa entre o 1,3- difosfoglicerato e o 3-fosfoglicerato que, apesar de diminuir o rendimento de produção de ATP, gera 2,3- difosfoglicerato (2,3-DPG). O 2,3-DPG se liga à hemoglobina e sua remoção permite a fixação e transporte do oxigênio pela hemoglobina. Quando o O<sub>2</sub> é liberado no tecido, o 2,3-DPG volta a se

ligar à hemoglobina, num equilíbrio controlado pela pressão de oxigênio na corrente sanguínea (SILVA, 2013).

Na via da metahemoglobina redutase o citocromo-b5-redutase transfere elétrons da nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH) para o citocromo b5, que transfere estes elétrons para a metahemoglobina reduzindo-a a hemoglobina. Metahemoglobina é uma forma aberrante de hemoglobina resultante da oxidação de ferro na molécula heme normal da forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ) para a forma férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ). A presença de moléculas de heme férrico provoca uma mudança estrutural na molécula de hemoglobina, resultando em redução da capacidade de transporte e liberação de oxigênio. (UWAKWE, 2015).

A via das pentoses fosfato consome aproximadamente 10% da glicose disponível sob condições fisiológicas para manter níveis elevados de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH). A via das hexoses monofosfato é um desvio da via das pentoses fosfato onde a glicose-6-fosfato (G6P) desidrogenase age sobre o substrato glicose-6-fosfato gerando NADPH que age como co-fator da glutathiona-redutase na geração de glutathiona reduzida (GSH). A GSH detoxifica o peróxido de hidrogênio protegendo assim estruturas críticas das hemácias, como lipídios da membrana e proteínas do citoesqueleto, contra danos oxidativos (Figura 2) (ACOSTA, 2012; ALAARG, 2013).

Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) é a enzima limitante da velocidade da via das pentoses fosfato. É composta por 514 aminoácidos e possui sítios de ligação para nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADP) e G6P, bem como um sítio alostérico modificador para NADP. A G6PD tem sido extensivamente estudada no que diz respeito à sua deficiência e a associação com hemólise, e com respeito ao papel desempenhado no metabolismo de lipídios. Porém, outro papel que se destacou foi a importância da G6PD na fisiologia celular, uma vez que é uma grande fonte de NADPH, necessária a muitos sistemas celulares, incluindo as vias antioxidantes, óxido nítrico sintase, da NADPH-oxidase e do sistema do citocromo P450 (STANTON, 2012).

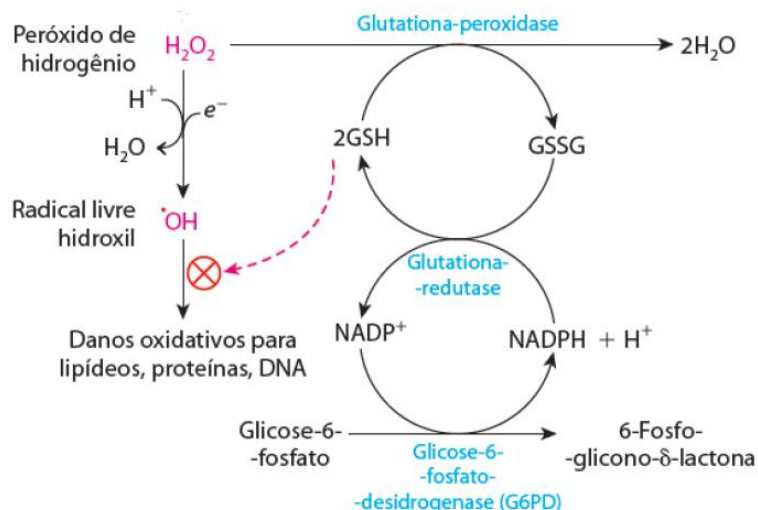


Figura 2 – Via da Hexose Monofosfato, Shunt da via de Embden-Meyerhof (modificada de Schmitt, G. C. et al., 2006)

## 1.2- DEFICIÊNCIA DE GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE

A anemia hemolítica se configura como um grupo variado de distúrbios em que a meia-vida da hemácia está reduzida. Genericamente, as anemias hemolíticas são classificadas em hereditárias, mais comumente devido a defeitos intrínsecos às hemácias, e adquiridas, quando envolve fatores extrínsecos às hemácias. Em casos de danos graves às hemácias ocorre hemólise intravascular. Em casos mais leves, essas células são destruídas no tecido reticuloendotelial do baço, fígado e medula óssea (FOCHESATTO & BARROS, 2013).

Eritroenzimopatias são doenças que afetam genes que codificam enzimas de hemácias. Elas alteram o metabolismo celular e são comumente associados à anemia hemolítica normocítica normocrômica, onde a morfologia dos eritrócitos não apresenta anormalidades específicas. A gravidade da eritroenzimopatia varia de acordo com a importância relativa da enzima mutante no que diz respeito à funcionalidade ou à estabilidade dessa enzima (ALAARG, 2013; KORALKOVA, 2014).

A deficiência da glicose 6-fosfato desidrogenase é uma das eritroenzimopatias mais frequentes, apresentando um quadro clínico bastante heterogêneo que varia de assintomático à anemia hemolítica crônica ou aguda. A sintomatologia se deve à ruptura da membrana das hemácias, em intensidade variável, na presença de agentes oxidantes de origem endógena ou exógena, como alguns fármacos e alimentos (VERDUGO, 2014).

A deficiência de G6PD é um distúrbio hereditário ligado ao cromossomo X, localizado no braço q28. O gene da G6PD possui 13 *exons* e 12 *introns*, sendo a região promotora rica em guanina e citosina. Os homens afetados são homozigotos e manifestam a deficiência enzimática, enquanto as mulheres, por possuírem dois genes para a enzima, podem ser heterozigotas ou homozigotas (FERREIRA, 2014).

A maior ocorrência desta deficiência se dá em regiões sub-saarianas, onde 23 a 39% da população é afetada. A América Latina possui padrão diferenciado devido à miscigenação com a população africana: a frequência varia de 0,39-6,22%. A frequência no Oriente Médio varia de 1% no Egito a 14,9% em alguns grupos étnicos do Irã. Entre a população branca do norte da Europa a ocorrência é de aproximadamente 1/1000 casos. Também entre os chineses e no sudeste da Ásia é bastante comum (FREITAS, 2013; ZAMORANO-JIMENEZ et al., 2015; REZAEI et al., 2015).

Nos Estados Unidos os principais afetados são homens negros, com uma frequência de cerca de 10%. Internacionalmente, a prevalência geográfica da doença se correlaciona com a distribuição da malária e as crises hemolíticas ocorrem devido ao uso de antimaláricos que possuem atividade oxidante. As maiores taxas de ocorrência (com frequências de genes afetados de 5-25%) são encontradas na África tropical, no Oriente Médio, na Ásia tropical e subtropical, algumas áreas do Mediterrâneo e em Papua Nova Guiné (SCHICK, 2016).

Na população brasileira a prevalência atual é estimada entre 3% e 6,9%, havendo, portanto, um grande número de indivíduos portadores e doentes (FREITAS, 2013). Um estudo realizado em uma população com descendência africana no Amazonas revelou uma frequência de 4,96%. Em São Paulo foi demonstrada uma frequência de 3,65% em homens. No Rio Grande do Norte, um estudo realizado com recém-nascidos mostrou uma ocorrência de 3,9%. Em Rondônia 3,3% dos investigados em uma pesquisa apresentaram deficiência de G6PD sendo que todos os indivíduos eram homens. Mais recentemente, outro estudo realizado em Rondônia demonstrou frequência de 3,1%. Trabalhos demonstraram uma frequência de 3% em Minas Gerais e de 3,5% no Rio Grande do Norte (BARRAVIERA et al., 1987; NICOLIELO et al., 2006; IGLESIAS et al., 2010; KATSURAGAWA et al., 2004; MAIA, 2010; CHAGAS et al., 2011; PERINOTO, 2013).

Atualmente, mais de 400 variantes G6PD são conhecidas das quais cerca de 140 mutações são de um único nucleotídeo do cromossomo X. Os homens são mais afetados que as mulheres, que exibem graus variáveis de expressão clínica. A maioria das

mutações de G6PD causa disfunção da enzima, diminuindo sua estabilidade, mas elas nunca perdem inteiramente sua atividade, o que seria letal para o indivíduo (BAUTISTA, 2014; ZAMORANO-JIMENEZ et al., 2015).

A primeira etapa crucial em um episódio hemolítico é a diminuição de NADPH e a consequente depleção de glutatona (GSH) através da sua conversão para dissulfureto de glutatona (GSSG). Uma vez que a GSH é exaurida, os grupos sulfidríla de hemoglobina são oxidados a sulfóxidos ou dissulfuretos, resultando em precipitados grosseiros de hemoglobina desnaturada denominados corpos de Heinz. O resultado clinicamente relevante é a hemólise intravascular, caracterizada por hemoglobinúria, e extravascular, apresentada como hiperbilirrubinemia. Os eritrócitos mais severamente danificados são eliminados pelos macrófagos através do sistema reticuloendotelial (LUZZATTO & SENECA, 2013).

Historicamente, as variantes genéticas de glicose-6-fosfato desidrogenase foram divididas em cinco classes, com a classe I sendo mais severamente disfuncional e a classe V possuindo a maior atividade da enzima. A classificação foi baseada em dois critérios: o nível de atividade enzimática nos eritrócitos e as manifestações clínicas dos indivíduos que possuem estas variantes (Quadro 1) (RELLING et al., 2014).

Quadro 1. Classificação das variantes de glicose-6-fosfato desidrogenase

<b>CLASSE I</b>	<b>CLASSES II E III</b>	<b>CLASSE IV</b>	<b>CLASSE V</b>
Atividade enzimática muito baixa (< 10%)	Atividade enzimática até 60%	Atividade enzimática levemente deficiente	Atividade enzimática aumentada
Provoca anemia hemolítica não esferocítica crônica	Risco de anemia hemolítica aguda induzida por drogas	Portadores assintomáticos	Sem doença associada

Embora os portadores dessa deficiência sejam geralmente assintomáticos, ao longo da sua vida podem desenvolver uma gama de condições hematológicas incluindo anemia hemolítica aguda, icterícia neonatal e anemia não esferocítica crônica quando expostos a infecção, determinadas medicações e alimentos, especificamente a fava. A deficiência de G6PD é reconhecida como fator de risco para hiperbilirrubinemia neonatal grave, encefalopatia bilirrubínica aguda e paralisia cerebral entre infantes. A prevenção das crises hemolíticas induzidas por infecção é de difícil controle, mas a

hemólise induzida por alimentos e medicamentos pode ser prevenida evitando os alimentos e substâncias desencadeadoras (BADEJOKO, 2014; MONTEIRO et al., 2014).

### 1.3- TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DE DEFICIÊNCIA DE G6PD

As técnicas de triagem são realizadas por meio de testes fenotípicos qualitativos e quantitativos baseados na detecção direta ou indireta de NADPH e  $H^+$  e por vezes fornecem um resultado duvidoso: estes testes identificam com mais precisão a deficiência em homens hemizigotos e mulheres homozigotas, mas podem classificar erroneamente mulheres com atividade enzimática intermediária (LEY et al., 2015). Os principais testes disponíveis são o teste da mancha fluorescente, desenvolvido a partir do teste de Beutler (1979); de redução da metahemoglobina, denominado teste de Brewer (1962); o do ascorbato-cianeto, desenvolvido por Jacob (1966); e o WST8/1-metoxi-PMS, elaborado por Tantular e Kawamoto (2003).

O ensaio qualitativo mais utilizado é o teste da mancha fluorescente que pode ser realizado em áreas de baixos recursos e identifica graves deficiências. Este teste é uma modificação do ensaio de Beutler (1979), no qual a glicose-6-fosfato e  $NADP^+$  presente no substrato, na presença da amostra de sangue com G6PD, produz NADPH fluorescente e 6-fosfogluconato. O progresso da reação é observada sob iluminação ultravioleta de onda longa em papel de filtro em intervalos de 0, 5 e 10 minutos. Os indivíduos deficientes apresentam fluorescência fraca (intermediários) ou ausente e os normais apresentam forte fluorescência (Figura 3) (LARUE et al., 2014; SATYAGRAHA et al., 2016).

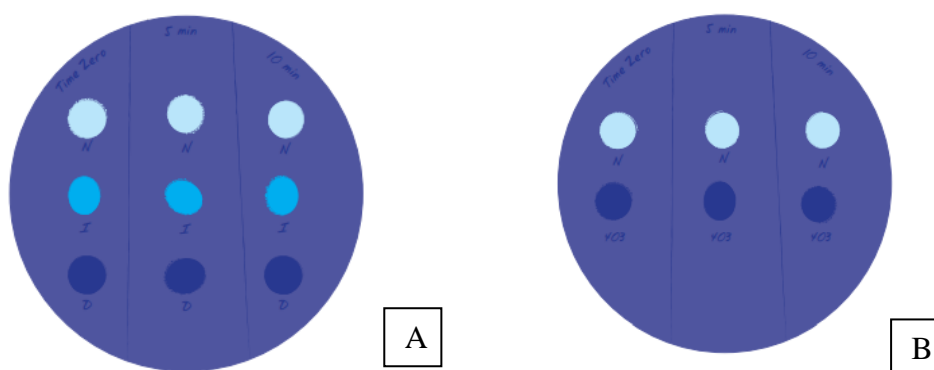


Figura 3. Teste da Mancha Fluorescente durante observação em luz ultravioleta. A: controles normal (N), intermediário (I) e deficiente (D). B: controle normal (N) e amostras positivas. (PATH, 2014. A guide to fluorescent spot testing for G6PD deficiency)

O teste de Brewer (1962) é um teste fenotípico qualitativo indireto que se baseia na redução de metahemoglobina. Neste teste, nitrito de sódio converte hemoglobina (Hb) em metahemoglobina (MetHb) (Figura 4). A incubação da amostra com azul de metileno permite a estimulação da via das pentoses fosfato em indivíduos com níveis normais de G6PD e redução da MetHb. Em indivíduos com deficiência de G6PD, o bloqueio na via das pentoses impede esta redução. A amostra deficiente em G6PD apresenta coloração castanha devido a presença de MetHb e a normal apresenta coloração avermelhada devido a presença de Hb. Outros ensaios indiretos de atividade da G6PD usam cromóforos, como o azul de cresil brilhante, resazurina e formazan para monitorar a produção de NADPH (SUGATHADASA & DISSANAYAKE, 2011; VON SEIDLEIN et al., 2013).

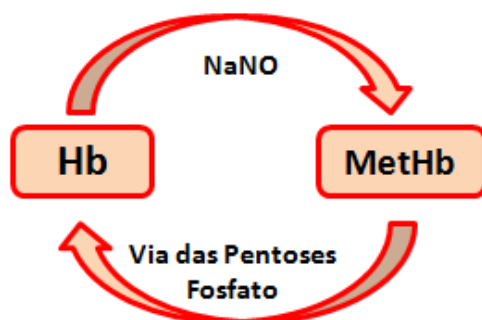


Figura 4. Teste de Brewer. Oxidação da hemoglobina pelo nitrito de sódio e redução de metahemoglobina através da via das pentoses fosfato.

O método do ascorbato-cianeto também é utilizado como teste de triagem e foi desenvolvido por Jacob em 1966. A glutatona reduzida pode converter totalmente vitamina C oxidada a sua forma reduzida, designada ascorbato ou ácido ascórbico. Este por sua vez pode doar elétrons e hidrogênios a  $O^{2-}$ ,  $H_2O_2$  e radicais livres de oxigênio. A enzima catalase também neutraliza  $H_2O_2$ . Quando o cianeto de sódio e o ascorbato de sódio são adicionados à amostra de sangue, a catalase é inibida pelo cianeto e há a formação de peróxido de hidrogênio pela oxidação do ascorbato e da hemoglobina. O peróxido gerado converterá a Hb em MetHb. Em indivíduos normais a glutatona age como doador de prótons para a glutatona peroxidase reduzir o peróxido, impedindo a formação de MetHb (Figura 5), que estará aumentada em indivíduos com deficiência de G6PD (MCDONAGH et al., 2013).

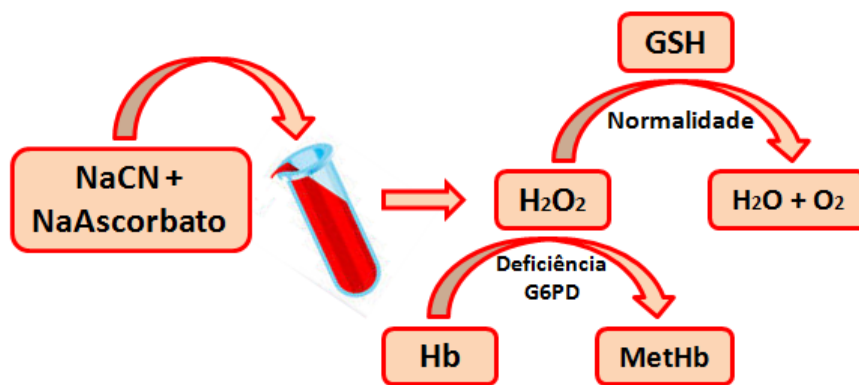


Figura 5. Método do ascorbato-cianeto. Em indivíduos com níveis normais de GSH o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é convertido em H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub>. Em indivíduos deficientes em G6PD o excesso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> leva à conversão de hemoglobina em metahemoglobina.

O teste de WST8/1-metoxi-PMS, foi desenvolvido por Tantular e Kawamoto (2003), devido à falta de um teste de diagnóstico padrão e às interferências que afetam a maioria dos métodos diagnósticos da deficiência de G6PD. Este é um método enzimático com baixa sensibilidade à luz e facilmente interpretável, tanto quantitativa como qualitativamente. Depende da redução de hidrogênio a partir de NADPH para converter o sal de tetrazólio WST-8 a WST-8-formazano, na presença do carreador de hidrogênio 1-metoxi-PMS (Figura 6). As amostras com atividade enzimática normal apresentam uma forte cor laranja, as amostras de pacientes com deficiência moderada mostram cor fraca e as de pacientes com deficiência severa e controles negativos não apresentam cor (DE NIZ et al., 2013).

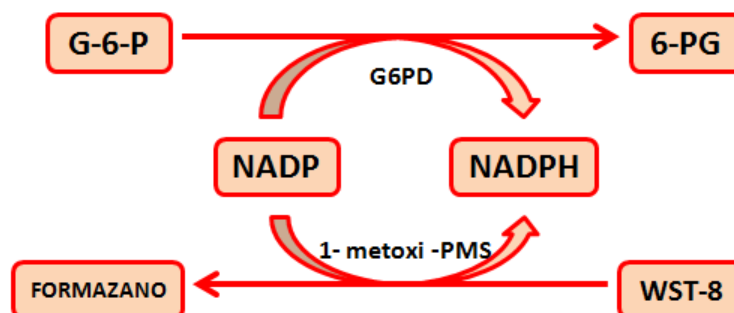


Figura 6. Esquema de detecção da deficiência de G6PD utilizando WST8/1-metoxi-PMS. (Modificado de Tantular e Kawamoto, 2003)

Os métodos quantitativos são mais específicos que os qualitativos e podem ser utilizados como testes confirmatórios. Podem classificar de forma confiável homens hemizigotos e mulheres homozigotas, mas não conseguem diagnosticar corretamente as mulheres heterozigotas com atividade de G6PD intermediária (LEY et al., 2015).

O método de ensaio *Glucose-6-phosphate dehydrogenase assay kit (G-6-PDH)* (Trinity Biotech, Bray, Irlanda) é utilizado como o padrão ouro para a detecção da deficiência de G6PD. O método baseia-se nos métodos espectrofotométricos de Kornberg (1955) e Lohr et al. (1974) e envolve a redução de NADP para NADPH, pela glicose-6-fosfato desidrogenase na presença de glicose-6-fosfato para a determinação quantitativa, ultravioleta e cinética de G6PD em amostras de sangue (TRINITY BIOTECH, 2012).

O teste Neonatal *G6PD assay kit* (Perkin Elmer, Turku, Finlândia) adota metodologia quantitativa (Beutler, 1984). O ensaio envolve a oxidação do substrato glicose-6-fosfato em 6-fosfogluconato pela G6PD presente na amostra de sangue, e a concomitante redução de NADP a NADPH. O NADPH gerado emite fluorescência que é medida por fluorescência resolvida no tempo (PERKIN ELMER, 2014).

Algumas etapas do processo analítico de uma metodologia quantitativa como a coleta insatisfatória do sangue em papel filtro, o transporte não refrigerado das amostras e o tempo entre a coleta e a realização do ensaio podem alterar os valores de atividade enzimática. Desta forma, a depender das condições pré-analíticas, os testes quantitativos nem sempre podem ser utilizados como exames confirmatórios, sendo classificados como testes de triagem (FERREIRA, 2014).

A maioria dos testes fornece apenas a atividade global da G6PD em uma amostra de sangue com células lisadas. Entretanto, os testes de coloração citoquímica sobre células intactas ou testes de atividade G6PD intracelulares determinam a proporção de eritrócitos deficientes (KHAN et al., 2015).

A citometria de fluxo é uma técnica citoquímica que permite a observação e estratificação das hemácias através da medida de atividade intracelular de glicose-6-fosfato desidrogenase. No caso das mulheres heterozigóticas, tanto as populações normais como as deficientes podem ser observadas por ensaios citofluorométricos (KHAN et al., 2015). Num ensaio citoquímico, grânulos roxo-escuro estão presentes em eritrócitos que possuem atividade de G6PD, enquanto que a população deficiente permanece intacta. O número de positivos (células “marcadas” em roxo-escuro) e negativos (células com pouca ou nenhuma coloração) são contados numa população mínima de 1000 hemácias. A correta interpretação do teste citofluorométrico em termos de proporções de eritrócitos normais e deficientes é dependente de amostras funcionais e íntegras (NANTAKOMOL et al., 2013; KHAN et al., 2015).

Técnicas moleculares também são utilizadas na caracterização da deficiência de G6PD. A reação em cadeia de polimerase é uma técnica molecular utilizada para identificar o genótipo do indivíduo. O DNA é extraído de amostras de sangue total e utilizado como molde para pesquisar as variantes genéticas. Regiões específicas do DNA são amplificadas e analisadas em eletroforese em gel de agarose para identificação de substituições de nucleotídeos que ocasionam a deficiência enzimática (VIZZI et al., 2016).

## 2- REFERÊNCIAS

- ACOSTA, I. D. L. et al. Deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa eritrocitaria en Rosario. **Acta Bioquím. Clín. Latinoam.** v. 46, n. 3, p. 359-63, 2012
- ALAARG, A et al. Red Blood Cell Vesiculation in Hereditary Hemolytic Anemia. **Frontiers in Physiology.** v. 4, p. 365, 2013
- BADEJOKO, B. O. et al. Early Neonatal Bilirubin, Hematocrit, and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Status. **Pediatrics.** v. 134, n.4, p.1082-8, 2014
- BARRAVIERA, B. et al. Malária no município de Humaitá, Estado do Amazonas. XXI. Prevalência de deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) em amostra de população e em doentes com malária causada pelo Plasmodium falciparum. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** v. 29, p.374-380, 1987
- BAUTISTA, J. M. Epigenetic therapy reprograms hereditary disease. **Blood.** v. 124, n. 1, p.7-8, 2014
- BWAYO, D. et al. Prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and its association with Plasmodium falciparum infection among children in Iganga distric in Uganda. **BMC Research Notes.** v. 7, p. 372, 2014
- CHAGAS, U. O. et al. Ocorrência da deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase na região sudeste de Rondônia, Brasil. **UNINGÁ Review.** v. 8, n. 2, p. 13-20, 2011
- DA COSTA, J. et al. Hereditary spherocytosis, elliptocytosis, and other red cell membrane disorders. **Blood Rev.** v. 27, p. 167–178, 2013
- DE NIZ, M. et al. Tools for mass screening of G6PD deficiency: validation of the WST8/1-methoxy-PMS enzymatic assay in Uganda. **Malaria J.** v. 12, p. 210, 2013
- DOMINGO, G. J. et al. G6PD testing in support of treatment and elimination of malaria: recommendations for evaluation of G6PD tests. **Malaria J.** v. 12, p. 391, 2013
- FERREIRA, M. F. C. Triagem neonatal da deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase e prevalência das mutações G202A (G6PD A-) e C563 T (G6PD Mediterrâneo) em Mato grosso/Brasil. 2014. 116 pg. **Tese** (doutorado-Faculdade de Medicina a Universidade de São Paulo. São Paulo, 2014

FOCHESATTO, F. L.; BARROS, E. Medicina Interna na Prática Clínica. Porto Alegre: **Artmed**. p. 364, 2013.

FREITAS, P. F. V. B.; SEGRE, C. A. M. Deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase. **Grupo Editorial Moreira Júnior**, p. 376-81, 2013

IGLESSIAS, M. A. et al. Erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in male newborn babies and its relationship with neonatal jaundice. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**. v. 32, n. 6, p. 434-438, 2010

ZAMORANO-JIMENEZ, C. A. et al. Identificación Molecular de la Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa detectada en el tamiz neonatal. **Gac. Med. Mex**. v.151, p.34-41, 2015

KAHN, M. et al. Maintaining specimen integrity for G6PD screening by cytofluorometric assays. **J. Histochem. Cytochem**. v. 63, p. 454-458, 2015

KALNOKY, M. et al. Development of a new software tool and analysis method to improve determination of G6PD status. **Malaria J**. v. 13, n.1, p 48, 2014

KATSURAGAWA, T. H. et al. Avaliação da incidência da deficiência de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G6PD) e perfil hematológico em indivíduos de uma região de Rondônia. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**. v. 26, n. 4, p. 268-273, 2004

KORALKOVA, P.; VAN SOLINGE, W. W.; VAN WIJK, R. Rare hereditary red blood cell enzymopathies associated with hemolytic anemia – pathophysiology, clinical aspects, and laboratory diagnosis. **Int. J. Lab. Hematol**. v. 36, p. 388–397, 2014

LARUE, N. et al. Comparison of Quantitative and Qualitative Tests for Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. **Am. J. Trop. Med. Hyg**. v. 91, n. 4, p. 854–861, 2014

LEY, B. et al. The challenges of introducing routine G6PD testing into radical cure: a workshop report. **Malaria J**. v. 14, p.377, 2015

LUZZATTO, L.; SENECA, E. G6PD deficiency: a classic example of pharmacogenetics with on-going clinical implications. **Bri. J. Haematol**. v. 164, p. 469–480, 2014

- MAIA, U. M. et al. . Prevalência da deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase em doadores de sangue de Mossoró, Rio Grande do Norte. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** São Paulo. v. 32, n. 5, p: 422-423, 2010
- MCDONAGH, E. M. et al. PharmGKB summary: methylene blue pathway. **Pharmacogenet Genom.** v. 23, n. 9, p. 498–508, 2013
- MONTEIRO, M. W. et al. Clinical complications of G6PD deficiency in Latin American and Caribbean populations: systematic review and implications for malaria elimination programmes. **Malaria J.** v. 13, p. 70, 2014
- NANTAKOMOL, D. et al. Evaluation of the phenotypic test and genetic analysis in the detection of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. **Malaria J.** v. 12, p. 289. 2013
- NICOLIELO, D. B.; FERREIRA, R. I. P.; LEITE, A. A. Atividade da 6-fosfogliconato desidrogenase em deficientes de glicose-6-fosfato desidrogenase. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v. 28, n. 2, p.135-138, 2006
- PEREIRA, B. A. C.; RAMOS, I. R. Direito e medicina: o espectro equimótico de Legrand du Saulle à luz da jurisprudência brasileira. **RJLB.** v. 1, p. 3343-360, 2015
- PERINOTO, A. et al. Prevalência da deficiência de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase em uma população adulta. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações.** v. 11, n. 1, p. 127-134, 2013
- PERKIN ELMER. Neonatal G6PD Kit. 13905225-8 (br). 2014
- RELLING, M. V. et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guidelines for Rasburicase Therapy in the Context of G6PD Deficiency genotype. **Clin. Pharm. & Ther.** v. 96, n. 2, p. 169-74, 2014
- REZAEI, N. et al. Burden of Hemoglobinopathies (Thalassemia, Sickle Cell Disorder, and G6PD deficiency) in Iran. **Arch. Iran. Med.** v. 18, n. 8, p. 502-7, 2015
- SATYAGRAHA, A. W. et al. Assessment of Point-of-Care Diagnostics for G6PD Deficiency in Malaria Endemic Rural Eastern Indonesia. **PLoS Negl Trop Dis.** v. 10, n. 2, p. e0004457, 2016

SCHICK, P. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) Deficiency. **Medscape**. Acesso em 29/07/2016, às 13:20. Disponível em <<http://emedicine.medscape.com/article/200390-overview#showall>>

SCHICK, P.; TALAVERA, F.; CONRAD, M. E. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) Deficiency. **Medscape Medical News**, 2015.

SILVA, C. A. L. Ação da atividade antioxidante da vitamina e em eritrócitos – aplicações em hemoterapia. 2013. 62 pg. **Dissertação** (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Pernambuco, 2013.

STANTON, R. C. Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival. **IUBMB Life**. v. 64, p. 362–369, 2012

SUGATHADASA, R.; DISSANAYAKE, D. The effect of different haemoglobins on the glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency screening test (Brewer's test). **J. Diagn. Pathol**. v. 5, n. 1, p. 30–34, 2011

TEIXEIRA, P. M. S. Hemoglobinopatias: Clínica, diagnóstico e terapêutica. Março de 2014. 82 pg. **Dissertação** (mestrado) – Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Março de 2014

TRINITY BIOTECH. Glucose-6-Phosphate-Dehydrogenase (G-6-PDH). 2012

UWAKWE, A. A. et al. Erythrocyte Methaemoglobin Concentration and Methaemoglobin Reductase Activity in the Presence of Nevirapine and Efavirenzin Wistar Rats. **Sch. J. App. Med. Sci**. v. 3, n. 2E, p. 897-900, 2015

VERDUGO, L. P. et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in children: A Case report. **Rev. Chil. Pediatr**. v. 85, n. 1, p. 74-79, 2014

VIZZI E, B. G. et al. Prevalence and molecular characterization of G6PD deficiency in two *Plasmodium vivax* endemic areas in Venezuela: predominance of the African A-(202A/376G) variant. **Malaria J**. v. 15, p. 19, 2016

VON SEIDLEIN, L. et al. Review of key knowledge gaps in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency detection with regard to the safe clinical deployment of 8-aminoquinoline treatment regimens: a workshop report. **Malaria J**. v. 12, p. 112, 2013

### **3-CAPÍTULO 1**

**ARTIGO CIENTÍFICO A SER SUBMETIDO À REVISTA  
*CLINICAL LABORATORY* (Qualis B2 – Farmácia)**

**INTERFERENTES NA TÉCNICA QUANTITATIVA PARA DIAGNÓSTICO DA  
DEFICIÊNCIA DA GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE EM  
AMOSTRAS DE TRIAGEM NEONATAL**

INTERFERENTES NA TÉCNICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE G6PD

Yvanna L. Di C. Oliveira, Djane Oliveira, Larissa A. Barreto, Amanda Fernandes,  
Dulce M. Schimieguel

Universidade Federal de Sergipe; Hospital Universitário da Universidade Federal de  
Sergipe

Profa. Dra. Dulce Marta Schimieguel Mascarenhas Lima  
Departamento de Farmácia - CCBS - UFS  
Cidade Universitária Prof. José Aloísio de Campos  
Av. Marechal Rondon, s/n Jardim Rosa Elze - CEP 49100-000 - São Cristovão/SE  
Fone: (79) 2105-6319

Declaro que não há conflitos de interesses entre os autores do artigo intitulado  
“Padronização da técnica quantitativa por fluorescência resolvida no tempo para  
diagnóstico da deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase em amostras de triagem  
neonatal” submetido para apreciação na *Clinical Laboratory*.

## RESUMO

**Background:** A deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase é a eritroenzimopatia mais comum em todo o mundo. As manifestações clínicas ocorrem quando os portadores são expostos a fatores como medicamentos, infecções e substâncias oxidativas, e vão desde icterícia neonatal a anemia hemolítica aguda. O diagnóstico desta deficiência enzimática pode ser realizado através de ensaios genotípicos ou métodos moleculares, e fenotípicos, empregando métodos qualitativos, quantitativos e citoquímicos. O presente estudo teve por objetivo analisar os interferentes da técnica quantitativa por fluorescência resolvida no tempo utilizada para o diagnóstico da deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase em amostras de triagem neonatal.

**Métodos:** Foram analisadas 5.705 amostras de sangue de recém-nascidos colhidos em papel filtro entre maio e outubro de 2016 nos postos de saúde do Estado de Sergipe/Brasil. As amostras foram divididas em cinco grupos e analisadas sob diferentes condições de transporte; tempo entre a coleta e a execução do ensaio; e procedimento técnico a fim de comparar a frequência de resultados positivos antes e após a padronização da técnica. Foram analisados os interferentes nas fases pré-analítica e analítica.

**Resultados:** As frequências de resultados positivos nos cinco grupos foram, respectivamente, 13,58%, 13,03%, 6,29%, 9,20% e 1,00% demonstrando uma tendência de queda nos resultados positivos à medida que a técnica foi sendo adaptada e os interferentes amenizados. Os principais interferentes observados na etapa pré-analítica foram qualidade das amostras, tempo entre coleta e realização do exame e temperatura durante o transporte. Na etapa analítica apenas a eluição das amostras apresentou interferência nos resultados. **Conclusão:** A temperatura em que as amostras foram manipuladas, o tempo entre a coleta e a realização do ensaio, as condições de temperatura e umidade durante o transporte e o próprio procedimento do teste se comprovaram como interferentes provocando a emissão de resultados possivelmente falso positivos nos grupos não padronizados. O grupo que utilizou controle rigoroso de temperatura de transporte apresentou baixos resultados positivos, demonstrando que o principal interferente nesta metodologia foi a temperatura. No entanto, se faz necessário observar a viabilidade do emprego deste controle térmico, por meio de transporte refrigerado para grandes rotinas de triagem neonatal.

Palavras-chave: interferentes, teste quantitativo, glicose-6-fosfato desidrogenase

## INTRODUÇÃO

As vias metabólicas envolvidas na função e sobrevivência celular dos eritrócitos compreendem a glicólise anaeróbica não oxidativa, via das hexoses monofosfato e a via do metabolismo da glutatona<sup>1,2</sup>. A glicólise anaeróbia, denominada via de Embden-Meyerhof, é a única fonte de energia para as hemácias.

A via das pentoses fosfato é um desvio da via glicolítica. Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) é a enzima limitante da velocidade desta via<sup>3</sup> cuja função principal é a proteção celular contra danos oxidativos que diminuem a vida média dos eritrócitos. As hemácias dependem exclusivamente dessa enzima para essa função, pois não possuem mitocôndrias. As enzimas G6PD e 6-fosfogluconato desidrogenase reduzem a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP), que será utilizada para a manutenção da glutatona no estado reduzido (GSH)<sup>4</sup>.

A deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase é uma doença recessiva codificada no cromossomo X e expressa em todos os tecidos do corpo. É uma eritroenzimopatia e predispõe o portador a anemia hemolítica e icterícia neonatal, geralmente secundária a estresse oxidativo gerado por determinados alimentos, medicamentos e infecções<sup>5</sup>.

Esta deficiência é a eritroenzimopatia de maior ocorrência nos seres humanos, estando presente em mais de 400 milhões de pessoas em todo o mundo, ocorrendo com maior frequência na África, Ásia, Mediterrâneo e Oriente<sup>6</sup>. A maior ocorrência se dá em regiões sub-saarianas, onde 23 a 39% da população é afetada. A América Latina possui padrão diferenciado devido à miscigenação com a população africana de modo que a frequência varia de 0,39-6,22%<sup>7-9</sup>.

A maioria dos testes para deficiência de G6PD considera o fenótipo bioquímico - medidas qualitativas ou quantitativas de atividade enzimática e ensaios citoquímicos. Os testes rotineiramente utilizados são o da redução de meta-hemoglobina (Brewer et al., 1962); o da mancha fluorescente de Beutler (1979) e, mais recentemente, o método de metossulfato de WST-8/1-metoxi fenazina (PMS) (Tantular e Kawamoto, 2003)<sup>10</sup>.

Os testes quantitativos podem acomodar diferentes limiares de atividades e são capazes de identificar as heterozigotas como indivíduos com intermediária atividade enzimática, como um resultado da combinação de populações de células com G6PD normal e deficiente. Entretanto, não permitem a discriminação de níveis entre o intermediário e o normal com especificidade<sup>11,14</sup>.

Desde a coleta até a realização do ensaio, as amostras podem sofrer alterações como, por exemplo, degradação das células, que interferem no resultado do exame, principalmente se a metodologia se basear na medida da atividade enzimática<sup>15</sup>. Desta forma, a padronização das etapas pré-analíticas, que incluem coleta, transporte, armazenamento, tempo entre a coleta e a análise das amostras, e analíticas, que vão desde o picote do papel-filtro, pipetagem, eluição as amostras até a análise espectrofotométrica, reduzem os interferentes tornando os resultados dos exames mais precisos e confiáveis. O objetivo deste estudo foi identificar os interferentes na técnica quantitativa para diagnóstico da deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase em amostras de triagem neonatal.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

- Coleta e transporte das amostras

Foram analisadas amostras de sangue de recém-nascidos colhidos preferencialmente entre três e sete dias após o nascimento. A coleta foi realizada nos postos de saúde de todo o estado de Sergipe, Brasil, como parte da rotina de triagem neonatal, por meio de punção no calcanhar com armazenamento em papel de filtro. As amostras foram enviadas ao laboratório de triagem neonatal do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe através do Correio em caminhão sem refrigeração, armazenadas em envelopes de papel. Apenas 100 amostras foram transportadas sob refrigeração, em isopor com gelo reciclável.

- Processamento das amostras

Os papéis de filtro com as amostras foram picotados em perfurador automático Wallac DBS Puncher (Perkin Elmer, Turku, Finlândia) com diâmetro de 3.2 mm diretamente numa microplaca branca.

- Dosagem da glicose-6-fosfato desidrogenase

A dosagem da glicose-6-fosfato desidrogenase foi realizada no período de maio a outubro de 2016 utilizando o kit Neonatal G6PD (Perkin Elmer, Turku, Finlândia) que adota metodologia quantitativa com análise por fluorescência resolvida no tempo. O reagente substrato de G6PD foi reconstituído com 11 mL da solução de reconstituição e 100 µL foram adicionados a cada poço que continha um disco de papel de filtro e

incubados à temperatura ambiente por 30 minutos com agitação lenta no agitador Delphia Plateshake (Perkin Elmer, Turku, Finlândia). Ao fim da reação, 200 µL do *Copper Reagent* foram adicionados a cada poço para tornar a reação mais lenta. Os picotes flutuantes foram retirados. A fluorescência foi medida pelo fluorômetro Victor D (Perkin Elmer, Turku, Finlândia) em até 15 minutos após adição do Cooper Reagent em filtro com 355 nm de excitação com 460 nm de emissão (Perkin Elmer, 2015).

Inicialmente, a análise das amostras seguiu o procedimento padronizado pela empresa Perkin Elmer, responsável pela produção do kit utilizado nesta pesquisa. Em busca de modificações que pudessem tornar os resultados obtidos menos variáveis, alterações foram realizadas em algumas etapas do ensaio:

- O tempo entre a coleta das amostras e realização do ensaio não deveria ultrapassar 3 semanas;
- O tempo de reconstituição do substrato reagente aumentaria de 5 para 10 minutos;
- Os picotes deveriam ser afundados nos micropoços aos 15 minutos de reação;
- Os resultados de picotes que permaneceram flutuando mesmo após serem afundados deveriam ser descartados.

Seguindo estas orientações, as amostras analisadas foram classificadas em 5 grupos onde diferentes procedimentos foram adotados:

**Grupo 1 (Grupo Piloto):** Todas as amostras coletadas até o dia da análise, sem levar em consideração há quanto tempo haviam sido coletadas, se o sangue preenchia completamente o diâmetro do picote ou se os picotes flutuaram na placa. O substrato reagente foi reconstituído e sofreu agitação constante por 5 minutos e ao final dos 30 minutos de reação os picotes eram afundados na placa. Caso flutuassem, eram retirados para não interferirem na leitura. Todos os resultados foram considerados.

**Grupo 2:** Amostras coletadas até 4 semanas antes do dia da realização do ensaio. As amostras que não preenchiam completamente o diâmetro do picote não foram analisadas. O substrato reagente foi reconstituído e sofreu agitação constante por 5 minutos e ao final dos 30 minutos de reação os picotes eram afundados na placa. Caso flutuassem, eram retirados para não interferirem na leitura. Todos os resultados foram considerados.

**Grupo 3:** Amostras coletadas até 3 semanas antes do dia de realização do ensaio. As amostras que não preenchiam completamente o diâmetro do picote não

foram analisadas. O substrato reagente foi reconstituído e sofreu agitação constante por 5 minutos e ao final dos 30 minutos de reação os picotes eram afundados na placa. Caso flutuassem, eram retirados para não interferirem na leitura. Só foram considerados os resultados dos picotes que não flutuaram na placa.

**Grupo 4:** Amostras coletadas até 3 semanas antes do dia de realização do ensaio. As amostras que não preenchiam completamente o diâmetro do picote não foram analisadas. O substrato reagente foi reconstituído e sofreu agitação constante por 10 minutos e os picotes foram afundados na placa na metade do tempo da reação (15 minutos). Caso flutuassem, eram retirados para não interferirem na leitura. Só foram considerados os resultados dos picotes que não permaneceram flutuando na placa.

**Grupo 5:** Amostras coletadas até 3 semanas antes do dia de realização do ensaio, transportadas sob refrigeração. As amostras que não preenchiam o diâmetro do picote não foram analisadas. O substrato reagente foi reconstituído e sofreu agitação constante por 10 minutos e os picotes foram afundados na placa na metade da reação, ou seja, em 15 minutos. Caso flutuassem, eram retirados para não interferirem na leitura. Só foram considerados os resultados dos picotes que não permaneceram flutuando na placa.

## **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados obtidos foram analisados por estatística descritiva, empregando variáveis qualitativas demonstradas através de frequência e porcentagem.

## **RESULTADOS**

No período de maio a outubro de 2016 um total de 5.705 amostras foi analisado, sendo 1.656 pertencentes ao Grupo 1, 560 ao Grupo 2, 217 ao Grupo 3, 3.172 ao Grupo 4 e 100 ao Grupo 5. O procedimento foi padronizado seguindo as especificações do fabricante e revisão da literatura. As amostras foram subdivididas nos cinco grupos de acordo com as modificações que sofreram no decorrer do estudo, com intuito de avaliar os interferentes nas etapas pré-analítica e analítica.

- **CRITÉRIOS ADOTADOS NA PADRONIZAÇÃO**

Nos Grupos 1, 2, 3 e 5 foram analisados os interferentes da etapa pré-analítica: tempo entre a coleta das amostras e a realização dos exames; qualidade das amostras; e

refrigeração durante transporte e armazenamento das amostras. No Grupo 4 foi analisado o interferente eluição das amostras, referente à etapa analítica

- **PONTO DE CORTE**

Após a análise espectrofotométrica os resultados dos testes foram emitidos como POSITIVOS ou NEGATIVOS baseados em valor de corte inicial indicado pelo fabricante que foi de 2,6 U/g Hb. Pacientes com valores iguais ou abaixo de 2,6 U/g Hb foram considerados deficientes.

- **GRUPO 1 (Grupo Piloto)**

Neste grupo foram englobadas 1.656 amostras, dentre as quais 225 (13,58%) apresentaram resultado positivo. Não houve restrições para a execução do ensaio neste grupo de modo que todos os resultados foram considerados válidos.

- **GRUPO 2**

No Grupo 2 foram incluídas 560 amostras. Dentre elas, 73 (13,03%) apresentaram resultado positivo. Ao se analisar os resultados obtidos das amostras do Grupo 1, os primeiros interferentes observados foram relacionados ao tempo entre coleta e realização do exame e à má qualidade das amostras.

- **GRUPO 3**

Foram analisadas 217 amostras, dentre as quais 19 (8,75%) apresentaram resultado positivo. Neste grupo, 74 picotes flutuaram dentre os quais 10 possuíam amostras positivas. Ao final, os resultados de 143 amostras foram considerados, com um total de 9 (6,30%) resultados positivos.

- **GRUPO 4**

No Grupo 4, 3.172 amostras foram analisadas e 367 delas (11,57%) obtiveram resultado positivo, entretanto apenas 245 (9,21%) foram considerados válidos, visto que somente 2.661 picotes não flutuaram e tiveram seus resultados aceitos. Na Tabela 1 estão dispostas as quantidades de picotes flutuantes dos Grupos 3 e 4 e os resultados positivos obtidos entre elas.

- **GRUPO 5**

O Grupo 5 albergou 100 amostras das quais apenas 1 se mostrou positiva, contabilizando 1,00%. Para confirmar a interferência do transporte na estabilidade das amostras este grupo foi formado por amostras que preenchiam os requisitos do Grupo 4, com o diferencial que foram transportadas sob refrigeração e assim mantidas até a realização do ensaio. Nenhum dos picotes flutuou, logo todos os resultados foram considerados válidos.

## **DISCUSSÃO**

A deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase é a eritroenzimopatia de maior ocorrência entre os seres humanos e devido à heterogeneidade das manifestações clínicas o diagnóstico clínico é inconclusivo. Desta forma, o diagnóstico laboratorial é de extrema importância na detecção da doença. Os testes fenotípicos quantitativos mensuram a atividade enzimática na amostra e por isso a integridade da enzima é essencial para que os resultados obtidos sejam fidedignos<sup>6, 15, 16</sup>.

As amostras pertencentes ao Grupo 1 (Grupo Piloto) não passaram por triagem a fim de se avaliar os resultados sem a adoção de quaisquer critérios. Todos os resultados foram considerados válidos. Entretanto, é sabido que fatores externos influenciam na atividade enzimática, frequentemente reduzindo-a, o que acarreta em resultados falso-positivos<sup>17</sup>.

Em seu estudo, Jalil e colaboradores<sup>17</sup> demonstraram que a diferença média de atividade enzimática entre amostras iguais coletadas em tubo com EDTA e em papel filtro no primeiro dia após a coleta foi de 2,0 U/g Hb e no segundo dia foi de 3,8 U/g Hb. Já a diferença entre as médias de atividade enzimática no primeiro e no sétimo dia de amostras coletadas em tubo com EDTA foi 1,3 U/g Hb enquanto que a diferença entre as atividades de G6PD de amostras em papel filtro foi de 4,6 U/g Hb neste mesmo período, demonstrando que amostras coletadas em papel filtro possuem baixa estabilidade e a atividade enzimática decai consideravelmente na primeira semana após a coleta.

No Grupo 1, devido à não adoção de critérios adicionais, é possível que a atividade enzimática das alíquotas antigas tenha sofrido um decaimento devido, entre outros fatores, ao tempo entre a coleta e a execução do teste e à má qualidade das amostras, culminando em uma grande quantidade de resultados positivos.

Após a coleta, as amostras devem secar a temperatura de 25°C durante 3 horas antes de serem embaladas. É indicado que elas não entrem em contato umas com as outras durante a secagem e o transporte, devendo estar separadas por plástico ou papel e embaladas em sacos plásticos vedados com dessecante, pois a umidade induz crescimento bacteriano, fúngico e altera o tempo de eluição<sup>18, 19</sup>. Desta forma, foi estabelecido que as amostras dos Grupos 2, 3, 4 e 5 só seriam analisadas se houvessem sido coletadas de maneira satisfatória, ou seja, não deveriam estar diluídas, contaminadas com fungos e ambos os lados do papel filtro deveriam conter sangue.

Quando a coleta é realizada de forma inadequada deve ser requisitada uma nova amostra. Entretanto, uma grande quantidade de amostras é coletada de forma insatisfatória e o pedido de uma nova coleta é frequentemente ignorado pelas unidades de saúde requisitadas, de modo que o laboratório utiliza todas as amostras recebidas em suas análises de rotina. É importante frisar que mesmo assim, a qualidade das amostras não se configura como interferente nos outros testes realizados na triagem neonatal.

Para esta pesquisa, ainda que o sangue não preenchesse totalmente o campo demarcado no papel filtro, foram utilizados picotes com sangue em ambos os lados. Entretanto, os círculos possuem um volume de sangue 1-2% menor nas bordas do que no centro<sup>18</sup>. Devido a essa variação, não é seguro afirmar que as alíquotas contidas em todos os picotes possuíam o mesmo volume, de modo que os níveis de enzima em cada amostra variaram de acordo com a quantidade de sangue presente. Este pode ser um dos fatores que ocasionou um percentual de positivos no Grupo 2 semelhante ao Grupo 1.

A adoção destes critérios não modificou significativamente o percentual de amostras positivas, confirmando que o tempo estabelecido ainda não foi adequado. Logo, o prazo entre coleta e procedimento foi diminuído para três semanas.

De acordo com o fabricante, manchas de sangue que sofreram desnaturação por envelhecimento, calor ou congelamento e descongelamento alternados tendem a flutuar e não eluir completamente podendo fornecer resultados 1 a 4 U/g Hb menores do que os de discos que permaneceram no fundo dos micropoços, configurando falsos positivos. Estes picotes podem ser empurrados manualmente para o fundo com auxílio de haste não absorvente antes da adição do reagente de cobre para que umedeçam e eluam<sup>20</sup>. Assim, os picotes que permaneceram flutuando nos micropoços nos Grupos 3, 4 e 5 tiveram seus resultados desconsiderados. Na Tabela 2 podem ser observados os resultados de todos os grupos.

As amostras pertencentes aos Grupos 4 e 5 foram afundadas no micropoço na metade do tempo de reação e durante o tempo restante permaneciam completamente em contato com o substrato. As amostras do Grupo 3, que foram afundadas ao final de reação, não umedeciam em ambos os lados por isso não eluíam satisfatoriamente. O grande percentual de positivos entre as amostras flutuantes nos Grupos 3 comprova a influência da qualidade da amostra na eluição do sangue do picote.

O Grupo 3 obteve um alto índice de amostras que flutuaram, enquanto que no Grupo 4 houve mais positivos entre as flutuantes. Isto indica que o Grupo 4 apresentou mais resultados positivos devido a má qualidade das amostras e desnaturação da enzima, visto que os picotes estiveram completamente em contato com o reagente. A diferença percentual entre os Grupos 3 e 4 pode ter ocorrido devido à grande quantidade de amostras que foram descartadas no Grupo 3 em decorrência da flutuação.

Nos Grupos 3, 4 e 5 as amostras foram analisadas até 3 semanas após a coleta. Após esse prazo, Flores e colaboradores<sup>19</sup> demonstraram que amostras armazenadas sob alta temperatura e umidade sofreram redução da atividade enzimática abaixo do ponto de corte levando à conclusão que a umidade deve ser controlada e a temperatura de armazenamento não deve ultrapassar 25°C, caso sejam analisadas após 5 dias de coleta.

As amostras utilizadas na pesquisa foram armazenadas sob refrigeração, mas durante o cadastro dos pacientes e realização dos testes de rotina da triagem neonatal as amostras permaneceram numa faixa de temperatura entre 24 e 27°C. Outro agravante é a demora no envio das amostras ao laboratório, visto que nem todas as unidades de saúde possuem ar condicionado e refrigerador para armazenamento das mesmas e a temperatura ambiente em Sergipe frequentemente ultrapassa 30°C.

Foi realizado um levantamento das cidades em que 325 amostras positivas do Grupo 4 foram coletadas de modo que se pudesse avaliar a influência da distância e condições de transporte nos resultados dos testes. A capital Aracaju foi a cidade com maior número de positivos, seguida por Nossa Senhora do Socorro e Estância, distantes 18 km e 66 km, respectivamente, da capital<sup>21</sup>. Na Figura 1 está representado o mapa com a distribuição dos locais de coleta de acordo com a quantidade de amostras. A interferência da distância entre o local de coleta e o laboratório não se comprovou tão significativa quanto as condições de transporte visto que o maior percentual de amostras positivas foi de Aracaju, mesma cidade de realização do ensaio.

Esta teoria foi confirmada pelo baixo índice de resultados positivos no Grupo 5, no qual as amostras foram transportadas sob refrigeração, demonstrou que a alta

temperatura durante o traslado diminui a atividade enzimática nas amostras. Este fato é comprovado pela pesquisa realizada por Flores e colaboradores<sup>19</sup> onde foi demonstrado que a atividade enzimática em amostras armazenadas a uma temperatura de -20°C com ou sem dessecante foi maior que 95%. Amostras armazenadas a 4°C com dessecante mantiveram atividade de G6PD acima de 95% e perderam 15% da atividade quando armazenadas sem dessecante. Estes resultados estão em concordância com o trabalho realizado por Kuwahata e colaboradores<sup>22</sup> que demonstrou um declínio de 5% da atividade de G6PD após 14 dias quando armazenadas a 4°C, 15% quando acondicionadas a 25°C e 40% a 37°C. De Niz e colaboradores<sup>23</sup> afirmaram em seu estudo que as amostras devem ser analisadas após no máximo 72 horas da coleta para que haja garantia que não houve degradação significativa. Ainda assim, Flores e colaboradores<sup>19</sup> afirmam que amostras armazenadas até 37°C podem fornecer resultados confiáveis se analisadas em até 5 dias, pois perdem apenas 5% da atividade enzimática.

As frequências semelhantes da deficiência em diferentes estados brasileiros embasam a estimativa descrita por Freitas e colaboradores<sup>9</sup> e apoiam a frequência encontrada no Grupo 5. Estudos realizados no Brasil estimam a frequência da deficiência entre 3-4%, porém todos estes trabalhos utilizaram o teste da redução da metahemoglobina, um teste qualitativo, que não quantifica a atividade enzimática<sup>24-27</sup>. Ainda que estes estudos tenham demonstrado uma baixa ocorrência da deficiência de G6PD, na revisão sistemática realizada por Monteiro e colaboradores<sup>28</sup> a faixa de prevalência no Brasil demonstrada nos artigos analisados foi de 1,1 a 13,3%, variação justificada pela grande quantidade de estudos realizados entre homens, que demonstraram uma frequência elevada em diversos estudos.

De acordo com a literatura o grupo padronizado apresentou resultados semelhantes à estimativa da frequência nacional da deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase, demonstrando que esta técnica pode ser utilizada para o diagnóstico desta eritroenzimopatia, desde que adote os critérios estabelecidos neste estudo.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos à colaboração do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Sergipe pelo suporte físico e material para a realização dos exames e à Farmac (Sergipe, Brasil), em parceria com a Perkin Elmer (Turku, Finlândia) pela doação dos kits utilizados na pesquisa e pela assessoria científica.

## REFERÊNCIAS

- (1) Da Costa J, Galimand J, Fenneteau O, Mohandas N. Hereditary spherocytosis, elliptocytosis, and other red cell membrane disorders. *Blood Rev.* 2013; 27:167–178
- (2) Koralkova P, van Solinge WW, van Wijk R. Rare hereditary red blood cell enzymopathies associated with hemolytic anemia – pathophysiology, clinical aspects, and laboratory diagnosis. *Int J Lab Hematol* 2014; 36: 388–397
- (3) Stanton, R.C. Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival. *IUBMB Life.* 2012. 64: 362–369.
- (4) Schick P, Talavera F, Conrad ME. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) Deficiency. *Medscape Medical News*, 2015. Disponível em <<http://emedicine.medscape.com/article/200390-overview>>. Acesso em 20 nov 2016
- (5) Shah SS, Macharia A, Makale J et al. Genetic determinants of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in Kenya. *BMC Med Genet.* 2014; 15:93.
- (6) Renzaho AMN, Husser E, Polonsky M. Should Blood Donors Be Routinely Screened for Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency? A Systematic Review of Clinical Studies Focusing on Patients Transfused With Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase–Deficient Red Cells. *Transfus Med Rev* 2014. 28(1):7-17
- (7) Zamorano-Jimenez CA, Baptista-González HA, Bouchán-Valencia P et al. Identificación Molecular de la Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa detectada en el tamiz neonatal. *Gac Med Mex* 2015. 151:34-41. Disponível em <[http://www.anmm.org.mx/GMM/2015/n1/GMM\\_151\\_2015\\_1\\_034-041.pdf](http://www.anmm.org.mx/GMM/2015/n1/GMM_151_2015_1_034-041.pdf)>. Acesso em 20 nov 2016.
- (8) Rezaei N, Naderimaghani S, Ghasemian A et al. Burden of Hemoglobinopathies (Thalassemia, Sickle Cell Disorder, and G6PD deficiency) in Iran. *Arch Iran Med* 2015; 18(8): 502-7
- (9) Freitas PFVB, Segre CAM. Deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase. Grupo Editorial Moreira Júnior, 2013. 376-381. Disponível em <[http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?id\\_materia=2482&fase=imprime](http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?id_materia=2482&fase=imprime)>. Acesso em 20 nov 2016

- (10) Howes ER, Battle KE, Satyagraha AW, Baird JK, Hay SI. G6PD Deficiency: Global Distribution, Genetic Variants and Primaquine Therapy. *Adv. Parasitol.* 2013. 81: 134-201.
- (11) Ley B, Luter N, Espino FE et al. The challenges of introducing routine G6PD testing into radical cure: a workshop report. *Malaria J.* 2015; 14:377.
- (12) Kahn M, Ward WH, LaRue N, Kalkony M, Pal S, Domingo GJ. Maintaining specimen integrity for G6PD screening by cytofluorometric assays. *J Histochem Cytochem* 2015; 63:454-458.
- (13) Leslie T, Moiz B, Mohammad M et al. Prevalence and molecular basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Afghan populations: implications for treatment policy in the region. *Malaria J.* 2013. 12:230.
- (14) LaRue N, Kahn M, Murray M et al. Comparison of Quantitative and Qualitative Tests for Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *Am J Trop Med Hyg* 2014; 91(4): 854–861
- (15) Kanagasabapathy M, Ramesh Babu GNK, Lingac P, Gnanamuthud RM. Numerical Modeling on Non-enzymatic, Potentiometric Glucose Sensor. *Port Electrochim Acta* 2012; 30(4): 295-306. Disponível em <[http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0872-19042012000400006](http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0872-19042012000400006)>. Acesso em 20 nov 2016
- (16) Verdugo L P, Calvanese T M, Rodríguez V D, Cárcamo C C. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in children: A Case report. *Rev Chil Pediatr* 2014; 85(1):74-79
- (17) Jalil N, Azma NZ, Mohamed E et al. Evaluation of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase stability in stored blood samples. *EXCLI J* 2016;19(5):155-62
- (18) Mei JV, Alexander JR, Adam BW, Hannon WH. Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens. *J Nutr* 2001; 131:1631S–6S
- (19) Flores S, Hall EM, Jesus V. Stability of Glucose-6 -Phosphate Dehydrogenase Proficiency Testing Dried Blood Spot Materials. CDC, 2013. Disponível em <

<https://www.aphl.org/conferences/Documents/16-NBS-Poster-Abstracts.pdf>>. Acesso em 20 nov 2016

(20) Perkin Elmer. Neonatal G6PD Kit. 2014

(21) DistanciaCidades.com. Distância entre cidades. Disponível em <<http://br.distanciacidades.com/calcular?from=Ns.+do+Socorro%2C+Sergipe%2C+Brasil&to=Aracaju+-+SE%2C+Brasil>>. Acesso em 06 dez 2016.

(22) Kuwahata M, Wijeshing R, Ho MF et al. Population screening for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiencies in Isabel Province, Solomon Islands, using a modified enzyme assay on filter paper dried bloodspots. *Malaria J.* 2010; 9:223.

(23) De Niz M, Eziefula AC, Othieno L et al. Tools for mass screening of G6PD deficiency: validation of the WST8/1-methoxy-PMS enzymatic assay in Uganda. *Malar J* 2013; 12:210.

(24) Nicolielo DB, Ferreira RIP, Leite AA. Atividade da 6-fosfogliconato desidrogenase em deficientes de glicose-6-fosfato desidrogenase. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2006; 28 (2):135-138. Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-84842006000200014](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842006000200014) >. Acesso em 20 nov 2016

(25) Iglecias MA, Santos RMV, Amorim MST et al. Erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in male newborn babies and its relationship with neonatal jaundice. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2010; 32 (6): 434-438. Disponível em [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-84842010000600005](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842010000600005)>. Acesso em 20 nov 2016

(26) Perinoto A, Costa CROB, Duarte GS, Paula RAO, Paula FBA, Duarte SMS. Prevalência da deficiência de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase em uma população adulta. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações*, 2013;11(1):127-134. Disponível em <[http://www.periodicos.unincor.br/index.php/revistaunincor/article/view/924/pdf\\_15](http://www.periodicos.unincor.br/index.php/revistaunincor/article/view/924/pdf_15)>. Acesso em 20 nov 2016

(27) Maia UM, Batista DCA, Pereira WO, Fernandes TAAM. Prevalência da deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase em doadores de sangue de Mossoró, Rio Grande do Norte. Rev Bras Hematol Hemoter 2010; 32 (5): 422-423. Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-84842010000500017](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842010000500017)>.

Acesso em 20 nov 2016

(28)Monteiro MW, Franca GP, Melo GC et al. Clinical complications of G6PD deficiency in Latin American and Caribbean populations: systematic review and implications for malaria elimination programmes. Malar J 2014; 13:70

Tabela 1. Resultados da triagem para deficiência de G6PD dos Grupos 3 e 4

	<b>Todas as amostras</b>					<b>Amostras válidas</b>			
	<b>Total</b>	<b>Normal</b>		<b>Deficiente</b>		<b>Normal</b>		<b>Deficiente</b>	
		<b>N</b>	<b>%</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Grupo 3</b>	217	198	91,25	19	<b>8,75</b>	134	93,70	9	<b>6,30</b>
<b>Grupo 4</b>	3.172	2.805	88,43	367	<b>11,57</b>	2.416	90,79	245	<b>9,21</b>

Tabela 2. Resultados da triagem para deficiência de G6PD realizada em 5.705 amostras divididas em 5 grupos

Grupo	Total	Positivos entres				Válidas	Deficiente	
		Excluídos		excluídos			N	%
		N	%	N	%		N	%
<b>1</b>	1.656	-	-	-	-	1.656	225	13,58
<b>2</b>	560	-	-	-	-	560	73	13,03
<b>3</b>	217	74	<b>34,10</b>	10	<b>13,51</b>	143	9	<b>6,30</b>
<b>4</b>	3.172	511	<b>16,11</b>	122	<b>23,87</b>	2.661	245	<b>9,21</b>
<b>5</b>	100	0	0	0	<b>0</b>	100	1	<b>1,00</b>

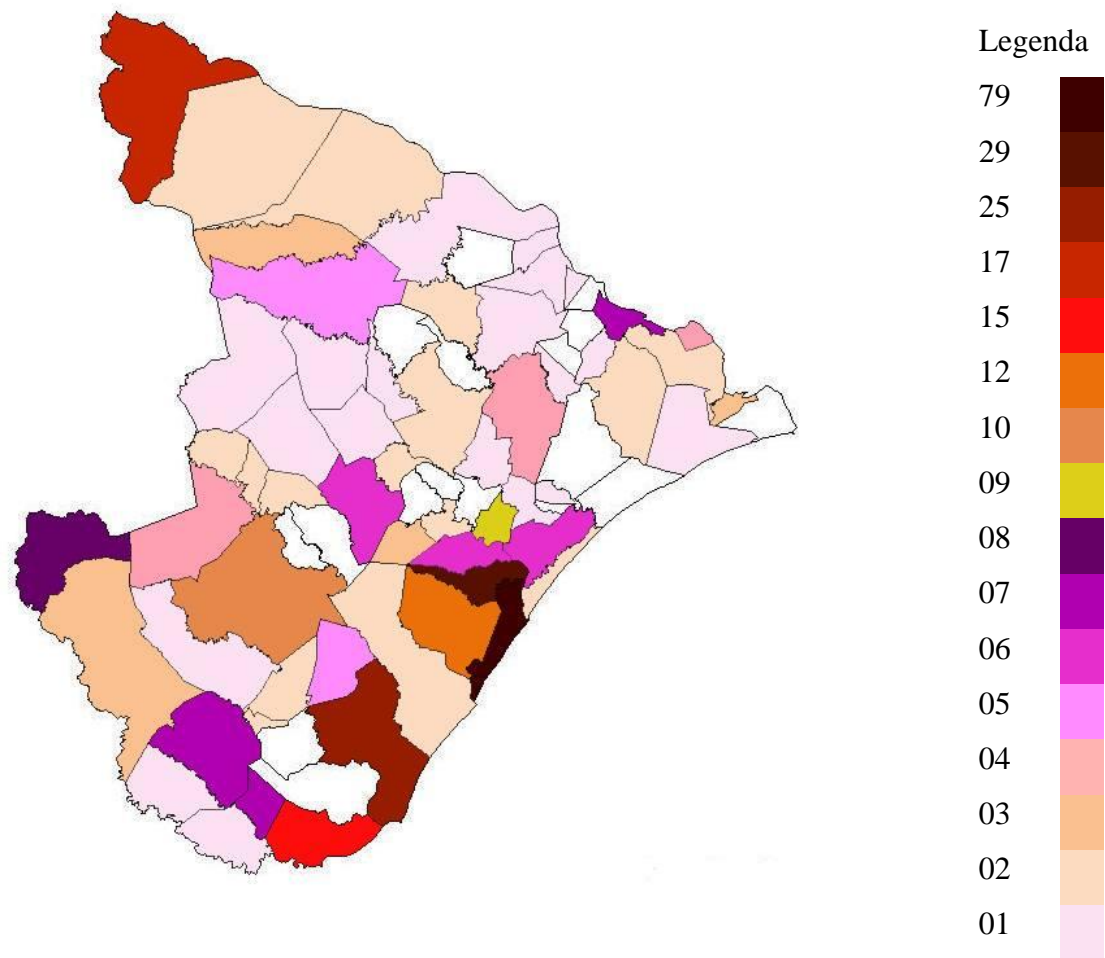


Figura 1. Distribuição geográfica dos locais de coleta de acordo com a quantidade de amostras triadas para deficiência de G6PD

#### **4- ANEXO**

Instructions for the preparation of manuscripts. Aims and scope of Clinical Laboratory (ABBREVIATION: Clin Lab)

Clinical Laboratory is an international fully peer-reviewed journal covering all aspects of laboratory medicine and transfusion medicine. In addition to transfusion medicine topics Clinical Laboratory represents submissions concerning tissue transplantation and hematopoietic, cellular and gene therapies. The journal publishes original articles, review articles, posters, short reports, case studies and letters to the editor dealing with

- 1) the scientific background, implementation and diagnostic significance of laboratory methods employed in hospitals, blood banks and physicians' offices and with
- 2) scientific, administrative and clinical aspects of transfusion medicine and
- 3) In addition to transfusion medicine topics Clinical Laboratory represents submissions concerning tissue transplantation and hematopoietic, cellular and gene therapies.

Clinical Laboratory provides an international forum for the publication of original articles describing basic, translational and clinical investigation in laboratory medicine and transfusion medicine. In addition to transfusion medicine topics Clinical Laboratory represents submissions concerning tissue transplantation and hematopoietic, cellular and gene therapies.

If your manuscript is dealing with one of the above mentioned topics you are always welcome to submit your manuscript for publication in our journal Clinical Laboratory. Please send the complete manuscript with tables and figures as an e-mail attachment to the e-mail address: [info@clin-lab-publications.com](mailto:info@clin-lab-publications.com)

#### **TYPES OF ARTICLES CONSIDERED FOR PUBLICATION**

##### **Original articles**

The majority of articles published in the Journal report original research into laboratory medicine, transfusion medicine and cell therapy. All articles are subject to review and authors are urged to be brief; long papers with many tables and figures may require shortening if they are to be accepted for publication. The text is limited to 7,000 words (not counting summary, tables, figure legends, and references), with a summary, a maximum of 7 figures and up to 40 references. There is no limit on the number of tables.

## **PREPARATION OF MANUSCRIPTS**

Only manuscripts in English are accepted. Manuscripts, including figures, tables and figure legends, should be submitted as an e-mail attachment or, alternatively, in triplicate, one original and two copies. The text should be typed 1½-spaced, on one side of the paper, with a margin of 3 cm. The pages should be numbered consecutively as well as the lines beginning with the title page. Use a separate sheet of paper for each of the following sections: title page, summary and key words, text, acknowledgements, references, individual tables and figure legends, in that order. Preferably use the type Times New Roman or Courier, and Symbol, as these can be converted into pdf files without problems.

### **Title Page**

The title page should contain: 1) the title of the article, which should be concise but informative and should not include abbreviations or brand names; 2) a short “running title” of no more than 50 characters (count letters and spaces) typed at the bottom of the title page and identified as such; 3) first name (additional first names must be given as initials with dots) and last name (double last names must be hyphenated) of each author but not his/her titles, degrees, positions, or academic ranks; 4) the name(s) of department(s) and institution(s) to which the work should be attributed; 5) disclaimers, if any; 6) name, address, telephone and FAX numbers, and e-mail address of the author responsible for correspondence about the manuscript; 7) either the name and address of the author responsible for reprint requests or a statement that reprints will not be available from the author; and 8) the source(s) of support in the form of grants, equipment, or drugs; 9) Declaration of Interest. Please note on the title page of your word document any Declaration of Interest of any of the authors. If there are no conflicts, please state that fact.

### **Summary and key words**

The second page must carry a summary of not more than 350 words. The summary should consist of four sections labeled BACKGROUND, METHODS, RESULTS, and CONCLUSIONS. These sections should briefly describe, respectively, the objectives of the study or investigation, the basic procedures (study subjects and analytic methods), the main findings (giving specific data and the statistical significance, if possible), and the principal conclusions. Emphasize new and important aspects of the study. Do not

use first-person pronouns in the summary. Key words should follow the summary on the same page.

## **Text**

The text of observational and experimental articles is usually divided into sections using the headings INTRODUCTION, MATERIALS AND METHODS, RESULTS, and DISCUSSION. Long articles may need subheadings within some sections to clarify content, especially in the Materials and Methods, Results, and Discussion sections. Other types of articles, such as reviews and editorials, may require other formats; authors should consult the Editor for guidance. Use as much active voice as possible in writing.

*Introduction.* Clearly state the purpose of the article. Summarize the rationale used for the study or observations. Give only pertinent references: do not review the subject extensively. Do not include data or conclusions from work being reported.

*Materials and Methods.* Describe your selection of observational or experimental subjects (patients or animals, including controls, and the number in each study group) clearly. Identify the methods, apparatus, equipment, reagents, and procedures used in sufficient detail to allow other colleagues to reproduce the results. Publication of an original research article implies that the authors are prepared to distribute freely to academic researchers for their own use any materials (e.g., cell lines, DNA clones, antibodies) used in the experiments. Provide model name or number, and the manufacturer's name (in parentheses) the first time a reagent, an apparatus, or any equipment is mentioned. Give references to established methods; provide references and brief descriptions of methods that are not well-known; describe new or substantially modified methods, give reasons for using them, and describe their limitations.

*Statistics.* The basis for these guidelines is described in Bailar JC III, Mosteller F. Guidelines for statistical reporting in articles for medical journals: amplifications and explanations. *Ann Intern Med* 1988;108:266-73. Describe statistical methods in detail to enable a knowledgeable reader with access to the original data to verify the reported results. When possible, quantify findings and present them with appropriate indicators of measurement error or uncertainty (such as confidence intervals). Avoid sole reliance on statistical hypothesis testing, such as the use of p values, which fails to convey

important quantitative information. References for study design and statistical methods should be to standard works (with pages stated) when possible, rather than to papers in which designs or methods were originally reported. Specify any general-use computer programs used. Put general descriptions of methods in the Methods section. Define statistical terms, abbreviations, and most symbols.

*Results.* Present your results in logical sequence in the text, tables, and/or illustrations. Do not repeat in the text any data presented in tables and/or illustrations; emphasize or summarize only important observations, and avoid tables displaying data showing insignificant differences among groups.

*Discussion.* Emphasize the new and important aspects of the study and the conclusions that follow from them. Do not repeat in detail the data given in the Results section or in tables or illustrations. Include in the Discussion the implications of the findings and their limitations, and relate the observations to other relevant studies. Link the conclusions with the stated purpose of the study, but avoid unqualified statements and conclusions not completely supported by the data presented. Avoid claiming priority and alluding to work that has not been completed. Recommendations, when appropriate, may be included.

## **JOURNAL STYLE**

### **Tables**

Type each table on a separate sheet. Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals. A short descriptive heading should be given above each table and footnotes and/or explanations below. Please prepare your tables in "Word" by the "Table" function or use xls.-files (Excel). Do not use the Tab key for tables.

### **Illustrations**

Please send figures as an e-mail attachment or, alternatively, submit three complete sets of figures (1 original set with photographs, 13 cm x 18 cm black and white; two sets of copies, and store the figures on disks). If possible, use Word, xls, cdr, tif or jpg files for storage of figures on disks. Illustrations in color will be published only if the author pays for the extra cost involved. For more detailed information on manuscripts see:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *Brit Med J* 1991;302:338-41.

## References

EACH REFERENCE GIVEN MUST HAVE AT A MINIMUM AN ENGLISH ABSTRACT. REFERENCES TO ARTICLES AVAILABLE ONLY IN NON-ENGLISH LANGUAGE WILL NOT BE ACCEPTED.

References must be 1½-spaced and numbered consecutively, with Arabic numerals in brackets, as they are cited. References first cited in a table or figure legend should be numbered so that they will be in sequence with references cited in the text at the point where the table or figure is first mentioned. List all authors when there are six or fewer; when there are seven or more, list the first three, followed by “et al.” The following are sample references:

1. Park BK, Ohnhaus EE. Urinary 6β-hydroxycortisol: a simple, non-invasive index of enzyme induction in man. *Clin Lab* 1983;29:53-8.
2. Shapiro AMJ, Lakey JRT, Ryan EA, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000;343:230-8.
3. Knowles S, Poole G. Haemolytic transfusion reactions. In: Murphy MF, Pamphilon DH (eds). *Practical Transfusion Medicine*, 2nd ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2005:161-170.
4. Kuczmariski RJ, Ogden CL, Grammer-Strawn LM, et al. CDC growth charts: United States. Advance data from vital and health statistics. No. 314. Hyattsville, Md.: National Center for Health Statistics, 2000. (DHHS publication no. (PHS) 2000-1250 0-0431.)
5. Please include the following for each reference: either the PMID (PMID: 8xxxxx4) or PMC (PMC: 4xxx4) reference including the link or a link/address where the article can be located in the internet, if it is not available through NCBI resources.

Key references only should be given, and exhaustive lists will not be accepted. Few original communications justify more than 40 references. Reviews may contain more references. Try to avoid using summaries as references; ‘unpublished observations’ and ‘personal communications’ may not be used as references, although references to written, not oral, communications may be inserted (in parentheses) in the text. Give the name of the person from whom the communication was received and the date (month

and year) of the communication. References to manuscripts accepted but not yet published may be included; designate the journal name, followed by 'in press' (in parentheses). Information from manuscripts submitted but not yet accepted should be cited in the text as 'unpublished observations' or 'submitted for publication' (in parentheses).

### **Abbreviations, Units**

Except for units of measurement, abbreviations are strongly discouraged. The full term for which an abbreviation stands must precede its first use in the text for ALL abbreviations with the exception of units of measurement. Use only standard abbreviations. No abbreviations should be used in the title of the manuscript.

Solutes should be expressed in g/L, mg/L etc. Concentrations of solutes of known molecular weight may be stated in mol/L or recognized submultiples thereof (mmol/L,  $\mu$ mol/L etc. according to the international system of units (SI)). Enzyme activities should be reported in U/L ([http://www.bipm.org/en/si/si\\_brochure/](http://www.bipm.org/en/si/si_brochure/)).

### **Acknowledgments**

Acknowledgments include one or more statements that specify: 1) contributions that should be acknowledged but do not justify authorship, such as general support by a departmental chairman; 2) technical help received; 3) financial and material support, specifying the nature of the support; and/or 4) financial relationships that may pose a conflict of interest. Persons who have contributed intellectually to the paper, but whose contributions do not justify authorship, may be named and their function or contribution described as, for example, 'scientific adviser', 'critical review of study proposal', 'data collection', or 'participation in clinical trial'. Such persons must have given written permission to be named. Authors are responsible for obtaining this written permission from persons acknowledged by name, because readers may infer their endorsement of the data and conclusions. Technical help should be acknowledged in a paragraph separate from paragraphs acknowledging other contributions.