UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
INDIARA CORREIA PEREIRA

“Padronização do tempo e temperatura para determinação da atividade da enzima G6PD em amostras de papel filtro”

CAMPO GRANDE – MS
2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

INDIARA CORREIA PEREIRA

“Padronização do tempo e temperatura para determinação da atividade da enzima G6PD em amostras de papel filtro”

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – (UFMS), para obtenção do título Doutor. Orientadora: Profa. Dra. Renata Trentin Perdomo.

CAMPO GRANDE – MS
2025

AGRADECIMENTOS

A Deus, sob todas as coisas;

Aos meus pais, Edison e Roselene, e minha irmã Alana, por serem minha base;

Ao meu esposo, Reinaldo, por toda ajuda, dedicação e amor nos dias difíceis;

À minha orientadora, Professora Renata, que aceitou esse desafio e, além de orientadora, se tornou minha amiga;

À FUNDECT, pelo suporte financeiro;

Às minhas amigas, Juliana Geller, Juliana Trivelato, Lívia Freitas e Stephanie Villaescusa, por me ajudarem no recrutamento dos participantes;

À Marcela Zuza, pela ajuda com as coletas de papel filtro;

Ao grupo de Mães que cuidam de G6PD, que fizeram questão de participar do estudo;

Ao IPED-APAE, pelas doações de papel filtro;

À Intercientífica, pela doação dos kits Neolisa G6PD.

RESUMO

A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) é uma enzima citoplasmática presente em todas as células do organismo, responsável por catalisar a primeira etapa da via das pentoses, que gera o cofator NADPH. Esse cofator desempenha papel fundamental na proteção contra danos oxidativos, especialmente nos eritrócitos, que não possuem vias alternativas para sua produção. Indivíduos com atividade enzimática reduzida são classificados como deficientes em G6PD. Atualmente, existem diversos métodos para o diagnóstico da deficiência, incluindo abordagens qualitativas, quantitativas, semiquantitativas e moleculares, todos com suas respectivas limitações. Para a obtenção de resultados confiáveis na dosagem da atividade enzimática, é essencial o controle de variáveis pré-analíticas, como tempo e condições de armazenamento da amostra. Este estudo teve como objetivos padronizar as condições de tempo e temperatura entre a coleta e o processamento de amostras em papel filtro para a dosagem quantitativa da G6PD por método enzimático colorimétrico, além de realizar a primeira triagem populacional da deficiência de G6PD em pacientes atendidos em Unidades Básicas de Saúde de Campo Grande, MS. Para a padronização, foram coletadas amostras de sangue total em papel filtro de 17 indivíduos com deficiência de G6PD e 19 com atividade enzimática normal. As amostras foram armazenadas sob três condições: temperatura ambiente, 5 °C e -20 °C, e testadas diariamente durante 15 dias. Na triagem populacional, foram analisadas 426 amostras de sangue seco em papel filtro. Os resultados demonstraram que a temperatura ambiente promove instabilidade significativa, reduzindo a atividade enzimática em aproximadamente 61%. Observou-se que a degradação da enzima está mais relacionada à temperatura do que ao tempo de armazenamento, uma vez que, após 48 horas à temperatura ambiente, a acurácia do teste e a identificação do status da G6PD é comprometida. Amostras refrigeradas mantiveram estabilidade por até sete dias, enquanto aquelas congeladas a -20 °C se mostraram ainda mais estáveis, permitindo armazenamento por até 14 dias. A análise de regressão linear indicou que 58% da variação da atividade enzimática pode ser explicada pelo tempo de armazenamento e pela temperatura, sugerindo que outras variáveis também influenciam a estabilidade da amostra. Conclui-se que o armazenamento à temperatura ambiente é um fator de risco para resultados falso-positivos, sendo recomendada seleridade na análise dessas amostras. Amostras mantidas sob refrigeração ou congelamento apresentam maior estabilidade e confiabilidade diagnóstica. Na triagem realizada, foi identificada uma prevalência de 1,1% de indivíduos com deficiência de G6PD e 15,2% com atividade enzimática intermediária.

Palavras-chave: Deficiência de G6PD, papel filtro, método enzimático colorimétrico, condições pré-analíticas, glicose-6-fosfato desidrogenase, triagem.

ABSTRACT

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) is a cytoplasmic enzyme present in all cells of the body, responsible for catalyzing the first step of the pentose phosphate pathway, which generates the cofactor NADPH. This cofactor plays a fundamental role in protecting against oxidative damage, particularly in erythrocytes, which lack alternative pathways for NADPH production. Individuals with reduced enzymatic activity are classified as G6PD-deficient. Currently, various methods are available for diagnosing G6PD deficiency, including qualitative, quantitative, semi-quantitative, and molecular tests, each with its own limitations. To ensure reliable results in enzymatic activity testing, careful control of pre-analytical variables such as time and storage conditions is essential. This study aimed to standardize the time and temperature conditions between sample collection and processing for the quantitative determination of G6PD activity in filter paper samples using a colorimetric enzymatic method. It also aimed to conduct the first population-based screening for G6PD deficiency in patients treated at Primary Health Care Units in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. For the standardization process, filter paper samples impregnated with whole blood were collected from 17 individuals with G6PD deficiency and 19 with normal enzymatic activity. The biological material was stored under three different conditions: room temperature, 5 °C, and -20 °C, and tested daily over a period of 15 days. For the population screening, 426 dried blood spot samples were collected and tested using a colorimetric assay to determine enzymatic activity. The results showed that room temperature caused significant instability, reducing enzymatic activity by approximately 61%. It was observed that enzyme degradation was more strongly influenced by temperature than by storage time, as accurate identification of G6PD status was no longer possible after 48 hours at room temperature. Samples stored under refrigeration remained stable for up to seven days, while those frozen at -20 °C showed even greater stability, allowing for storage of up to 14 days. Linear regression analysis indicated that 58% of the variation in G6PD enzymatic activity could be explained by storage time and temperature, suggesting that additional variables may also influence sample stability. It was concluded that storage at room temperature is a risk factor for false-positive results, and prompt analysis is recommended for such samples. Samples stored under refrigeration or freezing conditions exhibited greater stability and diagnostic reliability. In the screening performed, a prevalence of 1.1% of G6PD-deficient individuals and 15.2% with intermediate enzymatic activity was identified.

Keywords: G6PD deficiency, filter paper, colorimetric enzymatic method, pre-analytical conditions, glucose-6-phosphate dehydrogenase, screening.

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1- Via glicolítica, catalisada pela enzima G6PD. 15

Figura 2. Gene da *G6PD* e suas principais mutações. Os círculos vermelhos representam as mutações esporádicas incluídas na classe I da OMS. Os círculos brancos são referentes as classes II e III da OMS. Os quadrados vermelhos representam pequenas deleções. 19

Figura 3. A - Via das pentoses, em indivíduos não deficiente da G6PD. O organismo gera espécies reativas de oxigênio (peróxidos de hidrogênio H_2O_2 ou O_{-2}), em resposta ao metabolismo de substâncias pró-oxidantes. Nas hemácias com atividade normal da G6PD, cuja via das pentoses é catalisada pela enzima G6PD convertendo a glicose 6-fosfato em 6-fosfogliconolactona, subsidiando assim o suprimento de NADPH, que deve regenerar o GSH quando este for oxidado pelas espécies reativas de oxigênio.
B - Via das pentoses, em indivíduos deficiente da G6PD. Fatores exógenos como o consumo de alimentos ou medicamentos oxidativos aumentam a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Nas hemácias, a catalise realizada pela enzima G6PD, convertendo a glicose 6-fosfato em 6-fosfogliconolactona, não subsidia substrato de NADPH suficiente para regenerar todo o GSH oxidado. O aumento do (H_2O_2) culmina em clivagem da membrana, desencadeando no rompimento da célula ou em mudanças conformacionais. As alterações fazem com que os eritrócitos sejam removidos da circulação pelos macrófagos. 24

Figura 4. Resultado do ensaio de fluorescência para a deficiência da G6PD. As amostras foram observadas no tempo 0 e no tempo 10 minutos, o lado A não está na presença da luz UV, o lado B está na presença de UV. Amostras que não emitem fluorescência na presença da UV são considerados deficientes da G6PD, na imagem é possível identificar 2 indivíduos com a deficiência da G6PD. 34

Figura 5. Resultado: amostra deficiente apresenta cor avermelhada, sem alteração da cor após reação. Resultado: amostra não deficiente apresenta coloração distinta na área superior da superfície da reação. 35

Figura 6. Resultado do teste rápido CareStart™ G6PD. O cassete A não apresenta coloração =deficiente da enzima G6PD. O cassete B apresenta coloração arroxeada = atividade normal da G6PD. 36

Figura 7. Características visuais do papel filtro que indicam a qualidade da coleta, preenchimento total da circunferência, sem aspecto de sobreposição de amostra e secagem adequada do material biológico. As amostras foram avaliadas nos dias 1, 7 e 14 e demostram diferença na coloração entre o grupo G1 e os grupos G2 e G3 47

Figura 8. O gráfico mostra a média da atividade da enzima nas diferentes

temperaturas. O box mostra a variabilidade da atividade da enzima entorno da média, durante os 15 dias de análise. Os círculos acima da barra de desvio padrão 48

Figura 9. Comparação gradual da queda da atividade da enzima G6PD em papel filtro, entre os grupos, no período de 15 dias. A linha tracejada superior delimita o cutoff de 6,7 U/gHb, acimadeste ponto as amostras são consideradas com atividade normal da enzima G6PD A linha tracejada inferior delimita o *cutoff* 2,1 e as amostras abaixo deste valor são consideradas deficientes, entre a linha superior e inferior à atividade é considera intermediária 50

Figura 10. Estabilidade da enzima G6PD em papel filtro, armazenada por 15 dias, nas seguintes condições: A e D) temperatura ambiente (25,5 ºC); B e E) condição refrigerada (5,0 ºC); e C e F) condição a -20,5 ºC. A, B e C representam amostras do grupo com deficiência de G6PD, enquanto D, E e F representam amostras do grupo sem deficiência de G6PD. As letras, linhas e barras mostram a diferença dia a dia durante o armazenamento ($p < 0,001$). 51

Figura 11. O gráfico ilustra os resultados de triagem da deficiência da G6PD em 426 voluntários atendidos em Unidades Básicas de Saúde na cidade de Campo Grande. As atividades da enzima <2.1 foram consideradas deficientes; entre 2.2 e 6.6 foram consideradas intermediária e acima de 6.7 atividade normal. 55

LISTA DE TABELAS E QUADRO

	Pág.
Tabela 1. Classificação das variantes da G6PD a partir das classes determinadas pela OMS	17
Tabela 2. Nova Classificação das variantes da deficiência da G6PD	17
Tabela 3. Classes medicamentosas, variantes e classificação de risco para hemólise em deficientes da G6PD.	21
Tabela 4. Drogas que devem ser evitadas por pacientes com deficiência da G6PD.	23
Tabela 5. Distribuição da deficiência da G6PD no Brasil.	29
Tabela 6. Método de diagnóstico, sensibilidade/especificidade e suas limitações.	38
Tabela 7. Classificação sigma associado ao número de defeitos por milhão de oportunidades.	45
Tabela 8. Média da atividade da enzima G6PD durante todo o período de armazenamento, nas 3 condições de temperatura.	48
Tabela 9. Correlação entre atividade da enzima G6PD, o tempo de armazenamento e a temperatura, para amostras com atividade normal da G6PD	52
Quadro 1. Modelo linear para atividade da G6PD em amostras deficientes e não deficientes	53
Tabela 10. Conversão do DPMO em escala sigma.	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

AHA	Anemia hemolítica aguda
ATP	Adenosina trifosfato
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CONITEC	Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde
CNSHA	anemia hemolítica crônica não esferocítica
Cutoff	Linha de corte
DPMO	Defeitos Por Milhão de Oportunidade
ELA	Esclerose Lateral Amiotrófica
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
Fe^{+2}	Ferroso
Fe^{+3}	Férrico
G6P	Glicose-6-fosfato
G6PD	Glicose 6-fosfato desidrogenase
6PGD	6- fosfogluconato desidrogenase
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
H2O2	Peróxido de hidrogênio
IC 95%	Intervalo de confiança de 95%
KSD	Transtorno do espectro do kernicterus

$NADP^+$	Nicotinamina Adenina Dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NF-κB	Fator nuclear kappa B
O2	Oxigênio
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	*odds ratio*
POP	Procedimento operacional padrão
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SPSS	*Statistical Packages for the Social Sciences*
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TNF-α	Fatores de Necrose Tumoral Alfa
U/gHb	Unidade por grama de hemoglobina
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO..... 12
2. REVISÃO DA LITERATURA.....14
2.1 Mecanismo da enzima G6PD..... 14
2.2 Contexto Genético da G6PD..... 16
2.3 Manifestações clínicas..... 19
2.4 Doenças crônicas relacionadas à deficiência da G6PD..... 26
2.5 Distribuição da deficiência da G6PD no Brasil e no mundo.....27
2.6 Gestão e melhoria da qualidade.....30
2.7 Métodos de diagnóstico.....32
3.0 OBJETIVO..... 40
4. METODOLOGIA..... 41
5.RESULTADOS..... 47
5.1 Resultados das análises da atividade da enzima G6PD em papel filtro..... 47
5.1.1Características visuais do papel filtro..... 47
5.1.2 Condições de armazenamento e casuística..... 47
5.1.3 Viabilidade da G6PD em papel filtro..... 48
5.1.4 Análise de correlação..... 52
5.1.5 Regressão linear..... 52
5.1.6 Capacidade Seis Sigma..... 54
5.2 Triagem da deficiência da enzima G6PD em Campo Grande - MS..... 54
6.DISCUSSÃO..... 57
CONCLUSÃO..... 62
Referências: 63
ANEXO I: The influence of storage time and temperature on G-6PD enzyme activity for the enzymatic colorimetric measurement
ANEXO II - CENÁRIO DA DEFICIÊNCIA DA G6PD NO BRASIL: Primeiro estudo de triagem da deficiência no Estado do Mato Grosso do Sul
ANEXO III – POP: Controle de fatores pré-analíticos para a dosagem da enzima G6PD em papel filtro.

1. INTRODUÇÃO

A enzima glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD) é encontrada em todas as células, mas, nos eritrócitos desempenha uma função essencial para a proteção e manutenção frente aos danos oxidativos [1]. A deficiência da enzima G6PD é o distúrbio enzimático mais comum em todo o mundo, estima-se que cerca de 500 milhões de pessoas são afetadas[2]. Trata-se de uma condição genética hereditária, ligada ao cromossomo X. Por isso, homens que portam a deficiência são denominados como hemizigotos, pois possuem apenas 1 cópia do cromossomo X. Já as mulheres, quando apresentam 1 cromossomo mutado são heterozigotas, ou homozigotas, quando possuem os dois cromossomos mutados[1].

Embora, geralmente, os indivíduos portadores da deficiência sejam assintomáticos, quando expostos a situações desencadeantes, como certos medicamentos, processos infecciosos, consumo alimentar, ou frente a produtos químicos, poderão apresentar reações hemolíticas de diferentes intensidades[3]. Durante um evento hemolítico, o indivíduo pode manifestar palidez, icterícia, urina escura, dor abdominal, esplenomegalia e muitas vezes febre. Nos casos mais leves o tratamento é basicamente hidratação e controle dos sintomas, mas os casos mais graves necessitam de hospitalização, sendo a transfusão sanguínea uma alternativa, quando apresentam queda brusca da hemoglobina[2].

A identificação das pessoas com deficiência da G6PD é importante para a orientação adequada das restrições medicamentosas e alimentares [4]. Com o intuito de ampliar o diagnóstico da deficiência na população brasileira, em 2018, foi submetido à consideração da Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde (CONITEC) a inclusão do teste da atividade da G6PD no Programa Nacional de Triagem Neonatal. No parecer, a CONITEC não recomendou a incorporação, com base em questões como incertezas sobre o tempo de estabilidade da amostra para resultados assertivos, e a elevada taxa de falso-positivo no Brasil, que varia entre 5% e 66%. Isso impactaria a logística e custos associados, como: serviço para acolhimento das famílias, recoleta e análise do material biológico[5].

A Organização Mundial da Saúde, recomenda a triagem da doença em locais onde a prevalência é superior a 3-5%[6]. Os estudos brasileiros demonstram uma ampla variação da prevalência, a depender da região. A região Sudeste apresenta as

menores prevalências (1,7%), enquanto a Norte (8,3%) e Nordeste (10,1%) as maiores[7; 8; 9] No entanto, ainda existem lacunas no conhecimento epidemiológico em 10 dos 26 estados, sendo a região centro-oeste a menos investigada, com apenas 1 estudo realizado no estado do Mato Grosso[10].

O estado do Mato Grosso do Sul, localizado no centro-oeste brasileiro, não possui relatos sobre a prevalência da deficiência da G6PD. Diante da necessidade de responder aos questionamentos levantados sobre a viabilidade do material e as condições de armazenamento para um diagnóstico assertivo, este estudo visou identificar as condições pré-analíticas adequadas para a avaliação da atividade da G6PD em papel filtro, além de realizar a primeira triagem da deficiência da G6PD em pacientes atendidos em Unidades Básicas de Saúde na capital do Mato Grosso do Sul.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Mecanismo da enzima G6PD

A glicose é a fonte de energia utilizada pelos tecidos para produção de moléculas de adenosina trifosfato (ATP), esse metabolismo pode ocorrer por via aeróbica (ciclo de Krebs) ou via anaeróbica (glicólise). A via aeróbica necessita de fonte de O2 e de mitocôndrias, enquanto a via anaeróbica ocorre pelo processo de catálise por diferentes enzimas, entre elas a G6PD.

A G6PD é uma enzima citoplasmática, presente em todas as células do organismo. No metabolismo eritrocitário tem papel fundamental na proteção do eritrócito contra os danos oxidativos[1]. Durante o processo de maturação, o eritrócito perde as organelas citoplasmáticas responsáveis por gerar energia, por isso, como fonte de energia, utiliza-se da via glicolítica Embden-Meyerhof, via anaeróbia, responsável por metabolizar 90% da glicose, transformando-a em energia na forma de ATP e o lactato como produto final. Um desvio da via glicolítica, conhecido por via das pentoses, recebe os 10% restantes da glicose e, a partir da atividade da G6PD, gera nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). A reação é mediada pela enzima G6PD que limita a velocidade na primeira fase da via das pentoses, na qual catalisa a oxidação da molécula glicose-6-fosfato (G6P) em 6-fosfogliconolactona. Com isso, o oxigênio liberado nessa conversão é ligado a Nicotinamina Adenina Dinucleotídeo (NADP+), reduzindo-a a NADPH, molécula essencial para a proteção das hemácias contra o estresse oxidativo[11]. Figura 1.

De forma secundária, a 6- fosfogluconato desidrogenase (6PGD) catalisa a reação de oxidação da 6-fosfogliconolactona, liberada na primeira fase, gerando como produto a D-Ribose-5-Fosfato, molécula que será posteriormente usada para a síntese de nucleotídeos[12].

O NADPH gerado, é um potente agente redutor da glutationa oxidada (GSSG), convertendo-a em glutationa reduzida (GSH)[12]. Esse metabolismo é importante para a manutenção da viabilidade dos eritrócitos, justamente, por passarem diariamente por exposições a agentes oxidativos que atingem os sítios de ligação da molécula heme, internalizada na hemoglobina. Especialmente em eritrócitos maduros, que utilizam a via das pentoses como única fonte para produção de NADPH, o funcionamento ideal dessa via é indispensável [1; 12].

Na maioria das células, não só a G6PD, mas outras enzimas catalisam a reação de desidrogenase, mantendo a produção de NADPH, mas nos eritrócitos essa função é exclusiva da enzima G6PD[2]. A regulação da geração de NADPH é conforme demanda, em células expostas a radicais livres de oxigênio com pouca síntese de nucleotídeo, a D-Ribose-5-Fosfato volta para a via das pentoses e dá origem a novas moléculas de glicose 6- fosfato, para suprir a necessidade de NADPH na regeneração da glutationa reduzida (GSH).

Fisiologicamente, os eritrócitos vão perdendo atividade da G6PD conforme ficam mais velhos, no entanto, sua atividade enzimática residual é suficiente para protegê-lo dos danos. Já em indivíduos deficientes da atividade da enzina G6PD existe um comprometimento da produção de NADPH, que em condições normais não afeta a viabilidade dos eritrócitos[2]. No entanto, em situações de estresse oxidativo exógeno, as células se tornam incapazes de produzir NADPH suficiente para a manutenção do ciclo da glutationa, consequentemente, o GSH deixa de detoxificar o peróxido de hidrogênio. Com isso, a hemoglobina e outras proteínas de membrada são danificadas e a célula passa a evidenciar sinais de hemólise intravascular ou é fagocitada pelos macrófagos[12].

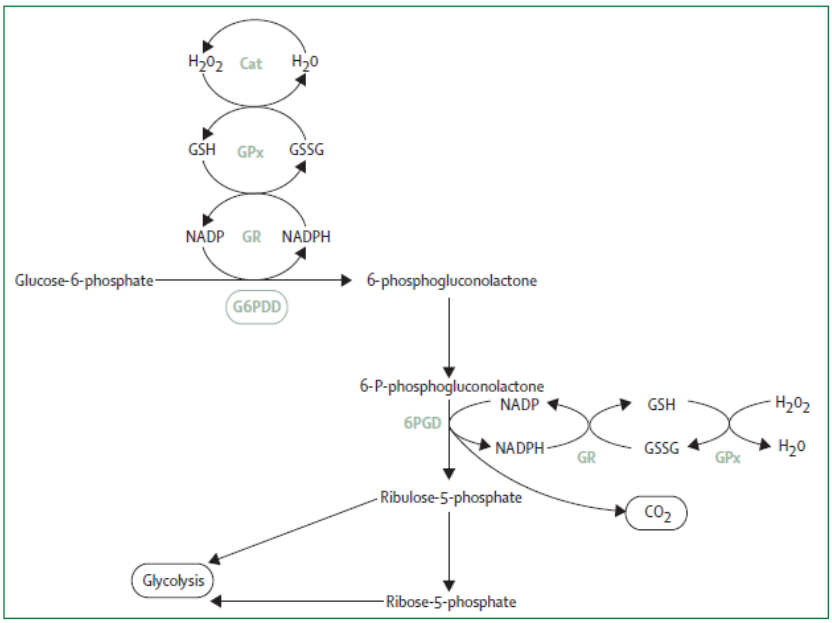


Figura 1- Via glicolítica, catalisada pela enzima G6PD. Fonte: Cappellini MD, Fiorelli G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. The lancet. 2008.

2.2 Contexto Genético da G6PD

O gene da G6PD é localizado no braço longo do cromossomo X (banda Xq28), e é composto por 13 éxons e 12 íntrons. A enzima é constituída por 515 aminoácidos[11]. Quando ocorrem erros durante transcrição do gene, como substituições ou deleções nas posições dos aminoacidos geram-se mutações que interferem na estabilidade estrutural da enzima e consequentemente em sua atividade. Sendo que o grau de comprometimento da enzima depende da localização da mutação e a inativação completa é incompatível com a vida[13].

A deficiência tem distribuição global e estima-se que cerca de 500 milhões de pessoas são afetadas[2]. Já foram identificadas mais de 400 variantes e aproximadamente 217 mutações, mas nem todas são de importância clínica. Das 217 mutações, 182 são de substituição única de nucleotídeos, 19 são substituições múltiplas, 11 são deleções e 5 são mutações intrónicas[14]. Algumas dessas mutações são associadas a manifestações clínicas. Por isso, com o objetivo de categorizar as mutações, a Organização Mundial da Saúde, em 1989, dividiu-as em 5 classes, a depender das manifestações clínicas e gravidade da deficiência[6]. Na tabela 1 é possível observar exemplos de variantes da deficiência da G6PD, segundo a classificação da OMS de 1989.

Classe I: inclui variantes associadas a anemia hemolítica crônica não esferocítica (CNSHA).

Classe II: variantes que causam atividade residual inferior a 10%, mas sem incluir CNSHA.

Classe III: inclui variantes com atividade enzimática residual entre 10-60%.

Classe IV: variantes com atividade enzimática normal.

Classe V: atividade enzimática é aumentada.

Tabela 1. Classificação das variantes da G6PD a partir das classes determinadas pela OMS:

Classes (OMS 1989)	Atividade residual da G6PD (%)	Exemplos de variantes genéticas
I.	< 10	Guadalajara, Nara, Sunderland.
II.	< 10	Mediterrâneo, Canton, Union.
III.	10 – 60	A -, Mahidol, Seattle, Asahi.
IV.	Atividade normal	A, São Borja.
V	> 150	Hektoen

Fonte: Adaptado Luzzatto L, Nannelli C, Notaro R. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Hematology/Oncology Clinics. 2016.

Em 2025, o esquema de classificação foi revisado e importantes mudanças ocorreram. Dois principais fatores motivaram essa revisão, ambos de grande relevância para a população neonatal. O primeiro ponto diz respeito à diferença na atividade enzimática entre indivíduos que apresentam a mesma variante genética. Essa atividade pode, em alguns casos, ultrapassar 10%, o que gera confusão na distinção entre as Classes II e III. O segundo ponto está relacionado a preocupação com os relatos de hiperbilirrubinemia neonatal associada à variante A-, incluída na classe III [15].

A nova classificação unifica as Classes II e III na Categoria B (atividade <45%). Essa alteração reflete o risco significativo de hiperbilirrubinemia neonatal, observado em portadores de variantes consideradas menos graves da Classe III (Tabela 2).

Tabela 2. Nova Classificação das variantes da deficiência da G6PD

Classe	Média da Atividade da G6PD	Hemólise
A	< 20%	Anemia hemolítica crônica não esferocítica (CNSHA).
B	< 45%	Agudo, provoca
C	60 – 150%	Sem hemólise
U	Qualquer	Sem significância clínica

Adaptado de WATCHKO, J. F.; BHUTANI, V. K. Revised World Health Organization (WHO) classification of G6PD gene variants: Relevance to neonatal hyperbilirubinemia. Seminars in Fetal and Neonatal Medicine: Elsevier, 2025

A deficiência da G6PD é herdada, e pode afetar tanto homens quanto mulheres. Indivíduos do sexo masculino, por portarem apenas 1 cromossomo X, localização do

gene da enzima, apresentam-se como hemizigoto, o que significa que apresentam a deficiência em sua forma completa[1]. Enquanto, as mulheres podem carregar 1 gene mutado, são heterozigotos, ou ambos os genes, quando são homozigotos para a deficiência. Em heterozigotos, é possível identificar 2 populações celulares, uma com atividade normal e outra com atividade deficiente, a isso dá- se o nome de mosaicismo. Em alguns casos ocorre a inativação aleatória de um dos cromossomos X, levando a proporções de hemácias com atividades enzimáticas diferentes[11; 16].

A deficiência da G6PD é heterogênea nas manifestações bioquímicas, uma vez que as diferentes mutações geram uma gama variada de atividade enzimática. Consequentemente, as manifestações clínicas seguem a mesma variabilidade e vão desde um portador assintomático a indivíduos que desenvolvem hemólise em diferentes graus, icterícia neonatal ou anemia hemolítica crônica não esferocítica[14]

As variantes genéticas frequentemente descritas no Brasil são as variantes G6PD A(-) e G6PD Mediterrâneo [17; 18]. A Figura 2 apresenta a posição dessas mutações no gene da *G6PD*. A variante A(-) é comumente encontrada na população africana, mas também foi identificada nas populações da América Latina, Sul da Itália e Portugal [19; 20]. Esta variante apresenta uma substituição de Adenina por Guanina na posição 376, a mesma substituição é encontrada na variante A(+). A diferença entre elas é uma segunda mutação em pontos específicos, como substituição de Guanina por Adenina na posição 202, ou de Guanina por Timina na base 680, ou ainda, de Timina por Citosina na base 968[21]

A variante Mediterrâneo (C563T), tem distribuição predominante no Oriente Médio, mas devido à migração populacional, também é encontrada em diversos países [22]. Essa mutação é derivada da substituição de Citosina por Timina na base 563 [23].

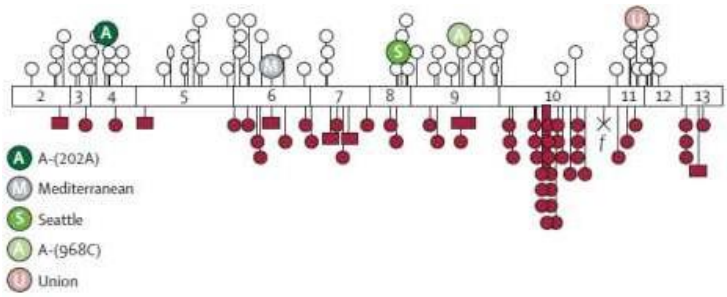


Figura 2. Gene da *G6PD* e suas principais mutações. Os círculos vermelhos representam as mutações esporádicas incluídas na classe I da OMS. Os círculos brancos são referentes as classes II e III da OMS. Os quadrados vermelhos representam pequenas deleções. Fonte: Cappellini MD, Fiorelli G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. The lancet. 2008.

2.3 Manifestações clínicas

2.3.1 Icterícia neonatal

A icterícia neonatal pode acontecer independente da deficiência da enzima G6PD, porém, indivíduos deficientes possuem 2 vezes mais chances de desenvolvê-la. Em uma coorte de 84 recém-nascidos deficientes da G6PD, 54% deles apresentaram icterícia neonatal, dentre esses 11% necessitaram de hospitalização [24]. O cuidado com a icterícia neonatal é visto como importância de saúde pública, uma vez que a identificação do aumento da bilirrubina indireta em tempo oportuno e o manejo adequado do recém-nato são mandatórios para minimizar os riscos de encefalopatia ou *kernicterus* (KSD)[15].

Quando as concentrações de bilirrubina indireta se tornam neurotóxicas, os recém-natos mostram sinais de encefalopatia aguda. Dependendo do quadro e da fase, o dano pode ser reversível, mas na fase mais avançada existe chance de evolução para o transtorno do espectro do *kernicterus* ou morte[25]. As sequelas neurológicas que englobam o espectro são distúrbios auditivos, paralisia cerebral, deficiência cognitiva e anormalidades no olhar[26].

Os casos de *kernicterus* associados à deficiência da G6PD são frequentemente relatados. Em Omã, no Oriente Médio, uma série de casos revelou 14 crianças deficientes da G6PD, que apresentaram concentrações elevadas de bilirrubina, e em 70% dos casos desenvolveram *kernicterus* [27]. Registros após os anos 2000, na Irlanda, no Reino Unido, no Canadá e na Dinamarca, contabilizam 125 indivíduos que desenvolveram *kernicterus*, consequência da hiperbilirrubinemia [26].

A alternativa para minimizar as chances de uma evolução para encefalopatia ou *kernicterus* é realizar o teste de triagem da atividade da enzima G6PD e associá-lo aos parâmetros de bilirrubina total. Parte dos pacientes deficientes da G6PD sofrem com a icterícia pós-alta hospitalar, por isso, conhecer quais indivíduos possuem maiores chances de desenvolvê-la e orientar aos responsáveis dos cuidados, caso

apareçam os sinais clínicos, é imprescindível para impedir a progressão para o transtorno de *kernicterus* [4].

2.3.2 Eventos Hemolíticos em deficientes da G6PD

A anemia hemolítica aguda (AHA) é a manifestação mais comum entre os indivíduos deficientes. O gatilho para desencadeá-la pode ser alimentar, com o consumo do feijão-fava e seus derivados, decorrente de infecções ou após administração medicamentosa [2]. Após a exposição aos fatores desencadeadores o indivíduo pode responder com o aumento na produção de peróxidos de hidrogênio, consequentemente o GSH não consegue proteger os grupos sulfidrilas da oxidação. Então, a globina é desnaturada e a massa formada desta desnaturação é precipitada no interior das hemácias, constituindo os corpúsculos de Heinz. Essa precipitação altera a conformação da célula e faz com que o organismo reconheça como um corpo estranho, culminando na fagocitose por macrófagos do baço. Esse mecanismo de defesa é conhecido por hemólise extravascular [12].

Outra forma de hemólise é observada quando os fosfolipídios de membrana são clivados, consequência do aumento de peróxidos de hidrogênios no interior da hemácia, essa hemólise é denominada de intravascular e tem como característica o rompimento da célula e a presença de hemoglobinemia (presença de Hb livre no sangue) e hemoglobinúria (presença de Hb livre na urina).

- **Hemólise induzida por drogas**

O grau de hemólise medicamentosa depende de fatores como: o potencial oxidativo do medicamento, dose administrada e a variante da G6PD [28]. O primeiro relato de hemólise causada por medicamento foi de homens negros americanos em 1926, e foi descrito como sensibilidade a primaquina. Neste episódio, foi notado que os eritrócitos de alguns indivíduos eram mais suscetíveis a hemólise, após administração do princípio ativo, primaquina [29]. A associação com a deficiência da G6PD foi comprovada após a comparação da atividade enzimática entre os indivíduos que desenvolveram hemólise e os que não desenvolveram, os resultados demonstraram que os eventos hemolíticos estavam relacionados à atividade enzimática reduzida [30].

A primaquina e tafenoquina são medicamentos antimaláricos, importantes para o controle da doença. A alta prevalência da deficiência da G6PD em locais endêmicos

para malária é descrita como um fator de proteção ao agente etiológico. Essa alta prevalência torna-se um problema de saúde pública, justamente pela restrição na administração do antimalárico [31]. No Brasil, um estudo realizado com 516 homens, que já trataram a malária em algum momento da vida, identificou 23 indivíduos deficientes. No histórico clínico, 82,6% dos indivíduos deficientes apresentaram hemólise, icterícia ou hemoglobinúria ao receber o tratamento padrão, que consiste em 3 dias administrando cloroquina e 7 ou 14 dias de primaquina [32]. Já a tafenoquina é administrada em dose simples, mas para segurança o indivíduo deve possuir atividade da G6PD superior a 70% [31].

Além da primaquina e da tafenoquina, outras classes medicamentosas foram descritas como potenciais agentes hemolíticos, conforme tabela 3.

Tabela 3. Classes medicamentosas, variantes e classificação de risco para hemólise em deficientes da G6PD.

Princípio Ativo	**Classe medicamentosa**	**Risco**	**Variante**
Paracetamol	Antipirético	Baixo	Todas
Ácido Acetilsalicílico		Variável	
Ácido ascórbico	Suplemento	Alto (em altas doses)	
Ciprofloxacino	Antibiótico	Alto	
Colchicina	Anti-inflamatório	Baixo	
Glimepirida	Antibiabético	Alto	
Glipizida		Alto	
Glibenclamida		Uso com cautela	
Lexofloxacino	Antibiótico	Alto	
Nitrofurantoína	Antibiótico	Alto	

Nitroglicerina	Vasodilatadores	Alto	
Primaquina	Antimalárico	Muito alto	
Rasburicase	Uricolítico	Muito alto	
Estreptomicina	Antibiótico	Baixo	
Sulfacetamida		Alto	
Sulfametoxazol		Muito alto	
Trimetropina		Muito baixo	
Vitamina K	antagonista dos anticoagulantes	Baixo a alto	
Cloranfenicol	Antibiótico	Alto	
Moxifloxacino		Alto	
Fenazopiridina	Antisséptico	Alto	Mediterrâneo, Asian

Fonte: Adaptado de Harcke, S. J., Rizzolo, D., Harcke, H. T. G-6PD deficiency: An update. Journal of the American Academy of Physician Assistants. 2019

Não existe um consenso médico sobre quais os medicamentos devem ser evitados ou restritos aos deficientes. Essa lista bem determinada é difícil de ser construída, pois, um princípio ativo considerado seguro para um indivíduo pode não ser para outro. Outro ponto importante é que o paciente no momento do evento hemolítico pode estar sob administração de diferentes princípios ativos, dificultando apontar qual o medicamento causador da reação[11].

Dentre os relatos de hemólise encontrados na literatura estão: as altas doses administradas de vitamina C [33], o ácido acetilsalicílico, descrito como causador de hemólise assintomática em 40 indivíduos [34], o antibiótico ciprofloxacino responsável pelo aumento da bilirrubina total e diminuição da hemoglobina, caracterizando hemólise [35]. Eventos raros relacionados ao paracetamol também foram observados em crianças e adultos [36].

No entanto, mesmo com vários relatos publicados, uma revisão da literatura

refuta esta lista e aponta que são somente 7 princípios ativos que devem ser evitados. Segundo os autores, a hemólise, observada nesses relatos, é resultado da presença de quadros infecciosos ou febris e não diretamente relacionado ao princípio ativo [37]. A tabela 4, lista os 7 princípios ativos descritos como críticos.

Tabela 4. Drogas que devem ser evitadas por pacientes com deficiência da G6PD.

Drogas	**Classe Terapêutica**
Dapsona	Antibiótico
Azul de Metileno	Antídoto
Nitrofurantoína	Antibiótico
Fenazopiridina	Analgésico
Primaquina	Antimalárico
Rasburicase	Uricolítico
Azul de Toluidina	Corrante

Adaptado: Youngster I, Arcavi L, Schechmaster R, Akayzen Y, Popliski H, Shimonov J, et al. Medications and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Drug safety. 2010;33(9):713- 26.

A Figura 3 demonstra a resposta que ocorre em indivíduos deficientes e não deficientes quando expostos a medicamentos restritos.

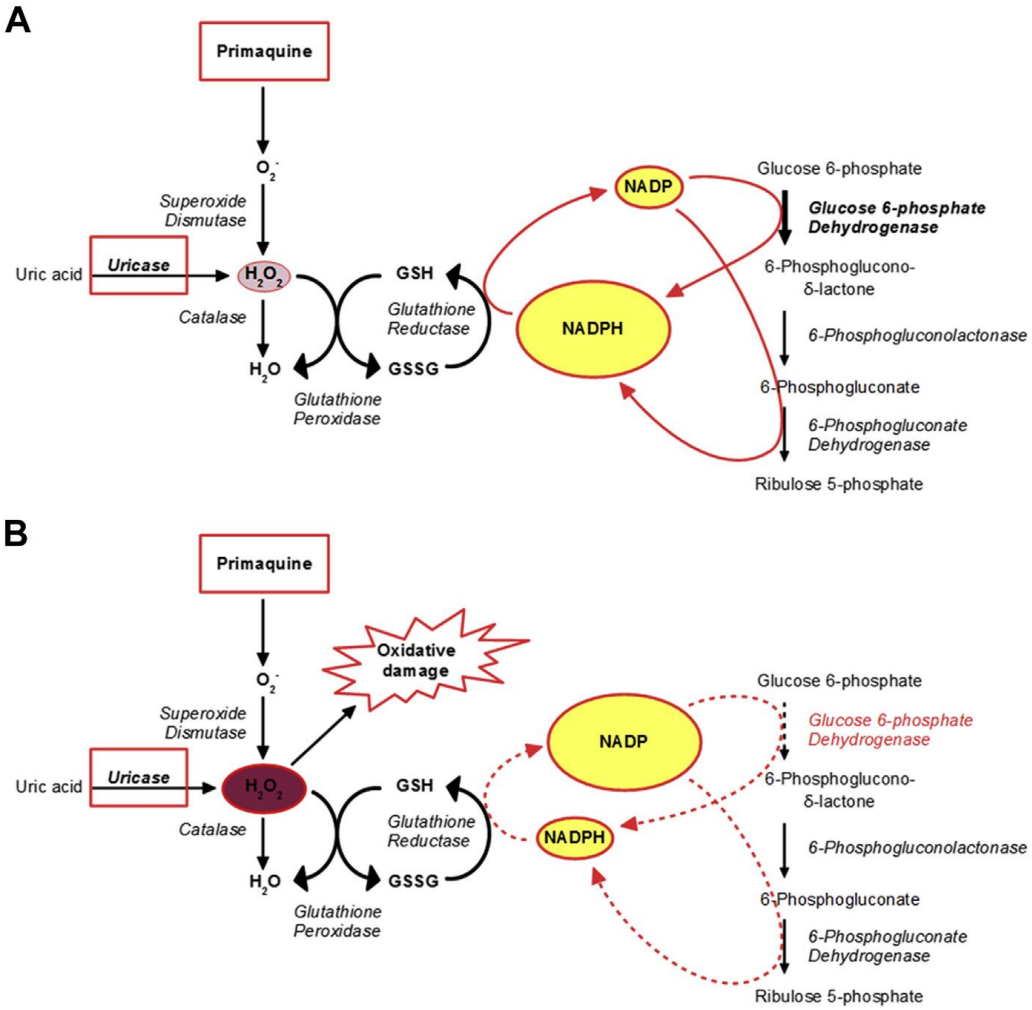


Figura 3. A - Via das pentoses, em indivíduos não deficiente da G6PD. O organismo gera espécies reativas de oxigênio (peróxidos de hidrogênio H_2O_2 ou O_2), em resposta ao metabolismo de substâncias pró-oxidantes. Nas hemácias com atividade normal da G6PD, cuja via das pentosesé catalisada pela enzima G6PD convertendo a glicose 6-fosfato em 6-fosfogliconolactona, subsidiando assim o suprimento de NADPH, que deve regenerar o GSH quando este for oxidado pelas espécies reativas de oxigênio.

B - Via das pentoses, em indivíduos deficiente da G6PD. Fatores exógenos como o consumo de alimentos ou medicamentos oxidativos aumentam a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Nas hemácias, a catalise realizada pela enzima G6PD, convertendo a glicose 6-fosfato em 6-fosfogliconolactona, não subsidia substrato de NADPH suficiente para regenerar todo o GSH oxidado. O aumento do (H_2O_2) culmina em clivagem da membrana, desencadeando no rompimento da célula ou em mudanças conformacionais. As alterações fazem com que os eritrócitos sejam removidos da circulação pelos macrófagos.
Adaptado: Luzzatto L, Nannelli C, Notaro R. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Hematology/Oncology Clinics. 2016.

- **Hemólise por consumo alimentício**

A denominação de “ataque de favismo” era dada aos indivíduos que manifestavam reações clínicas após consumo de feijão-fava. Os deficientes da G6PD não devem consumir feijão-fava ou seus derivados, pois estes alimentos possuem

glicosídeos redutores, isouramil e divicina, que geram altos níveis H_2O_2 e consequentemente, oxidam as proteínas de membrana, alterando sua conformação e como resultado, produzindo hemólise extra e intravascular [11]. O grau de hemólise é influenciado por alguns fatores como: quantidade de favas ingeridas, processamento (crua, cozida ou enlatada) e o grau de maturação, por ser relacionados à quantidade de glicosídeos [38].

A anemia hemolítica aguda após o consumo de fava, costuma acontecer em crianças entre 2 e 10 anos e pode ser grave, com risco de morte. As características clínicas envolvem palidez, icterícia, urina escura, dor abdominal, esplenomegalia e muitas vezes febre[2]. Segundo, Beretta, Manuelli e Cena (2023), o risco continua eminente durante toda a vida, incluindo o período de amamentação, quando o recém-nato possui a deficiência da G6PD [38].

- **Hemólise decorrente de infecção**

O gatilho da infecção é considerado o terceiro modo de desencadear a hemólise em pacientes deficientes. Mesmo que raramente, assim como as hemácias os neutrófilos podem ter atividade da enzima muito inferior ao normal,resultando em deficiência de NADPH. Esse substrato é essencial para exterminar bactérias calatalase-positiva, mas quando em menor quantidade torna o processo imunológico ineficiente. Essa cascata de eventos associados ao aumento de espécies reativas de oxigênio culmina em hemólise [39]. Esse cenário foi observado em crises de Pneumonia lobar [40], Brucelose [41],infecção por *Staphylococcus aureus* [39], entre outros.

2.3.3 Anemia hemolítica crônica não esferocítica

A anemia hemolítica crônica não esferocítica decorrente da deficiência da G6PD é um evento raro, associada a variantes que desempenham baixos níveis de atividade enzimática [42]. Esta condição aparece quando as hemácias não conseguem suprir à quantidade de NADPH mesmo que sem os estímulos oxidativo. O manejo desse paciente, em crise, envolve vigilância, transfusões sanguíneas, se necessário e, em casos de sobrecarga de ferro, administração de quelantes.

2.4 Doenças crônicas relacionadas à deficiência da G6PD

A enzima G6PD é amplamente expressa, o que pode significar que as manifestações clínicas não se limitam aos eritrócitos, mas deve-se esperar que diferentes células e tecidos apresentem essa desregulação. Mesmo que tal mecanismo não seja comumente observado. A relação entre a deficiência da G6PD e a hemólise e a icterícia neonatal é bem estabelecida, no entanto, estudos que associam a deficiência com doenças crônicas ainda são incipientes e trazem narrativas muitas vezes controversas [43].

Doenças cardiovasculares, como hipertensão e aterosclerose, são consideradas problemas de saúde pública. Durante sua progressão, ocorrem alterações fenotípicas nas células musculares lisas vasculares. Estudos demonstram que a enzima G6PD pode ser responsável por regular as células musculares lisas vasculares, aumentando o risco de doenças cardiovasculares em deficientes da enzima[43]. Thomas et al., (2018), afirmam que portadores da deficiência da G6PD têm 39% mais chances de desenvolverem problemas cardiovasculares devido à produção prejudicada de óxido nítrico [44]. A hipertensão arterial crônica é um dos fatores de risco para doenças cardiovasculares, e uma revisão da literatura aponta que a deficiência da G6PD aumenta a pressão arterial e pode gerar lesões arteriais prematuras[43].

Por uma revisão sistemática com meta-análise associou a deficiência da G6PD ao risco aumentado de diabetes, evidenciando que deficientes da enzima G6PD possuem mais chances de desenvolverem diabetes que indivíduos não deficientes. A sumarização do *odds ratio* demonstrou que entre os homens o risco é maior que entre as mulheres, (OR 2.22 (95% CI 1.31–3.75) vs. 1.87 (1.12–3.12), respectivamente [45]. Em vitro, o mecanismo que associa a deficiêncida da G6PD ao diabetes está relacionado à apoptose das células β pancreática, consequência do acúmulo de espécies reativas de oxigênio, tais células são sensíveis ao estresse oxidativo e perdem função. Por isso, a atividade da enzima G6PD foi elencada como importante para a proliferação e prevenção de morte das células β pancreáticas [46].

Enquanto a relação com as doenças cardiovasculares e o diabetes já está sendo elucidada, a associação entre a deficiência e o comprometimento da função hepática não está completamente esclarecida. No entanto, a deficiência foi relatada como um cofator para doença hepática progressiva e doença hepática crônica. Um relato de

caso abordou 2 pacientes que apresentavam a forma grave da deficiência e tiveram como desfecho icterícia colestática crônica com comprometimento da função hepática [47].

Outro fator, mesmo que atípico, associado à deficiência da G6PD é a imunodepressão devido à função bactericida prejudicada[48]. O resultado da baixa atividade enzimática é a carência da produção de NADPH oxidase nos fagócitos, que culmina em diminuição de espécies reativas de oxigênio (ROS), tornando o indivíduo mais propenso a infecções de repetição, já que as ROS são essenciais na defesa contra os patógenos[49].

Um relato de caso de uma criança chinesa de 5 anos com deficiência severa da G6PD descreveu diferentes episódios de infecções, incluindo broncopneumonia, infecção pelo vírus Epstein-Barr, amigdalites 5 a 6 vezes no ano, além de outras manifestações clínicas como anemia e problemas intestinais. O estudo concluiu que a deficiência da G6PD severa, mesmo que rara, pode ter características semelhantes à doença granulomatosa crônica. Foi identificado uma produção de ROS inferior ao normal e uma incapacidade de remoção de patógenos, devido à ativação ineficiente do fator nuclear kappa B (NF-κB) e a produção de TNF-α [50].

Sabendo que a deficiência tem relação direta com o transtorno de *kernicterus*, que pode gerar consequências encefalopáticas, estudos passaram a investigar o papel da enzima G6PD em doenças neurodegenerativas. Essa possível relação é baseada na associação entre a inflamação e o aumento de espécies reativas de oxigênio observadas nas manifestações degenerativas. Dentre os relatos estão doença de Parkinson [51] e Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) [52]. No contexto, de distúrbio do neurodesenvolvimento, como o transtorno do espectro autista, a deficiência da G6PD também é citada e relacionada como um dos fatores predisponentes [53].

2.5 Distribuição da deficiência da G6PD no Brasil e no mundo

A partir de uma revisão sistemática sobre a deficiência da G6PD em nível global, a estimativa foi de 7.1%[54]. Para essa revisão, foram analisados estudos de 88 países. Quando se trata apenas da America Latina países como Argentina, Peru e Uruguai apresentam baixa prevalência (< 1.5%). Em contrapartida, o Brasil, Colômbia, Cuba e Equador, Jamaica, apresentaram valores de prevalência que ultrapassam

10%[19].

A prevalência da deficiência da G6PD no Brasil não segue um padrão, variando entre 1,7% no Sudeste a 10% no Nordeste. Essa diferença já foi associada à migração e à colonização da região. Para caracterizar a prevalência da deficiência da G6PD no Brasil, foi realizado um levantamento por estado. Os estudos encontrados foram apresentados na tabela 5. Foram incluídos nesse levantamento os artigos e teses que avaliaram a atividade enzimática ou identificaram a deficiência por meio de estudo molecular.

A região Norte destaca-se pelo maior número de publicações, justamente por ser a região com maior incidência de malária. Como o tratamento do *plasmodium vivax* causa riscos ao portador da deficiência, é necessário conhecer o perfil genético da população. O que explica o grande número de estudos [55]. Por outro lado, a região Centro-Oeste tem o menor número de publicações, seguida da região Sul, conforme tabela 5. Não foram encontrados estudos estimando a prevalência em 10 dos 26 estados brasileiros e a ausência desta informação impossibilita um panorama nacional.

Foi possível observar que, dentro de um mesmo estado, existem variações na prevalência, como foi identificado no Acre, onde a prevalência variou de 4,5 a 8,3%, a depender da população investigada. No Pará, observou-se uma variação semelhante, com prevalências que variaram entre 5,7% e 19%. O estudo com a maior prevalência focou em comunidades ribeirinhas afrodescendentes, no nordeste do estado, e utilizou somente a genotipagem para identificação, o que pode ter influenciado os resultados[8]. O estudo de menor prevalência, usou um método de triagem seguido de ensaio molecular[18].

Essas discrepâncias demonstram como a escolha do método diagnóstico e da população a ser estudada podem influenciar na estimativa da prevalência de uma condição genética, podendo superestimar ou subestimar os dados. Detalhes dos testes disponíveis para o diagnóstico e suas limitações serão discutidas na seção 2.7.

Tabela 5. Distribuição da deficiência da G6PD no Brasil.

Região	Estado	População do estudo	Prevalência	Referência
Norte	Amazonas	Comunidade Ismail Aziz (somente homens foram avaliados)	3%	[55]
		Amostragem na comunidade	4%	[18]
		Doares de sangue	8.26%	[56]
		Amostragem na comunidade	4.5%	[57]
	Acre	Voluntários homens da Comunidade	4,5%	[32]
		Amostragem na comunidade	8,3%	[18]
	Rondônia	Voluntários da comunidade	3,3%	[58]
		Amostragem na comunidade	5,4%	[18]
	Pará	Comunidades afrodescendentes	(5% dos homens e 19% das mulheres)	[8]
		Amostragem na comunidade	5,7%	[18]
	Amapá	Amostragem na comunidade	5,8%	[18]
	Roraima	Amostragem na comunidade	4,2%	[18]
Nordeste	Bahia	Recém-nascidos	10,1%	[9]
	Pernambuco	Adultos doadores de sangue	7%	[59]
	Rio Grande do Norte	Recém-nascidos	2%	[60]

		Adultos doadores de sangue	3.8%	[61]
	Piauí	Voluntários da comunidade	6,5%	[62]
	Paraíba	Recém-nascidos	4,76%	[63]
Centro-Oeste	Mato Grosso	Recém-nascidos	1,76%	[10]
Sudeste	Espirito Santo	Recém-nascidos	2,5%	[7]
	São Paulo	Doadores de sangue	1,7%	[64]
		Individuos do sexo masculino	3.65%	[65]
		Doadores de sangue homens	1,75%	[66]
	Minas Gerais	Crianças com a clínica de acidente vascular cerebral	4,3%	[67]
Sul	Rio Grande do Sul	Recém-nascidos	7,9% (1,4 % Deficiência total e 6,4 Deficiência parcial.)	[68]
		Comunidade	9,7%	[69]
		Recém-nascidos (Com e sem procedimento de fototerapia)	4,6%	[70]

2.6 Gestão e melhoria da qualidade

2.6.1 Fases analíticas

A medicina laboratorial é constituída de três fases analitica: fase pré- analítica, analítica e pós-analítica. A execução correta de todas as fases, resulta em um diagnóstico seguro que auxilia o clínico na tomada de decisão. A fase pré-analítica inicia-se com a solicitação médica, passa pela preparação do paciente, coleta, armazenamento e transporte do material biológico. A fase analítica está voltada para a segurança do ensaio biológico, e a fase pós- analítica inclui a liberação do laudo e interpretação pelo profissional habilitado [71].

Dentre as fases analíticas, a fase pré-analítica é descrita como a mais crítica, porque parte dela é realizada fora do ambiente laboratorial, envolve processos manuais, o que torna mais suscetível a erros. Amostras inadequadas, falta de orientação ao paciente sobre a preparação, impactam diretamente no resultado do exame, assim como não manter a amostra nas condições ideais de tempo e temperatura pode tornar o analito a ser analisado instável, fazendo com que o resultado aferido não seja o real para o paciente [72].

A fase analítica, na maioria dos laboratórios, é automatizada, diminuindo as chances de erros, e a fase pós-analítica é norteada pelo clínico durante a associação do resultado com as manifestações clínicas do paciente. Nesse contexto, o laboratório precisa adequar a equipe, conhecer o ensaio e suas limitações, para minimizar as chances de erros, reduzindo as recoletas ou repetições, evitáveis.

2.6.2 Padronização

A padronização de processos está diretamente relacionada à qualidade e harmonização da entrega. No contexto de laboratórios de análises clínicas, a padronização é fundamental para a precisão dos resultados liberados e controle das variáveis que possam influenciar[73]. Em laboratórios de análises clínicas, a utilização de Procedimento Operacional Padrão (POP) é essencial para garantir que toda a equipe envolvida execute as atividades de maneira uniforme e consistente[74].

Para a elaboração adequada de um POP, é necessário identificar as dificuldades e pontos críticos de cada processo. Os POP's são documentos que descrevem detalhadamente cada procedimento. Alguns elementos fundamentais devem estar contemplados, como: cabeçalho, título, logotipo da empresa ou instituição, área responsável, responsáveis pelas atividades, datas de elaboração, aprovação e autorização, objetivos, campo de aplicação, abrangência, responsabilidades, abreviações, definições, descrição dos procedimentos e referências[75].

Esse documento é indispensável em auditorias, tanto internas quanto externas, pois, possibilita monitorar a execução dos processos em diferentes setores, além de permitir a identificação de não conformidades. As não conformidades ocorrem quando existe divergência entre a execução real e o que está descrito no POP. Quando uma não conformidade é identificada, o setor responsável deve reportar o incidente ao

responsável pelo controle de qualidade e implementar ações corretivas, como o treinamento da equipe, visando minimizar a ocorrência de novas não conformidades[75].

A aplicação de um procedimento padronizado, garante a segurança do paciente, resultados confiáveis e consequentemente credibilidade do laboratório junto à comunidade médica[73].

2.6.3 Metodologia Seis Sigma (*Six Sigma*)

A metodologia Seis Sigma surgiu na fabrica da Motorola, com o objetivo de fabricar produtos de qualidade superior a preços mais baixos. Para atingir esse objetivo, era essencial que os processos fossem realizados com qualidade, reduzindo a variabilidade e priorizando a melhoria contínua. A estratégia envolve monitorar os processos, mantendo-os sobre controle e estabilidade[76].

Na última década, observou-se um crescimento em modelos de gerenciamentos de processos na área da saúde. Programas como o *Six Sigma* mesmo que incipientes, já são utilizados em laboratórios de análises clínicas [77; 78]. A metodologia tem sido aplicada para identificar produtos defeituosos, ou seja, resultados fora do limite de variação máxima ou que não refletem a realidade, falsos positivos ou negativos[79].

A qualidade Seis Sigma, é mensurada a partir do número de defeitos por milhão de oportunidades (DPMO), que é calculada pela fórmula: número de defeitos vezes 1.000.000, dividido pelo número de unidades e multiplicado pelo número de oportunidades por unidade. A classificação Sigma varia de 1 a 6, sendo que o nível 1 apresenta o maior número de defeitos (690.000 defeitos por milhão de oportunidade), enquanto o nível 6 apresenta o menor número (3.4 defeitos por milhão de oportunidade)[76].

O objetivo de um laboratório de análises clínicas é alcançar o nível mais alto de Sigma, pois implica em um menor número de erros/defeitos, aumentando a confiabilidade dos resultados analíticos, consequentemente a segurança dos pacientes[79].

2.7 Métodos de diagnóstico

No Brasil, a triagem em massa para a deficiência da G6PD não é ofertada pelo

Programa de Nacional de Triagem Neonatal [80]. No entanto, os testes para diagnóstico estão disponíveis para serem realizados no SUS. Desta forma, o diagnóstico da deficiência da G6PD é relevante e deve ser considerado para adultos e crianças que apresentarem qualquer manifestação hemolítica decorrente de infecções, administração medicamentosa ou consumo de fava. Deve também ser considerado em indivíduos com ancestralidade africana, mediterrânea ou asiática[81].

Para um diagnóstico assertivo deve-se conhecer e minimizar qualquer interferência que possa alterar a acurácia do ensaio laboratorial. Existem variados métodos para o diagnóstico da deficiência da G6PD, desde metodologias qualitativas e quantitativas a moleculares, cada qual com suas limitações[81].

As limitações vão desde a sensibilidade e especificidade do ensaio a estrutura física disponível e de qualificação da equipe. Todas elas precisam ser analisadas antes de escolher e validar um método de diagnóstico. A sensibilidade, é o quanto o método consegue identificar os individuos que realmente são positivos dentre os positivos, ou seja, os verdadeiros positivos. Especificidade é a capacidade de identificar os individuos que realmente não possuem a doença, verdadeiros negativos[82].

Um teste de diagnósticos muito sensível, apresenta altos valores de falsos-positivos. São ideais para triagens em massa, indivíduos com a doença serão identificados assim como alguns que não possuem a patologia, a esses demonimamos de falsos-positivos. Testes muito específicos são ideias para confirmar uma condição, pois não identificam os individuos que não tem a doença, sendo assim são baixos os números de falsos-positivos[82]. No ítem seguinte, será apresentado os testes para diagnóstico da deficiência da G6PD e suas limitações.

2.7.1 Ensaios qualitativos

- **Mancha fluorescente**

O ensaio qualitativo usando mancha fluorescente foi descrito por Beutler (1966). É um ensaio simples e indicado para triagem, principalmente, em locais com baixo recurso financeiro[83]. O procedimento necessita de papel filtro Whatman, luz ultravioleta (UV), reagente (substrato NADP e glicose 6-fosfato) e coleta de sangue em EDTA ou heparina. A amostra de sangue é colocada na presença do reagente e incubada por 10 minutos a 37°C. A leitura é feita logo após, utilizando a luz UV.

Amostras que emitem fluorescência são consideradas com atividade normal da G6PD, aquelas que não emitem fluorescência são classificadas como atividade deficiente da G6PD. O ensaio apresenta sensibilidade entre 87,7 à 96,5% (dependendo do grupo) e a especificidade de 95,2% para atividade enzimática superior a 30% [84].

Esse ensaio tem como principal limitação a impossibilidade de identificar mulheres heterozigotas com atividade enzimática intermediária ou indivíduos deficientes com altas concentrações de reticulócitos [84]. Na Figura 4 é possível observar o resultado do teste e identificação de indivíduos deficientes, com e sem a presença da luz UV.

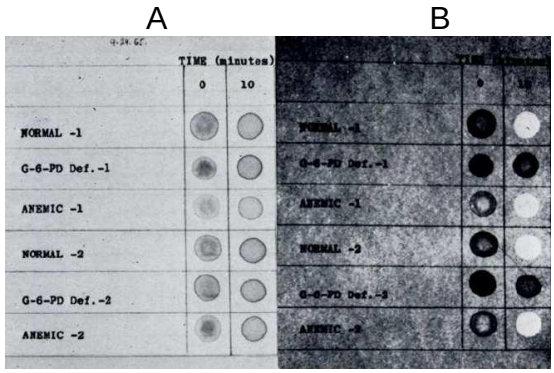


Figura 4. Resultado do ensaio de fluorescência para a deficiência da G6PD. As amostras foram observadas no tempo 0 e no tempo 10 minutos, o lado A não está na presença da luz UV, o lado B está na presença de UV. Amostras que não emitem fluorescência na presença da UV são considerados deficientes da G6PD, na imagem é possível identificar 2 indivíduos com a deficiência da G6PD. Fonte: BEUTLER E, Halasz A. A series of new screening procedures for pyruvate kinase deficiency, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, and glutathione reductase deficiency. Blood. 1966.

O teste de redução de metahemoglobina é outra opção de identificação visual do *status* da G6PD. O ensaio reproduz a via das pentoses e consiste em oxidar a hemoglobina em metahemoglobina, pela ação do nitrito de sódio, e posteriormente reconverter em hemoglobina pela ação do azul de metileno [85]. O teste é realizado em tubos de ensaio, são necessários 3 tubos, 1 para controle negativo, 1 para teste e 1 para controle positivo. Em cada tubo deve-se colocar 2 mL de sangue total, no tubo de controle positivo adiciona-se nitrito de sódio e no controle negativo somente adiciona azul de metileno. No tubo de teste são adicionados os dois reagentes. Após 3h, é feita a leitura, se o tubo teste apresentar coloração marrom é indício de que a amostra tinha fornecimento inadequado de NADPH e não foi possível reconverter a metahemoglobina em hemoglobina, caso o fornecimento seja adequado, a amostra

deve apresentar coloração avermelhada [86].

- **Teste rápido de diagnóstico**

Os testes rápidos de diagnóstico são alternativas para triagem do paciente antes da administração de medicamentos contraindicados para o deficiente da G6PD. Essa metodologia é viável para localidades que não possuem uma estrutura laboratorial e que necessitam de agilidade no resultado para o início da farmacoterapia.

O teste BinaxNOW ® G6PD foi o primeiro descrito, e é baseado em cromatografia enzimática, é uma tira com uma superfície de reação que na presença da enzima G6PD produz azul de formazano. O método consiste em adicionar reagente de lise no sangue total e posteriormente aplicá-lo na superfície de reação. O ensaio é sensível, devendo ser realizado em temperatura ambiente entre 18 e 25ºC. O resultado é lido visualmente, se na área superior da superfície de reação for observado cor avermelhada a amostra tem atividade enzimática deficiente, se for observado coloração distinta ao vermelho a amostra apresenta atividade normal [87]. Conforme Figura 5.

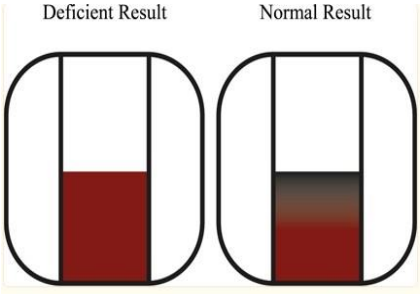


Figura 5. Resultado: amostra deficiente apresenta cor avermelhada, sem alteração da cor após reação. Resultado: amostra não deficiente apresenta coloração distinta na área superior da superfície da reação. Fonte: TINLEY, K. E. et al. Evaluation of a Rapid Qualitative Enzyme Chromatographic Test for Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 2010.

Uma segunda opção de teste rápido é o CareStart™ G6PD, que também segue a metodologia de cromatografia enzimática qualitativa, mas não necessita de temperatura controlada durante a execução do ensaio, o que o torna mais atrativo, visto a dificuldade de controlar a temperatura no campo. A tira reagente é envolvida

por um cassete, tem um poço determinado para aplicar a amostra e o regente, a reação leva aproximadamente 10 minutos. A leitura é visual, amostras com coloração arroxeada são normais, amostras que não apresentarem nenhuma cor são consideradas deficientes da G6PD [88]. Figura 6.

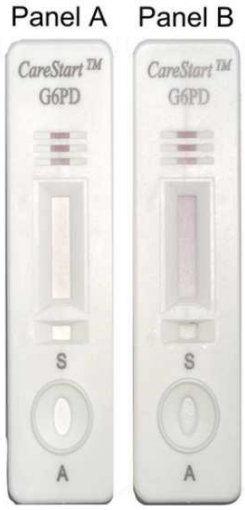


Figura 6. Resultado do teste rápido CareStart™ G6PD. O cassete A não apresenta coloração = deficiente da enzima G6PD. O cassete B apresenta coloração arroxeada = atividade normal daG6PD. Fonte: IM, S. et al. Performance of the CareStart™ G6PD Deficiency Screening Test, a Point-of-Care Diagnostic for Primaquine Therapy Screening. PLoS ONE, 2011.

2.7.2 Ensaio quantitativo

Os ensaios qualitativos em sua maioria são subjetivos e dependem muito do olhar do avaliador, por isso, a equipe deve ser bem treinada, além de evitar rotatividade de observador, para não comprometer o resultado.

- **Espectrofotometria**

A espectrofotometria é o padrão ouro entre os métodos de diagnóstico, a maior limitação deste ensaio é a necessidade de laboratório bem equipado, equipe treinada e não é possível realizá-lo no ponto de atendimento [89]. O teste é baseado na G6PD catalisando a primeira fase da via das pentoses e produzindo NADPH. A leitura do produto é realizada em absorbância 340 nm e é proporcional a atividade da enzima G6PD.

A especificidade e sensibilidade é alta para identificar mulheres homozigotas e homens deficientes, mas para identificar mulheres com atividade enzimática próxima à linha de corte *(cutoff)* a sensibilidade é baixa, cerca de 11%. Os resultados falso-

negativos ocorrem quando uma mulher heterozigota possui uma porção de hemácias com atividade enzimática normal superior à porção com atividade deficiente, mascarando assim o nível de atividade da enzima.

- **ELISA (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática)**

Os ensaios que utilizam leitores de microplaca Elisa são alternativas para a realização de análises quantitativas, com custo inferior ao da espectrofotometria. Os kits demonstram alta sensibilidade e especificidade, mesmo com algumas discrepâncias nos resultados, quando comparado ao padrão ouro [90].

- **Biossensor**

Os biossensores são aparelhos que utilizam tiras reagentes e avaliam as propriedades eletroquímicas da G6PD de forma quantitativa ou semiquantitativa, são ferramentas uteis em pontos de atendimento. Mas comparados à espectrofotometria, padrão ouro para a dosagem da G6PD, demonstram baixo poder discriminatório para as amostras entre o range de atividade baixa a intermediária [90]. Esses dispositivos estão em constante aperfeiçoamento e no futuro prometem identificar até as mulheres heterozigotas.

Esse aperfeiçoamento foi observado por Bancone et al. (2022), no estudo de avaliação de método misto, usando biossensor e método padrão ouro. Os resultados foram descritos como satisfatórios e demonstraram ser confiáveis nodiagnóstico de 100% dos neonatos deficientes e 80% das mulheres com atividade intermediárias. Os autores ainda descrevem que o biossensor apresentou-se mais confiável que o teste de mancha fluorescente [91].

- **Ensaio Citofluorométrico**

Com a metodologia de citometria de fluxo é possível discriminar as diferentes populações de glóbulos vermelhos. É um meio para determinar com precisão a expressão de dois alelos (normal e deficientes) em mulheres heterozigotas. Essa preocupação com as mulheres é devido à limitação da maioria dos ensaios em discriminá-las corretamente [92]. A citometria de fluxo, é uma ferramenta robusta que necessita de estrutura laboratorial e treinamento de técnicos para o manuseio correto do equipamento e do software para a interpretação dos resultados. A sensibilidade do teste é por volta de 85%, enquanto a especificidade é de 100%, comparando a espectometria, padrão ouro, o potencial discriminatório da citometria de fluxo é maior [93].

2.7.3 Genotipagem

O ensaio de genotipagem identifica a mutação, sem considerar a atividade da enzima. É adequado para identificar indivíduos deficientes, mesmo após crises hemolíticas, quando um ensaio baseado na atividade enzimática não o identificaria.

O DNA para a genotipagem pode ser extraído do sangue total ou do sangue seco em papel filtro e para a identificação da mutação é necessário um prime específico. A complexidade da avaliação e dos equipamentos, o alto custo de execução e a necessidade de qualificação técnica, são limitadores desse ensaio[94; 95]

Os dados descritos nessa seção foram copilados e apresentados na tabela 6.

Tabela 6. Método de diagnóstico da deficiência da G6PD, sensibilidade/especificidade e suas limitações

Método	Descrição	Sensibilidade	Especificidade	Limitações
Mancha Fluorescente	Uso papel filtro Whatman 903 e reagentes; Leitura por luz UV.	Entre 87,7 e 96,5%	95,2%	Não identifica mulheres heterozigotas com atividade intermediária; Menos eficaz com altas concentrações de reticulócitos.
Teste BinaxNOW® G6PD CareStart™ G6PD	Cromatografia enzimática; Leitura visual.	-	-	Viés do analisador; Resultados podem ser subjetivos;
Espectrofotometria	Mensura NADPH produzido pela G6PD;	Alta para homozigotos e deficientes, baixa para heterozigotos com atividade próxima ao cutoff	Alta para homozigotos e deficientes, baixa para heterozigotos com atividade intermediária	Requer laboratório equipado e equipe treinada; Não aplicável em ponto de atendimento.
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática	Alta	Alta	Pode haver discrepâncias nos resultados comparados ao padrão

				ouro; Necessário laboratório equipado e equipe treinada.
Biossensor	Avalia propriedades eletroquímicas da G6PD;	100% para deficientes, 80% para intermediários	Inferior ao padrão ouro	Menor precisão na discriminação entre atividades baixa e intermediária; Apropriado para pontos de atendimento
Citofluorometria	Identifica diferentes populações de glóbulos vermelhos; Importante para identificação e mulheres em heterozigose.	85%	100%	Necessita de infraestrutura e treinamento especializado; complexidade e custo elevados.
Genotipagem	Identifica mutações específicas; não avalia atividade enzimática.	-	-	Alto custo e complexidade; Necessário conhecimento prévio das mutações.

3.0 OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi padronizar as condições pré- analíticas de temperatura e tempo na determinação da atividade da enzima G6PD em amostras de papel filtro.

3.1 Objetivos específicos

3.1.1 Avaliar a correlação entre a temperatura e o tempo decorrido entre a coleta e a realização do teste enzimático na atividade da enzima G6PD;

3.1.2 Avaliar o efeito da temperatura e do tempo de armazenamento na estabilidade da amostra;

3.1.3 Investigar a prevalência da deficiência da G6PD em pacientes atendidos em Unidade Básicas de Saúde do município de Campo Grande – MS;

4. METODOLOGIA

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Brasil, sob o parecer nº 4.500.914 em 18 de janeiro de 2021.

4.1 Ambientalizando

A Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, está localizada em Campo Grande, no centro-oeste brasileiro, onde foram realizados os ensaios para a padronização do tempo e temperatura na dosagem da enzima G6PD em sangue seco, coletado em papel filtro. O estado de Mato Grosso do Sul apresenta temperaturas elevadas na maior parte do ano, durante os meses de setembro a janeiro os termômetros frequentemente ultrapassam os 38 ºC, acompanhados de aumento da umidade devido à temporada de chuvas. Em contrapartida, entre os meses de abril a agosto as temperaturas são mais amenas, mas a umidade relativa do ar registra níveis abaixo de 15%.

As coletas e os ensaios foram conduzidos durante os meses mais quentes, setembro à outubro, aproveitando as condições extremas de temperatura para avaliar o impacto nas amostras mantidas em temperatura ambiente.

Os participantes deficientes foram recrutados atravez de um grupo de mães com filhos deficientes da G6PD, e pacientes em monitoramente ambulatorial. Os participantes não deficientes foram voluntários que estavam na UFMS.

4.2 Critérios de inclusão e exclusão

Critérios de Inclusão:

1 – Populaçãp geral;

2 - Ter condições de compreender o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e concordar em assiná-lo;

3 - No momento da coleta e nas 2 semanas anteriores não ter apresentado episódio de febre ou infecções;

Critérios de Exclusão:

1 - Não concordar em assinar o TCLE;

2 - Ter recebido transfusão sanguínea 90 dias antes da coleta;

4.3 Características do Papel filtro

A escolha do papel filtro para a coleta de amostras de sangue seco é fundamental para garantir a qualidade dos resultados laboratoriais. Existem três marcas de papel filtro consolidadas e recomendadas para tal, entre as quais está o papel filtro Whatman 903 (350 micrômetros).

Para a coleta de amostras, foi utilizado o papel filtro da marca Whatman 903, o qual possuia 6 circunferências de 2,0 cm de diâmetro delimitadas graficamente para demarcar a área de coleta. Para as coletas foram utilizadas 2 gotas de sangue, o que corresponde a um volume de aproximadamente 50 µL.

4.4 Controle de temperatura

Para garantir o controle da temperatura adequado nas três condições de armazenamento, foram utilizados termohigrometros devidamente calibrados antes do início dos ensaios.

No ambiente de armazenamento das amostras, diariamente, as temperaturas atuais, máximas e mínimas foram aferidas e registradas. Após cada leitura, os termohigrometros eram zerados para que as medições do dia seguinte começassem a partir deste ponto. Este processo de registro e reinicialização diário garantiu uma monitorização contínua das condições térmicas.

Os termohigrometros utilizados para medir a temperatura ambiente e refrigerada tinham uma faixa de medição entre -10 ºC e 55 ºC, enquanto o termohigrometro destinado ao monitoramento da temperatura congelada possuía uma faixa de medição, entre -30 ºC e 50 ºC.

A diferença dos equipamentos permitiu mensuração conforme a condição de armazenamento.

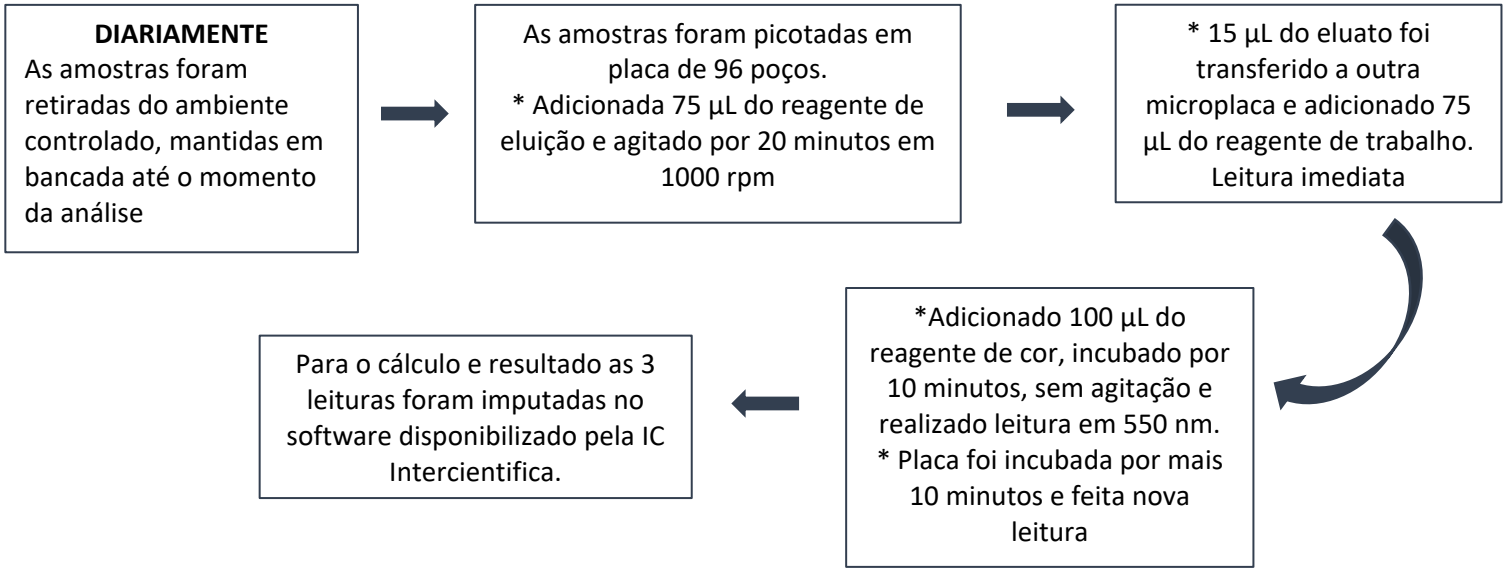
4.5 Coleta do material biológico em papel filtro

Amostras de sangue de 36 participantes foram coletadas em papel filtro, por coleta capilar, em dedo anelar, utilizando a metodologia de sangue seco em papel filtro. Desses participantes, 17 eram deficientes da atividade da enzima G6PD, previamente diagnosticados, e 19 participantes com atividade normal da enzima G6PD. De cada participante foi coletado 3 papeis filtros, cada um com 6 circunferências a serem preenchidas. Todas as amostras seguiram os padrões de

qualidade recomendados no documento Triagem Neonatal Biológica: Manual Técnico[96].

. Após coleta, os papeis filtros foram mantidos durante três horas em temperatura ambiente para secagem completa, sem influência mecânica de calor ou frio. Logo após, as amostras foram distribuídas em três grupos, G1 (temperatura ambiente), G2 (geladeira 4 – 8°C) e G3 (freezer -20 °C), armazenadas em sacos com zíper na presença de 6,5g de sílica dessecante, protegidas da luz por papel laminado e acondicionadas em caixas de isopores. As temperaturas, máxima, atual e mínimas, foram monitoradas e registradas diariamente.

Diariamente as amostras eram retiradas do ambiente de armazenamento, mantidas sob a bancada em temperatura ambiente, aproximadamente 25ºC, por 30 minutos. Logo após eram testadas. Este ciclo foi repetido durante 15 dias consecutivos, sempre no período matutino. A primeira leitura foi realizada 24 horas após a coleta e determinou a linha de base para comparação da % de atividade residual, obtidas nas análises subsequentes. O organograma abaixo explica o passo a passo do procedimento realizado diariamente para as análises.



4.6 Ensaio da atividade da G6PD

Os kits utilizados foram doados pela Empresa Intercientifica. O kit NeoLISA® G6PD foi usado para determinação da atividade enzimática da Glicose-6-Fosfato

Desidrogenase (G6PD) em amostras de papel filtro. Não há conflitos de interesse ou qualquer ligação com a empresa, apenas foi solicitado a doação do teste para a realização da pesquisa.

O ensaio tem como princípio a metodologia enzimática colorimétrica, utilizando a Glicose-6-fosfato Desidrogenase, que na presença de NADP catalisa a oxidação da glucose-6-fosfato a 6-fosfoglunato. O produto NADPH é medido colorimetricamente e o resultado é baseado no aumento das densidades óticas. O cálculo considera a diferença das leituras realizadas em 550nm no intervalo de 10 minutos e a correção da atividade da amostra é feita usando o filtro de 405nm, o resultado é liberado U/gHb. Neste estudo foi adotado como *cutoff* os valores descritos em bula: atividade normal > 6,7 U/g Hb; intermediária: 2,2 – 6,6U/g Hb e deficiente ≤ 2,1 U/g Hb.

As amostras de papel filtro foram picotadas em microplaca de 96 poços, dois picotes por poço, em duplicata. Adicionada 75 µL do reagente de eluição e agitado por 20 minutos em 1000 rpm. Logo após, 15 µL do eluato foi transferido a outra microplaca e adicionado 75 µL do reagente de trabalho. Imediatamente foi realizada leitura em 405 nm, as placas foram então incubadas por 10 minutos. Em seguida, foi adicionado 100 µL do reagente de cor, incubado por 10 minutos, sem agitação e realizado leitura em 550 nm. Logo após, as placas foram incubadas por mais 10 minutos e uma nova leitura realizada em 550 nm.

Par a o cálculo as três leituras foram imputadas no software disponibilizado pela Empresa Intercientifica.

4.7 Capacidade Seis Sigma

A capacidade sigma foi calculada utilizando os dados brutos por participante nos dias 1, 7 e 15, para cada grupo (G1 – G2 – G3). Foram considerados DEFEITO os resultados <6,7 U/gHb, cutoff do kit para os indivíduos que sabidamente não são deficientes. As UNIDADES foram as quantidades de amostras avaliadas em cada grupo por dia. As OPORTUNIDADES são os tipos de defeitos avaliados, no caso de testes de diagnóstico a oportunidade de defeito é 1 (ou é positivo para a deficiência da G6PD ou negativo para a deficiência G6PD).

O DPMO foi calculado multiplicando os defeitos por unidade por 1.000.000 e capacidade sigma foi adquirida a partir do Z-Bench. A tabela 4 mostra a ordem de classificação sigma.

Tabela 7. Classificação sigma associado ao número de defeitos por milhão de oportunidades.

δ (Capacidade do processo)	PPM (Defeitos por milhão de oportunidade DPMO)
1	690.000
2	308,537
3	66,807
4	6,210
5	233
6	3,4

4.8 Avaliação do perfil epidemiológico da deficiência da G6PD na cidade de Campo Grande - MS

Foram incluídos neste estudo indivíduos atendidos em Unidades Básicas de Saúde (UBS) da cidade de Campo Grande. Para garantir uma representação abrangente de diferentes perfis sociais, as coletas foram realizadas em uma unidade por distrito, considerando a divisão do município em 7 distritos. Um total de 427 amostras foi coletado de voluntários, tanto homens quanto mulheres.

Critérios de Inclusão:

Ter mais de 18 anos;

Ser acompanhado na Unidade de Saúde Básica;

Assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Criterios de exclusão:

Ter recebido transfusão sanguínea nos ultimos 90 dias;

Estar em processo infeccioso/inflamatório no momento ou 15 dias antes da coleta.

4.8.1 Amostras

A tecnologia empregada foi de sangue seco em papel filtro. As amostras foram coletadas conforme descrito no iten 4.5 deste documento. Após secagem do material

biológico, este foi armazenado em sacos plásticos com zíper e mantidas em -20ºC, de acordo com o estudo de condições pré-analíticas realizado por este grupo.

Para as análises foi utilizado o mesmo kit comercial (REF. 3570-200 São José dos Campos -SP, Brasil) empregado anteriormente e ponto de corte adotado foi o mesmo descrito no item 4.6

4.9 Estatística

A hipótese nula era que a condição de armazenamento e o tempo entre acoleta e análise não influenciavam na atividade da enzima G6PD. Para o teste de hipótese foi usado Anova para identificar diferença entre as médias da atividade da enzima entre os dias de análise do mesmo grupo. O teste Kruskal-Wallis foi usado para comparar a média da atividade G6PD nas diferentes temperaturas para o mesmo grupo (deficientes e não deficientes).

A análise de correlação de Spearman foi realizada para avaliar a relação entre atividade da enzima G6PD*temperatura e entre a atividade da enzima G6PD*tempo. A regressão linear foi realizada para descrever a partir de modelo matemático as relações existentes entre as variáveis. Foram considerados significativos os valores de $p<0,05$. As análises estatísticas foram realizadas usando GraphPad Prism 5 e IBM SPSS Statistics 22.

5. RESULTADOS

5.1 Resultados das análises da atividade da enzima G6PD em papel filtro

5.1.1Características visuais do papel filtro

Dentre as recomendações para o uso do papel filtro, como material biológico para fins de diagnóstico, está a coleta e armazenamento adequado. A figura 7 mostra as características visuais do papel filtro em cada condição de armazenamento (G1, G2 e G3). Visualmente é possível identificar que o papel filtro mantido em temperatura ambiente (G1) está com a coloração mais próxima do marrom e aspecto de ressecamento, que os mantidos sob refrigeração (G2) e congelamento (G3).

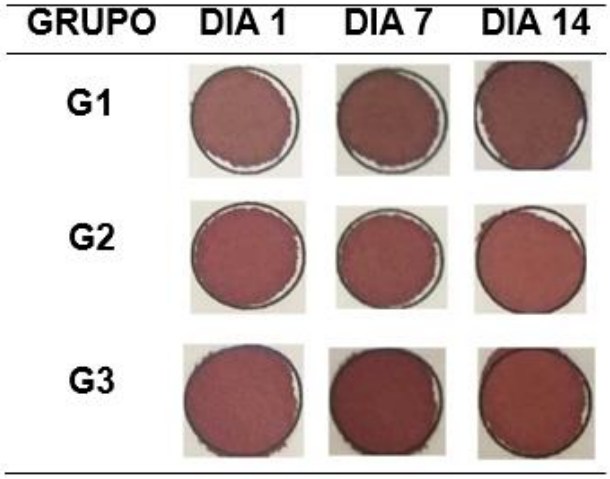


Figura 7. Características visuais do papel filtro que indicam a qualidade da coleta, preenchimento total da circunferência, sem aspecto de sobreposição de amostra e secagem adequada do material biológico. As amostras foram avaliadas nos dias 1, 7 e 14 e demostram diferença na coloração entre o grupo G1 e os grupos G2 e G3.

5.1.2 Condições de armazenamento e casuística

O grupo G1 foi condicionado a temperatura média de 25,54°C (IC 95% 24,88 – 26,20). O G2, armazenado em geladeira, foi mantido em temperatura média de 5,0 °C (IC 95% 4,01–5,98) e o G3, armazenado no freezer, foi condicionado a temperatura média de -20,5 °C (IC 95% -21,48 -19,51). Todas as amostras foram armazenadas na presença de sílica gel dessecante para evitar a absorção de umidade pelo papel filtro.

O estudo incluiu 36 participantes, sendo 17 deficientes da atividade da enzima G6PD e 19 participantes com atividade normal da G6PD.A atividade enzimática foi avaliada 24 horas após a coleta, caracterizando a linha de base, os grupos

apresentaram as seguintes médias para amostras deficientes e não deficientes da G6PD, respectivamente: G1 (2,067 U/gHb IC 95% 1,766 – 2,368) e (6,78 U/gHb IC 95 % 6,38 – 7,19), G2 (2,45 U/gHb IC 95% 2,29 – 2,64) e (8,27 U/gHb IC 95 % 7,82 – 8,79) e G3 (2,70 U/gHb IC 95 % 2,49 – 2,93) e (8,27 U/gHb IC 95 % 7,85 – 8,64).

5.1.3 Viabilidade da G6PD em papel filtro

Foi observada diferença entre as médias da atividade da enzima nas condições de armazenamento para os dois status da deficiente da G6PD, durante os 15 dias de análise. A tabela 8 mostra a comparação entre G1*G2, G1*G3 e G2*G3 e a figura 8 mostra a média de cada grupo e a variação de atividade entorno da média.

Tabela 8. Média da atividade da enzima G6PD durante todo o período de armazenamento, nas 3 condições de temperatura.

Status da G6PD	Condição de armazenamento			P
	Ambiente	5ºC	-20ºC	
Deficiente	1,20 [a] IC95% (0,99 – 1,41)	1,99 [b] IC95%(1,88 – 2,11)	2,16 [c] IC95%(2,07 – 2,26)	<0,0001
Não deficiente	4,13[a] IC95%(3,57 – 4,81)	6,81[b] IC95%(6,44 – 7,23)	7,48[c] IC95%(7,20 – 7,82)	<0,0001

Os dados apresentados são as médias e entre parênteses os intervalos de confiança 95%. Letras diferentes nas linhas mostram as diferenças entre os grupos. Foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

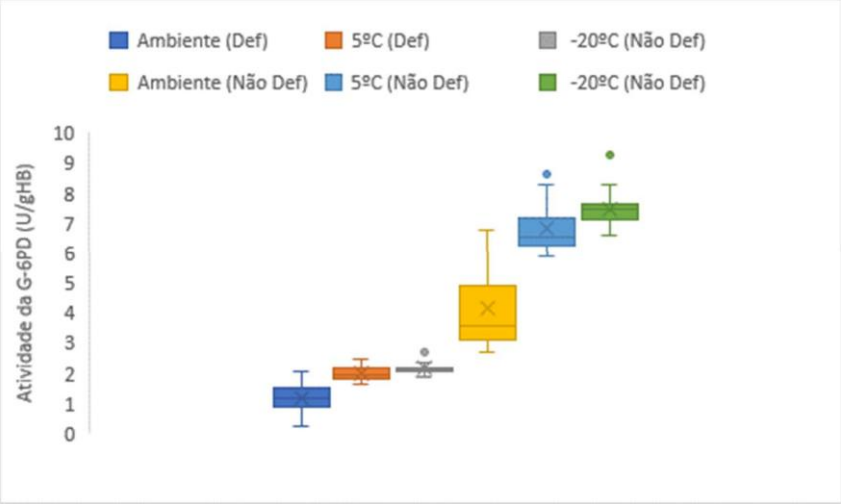


Figura 8. O gráfico mostra a média da atividade da enzima nas diferentes temperaturas. O box mostra a variabilidade da atividade da enzima entorno da média, durante os 15 dias de análise.Os círculos acima da barra de desvio padrão.

A atividade residual foi avaliada durante 15 dias consecutivos, o grupo G1 apresentou queda gradual durante o período de armazenamento. Entre os dias 1 e 3 foi possível observar redução de mais de 25% da atividade, pois a linha de base média da atividade era de 2,067 U/gHb (IC 95% 1,766 – 2,368) passou para 1,529 (IC 95% 1,321 - 1,738) em amostras deficientes. Em não deficientes a média foi de 6,789 U/gHb (IC 95% 6,388 – 7,191) para 4,905 U/gHb (IC 95% 4,556 – 5,255). No oitavo dia após a coleta, a queda de atividade enzimática foi superior a 40%, levando a média de atividade enzimática para 1,194 U/gHb (IC 95% 1,008 - 1,380) e 3,553 U/gHb (IC 95% 3,188 - 3,917), nas amostras deficientes e não deficientes, respectivamente. No décimo segundo dia a queda da atividade enzimática foi superior a 50% e as médias reduziram para 0,9176 U/gHb (IC 95%0,7167 - 1,119) e 3,253 U/gHb (IC 95% 2,974 - 3,532), amostras deficientes e não deficientes, respectivamente. Ao final dos 15 dias a queda foi de 61% da atividade enzimática inicial e a média da atividade enzimática diminuiu para 0,8118 U/gHb (IC 95% 0,6796 - 0,9440) nas amostras deficientes e 2,705 U/gHb(IC 95% 2,495 - 2,915) nas amostras não deficientes. Figura 9.

O grupo G2 apresentou redução de 15% da atividade enzimática entre os dias 1 e 3, a linha de base da atividade enzimática foi de 8,279 U/gHb (IC95% 7,728 – 8,830) para 7,021 U/gHb (IC 95% 6,514 – 7,528) nas amostras não deficientes e 2,459 U/gHb (IC 95% 2,252 – 2,666) para 2,059 U/gHb (IC 95% 1,797 - 2,321) nas deficientes. No oitavo dia de análise as amostras não deficientes haviam perdido 22% da atividade enzimática e as amostras deficientes 24%, essa quedareflete uma média de atividade de 6,379 (IC 95% 5,778 - 6,980) e 1,865 U/gHb(IC 95% 1,561 - 2,169), respectivamente. Ao final dos 15 dias, as amostras não deficientes perderam 29% da atividade enzimática, enquanto nas deficientes a queda foi de 32%, retratando nas médias de atividade 5,874 U/gHb (IC 95% 5,508 - 6,239) e 1,671 U/gHb (IC 95% 1,496 - 1,846), respectivamente.

No grupo G3 a diminuição da atividade enzimática até o décimo dia não chegava a 10%, para as amostras não deficientes, mas chegava a 24% para as amostras deficientes. Nesse grupo, a atividade média na linha de base foi de 8,274 U/gHb(IC 95% 7,860 - 8,687) para 7,137 U/gHb (IC 95% 6,589 - 7,684) no décimo dia, amostras não deficientes e de 2,706 U/gHb (IC 95% 2,457 – 2,955) para 2,041 U/gHb (IC 95% 1,761 - 2,321) nas amostras deficientes. Ao final do período de armazenamento, a queda foi de 20,37% nas amostras não deficientes e de 30,86% nas deficientes. Nas médias da atividade essa queda representa 6,589 U/gHb (IC 95%

6,147 – 7,032) nas amostras não deficientes e 1,871 U/gHb (IC 95% 1,591- 2,150) para as deficientes. Figura 10.

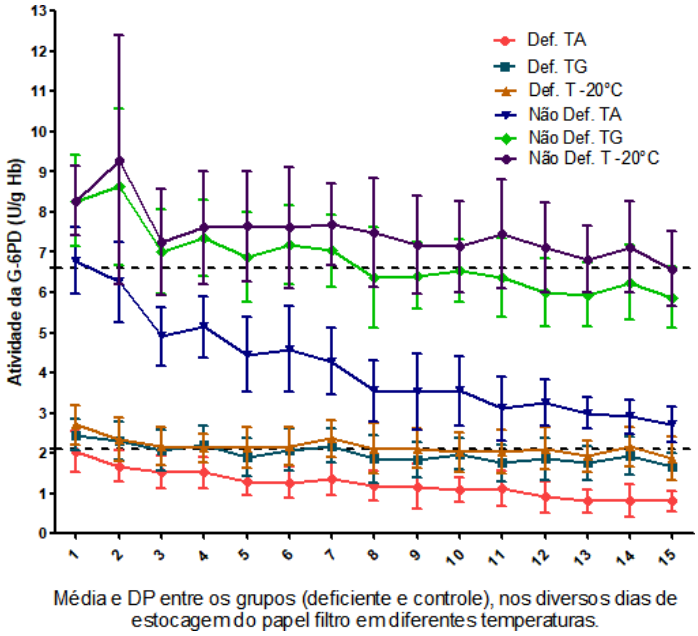


Figura 9. Comparação gradual da queda da atividade da enzima G6PD em papel filtro, entre os grupos, no período de 15 dias. A linha tracejada superior delimita o cutoff de 6,7 U/gHb, acima deste ponto as amostras são consideradas com atividade normal da enzima G6PD. A linha tracejada inferior delimita o *cutoff* 2,1 e as amostras abaixo deste valor são consideradas deficientes, entre a linha superior e inferior à atividade é considera intermediária. (Def: amostras deficientes; Não Def: amostras com atividade da G6PD normal; TA: temperatura ambiente; TG : temperatura 2-8 ºC; T -20ºC: amostras mantidas sob congelamento)

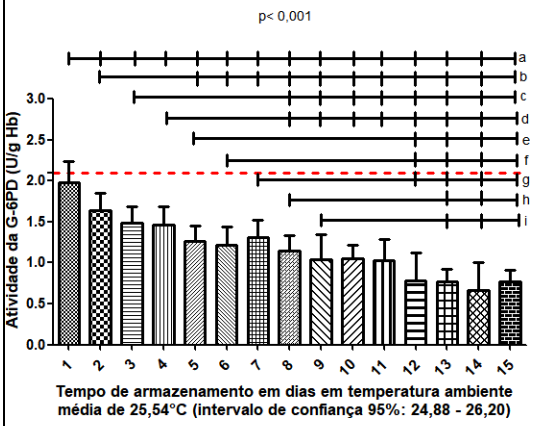
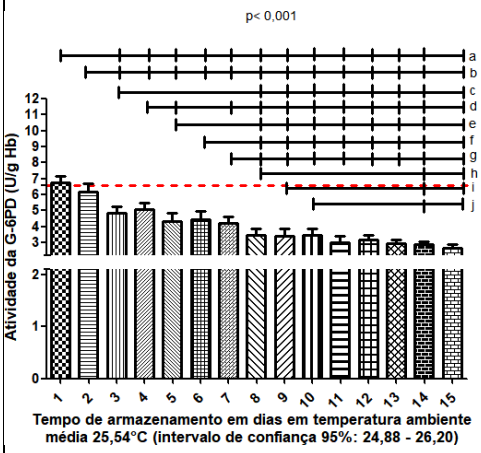
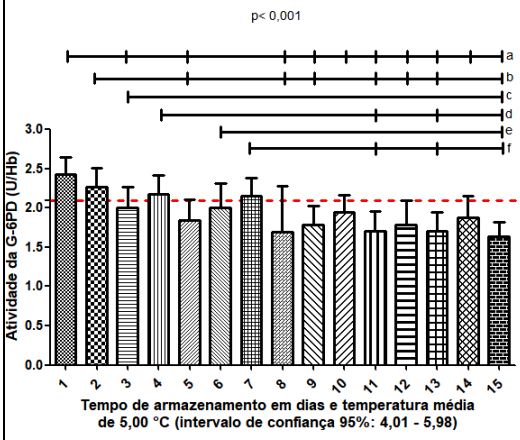
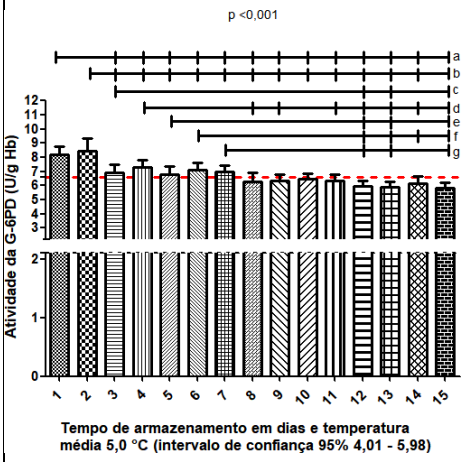
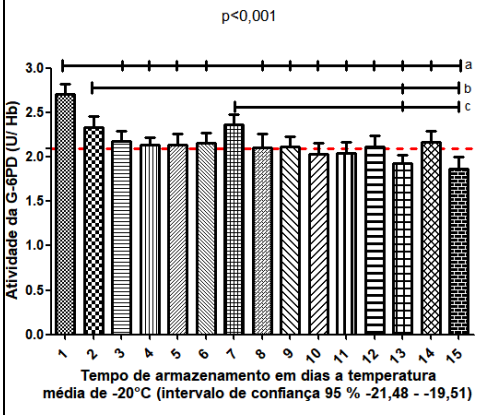
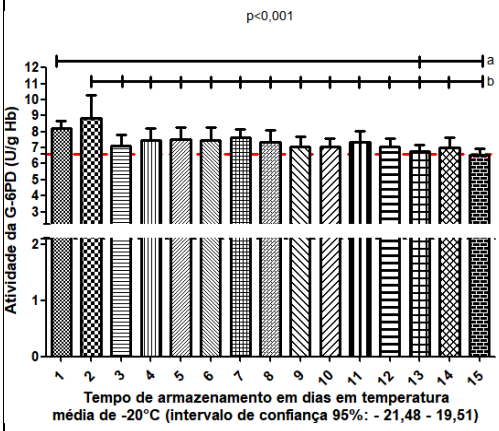
Grupo Deficiente da enzima G6PD	Grupo não Deficiente da enzima G6PD
A  	
B  	
C  	

Figura 10. Estabilidade da enzima G-6PD em papel filtro, armazenada por 15 dias, nas seguintes condições: A e D) temperatura ambiente (25,5 ºC); B e E) condição refrigerada (5,0 ºC); e C e F) condição a -20,5 ºC. A, B e C representam amostras do grupo com deficiência de G-6PD, enquanto D, E e F representam amostras do grupo sem deficiência de G6PD. As letras, linhas e barras mostram a diferença dia a dia durante o armazenamento ($p < 0,001$).

5.1.4 Análise de correlação

A análise de correlação de ordem de classificação de Spearman revelou moderada associação negativa e estatisticamente significativa entre a atividade da enzima G6PD e a temperatura ($rh0 = - 0,688$, $p < 0.0001$). Já entre a atividade da enzima G6PD e o tempo da coleta até a análise a associação foi negativa e fraca ($rh0 = - 0,361$, $p < 0.0001$). Tabela 9.

De modo geral, considera-se correlação: fraca quando o r está entre 0,1 a 0,49, moderada quando o r está entre 0,50 a 0,70 e forte quando o r está entre 0,71 a 1,00

Tabela 9. Correlação entre atividade da enzima G6PD, o tempo de armazenamento e a temperatura, para amostras com atividade normal da G6PD.

			Tempo de armazenamento	Temperatura
Teste Spearman's	Atividade da G6PD	Coeficiente de correlação	-,361 ** (p<0,001)	-,688 ** (p<0,001)
		N	855	855

** representa a diferença significativa e entre parênteses está o valor de p.

5.1.5 Regressão linear

A regressão linear forneceu o modelo que melhor descreve como a atividade da enzima G6PD diminui no grupo não deficiente e deficiente, com um aumento nas variáveis de exposição: temperatura e tempo de armazenamento.

No modelo 1, amostras não deficientes, o R^2 foi de 0,586, o que mostra que 58% dos resultados de atividade da G6PD são explicados pela temperatura e tempo de armazenamento. A tabela 7 mostra que a cada aumento de 1 grau de temperatura ocorre uma redução na atividade da enzima de 0,072 U/gHb. E a cada dia de armazenamento acontece a redução na atividade da enzima de 0,177 U/gHb. O valor beta identifica a variável que influencia mais na atividade da enzima, quanto maior o

valor de beta, maior a influência. O valor de beta da temperatura - 0,663 e do tempo de armazenamento é de -0,381. Os resultados mostram que não existe efeito de multicolinearidade entre as variáveis, ou seja, tempo de armazenamento e temperatura não estão correlacionadas, esta informação é provada pelo valor de tolerância superior a 0,01 e VIF inferior a 10.

O modelo 2, amostras deficientes da G6PD, apresentou o R^2 de 0,412, ou seja, 41% da atividade da enzima é explicada pelos fatores temperatura e tempo de armazenamento. A regressão mostra que a cada aumento de 1 grau de temperatura ocorre uma redução na atividade da enzima de 0,020 U/gHb. E a cada dia de armazenamento acontece a redução na atividade da enzima de 0,047 U/gHb. O valor beta de - 0,567 identifica que a variável de maior influência é a temperatura. Assim como no modelo 1, as variáveis independentes não apresentaram colinearidade. Quadro 1.

Quadro1. Modelo de regressão linear para atividade da G6PD em amostras deficientes e não deficientes.

Modelo		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	p	IC 95,0%		Colinearidade	
		B	EP	Beta		Inferior	Superior	Tolerância	VIF
1	Atividade da enzima G-6PD	7,803	0,093		<0,001	7,620	7,986		
	Temperatura	- 0,072	0,002	- 0,663	<0,001	-,077	-,068	1,000	1,000
	Tempo de armazenamento (Dias)	- 0,177	0,010	- 0,381	<0,001	-,197	-,157	1,000	1,000
2	Atividade da enzima G-6PD	2,314	0,039			2,238	2,391		
	Temperatura	-0,020	0,001	- 0,567	<0,001	- 0,022	- 0,018	1,000	1,000
	Tempo de armazenamento (Dias)	-0,047	0,004	- 0,304	<0,001	- 0,055	- 0,038	1,000	1,000

Quadro 1. Para aquisição dos modelos foi utilizado como variável dependente a atividade da enzima G6PD e independentes a temperatura e o tempo de armazenamento. Modelo 1 (amostras não deficientes); Modelo 2 (amostras deficientes). B: coeficiente de regressão; EP: Erro padrão do coeficiente; VIF: mede o quanto a variância do coeficiente B esta sendo inflada por multicolinearidades entre as variáveis independentes.

5.1.6 Capacidade Seis Sigma

A métrica é baseada na quantidade de defeitos em 1 milhão de oportunidades. O grupo G1 apresenta a menor capacidade sigma desde o primeiro dia de análise, no dia 7 e 15 apresenta o mesmo número de defeitos, por não distinguir nenhum indivíduo não deficiente corretamente. Enquanto o grupo G3 apresenta excelência no processo no dia 1, atingindo a maior capacidade sigma. O grupo G2 e G3 apresentam os menores números de defeitos até o dia 7, ambos aumentando no dia 15. Os dados podem ser observados na tabela 10.

Tabela 10. Conversão do DPMO em escala sigma.

GRUPOS		Defeitos	Unidades	Oportunidades	Defeitos por milhão de oportunidades	Capacidade sigma
G1	Dia 1	10	36	1	277.777	2,20
	Dia 7	19	36	1	527.777	1,73
	Dia 15	19	36	1	527.777	1,73
G2	Dia 1	1	36	1	27.777	3,42
	Dia 7	5	36	1	138.88	2,63
	Dia 15	15	36	1	444.44	1,86
G3	Dia 1	0	36	1	3.4	6,00
	Dia 7	3	36	1	83.333	2,91
	Dia 15	11	36	1	305.556	2,13

5.2 Triagem da deficiência da enzima G6PD em Campo Grande - MS

Foi coletado e analisado no município de Campo Grande 426 amostras, com o objetivo de investigar a atividade da enzima G6PD. Das 426 amostras, 297 (69.7%)

correspondiam a mulheres, enquanto 129 (30.3%) eram homens. Houve uma diversidade na distribuição etária, com 11.3% dos participantes entre 18 e 25 anos, 62.9% entre 25 e 49 anos, 25.3% entre 50 e 74 anos, 0,5% acima de 75 anos.

As amostras foram submetidas à avaliação enzimática colorimétrica da atividade da enzima G6PD e classificadas em três faixas: abaixo de 2,1 U/gHb (deficientes), entre 2,2 e 6,6 U/gHb (atividade intermediária), e acima de 6,7 U/gHb (atividade normal). Cinco amostras foram identificadas como deficientes, com atividade média de 1,47 U/gHb IC95% (0,82 – 2,35). Setenta e sete amostras apresentaram atividade intermediária, média de 5,68 U/gHb IC95% (5,40 – 5,90). As trezentas e trinta e quatro amostras demonstraram atividade normal, com atividade média de 8,07 U/gHb IC95% (7,75 – 8,33). Figura 11.

As amostras classificadas como deficientes e intermediárias foram submetidas a uma segunda análise, em duplicata, no mesmo material coletado. Na repetição dos testes foi identificado que 12 participantes interpretadas como intermediárias na primeira análise, tinham atividade normal, 5 permaneceram com atividade deficiente e 62 intermediárias. Atividade deficiente foi observada em 3 mulheres e 2 homens, enquanto a intermediária foi identificada em 21 homens e 41 mulheres. Nessa triagem a prevalência da deficiência da G6PD foi de 1.2 %, enquanto 14.5% dos indivíduos demonstraram atividade intermediária e 84.2% atividade normal.

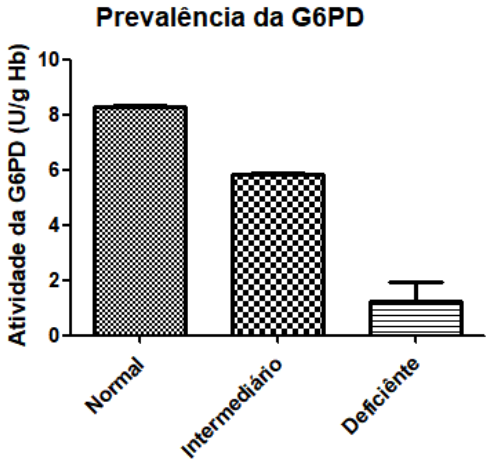


Figura 11. O gráfico ilustra os resultados de triagem da deficiência da G6PD em 426 voluntários atendidos em Unidades Básicas de Saúde na cidade de Campo Grande. As atividades da enzima <2.1 foram consideradas deficientes; entre 2.2 e 6.6 foram consideradas intermediária e acima de 6.7 atividade normal. O gráfico retrata as médias após as repetições.

6. DISCUSSÃO

Esse estudo responde aos questionamentos levantados pela CONITEC, a respeito da viabilidade das amostras de papel filtro para a dosagem da enzima G6PD, além de fornecer informações pragmáticas aos laboratórios. Para isso, avaliamos a correlação e o efeito do tempo e da temperatura na atividade da enzima G6PD em sangue seco coletado em papel filtro.

O papel filtro é usado a mais de 100 anos para aplicação de diferentes fluidos biológicos. Este modelo de coleta foi inovador, por utilizar pouco material biológico, ser menos invasivo, de facil manuseio e armazenamento. A metodologia de sangue seco em papel filtro se tornou conhecida por ser a matriz utilizada na triagem neonatal, mas ela não se limita somente a esta análise, pode ser usada em outros campos de estudo como: doenças infecciosas, monitoramento medicamentoso, teste de DNA, hemoglobinopatias, toxicologia, entre outros. A demanda em diferentes áreas do conhecimento proporcionou um crescimento e disponibilidade de novos métodos e técnicas usando o papel filtro como matriz [97].

Com uso frequente do papel filtro, para fins de diagnóstico, a preocupação com a fase pré-analítica também aumentou. Então, em 2015, os pesquisadores Grüner, Stambouli e Ross propuseram um protocolo para coleta, secagem, transporte, armazenamento e processamento do papel filtro, e o testaram por método de imunoensaio para diferentes doenças infecto contagiosas. Dentre as observações descritas no estudo, está a possibilidade de discrepância entre os resultados de um mesmo participante, devido ao baixo volume de amostra ou coleta inadequada [98].

Nosso estudo teve a preocupação de minimizar essa variável incluindo somente amostras adequadas, com as circunferências preenchidas completamente, sem saturação da amostra devido à sobreposição de material biológico, com absorção perfeita ultrapassando o papel filtro e secagem completa do sangue. Durante o período de avaliação, foi observado que o papel filtro armazenado em temperatura ambiente tinha coloração mais escurecida, quando comparado aos grupos que estavam sob refrigeração e congelamento. Essa característica pode ser explicada pelo ressecamento que a amostra sofreu, durante o período de exposição a temperaturas, muitas vezes próximo a 30ºC, característica natural do estado do Mato Grosso do Sul.

A atividade média dos grupos analisados foi diferente desde as primeiras 24 horas, sendo o grudo G1 mais instável, com a média da atividade da G6PD nas amostras não deficientes de 6,78 U/gHb, enquanto aqueles mantidos sob criopreservação G2 e G3 foi de 8,27 U/gHb. O grupo em temperatura ambiente mostrou-se estatisticamente diferente dos demais grupos ($p< 0,0001$). No dia 1 já se observou uma queda de 18% de atividade enzimática, o que evidencia a interferência da temperatura na estabilidade da enzima. O estudo de Castro et al. 2005 comparou a estabilidade da enzima G6PD em papel filtro e em sangue preservado em EDTA, nos dias 0, 3, 10 e 15 após coleta, e relatou que o aumento da temperatura diminuiu a atividade da enzima [99].

O nosso estudo avaliou durante 15 dias, a cada 24 horas, com isso foi possível demonstrar a queda gradativa e identificar o dia ideal para a avaliação do analito em cada condição de armazenamento. O grupo G1 evidenciou a necessidade de celeridade na dosagem, especialmente nas amostras não deficiente, pois, a partir do Dia 2, a média de atividade fica inferior ao *cutoff* 6,7 U/gHb, limiar que difere a população com atividade normal daqueles com atividade intermediária. O resultado demonstra que em temperatura média de 25,54 ºC a amostra deve ser analisada nas primeiras 48h, para minimizar as chances de classificação errônea, por resultados falso-positivos, decorrente da temperatura.

Os grupos G2 e G3 passaram diariamente por ciclos quente-frio, pois, eram retirados do ambiente controlado e mantidos em bancada até o momento da análise. Esses ciclos mimetizam o que ocorre nos laboratórios de análises, visto que a mesma amostra pode ser dosada para diferentes parâmetros e em vários momentos. Este processo quente-frio pode ser considerada uma limitação metodológica, uma vez que já foi avaliada a estabilidade da atividade enzimática, utilizando-se de ciclos quente-frio, nos tempos 1, 4, 8 e 12 meses, e ficou confirmado que esse processo acelera a degradação da enzima [100].

Os grupos mantidos em baixas temperaturas retrataram maior estabilidade na média da atividade da enzima. G2 se manteve dentro do cutoff até o sétimo dia com atividade média preservada de 84,93%, já no oitavo dia de armazenamento a média foi de 6,379 U/gHb, ficando a partir deste dia com status de atividade intermediaria, inferior ao cutoff de 6,7 U/gHb. Sendo assim, a média da atividade das amostras condicionadas a 5º C é estável até o sétimo dia após a data da coleta, por isso

recomendamos que o processamento seja realizado nesse período, afim de diminuir as chances de resultados falso-positivos.

O armazenamento a vinte graus negativos (– 20ºC) demonstrou ser a condição mais eficiente para preservar a atividade da G6PD por até 15 dias. O grupo condicionado a essa temperatura manteve 79,63% da atividade da enzima ao final dos 15 dias de avaliação e demonstrou o melhor desempenho, já que durante todo o tempo de armazenamento a média da atividade enzimática do grupo não deficiente somente ultrapassou o *cutoff* para atividade intermediaria no décimo quinto dia. Isso sugere que, laboratórios com estrutura adequada podem realizar a análise dentro de um período mais amplo.

É conhecido que a variabilidade da temperatura, especialmente os ciclos quente-frios alteram a estabilidade da amostra [100; 101]. No entanto, mesmo utilizando ciclos quente-frios, as amostras do grupo G3 apresentaram-se viáveis durante o período de armazenamento.

A dificuldade de padronizar as condições de armazenamento fica evidente nos estudos, justamente pela diversidade de métodos. Jalil et al. (2016) avaliaram amostra em papel filtro e em sangue total, armazenadas durante 7 dias, pelo método de espectrofotometria e concluíram que pela metodologia de papel filtro existe queda de atividade desde o primeiro dia de armazenamento e ao final a queda chega a 33% [102]. Em contrapartida, Flores et al. (2017), utilizando ensaio semi-quantitativo, encontraram resultados diferentes. Ao final de 30 dias de armazenamento, as amostras mantidas em temperatura ambiente perderam 23% da atividade da G6PD e as mantidas sob refrigeração e congelamento mantiveram 90% e 95% da atividade, respectivamente [101]. Chamchoy et al. (2021), trouxeram porcentagem de degradação nos tempos de 4, 8 e 12 meses de armazenamento. Durante este período, a atividade da enzima G6PD nas amostras armazenadas a 37ºC mantiveram somente 10% da atividade; nas mantidas a 25ºC, após 4 meses, restaram 31% da atividade; a 4ºC, ao final de 12 meses, a atividade restante era de 74 a 80%; e a -20ºC as amostras mantiveram 90% da atividade da enzima [100].

A degradação enzimática observada na condição de temperatura ambiente e causada pelos ciclos quente-frios é atribuída pelo desdobramento que ocorre após exposição a altas temperaturas, perturbando a viabilidade da atividade da enzima.

Esse prejuízo na viabilidade ocorre independente da presença ou ausência da deficiência [103].

A correlação moderada observada na regressão linear, no qual 58% da atividade da enzima G6PD é influenciada pela temperatura e pelo tempo de armazenamento, chama a atenção para a influência de outras variáveis não controláveis. Castro (2006), levanta a hipótese que fatores inerentes à própria célula, incluindo a idade dos eritrócitos e a proteção microambiental, podem também ter relação com as características da amostra [15; 99]. Essa hipótese é reforçada ao observar a diversidade de respostas, encontradas nos estudos, para amostras mantidas sob condições semelhantes, mesmo considerando as diferentes metodologias.

Durante a validação de um método analítico, é avaliado o potencial de sensibilidade e especificidade do teste, ou seja, potencial do ensaio discriminar o indivíduo verdadeiro doente do indivíduo verdadeiro saudável. Nosso estudo não teve o objetivo de validar o ensaio, por isso calculamos qual o defeito por milhão de oportunidade para os grupos G1, G2 e G3, nos dias 1, 7 e 15, o DPMO é a principal métrica baseada em defeitos utilizado na metodologia Seis Sigma, avaliando a quantidade de erros ao identificar uma amostra não deficiente, como deficiente [104].

Fica evidente que a média das amostras não retrata a variabilidade dos resultados. Quando analisamos a quantidade de erros através dos dados brutos, é possível verificar que algumas amostras mantidas sob refrigeração e congelamento apresentam instabilidade, reforçando a hipótese de que perfil da amostra interfere diretamente nos resultados, uma vez que mantidas nas mesmas condições apresentaram variabilidade de resultados.

Ao observar a tabela de erros por grupos, fica explícito que a temperatura ambiente é tão nociva que o tempo de armazenamento não importa, uma vez que todas as amostras não deficientes no sétimo dia são identificadas como deficientes. Já os grupos G2 e G3 mostram-se mais eficientes na identificação e pouco ou nenhum erro nos dias 1 e 7.

A preocupação com a condição de armazenamento é voltada para as amostras de pacientes não deficientes, já que as amostras de indivíduos deficientes, independentes da condição de armazenamento, apresentarão atividade enzimática diminuída. E o status do paciente não muda, ou seja, não existe prejuízo na

classificação. De qualquer forma, o material biológico deve ser mantido em condições adequadas, para assegurar a eficiência do exame ao laboratório.

Esse estudo traz o primeiro relato de triagem da deficiencia da G6PD no estado do Mato Grosso do Sul. Foram avaliados 426 individuos em 7 distritos da cidade de Campo Grande, com essa triagem foi possível identificar 5 individuos deficientes, estimando a prevalência de 1.1 %. Essa prevalência é semelhante a encontrada no Sudeste do Brasil [64; 66]. Esse relato nos permite inferir que a cidade de Campo Grande tem baixa prevalência da deficiência da G6PD. É um importante resultado para compor o cenário do Brasil, mas necessita de outros estudos moleculares e confirmatórios.

O estudo de padronização da dosagem da G6PD em papel filtro apresentou algumas limitações como não ser realizado o ensaio no dia da coleta e os ciclos de congelamento e descongelamento diários. As amostras poderiam ter sido picotadas antes do armazenadas para minimizar a degradação da enzima. Já o estudo de triagem apresenta limitação relacionada as caracteristicas do ensaio.

CONCLUSÃO

Em conclusão, foi identificado o período de viabilidade das amostras de papel filtro para dosagem da G6PD. Com base nos achados, recomendamos que as amostras em temperatura média de 25,54ºC sejam processadas nas primeiras 48 horas. Os materiais armazenados sob refrigeração e congelamento, mantiveram-se mais estáveis. As amostras armazenadas a 5ºC podem ser processadas até o sétimo dia após a coleta, enquanto aquelas armazenadas a -20ºC mostraram-se viáveis por até 15 dias, mantendo uma atividade enzimática aceitável para a análise.

Consideramos importante estudos posteriores que avaliem as características intrínsecas da amostra, pois, são variáveis que podem influenciar diretamente o seu comportamento frente às condições de armazenamento.

Ademais, o primeiro relato de triagem da deficiência da G6PD no estado do Mato Grosso do Sul, demonstra baixa prevalência na cidade de Campo Grande, esse dado compõe o cenário brasileiro e auxilia em estratégias no contexto da saúde pública.

Referências:

[1] HOWES, R. E. et al. G6PD deficiency: global distribution, genetic variants and primaquine therapy. In: (Ed.). **Advances in parasitology**: Elsevier, v.81, 2013. p.133-201. ISBN 0065-308X.

[2] LUZZATTO, L.; ALLY, M.; NOTARO, R. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. **Blood,** v. 136, n. 11, p. 1225-1240, 2020. ISSN 0006-4971.

[3] LUZZATTO, L.; ARESE, P. Favism and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. **New England Journal of Medicine,** v. 378, n. 1, p. 60-71, 2018. ISSN 0028-4793.

[4] KAPLAN, M.; HAMMERMAN, C.; BHUTANI, V. Parental education and the WHO neonatal G-6-PD screening program: a quarter century later. **Journal of Perinatology,** v. 35, n. 10, p. 779-784, 2015. ISSN 1476-5543.

[5] (CONITEC), C. N. D. I. D. T. N. S. Ú. D. S. **Triagem neonatal para deficiência de enzima desidrogenase deglicose hepática (glicose-6-fosfato desidrogenase, G-6-PD): RELATÓRIO DE RECOMENDAÇÃO**. 380**:** http://antigo-conitec.saude.gov.br/images/Relatorios/2018/Relatorio_Glicose-6-fosfato_TriagemNeonatal.pdf p. 2018.

[6] WHO, W. G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. WHO Working Group. **Bull World Health Organ,** v. 67, n. 6, p. 601-11, 1989. ISSN 0042-9686 (Print) 0042-9686.

[7] PEREIRA, L. L. M. D. et al. Prevalence of G6PD deficiency and molecular characterization of G202A, A376G and C563T polymorphisms in newborns in Southeastern Brazil. **Einstein (São Paulo),** v. 17, 2019. ISSN 1679-4508.

[8] OLIVEIRA, H. S. S. D. et al. Molecular genotyping of G6PD mutations and Duffy blood group in Afro-descendant communities from Brazilian Amazon. **Genetics and Molecular Biology,** v. 41, p. 758-765, 2018. ISSN 1415-4757.

[9] MOURA NETO, J. P. D. et al. A novel c. 197T® A variant among Brazilian neonates with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. **Genetics and Molecular Biology,** v. 31, p. 33-35, 2008. ISSN 1415-4757.

[10] FERREIRA, M. D. F. D. C. **Triagem neonatal de deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase e prevalência das mutações G202A (G6PD A-) e C563T (G6PD Mediterrâneo) em Mato Grosso/Brasil**. 2014. Universidade de São Paulo

[11] CAPPELLINI, M. D.; FIORELLI, G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. **The lancet,** v. 371, n. 9606, p. 64-74, 2008. ISSN 0140-6736.

[12] LUZZATTO, L.; NANNELLI, C.; NOTARO, R. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. **Hematology/Oncology Clinics,** v. 30, n. 2, p. 373-393, 2016. ISSN 0889-8588.

[13] NOTARO, R.; AFOLAYAN, A.; LUZZATTO, L. Human mutations in glucose 6-phosphate dehydrogenase reflect evolutionary history. **The FASEB Journal,** v. 14, n. 3, p. 485-494, 2000. ISSN 0892-6638.

[14] GÓMEZ-MANZO, S. et al. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase: Update and Analysis of New Mutations around the World. **International Journal of Molecular Sciences,** v. 17, n. 12, p. 2069, 2016. ISSN 1422-0067. Disponível em: < https://dx.doi.org/10.3390/ijms17122069 >.

[15] WATCHKO, J. F.; BHUTANI, V. K. **Revised World Health Organization (WHO) classification of G6PD gene variants: Relevance to neonatal hyperbilirubinemia**. Seminars in Fetal and Neonatal Medicine: Elsevier, 2025. 101619 p.

[16] BEUTLER, E.; YEH, M.; FAIRBANKS, V. F. The normal human female as a mosaic of X-chromosome activity: studies using the gene for G-6-PD-deficiency as a marker. **Proceedings of the National Academy of Sciences,** v. 48, n. 1, p. 9-16, 1962. ISSN 0027-8424.

[17] SAAD, S. et al. Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase in Brazil. **Human Heredity,** v. 47, p. 17-21, 1997.

[18] NASCIMENTO, J. R. et al. Prevalence of glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency in highly malaria-endemic municipalities in the Brazilian Amazon: A region-wide screening study. **The Lancet Regional Health-Americas,** v. 12, p. 100273, 2022. ISSN 2667-193X.

[19] MONTEIRO, W. M. et al. G6PD deficiency in Latin America: systematic review on prevalence and variants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** v. 109, n. 5, p. 553-568, 2014. ISSN 0074-0276.

[20] MANCO, L. et al. Heterogeneidade Molecular da Deficiência em Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G6PD) na População Portuguesa. **Acta Médica Portuguesa,** v. 36, n. 2, p. 81-87, 2023. ISSN 1646-0758.

[21] YOSHIDA, A. Evolution of glucose-6-phosphate dehydrogenase variants A+ and A. **Blood,** v. 74, n. 5, p. 1860, 1989. ISSN 0006-4971.

[22] KURDI-HAIDAR, B. et al. Origin and spread of the glucose-6-phosphate dehydrogenase variant (G6PD-Mediterranean) in the Middle East. **American journal of human genetics,** v. 47, n. 6, p. 1013, 1990.

[23] VULLIAMY, T. et al. Diverse point mutations in the human glucose-6-phosphate dehydrogenase gene cause enzyme deficiency and mild or severe hemolytic anemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences,** v. 85, n. 14, p. 5171-5175, 1988. ISSN 0027-8424.

[24] VELA-AMIEVA, M. et al. Genetic spectrum and clinical early natural history of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Mexican children detected through newborn screening. **Orphanet journal of rare diseases,** v. 16, n. 1, p. 1-11, 2021. ISSN 1750-1172.

[25] KAPLAN, M.; BROMIKER, R.; HAMMERMAN, C. Severe Neonatal Hyperbilirubinemia and Kernicterus: Are These Still Problems in the Third Millennium? **Neonatology,** v. 100, n. 4, p. 354-362, 2011. ISSN 1661-7800. Disponível em: < https://dx.doi.org/10.1159/000330055 >.

[26] DONNEBORG, M. L. et al. Extreme neonatal hyperbilirubinemia and kernicterus spectrum disorder in Denmark during the years 2000–2015. **Journal of Perinatology,** v. 40, n. 2, p. 194-202, 2020. ISSN 1476-5543.

[27] NAIR, A. K.; AL KHUSAIBY, S. M. Kernicterus and G6PD deficiency—a case series from Oman. **Journal of tropical pediatrics,** v. 49, n. 2, p. 74-77, 2003. ISSN 1465-3664.

[28] FANELLO, C. I. et al. High risk of severe anaemia after chlorproguanil-dapsone+ artesunate antimalarial treatment in patients with G6PD (A-) deficiency. **PloS one,** v. 3, n. 12, p. e4031, 2008. ISSN 1932-6203.

[29] TARLOV, A. R. et al. Primaquine sensitivity: glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: an inborn error of metabolism of medical and biological significance. **Archives of internal medicine,** v. 109, n. 2, p. 209-234, 1962. ISSN 0003-9926.

[30] CARSON, P. E. et al. Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. **Science,** v. 124, n. 3220, p. 484-485, 1956. ISSN 0036-8075.

[31] SUDSUMRIT, S. et al. Genotype-phenotype association and biochemical analyses of glucose-6-phosphate dehydrogenase variants: Implications for the hemolytic risk of using 8-

aminoquinolines for radical cure. **Frontiers in Pharmacology,** v. 13, p. e1032938, 2022. ISSN 1663-9812.

[32] DOMBROWSKI, J. G. et al. G6PD deficiency alleles in a malaria-endemic region in the Western Brazilian Amazon. **Malaria journal,** v. 16, n. 1, p. 1-9, 2017. ISSN 1475-2875.

[33] JUNEJA, D.; JAIN, R.; NASA, P. Vitamin C-induced Hemolysis: Meta-summary and Review of Literature. **Indian Journal of Critical Care Medicine: Peer-reviewed, Official Publication of Indian Society of Critical Care Medicine,** v. 26, n. 2, p. 224, 2022.

[34] CHEN, Y. et al. Association between aspirin-induced hemoglobin decline and outcome after acute ischemic stroke in G6PD-deficient patients. **CNS neuroscience & therapeutics,** v. 27, n. 10, p. 1206-1213, 2021. ISSN 1755-5930.

[35] SANSONE, S. et al. Ciprofloxacin-induced acute haemolytic anaemia in a patient with glucose-6-phosphate dehydrogenase Mediterranean deficiency: a case report. **Annals of hematology,** v. 89, n. 9, p. 935-937, 2010. ISSN 1432-0584.

[36] OLIVER, M. et al. Homozygous G6PD deficiency and propacetamol induced hemolysis. **Haematologica,** v. 86, n. 9, p. 987-988, 2001. ISSN 1592-8721.

[37] YOUNGSTER, I. et al. Medications and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. **Drug safety,** v. 33, n. 9, p. 713-726, 2010. ISSN 1179-1942.

[38] BERETTA, A.; MANUELLI, M.; CENA, H. Favism: Clinical Features at Different Ages. **Nutrients,** v. 15, n. 2, p. 343, 2023. ISSN 2072-6643. Disponível em: < https://dx.doi.org/10.3390/nu15020343 >.

[39] PAEK, D. S.; NADKARNI, M.; SINGLA, M. Treatment of MRSA infections in an African-American male with G6PD deficiency. **The Journal of emergency medicine,** v. 37, n. 3, p. 273-278, 2009. ISSN 0736-4679.

[40] WILLIAMS, A.; TUGWELL, P.; EDINGTON, G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and lobar pneumonia. Fine structure of the liver. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine,** v. 100, n. 1, p. 25-31, 1976. ISSN 0003-9985.

[41] PAMUK, G. E.; CELIK, A. D.; UYANıK, M. S. Brucellosis triggering hemolytic anemia in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. **Medical Principles and Practice,** v. 18, n. 4, p. 329-331, 2009. ISSN 1011-7571.

[42] VULLIAMY, T. J. et al. Clinical and haematological consequences of recurrent G6PD mutations and a single new mutation causing chronic nonspherocytic haemolytic anaemia. **British Journal of Haematology,** v. 101, n. 4, p. 670-675, 1998. ISSN 0007-1048. Disponível em: < https://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2141.1998.00763.x >.

[43] MENG, Q. et al. Recent findings in the regulation of G6PD and its role in diseases. **Frontiers in Pharmacology**, p. 3356, 2022. ISSN 1663-9812.

[44] THOMAS, J. E. et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency is associated with cardiovascular disease in US military centers. **Texas Heart Institute Journal,** v. 45, n. 3, p. 144-150, 2018. ISSN 0730-2347.

[45] LAI, Y. K.; LAI, N. M.; LEE, S. W. H. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and risk of diabetes: a systematic review and meta-analysis. **Annals of hematology,** v. 96, n. 5, p. 839-845, 2017. ISSN 1432-0584.

[46] ZHANG, Z. et al. High glucose inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase, leading to increased oxidative stress and β-cell apoptosis. **The FASEB Journal,** v. 24, n. 5, p. 1497-1505, 2010. ISSN 0892-6638.

[47] SHAH, M.; GOPALAREDDY, V. Liver Failure in Neonates With G6PD Deficiency. **ACG Case Reports Journal,** v. 9, n. 8, p. e00845, 2022. ISSN 2326-3253.

[48] Cooper, M. Robert, et al. "Complete deficiency of leukocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase with defective bactericidal activity." **The Journal of clinical investigation** 51.4 (1972): 769-778.

[49] VAN BRUGGEN, R. et al. Deletion of leucine 61 in glucose-6-phosphate dehydrogenase leads to chronic nonspherocytic anemia, granulocyte dysfunction, and increased susceptibility to infections. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology,** v. 100, n. 3, p. 1026-1030, 2002. ISSN 1528-0020.

[50] SUN, B. et al. Severe G6PD deficiency leads to recurrent infections and defects in ROS production: Case report and literature review. **Frontiers in Genetics,** v. 13, 2022.

[51] DUNN, L. et al. Dysregulation of glucose metabolism is an early event in sporadic Parkinson's disease. **Neurobiology of aging,** v. 35, n. 5, p. 1111-1115, 2014. ISSN 0197-4580.

[52] TIWARI, M. Glucose 6 phosphatase dehydrogenase (G6PD) and neurodegenerative disorders: Mapping diagnostic and therapeutic opportunities. **Genes & diseases,** v. 4, n. 4, p. 196-203, 2017. ISSN 2352-3042.

[53] MONDAL, A. et al. Role of glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency and its association to autism spectrum disorders. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease,** v. 1867, n. 10, p. 166185, 2021. ISSN 0925-4439.

[54] NKHOMA, E. T. et al. The global prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a systematic review and meta-analysis. **Blood Cells, Molecules, and Diseases,** v. 42, n. 3, p. 267-278, 2009. ISSN 1079-9796.

[55] SANTANA, M. S. et al. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency in an Endemic Area for Malaria in Manaus: A Cross-Sectional Survey in the Brazilian Amazon. **PLoS ONE,** v. 4, n. 4, p. e5259, 2009. ISSN 1932-6203. Disponível em: < https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0005259 >.

[56] FERREIRA, N. S. et al. G6PD deficiency in blood donors of Manaus, Amazon Region, northern Brazil. **International Journal of Laboratory Hematology,** v. 43, n. 6, p. e290-e293, 2021. ISSN 1751-5521.

[57] SANTANA, M. S. et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient variants are associated with reduced susceptibility to malaria in the Brazilian Amazon. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene,** v. 107, n. 5, p. 301-306, 2013. ISSN 1878-3503.

[58] 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. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia,** v. 26, p. 268-273, 2004. ISSN 1516-8484.

[59] DOMINGOS, I. et al. Prevalence and molecular defect characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Brazilian blood donors. **International journal of laboratory hematology,** v. 37, n. 5, 2015. ISSN 1751-5521.

[60] IGLESSIAS, M. A. C. et al. Erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in male newborn babies and its relationship with neonatal jaundice. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia,** v. 32, n. 6, p. 434-438, 2010. ISSN 1516-8484.

[61] MAIA, U. M. et al. Prevalência da deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase em doadores de sangue de Mossoró, Rio Grande do Norte. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia,** v. 32, n. 5, p. 422-423, 2010. ISSN 1516-8484.

[62] SOARES, L. F. et al. Atividade de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) em membros de

povos de terreiros de umbanda na cidade de Teresina, Piauí. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada,** v. 34, n. 3, 2013. ISSN 2179-443X.

[63] DA COSTA, K. M. et al. Deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) em recém-nascidos, numa maternidade pública da cidade de Campina Grande, Estado da Paraíba, Brasil. **Research, Society and Development,** v. 9, n. 11, p. e6399119855-e6399119855, 2020. ISSN 2525-3409.

[64] COMPRI, M. B.; SAAD, S. T.; RAMALHO, A. S. G-6-PD deficiency in a Brazilian community: an investigation involving epidemiological genetics and molecular techniques. **Cadernos de Saúde Pública,** v. 16, n. 2, p. 335-342, 2000. ISSN 0102-311X.

[65] NICOLIELO, D. B.; FERREIRA, R. I.; LEITE, A. A. Atividade da 6-fosfogliconato desidrogenase em deficientes de glicose-6-fosfato desidrogenase. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia,** v. 28, p. 135-138, 2006. ISSN 1516-8484.

[66] FERREIRA, R. I. P.; LEITE, F. R. M.; LEITE, A. A. Polimorfismo genético da glicose-6-fosfato desidrogenase na população da região de Araraquara, Estado de São Paulo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada,** v. 35, n. 3, 2014. ISSN 2179-443X.

[67] BELISÁRIO, A. R. et al. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficiency in Brazilian children with sickle cell anemia is not associated with clinical ischemic stroke or high-risk transcranial Doppler. **Pediatric Blood & Cancer,** v. 63, n. 6, p. 1046-1049, 2016. ISSN 1545-5009.

[68] CASTRO, S. et al. Prevalence of G6PD deficiency in newborns in the south of Brazil. **Journal of medical screening,** v. 13, n. 2, p. 85-86, 2006. ISSN 0969-1413.

[69] CASTRO, S. M. D. et al. Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in patients from the southern Brazilian city of Porto Alegre, RS. **Genetics and Molecular Biology,** v. 30, p. 10-13, 2007. ISSN 1415-4757.

[70] GUTIERREZ CARVALHO, C. et al. Glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency and its correlation with other risk factors in jaundiced newborns in Southern Brazil.

[71] JAFARI, E.; MALEKPOUR AFSHAR, R.; AMINZADE, R. Rates and Reasons of Laboratory Sample Rejection due to Pre-analytical Errors in Clinical Settings. **Archives of Iranian Medicine,** v. 25, n. 3, p. 166-170, 2022. ISSN 1029-2977. Disponível em: < https://dx.doi.org/10.34172/aim.2022.28 >.

[72] LIMA-OLIVEIRA, G. et al. Pre-analytical phase management: a review of the procedures from patient preparation to laboratory analysis. **Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation,** v. 77, n. 3, p. 153-163, 2017. ISSN 0036-5513.

[73] MARTELLI, A. Gestão da qualidade em laboratórios de análises clínicas. **Journal of Health Sciences**, 2011. ISSN 2447-8938.

[74] DIAS, V. S.; BARQUETTE, F.; BELLO, A. R. Padronização da qualidade: alinhando melhorias contínuas nos laboratórios de análises clínicas. **RBAC,** v. 49, n. 2, p. 164-9, 2017.

[75] BARBOSA, C. M. et al. **A importância dos procedimentos operacionais padrão (POPs) para os centros de pesquisa clínica**: SciELO Brasil. 57**:** 134-135 p. 2011.

[76] PRABHUSHANKAR, G. et al. The origin, history and definition of Six Sigma: a literature review. **International Journal of Six Sigma and Competitive Advantage,** v. 4, n. 2, p. 133-150, 2008. ISSN 1479-2494.

[77] CARVALHO, M. M. D. et al. Implementação de seis sigma no setor de saúde pública: uma abordagem de pesquisa-ação. **Anais.**, 2008.

[78] CARCHIO, S. M. et al. Aplicación de Seis Sigma en el Laboratorio Clínico. **Acta bioquímica**

clínica latinoamericana, v. 53, n. 4, p. 525-537, 2019. ISSN 0325-2957.

[79] CARVALHO, Â. R.; OLIVEIRA, O. L. M. Métrica Seis Sigma em análises clínicas e a qualidade na rotina laboratorial. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, p. 375-380, 2021.

[80] MENDES, I. C. et al. Aspectos gerais da triagem neonatal no Brasil: uma revisão. **Rev Med Minas Gerais,** v. 30, p. e3008, 2020.

[81] FRANK, J. E. Diagnosis and management of G6PD deficiency. **American family physician,** v. 72, n. 7, p. 1277-1282, 2005. ISSN 0002-838X.

[82] WILLIAMSON, M. A.; LM, S. **Wallach: Interpretação de Exames Laboratoriais**: Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2016.

[83] BEUTLER, E.; HALASZ, A. A series of new screening procedures for pyruvate kinase deficiency, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, and glutathione reductase deficiency. **Blood,** v. 28, n. 4, p. 553-562, 1966. ISSN 0006-4971.

[84] ESPINO, F. E. et al. Comparison of Three Screening Test Kits for G6PD Enzyme Deficiency: Implications for Its Use in the Radical Cure of Vivax Malaria in Remote and Resource-Poor Areas in the Philippines. **PLOS ONE,** v. 11, n. 2, p. e0148172, 2016. ISSN 1932-6203. Disponível em: < https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0148172 >.

[85] BREWER, G. J.; TARLOV, A. R.; ALVING, A. S. Methaemoglobin reduction test: a new, simple, in vitro test for identifying primaquine-sensitivity. **Bulletin of the World Health Organization,** v. 22, n. 6, p. 633, 1960.

[86] SHARMA, U. et al. Qualitative and quantitative assay of glucose 6 phosphate dehydrogenase in patients attending tertiary care center. **BMC Research Notes,** v. 13, n. 1, 2020. ISSN 1756-0500. Disponível em: < https://dx.doi.org/10.1186/s13104-020-05145-8 >.

[87] TINLEY, K. E. et al. Evaluation of a Rapid Qualitative Enzyme Chromatographic Test for Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,** v. 82, n. 2, p. 210-214, 2010. ISSN 0002-9637. Disponível em: < https://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0416 >.

[88] KIM, S. et al. Performance of the CareStart™ G6PD Deficiency Screening Test, a Point-of-Care Diagnostic for Primaquine Therapy Screening. **PLoS ONE,** v. 6, n. 12, p. e28357, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0028357 >.

[89] PFEFFER, D. A. et al. Quantification of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity by spectrophotometry: A systematic review and meta-analysis. **PLOS Medicine,** v. 17, n. 5, p. e1003084, 2020. ISSN 1549-1676. Disponível em: < https://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.1003084 >.

[90] LEY, B. et al. Repeatability and reproducibility of a handheld quantitative G6PD diagnostic. **PLOS Neglected Tropical Diseases,** v. 16, n. 2, p. e0010174, 2022. ISSN 1935-2735. Disponível em: < https://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0010174 >.

[91] BANCONE, G. et al. Technical evaluation and usability of a quantitative G6PD POC test in cord blood: a mixed-methods study in a low-resource setting. **BMJ open,** v. 12, n. 12, p. e066529, 2022. ISSN 2044-6055.

[92] THEDSAWAD, A. et al. Cut-off values for diagnosis of G6PD deficiency by flow cytometry in Thai population. **Annals of Hematology**, 2022. ISSN 0939-5555. Disponível em: < https://dx.doi.org/10.1007/s00277-022-04923-7 >.

[93] KALNOKY, M. et al. Cytochemical flow analysis of intracellular G6PD and aggregate analysis of mosaic G6PD expression. **European Journal of Haematology,** v. 100, n. 3, p. 294-303, 2018. ISSN 0902-4441. Disponível em: < https://dx.doi.org/10.1111/ejh.13013 >.

[94] ALGUR, N. et al. Quantitative neonatal glucose-6-phosphate dehydrogenase screening: distribution, reference values, and classification by phenotype. **The Journal of pediatrics,** v. 161, n. 2, p. 197-200, 2012. ISSN 0022-3476.

[95] TAKARA, A. H. Padronização da genotipagem da variante G202A da G6PD A-: análise comparativa da relação custo-benefício entre TETRA-ARMS e sequenciamento Sanger. 2018.

[96] BRASIL. **Triagem Neonatal Biológica: Manual Técnico**. 2016.

[97] HANNON, W. H.; THERRELL JR, B. L. Overview of the history and applications of dried blood samples. **Dried blood spots: Applications and techniques**, p. 1-15, 2014.

[98] GRÜNER, N.; STAMBOULI, O.; ROSS, R. S. Dried blood spots-preparing and processing for use in immunoassays and in molecular techniques. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 97, p. e52619, 2015. ISSN 1940-087X.

[99] CASTRO, S. M. et al. Evaluation of glucose-6-phosphate dehydrogenase stability in blood samples under different collection and storage conditions. **Clinical chemistry,** v. 51, n. 6, p. 1080-1081, 2005. ISSN 0009-9147.

[100] CHAMCHOY, K. et al. The integrity and stability of specimens under different storage conditions for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency screening using WST-8. **Acta Tropica,** v. 217, p. 105864, 2021. ISSN 0001-706X.

[101] FLORES, S. R.; HALL, E. M.; DE JESÚS, V. R. Glucose-6-phosphate dehydrogenase enzyme stability in filter paper dried blood spots. **Clinical biochemistry,** v. 50, n. 15, p. 878-881, 2017. ISSN 0009-9120.

[102] JALIL, N. et al. Evaluation of glucose-6-phosphate dehydrogenase stability in stored blood samples. **EXCLI journal,** v. 15, p. 155, 2016.

[103] CASTRO, S. M. D. Aspectos laboratoriais do diagnóstico da deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD). 2006.

[104] RODRIGUES, S. A. N. **Six Sigma aplicado ao erro total das medições laboratoriais**. 2014. Faculdade de Ciências e Tecnologia

ANEXO I: ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA MEDICINA (RIBEIRÃO PRETO)

The influence of storage time and temperature on G-6PD enzyme activity for the enzymatic colorimetric measurement

A influência do tempo de armazenamento e da temperatura na atividade da enzima G-6PD para a mensuração enzimática colorimétrica.

ABSTRACT

Background: To ensure accurate results when measuring glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6PD) enzyme activity, it is essential to take care of pre-analytical aspects related to time and storage conditions. This study sought to identify the ideal conditions for measuring G-6PD activity on filter paper using a colorimetric enzymatic method. **Methods:** The biological material was collected from 17 individuals deficient in G-6PD enzyme activity and 19 with normal enzyme activity and stored in three conditions: room temperature (25.5ºC), refrigerated (5ºC), and at -20ºC. Furthermore, the G-6PD enzyme activity was evaluated daily for 15 days by the colorimetric enzymatic method. **Results and Conclusion:** The results revealed that 81% of the sample's enzymatic activity was explained by the linear regression model, considering temperature, the time between collection and analysis, and the individual's state of disability. At the end of the storage period, samples kept at room temperature showed significant instability, losing around 61% of enzymatic activity. This emphasizes the negative influence of temperature on G-6PD enzyme activity and highlights the importance of analyzing biological material within 48 hours. On the other hand, the samples stored under cryopreservation (-20ºC) showed greater stability, preserving more than 60% of the residual activity. This highlights the need for appropriate treatment for samples collected in locations far from the analysis laboratory. Refrigerated samples can be stored for up to seven days without affecting the classification of the individual. Finally, samples stored at -20°C proved to be the most stable option throughout the entire storage period, with no error in the individual's classification.

Keywords: G-6PD deficiency, filter paper, colorimetric enzymatic method, pre-analytical conditions, glucose-6-phosphate dehydrogenase.

RESUMO

Contexto: Para garantir resultados precisos ao medir a atividade enzimática da glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6PD), é essencial cuidar dos aspectos pré-analíticos relacionados ao tempo e às condições de armazenamento. Este estudo buscou identificar as condições ideais para medir a atividade da G-6PD em papel filtro

usando um método enzimático colorimétrico. **Métodos:** O material biológico foi coletado de 17 indivíduos com deficiência na atividade da enzima G-6PD e 19 com atividade enzimática normal e armazenado em três condições: temperatura ambiente (25,5ºC), refrigerada (5ºC) e a -20ºC. Além disso, a atividade da enzima G-6PD foi avaliada diariamente por 15 dias pelo método enzimático colorimétrico**. Resultados e Conclusão:** Os resultados revelaram que 81% da atividade enzimática da amostra foi explicada pelo modelo de regressão linear, considerando temperatura, tempo entre coleta e análise e estado de deficiência do indivíduo. Ao final do período de armazenamento, amostras mantidas em temperatura ambiente mostraram instabilidade significativa, perdendo cerca de 61% da atividade enzimática. Isso enfatiza a influência negativa da temperatura na atividade enzimática da G-6PD e destaca a importância de analisar o material biológico dentro de 48 horas. Por outro lado, as amostras armazenadas sob criopreservação (-20ºC) mostraram maior estabilidade, preservando mais de 60% da atividade residual. Isso destaca a necessidade de tratamento adequado para amostras coletadas em locais distantes do laboratório de análise. Amostras refrigeradas podem ser armazenadas por até sete dias sem afetar a classificação do indivíduo. Finalmente, as amostras armazenadas a -20°C provaram ser a opção mais estável durante todo o período de armazenamento, sem erro na classificação do indivíduo.

Palavras-chave: Deficiência de G-6PD, papel filtro, método enzimático colorimétrico, condições pré-analíticas, glicose-6-fosfato desidrogenase.

1 Introduction

The enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6PD) is present in red blood cells. It plays an important role in protecting erythrocytes against oxidative stress generated by endogenous and exogenous factors by participating in the catalysis of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) into reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) [1;2]. The G-6PD gene is located on the X chromosome and the G-6PD enzyme deficiency is a genetic condition that affects about 400 million people worldwide [3]. However, this estimate may be even higher since enzyme activity evaluation is not available in social programs on a global basis.

G-6PD enzyme deficiency causes a variety of clinical manifestations, from asymptomatic to varying degrees of hemolysis and hyperbilirubinemia intensity, with greater severity occurring in the neonatal phase due to the risks of progression to encephalopathy or kernicterus [4;5]. Therefore, laboratory identification of G-6PD deficiency in the neonatal period is a major factor in the therapeutic management of these patients and in the differentiation between physiological jaundice and those from G-6PD low activity [6;7]. Furthermore, knowing the G-6PD deficiency condition is essential for the adequacy of lifestyle habits and administration of certain medications, such as primaquine (used to treat malaria), which is extremely dangerous in G-6PD deficient individuals because it triggers hemolytic events and the risk of death [8].

Diagnosis of G-6PD activity deficiency is performed using whole blood sample collected on filter paper. This is a dried blood sample and may be affected by sample

storage time and temperature. This limitation reflects on low reproducibility with decreased enzyme activity and the consequent misclassification of individuals, which can generate false-positive results for low enzyme activity [9;10].

Since the methodology using filter paper impregnated with dried blood is standardized for many other genetic analyses and is easy to collect and transport, this study aims to identify the gradual daily decrease of G-6PD enzyme activity under different temperature and time of storage. Moreover, this study aimed to determine the optimal pre-analytical condition and stability during 15 days of storage, considering the accuracy of the colorimetric enzymatic test to minimize the amount of false-positive results due to enzyme degradation.

2 Methodology

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Brazil, under opinion number 4,500,914 on January 18, 2021. All participants and/or their legal guardians signed the Free and Informed Consent Form.

2.1 Research participants and sample collection

Blood samples were collected on filter paper from 36 participants. Seventeen were deficient in G-6PD enzyme activity, diagnosed and on ambulatory monitoring, and 19 with normal G-6PD enzyme activity. Three filter papers were collected from each individual, each one with six circumferences to be filled in. All samples followed the quality standards recommended in the document *Triagem Neonatal Biológica: Manual Técnico* (Biological Newborn Screening: Technical Manual) from Brazilian Ministry of Health [11].

The samples were obtained by capillary collection on the ring finger. After collection, the filter paper was kept for three hours at room temperature for complete drying without the mechanical influence of heat or cold. After that, the samples were distributed in three groups: G1 (room temperature), G2 (refrigerator 4 - 8°C), and G3 (freezer -20°C). They were stored in zipper bags with 6.5g of desiccant silica, protected from light with laminated paper, and packed in styrofoam boxes. Daily, the samples were removed from the storage environment, kept at room temperature for 30 minutes, and tested. This cycle was repeated for 15 consecutive days. The first reading was taken 24 hours after collection and determined the baseline to compare the % residual activity obtained in subsequent analyses.

2.2 G-6PD activity assay

The assay is based on colorimetric enzymatic methodology, using Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase, which in the presence of NADP, catalyzes the oxidation of glucose-6-phosphate to 6-phosphogluconate. The NADPH produced is measured colorimetrically and the result is based on the increased optical densities. The calculation considers the difference of the readings taken at 550 nm within 10 minutes, and the correction of the sample activity is done using the 405 nm filter. The result is released in U/g of hemoglobin (Hb). This study adopted as cut-off the values described

in the patient information leaflet: normal activity > 6.7 U/g Hb; intermediate: 2.2 - 6.6 U/g Hb; and deficient ≤ 2.1 U/g Hb.

The filter paper samples were pricked in a 96-well microplate, two pricks per well, in duplicate. First, we added 75 µL of the elution reagent and stirred for 20 minutes at 1,000 rpm. Then, 15 µL of the eluate was transferred to another microplate, and 75 µL of the working reagent was added. A reading at 405 nm was immediately taken, and the plates were then incubated for 10 minutes. Next, 100 µL of the color reagent was added, incubated for 10 minutes without shaking, and read at 550 nm. After that, the plates were incubated for another 10 minutes and read again at 550 nm.

For the calculation, the three readings were imputed in proprietary software made available by Intercientifica, the company responsible for producing and commercializing the kits.

2.3 Data Analysis

A one-way ANOVA test was used to compare days in the same group. The three-way ANOVA test was employed in comparing Day*Group, Day*temperature, Group*temperature, and Day*Group*temperature. A linear regression was calculated using G-6PD deficiency status, temperature and storage time to explain G-6PD activity. The IBM SPSS Statistics 22 software was associated with the GraphPad Prism software and accepted a p-value < 0.05 as significant.

3 Results

3.1 Storage conditions and casuistry

The G1 group was conditioned at a mean temperature of 25.5°C (95% CI 24.9 - 26.2). The G2 group was kept at a mean temperature of 5.0°C (95% CI 4.0 – 6.0). The G3 group was conditioned at a mean temperature of -20.5°C (95% CI -21.5 - -19.5). All samples were stored with desiccant silica gel to prevent moisture absorption by the filter paper. Enzyme activity was evaluated 24 hours after collection, characterizing the baseline. The groups showed the following means for G-6PD deficient and non-deficient samples, respectively: G1 2.07 U/gHb (95% CI 1.77 - 2.37) and 6.78 U/gHb (95% CI 6.38 - 7.19); G2 2.45 U/gHb (95% CI 2.29 - 2.64) and 8.27 U/gHb (95% CI 7.82 - 8.79); and G3 2.70 U/gHb (95% CI 2.49 - 2.93) and 8.27 U/gHb (95% CI 7.85 - 8.64).

Residual activity was evaluated for 15 consecutive days. The G1 group showed a gradual decrease during the storage period. Between days 1 and 3, a reduction of more than 25% in activity was observed, as the activity baseline averaged from 2.07 U/gHb (95% CI 1.77 - 2.37) to 1.53 (95% CI 1.32 - 1.74) in deficient samples and from 6.79 U/g Hb (95% CI 6.39 - 7.19) to 4.90 U/g Hb (95% CI 4.56 - 5.25) in non-deficient ones. On day 8, after collection, the drop-in enzyme activity was more than 40%, which brought the mean enzyme activities to 1.19 U/g Hb (95% CI 1.01 - 1.38) and 3.55 U/g Hb (95% CI 3.19 - 3.92) in deficient and non-deficient samples, respectively. On the twelfth day, the drop-in enzyme activity was more than 50%, and the means reduced to 0.92 U/g Hb (95% CI 0.72 - 1.12) and 3.25 U/g Hb (95% CI 2.97 - 3.53) in deficient and non-deficient samples, respectively. At the end of 15 days, the initial enzyme

activity dropped by 61%, and mean enzyme activity decreased to 0.81 U/g Hb (95% CI 0.68 - 0.94) in deficient samples and 2.70 U/g Hb (95% CI 2.49 - 2.91) in non-deficient samples, as demonstrated in Figure 1.

Group G2 showed a 15% reduction in enzyme activity between days 1 and 3. The baseline of enzyme activity dropped from 8.28 U/g Hb (95% CI 7.73 - 8.83) to 7.02 U/g Hb (95% CI 6.51 - 7.53) in non-deficient samples and from 2.46 U/g Hb (95% CI 2.25 - 2.67) to 2.06 U/gHb (95% CI 1.80- 2.32) in deficient samples. On the eighth day of analysis, non-deficient samples lost 22% of enzyme activity, while deficient samples lost 24%. This drop reflects a mean activity of 6.38 (95% CI 5.78 - 6.98) and 1.86 U/g Hb (95% CI 1.56 - 2.17), respectively. At the end of the 15 days, non-deficient samples lost 29% of their enzyme activity, while deficient samples lost 32%, with mean activity levels of 5.87 U/g Hb (95% CI 5.51 - 6.24) and 1.67 U/g Hb (95% CI 1.50 - 1.85), respectively.

In the G3 group, the decrease in enzyme activity by day 10 did not reach 10% for non-deficient samples. However, it reached 22% for deficient samples. In this period, the activity baseline dropped from 8.27 U/g Hb (95% CI 7.86 - 8.69) to 7.14 U/g Hb (95% CI 6.59 - 7.68) for non-deficient samples and from 2.71 U/g Hb (95% CI 2.46 - 2.95) to 2.04 U/g Hb (95% CI 1.76 - 2.32) for deficient samples. At the end of the storage period, non-deficient samples showed a 20.4% decrease, and deficient samples showed a 30.9% decrease. In the activity means, this drop represents 6.59 U/g Hb (95% CI 6.15 - 7.03) for non-deficient samples and 1.87 U/g Hb (95% CI 1.59 - 2.15) for deficient samples as showed in Figure 2.

When a linear regression was applied, it was showed that 81% of the enzyme activity is explained by temperature, storage time and having or not having G-6PD deficiency.

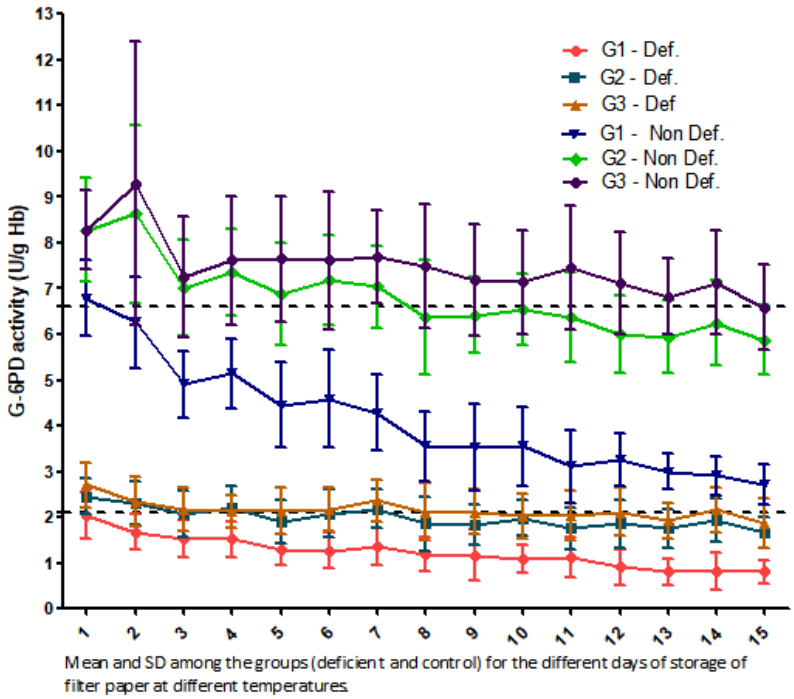


Figure 1. Comparison of the drop in G-6PD enzyme activity on filter paper between

the groups over 15 days. G1 (Deficient and Non Deficient – storege room temperature); G2 (Deficient and Non Deficient – storege mean temperature of 5ºC); G3 (Deficient and Non Deficient – storege mean temperatura of – 20.5ºC)

The upper line is the cut-off point determining normal G-6PD activities. The lower line is the cut-off point that determines the deficient activities of G-6PD. Between the upper line and the lower line are the intermediate activities of G-6PD.

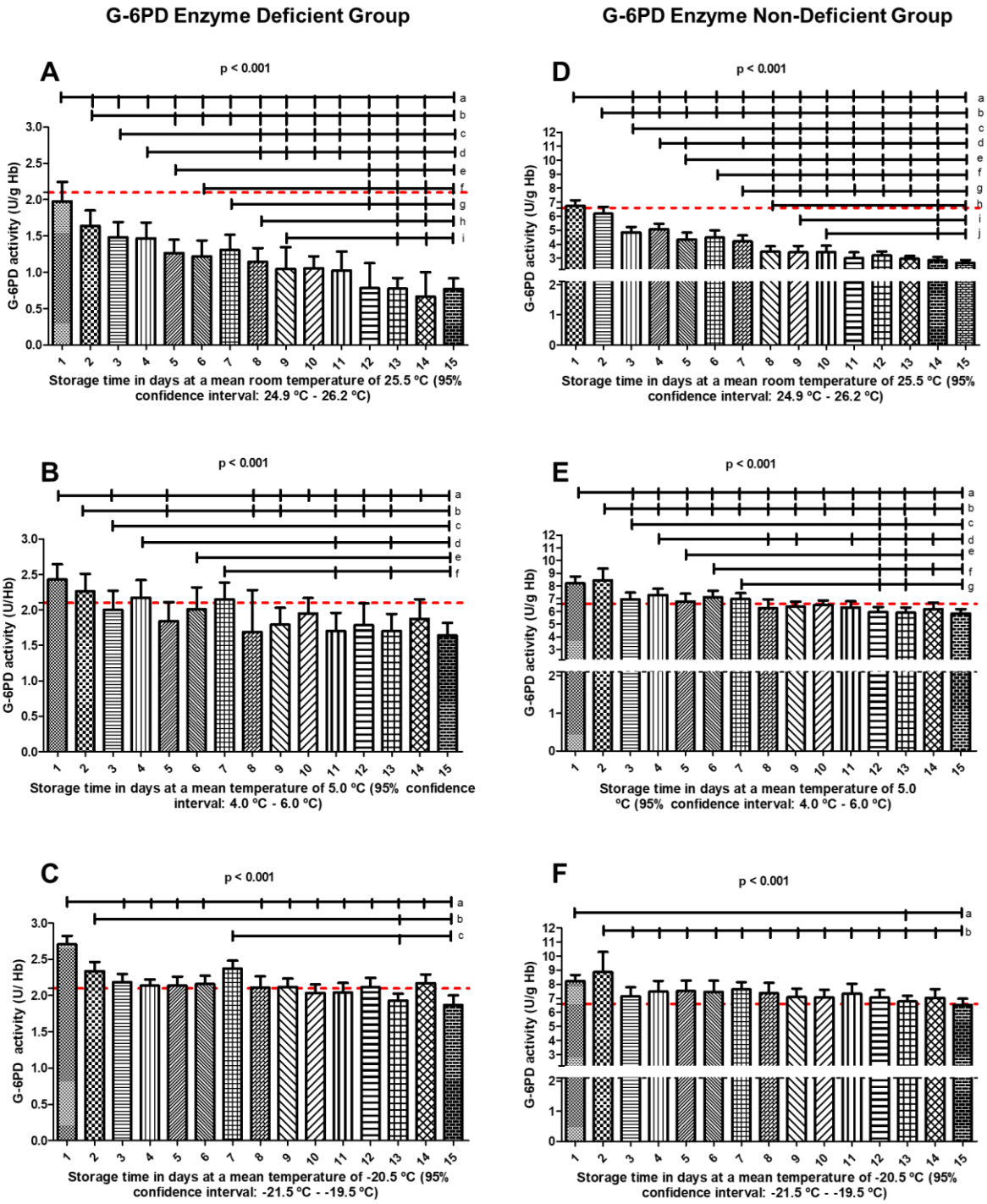


Figure 2. Stability of G-6PD enzyme on filter paper, stored for 15 days, in the following conditions: A and D) room temperature (25.5 ºC); B and E) refrigerated condition (5.0 ºC); and C and F) -20.5°C condition. A, B and C represent samples of G-6PD deficient group, while D, E and F represent samples of G-6PD non-deficient group.
The letters, lines, and bars show the difference day-by-day during storage ($p < 0.001$).

4 Discussion

Individuals deficient in the G-6PD enzyme are more susceptible to antioxidant-induced hemolysis when exposed to certain drugs, chemicals, foods, preservatives, or infectious processes [12]. In the newborn, the risks are even greater since the deficient patient has a higher chance of developing hyperbilirubinemia and, consequently, encephalopathies and kernicterus [13]. Due to the different clinical manifestations and complications, the World Health Organization (WHO) recommended early screening for G-6PD deficiency in 1989, especially in locations with a prevalence of 3-5% or higher. However, this early screening has yet to be available for free and globally [14].

Filter paper impregnated with whole blood has been used since the 1950s for dosing phenylalanine [15]. This biological matrix is currently used for dosing different metabolism errors and molecular assays precisely because it is easy to transport and does not require storage complexity [16].

The inclusion of the determination of G-6PD activity in a national neonatal screening program is essential. However, it should be noted that the stability of the sample for this determination can be a limitation. However, this study aimed to overcome the difficulty laboratories have in maintaining the feasibility of filter paper for G-6PD enzyme activity dosage. Therefore, we evaluated the G-6PD enzyme activity on filter paper samples stored with silica gel at room temperature and refrigerated at 5ºC and -20ºC.

The filter paper impregnated with whole blood to evaluate G-6PD activity proved unstable when kept at a mean temperature of 25ºC for the first 24 hours. The mean activity of the G1 group for non-deficient samples amounted to 6.78 U/g Hb, while those kept under G2 and G3 cryopreservation amounted to 8.27 U/g Hb. When comparing the group at room temperature and the cryopreserved one, we already observe an 18% decrease in enzyme activity, which shows the temperature's interference with enzyme stability. Castro et al. 2005 evaluated the stability of the G-6PD enzyme on filter paper on days 0, 3, 10, and 15 after collection and reported that increasing temperature decreases enzyme activity [9].

This study evaluated for 15 days, every 24 hours, demonstrated the gradual decline, and identified the optimal day for analyte evaluation at each storage condition. The G1 group showed the need to speed up the dosage, especially in non-deficient samples, because as of Day 2, the mean activity is below the 6.7 U/gHb cut-off, the threshold that differentiates the population with normal activity from those with intermediate activity. The result shows that at a mean temperature of 25ºC, the sample should be analyzed within the first 48 hours to minimize the chances of misclassification due to false-positive results resulting from temperature.

The groups kept at low temperatures showed greater stability in enzyme activity. For example, the G2 group remained within the cut-off until the seventh day, with 84.9% preserved enzyme activity. On the eighth day of storage, the average enzyme activity reached 6.38 U/g Hb. From this day on, it remained below the 6.7 U/g Hb cut-off. Thus, the stability of samples conditioned at 5°C is maintained until the seventh day after the collection date. Therefore, we recommend processing during this period to decrease the chances of false-positive results.

The cryopreserved groups underwent daily hot-cold cycles because they were removed from the controlled environment and kept on the workbench until the analysis time. These cycles mimic what happens in analytical laboratories since the same sample can be assayed for different parameters at various times. This hot-cold process may be a methodological limitation since the enzyme activity stability has already been evaluated using hot-cold cycles at 1, 4, 8, and 12 months. Moreover, it was confirmed that this process accelerates enzyme degradation [17].

Storage at -20°C proved optimal for the G-6PD activity assay. The group conditioned at this temperature maintained 79.6% enzyme activity at the end of the 15 days of evaluation. Furthermore, it had the best performance since, during the entire storage, the enzyme activity of the non-deficient group did not exceed the cut-off that delimits the individual with intermediate activity. Temperature variability, especially hot-cold cycles, alters the sample's stability. While the process without this temperature variation, keeping the filter paper at -20°C can preserve the enzyme activity by about 90% [10;17]. However, even using hot-cold cycles, the samples under study proved feasible during the 15 days of storage.

When comparing the baseline enzyme degradation with the mean enzyme activity found on days 3, 8, and 15, the deficient samples showed a profile similar to the non-deficient samples, stored at -20ºC. However, at the end of the evaluation period, samples with deficient enzyme activity showed a lower percentage of residual activity than non-deficient samples. Thermal instability is known to be triggered by the unraveling after exposure to high temperatures, disrupting enzyme activity feasibility. This impairment in feasibility occurs regardless of the presence or absence of the deficiency. However, deficient enzymes demonstrated greater fragility [18;19].

Regardless of the storage condition, samples from deficient individuals will present decreased enzyme activity without affecting classification. However, keeping the biological material in adequate conditions increases the laboratory's efficiency in the identification, reducing false-positive rates and expenses with repetitions.

5 Conclusion

This study showed the influence of storage time and temperature on the activity of the G-6PD enzyme. The inversely proportional relationship observed between these variables indicated that strict control of these factors is essential to obtain reliable results and minimize the possibility of false positive results.

The findings have significant implications for clinical and laboratory practice. We strongly recommend that samples collected for the analysis of G-6PD enzyme activity at an average temperature of 25.5°C be processed within the first 48 hours after collection. This will help ensure that the results accurately reflect the activity of the enzyme at the time of collection. For samples kept at an average temperature of 5°C, the data indicates that they can be safely processed up to 7 days after collection. This

extension in processing time can be especially beneficial in situations where transporting samples to the laboratory can take some time. Finally, samples packaged at -20°C were remarkably stable throughout the storage period, allowing them to be kept for up to 15 days without compromising the accuracy of the results. This offers a convenient and safe option for long-term storage.

Finally, the findings of this study provide practical guidelines that can be applied in clinical and laboratory settings, contributing to greater accuracy, reproducibility, and quality of results.

Declaration of interest:

The authors declare no competing financial interests or personal relationships that may have influenced the work reported in this article.

Acknowledgment:

We want to thank Intercientifica for donating the kits to perform the tests. The NeoLISA® G-6PD kit was used to determine the enzyme activity of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) in filter paper samples.

REFERENCES

[1] Beutler, E. G-6PD deficiency. *Blood.* 1994; 84: 3613-3636. DOI: 10.1182/blood.V84.11.3613.bloodjournal84113613

[2] Frank, J. E. Diagnosis and management of G-6PD deficiency. *American family physician*. 2005; 72:1277-1282.

[3] Harcke, S. J., Rizzolo, D., Harcke, H. T. G-6PD deficiency: An update. *Journal of the American Academy of Physician Assistants*. 2019; 32: 21-26. DOI: 10.1097/01.JAA.0000586304.65429.a7

[4] Nair, A. K., Al Khusaiby, S. M. Kernicterus and G-6PD deficiency - a case series from Oman. *Journal of tropical pediatrics*. 2003; 49: 74-77. DOI: 10.1093/tropej/49.2.74

[5] Watchko, J. F. Refractory causes of kernicterus in developed countries: can we eradicate G-6PD deficiency triggered and low-bilirubin kernicterus?. *Current pediatric reviews.* 2017; 13: 159-168. DOI: 10.2174/1573396313666170718144025

[6] Mallouh, A., Imseeh, G., Abu-Osba, Y. K., Hamdan, J. A. Screening for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency can prevent severe neonatal jaundice. *Annals of tropical paediatrics*, 1992; 12: 391-395. DOI: 10.1080/02724936.1992.11747604

[7] Mezzacappa, M., et al. Clinical and genetic risk factors for moderate hyperbilirubinemia in Brazilian newborn infants. *Journal of Perinatology*. 2010; 30: 819-826. DOI: 10.1038/jp.2010.48

[8] Baird, J. K. Evidence and implications of mortality associated with acute Plasmodium vivax malaria. *Clinical microbiology reviews*. 2013; 26: 36-57. DOI: 10.1128/CMR.00074-12

[9] Castro, S. M., Weber, R., Dadalt, V., Santos, V. F., Reclos, G. J., Pass, K. A., Giugliani, R. Evaluation of glucose-6-phosphate dehydrogenase stability in blood samples under different collection and storage conditions. *Clinical chemistry.* 2005; 51: 1080-1081. DOI: 10.1373/clinchem.2005.048520

[10] Flores, S. R., Hall, E. M., De Jesús, V. R. Glucose-6-phosphate dehydrogenase enzyme stability in filter paper dried blood spots. *Clinical biochemistry*. 2017; 50: 878-881. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2017.05.003

[11] Brazil. Ministry of Health. Secretariat of Health Care. Department of Specialized and Thematic Care. Neonatal biological screening: technical manual. Brasília: Ministry of Health; 2016.

[12] Cappellini, M. D., Fiorelli., G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *The lancet*. 2008; 371: 64-74. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)60073-2

[13] Manning, D., Todd, P., Maxwell, M., Platt, J. Prospective surveillance study of severe hyperbilirubinaemia in the newborn in the UK and Ireland. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition*. 2007; 92: 342-346. DOI: 10.1136/adc.2006.105361

[14] WHO, Working Group Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. WHO Working Group. Bull World Health Organ. 1989; 67: 601-611.

[15] Guthrie, R., Susi, A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics*. 1963; 32: 338-343. DOI: 10.1542/peds.32.3.338

[16] Sahai, I., Marsden, D. Newborn screening. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 2009; 46: 55-82. DOI: 10.1080/10408360802485305

[17] Chamchoy, K., A. et al. The integrity and stability of specimens under different storage conditions for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency screening using WST-8. *Acta Tropica*. 2021; 217: 105864. DOI: 10.1016/j.actatropica.2021.105864

[18] Boonyuen, U., Chamchoy, K., Swangsri, T., Junkree, T., Day, N. P., White, N. J., Imwong, M. A trade off between catalytic activity and protein stability determines the clinical manifestations of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6PD) deficiency. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017; 104: 145-156. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.06.002

[19] Praoparotai, A., Junkree, T., Imwong, M., Boonyuen, U. Functional and structural analysis of double and triple mutants reveals the contribution of protein instability to clinical manifestations of G-6PD variants. *International journal of biological macromolecules*. 2020; 158: 884-893. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.05.026

ANEXO II - ESTE MANUSCRITO FOI SUBMETIDO À REVISTA BRASILEIRA DE EPIDEMIOLOGIA NO FORMATO DE "COMUNICAÇÃO BREVE"

CENÁRIO DA DEFICIÊNCIA DA G6PD NO BRASIL: Primeiro estudo de triagem da deficiência no Estado do Mato Grosso do Sul

Resumo

A deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) é a enzimopatia mais comum no mundo, afetando cerca de 500 milhões de pessoas. No Brasil, sua prevalência varia entre as regiões. No entanto, a falta de dados em algumas áreas e as diferenças metodológicas limitam uma visão nacional abrangente. Este estudo fez uma revisão sobre a prevalência da deficiência de G6PD no país e contribuiu para a primeira triagem populacional no Mato Grosso do Sul. Foram coletadas 426 amostras de sangue seco em papel filtro no município de Campo Grande, testadas por meio de ensaio colorimétrico para determinação da atividade enzimática. Os resultados mostraram uma estimativa de 1,1% de indivíduos deficientes e 15,2% com atividade intermediária.

Palavras-chave: G6PD, deficiência, glicose 6- fosfato desidrogenase.

Introdução

A enzima G6PD está presente em todos os tecidos, mas nos eritrócitos é essencial para manter sua viabilidade, pois catalisa a primeira fase da via das pentoses. Sua principal função é subsidiar NADPH para regenerar GSH quando este for oxidado por espécies reativas de oxigênio. Indivíduos deficientes da G6PD, dependendo da variante genética, apresentam baixos níveis de atividade enzimática, impactando a regeneração do GSH e aumentando o estresse oxidativo, resultando em danos conformacionais aos eritrócitos [1].

A deficiência de G6PD é a enzimopatia mais comum, afetando cerca de 500 milhões de indivíduos em todo o mundo[2]. Muitos são assintomáticos, enquanto outros manifestam sintomas hemolíticos de diferentes intensidades, desencadeados pelo consumo de feijão fava e corrantes, administração de medicamentos altamente oxidantes e produtos químicos [3].

No Brasil, a prevalência da deficiência de G6PD apresenta índices variáveis, que são influenciados por fatores históricos, demográficos, diversidade populacional e escolha do método de diagnóstico. Este estudo teve por objetivo delinear o

panorama da deficiência de G6PD no Brasil e relatar a primeira triagem populacional realizada no Estado do Mato Grosso do Sul.

Metodologia

Revisão da Literatura: a revisão sobre a prevalência da deficiência de G6PD nas regiões brasileiras foi conduzida por busca manual nas bases PubMed e Google Acadêmico, utilizando os termos "prevalence and deficiency G6PD in Brazil", "distribution of G6PD in Brazil" e "frequency of deficiency G6PD in Brazil". Foram incluídos artigos e teses que avaliaram a atividade enzimática ou identificaram a deficiência por estudo molecular.

Triagem da atividade da G6PD em Campo Grande – MS: a triagem da deficiência da G6PD foi realizada em indivíduos atendidos em Unidades Básicas de Saúde (UBS) de Campo Grande, MS. Foram coletadas 426 amostras de sangue seco em papel filtro, abrangendo uma unidade básica por distrito da cidade. A determinação da atividade enzimática foi realizada com o kit NeoLISA® G6PD, utilizando metodologia enzimática colorimétrica.

Resultados e Discussão

Foram identificados 22 estudos sobre a prevalência da deficiência de G6PD no Brasil. Não há relatos em 10 estados, incluindo o Mato Grosso do Sul, o que impede uma visão nacional abrangente. A Região Norte é a mais estudada devido à alta incidência de malária, seguida pelo Nordeste e Sudeste. A Região Centro-Oeste apresenta o menor número de publicações, com apenas um estudo no Mato Grosso.

Dentro de um mesmo estado, a prevalência variou consideravelmente. No Acre, um estudo relatou prevalência de 8,3% em comunidades gerais e 4,5% em voluntários masculinos. No Amazonas, observa-se diferenças entre 8 e 4 %, dependendo da população estudada e dos métodos empregados. Na tabela 1, é possível visualizar a região, os estados e a prevalência descrita em cada estudo.

Tabela 1. Prevalência da deficência da G6PD, dividida por região e populaçãodo estudo.

Região	Estado	População do estudo	Prevalência	Referência

Norte	Amazonas	Comunidade Ismail Aziz (somente homens foram avaliados)	3%	[4]
		Amostragem na comunidade	4%	[5]
		Doares de sangue	8.26%	[6]
		Amostragem na comunidade	4.5%	[7]
	Acre	Voluntários homens da Comunidade	4,5%	[8]
		Amostragem na comunidade	8,3%	[5]
	Rondônia	Voluntários da comunidade	3,3%	[9]
		Amostragem na comunidade	5,4%	[5]
	Pará	Comunidades afrodescendentes	(5% dos homens e 19% das mulheres)	[10]
		Amostragem na comunidade	5,7%	[5]
	Amapá	Amostragem na comunidade	5,8%	[5]
	Roraima	Amostragem na comunidade	4,2%	[5]
Nordeste	Bahia	Recém-nascidos	10,1%	[11]
	Pernambuco	Adultos doadores de sangue	7%	[12]
	Rio Grande do Norte	Recém-nascidos	2%	[13]
		Adultos doadores de sangue	3.8%	[14]
	Piauí	Voluntários da comunidade	6,5%	[15]

	Paraíba	Recém-nascidos	4,76%	[16]
Centro-Oeste	Mato Grosso	Recém-nascidos	1,76%	[17]
Sudeste	EspiritoSanto	Recém-nascidos	2,5%	[18]
	São Paulo	Doadores de sangue	1,7%	[19]
		Individuos do sexo masculino	3.65%	[20]
		Doadores de sangue homens	1,75%	[21]
	Minas Gerais	Crianças com a clínica de acidente vascular cerebral	4,3%	[22]
Sul	Rio Grande do Sul	Recém-nascidos	7,9% (1,4 % Deficiência total e 6,4 Deficiência parcial.)	[23]
		Comunidade	9,7%	[24]
		Recém-nascidos (Com e sem procedimento de fototerapia)	4,6%	[25]

Na triagem realizada em Campo Grande, 69.7% das amostras eram de mulheres e 30.3% de homens, com distribuição etária variada. A primeira análise enzimática revelou cinco indivíduos deficientes (1,1%), setenta e sete (17,4%) com atividade intermediária e 344 (77.8%) com atividade normal. Na repetição dos testes foi identificado que 12 participantes interpretadas como intermediárias tinham atividade normal, 5 permaneceram com atividade deficiente e 65 (15,2%) intermediárias. Atividade deficiente foi observada em 3 mulheres e 2 homens, enquanto que a intermediária foi identificada em 21 homens e 44 mulheres.

Apesar das limitações de um teste de triagem, foi possível identificar que a atividade média entre os indivíduos normais foi 8,07 U/gHb IC95% (7,75 – 8,33), a atividade intermediária obteve média de 5,68 U/gHb IC95% (5,40 – 5,90) e atividade deficiente apresentou média de 1,47 U/gHb IC95% (0,82 – 2,35). Além de classificar possíveis portadores da deficiência de G6PD e inferir que o estado do Mato Grosso do Sul apresenta baixa prevalência. Estudos complementares, incluindo confirmação

molecular, são necessários confirmar as estimativas e fundamentar a implementação de políticas de saúde pública voltadas às populações de risco.

Conclusão

A deficiência da G6PD no Brasil apresenta um panorama heterogêneo. A ausência de estudos em 10 estados, incluindo o Mato Grosso do Sul, dificulta a compreensão do cenário nacional. A revisão realizada neste estudo evidenciou variações significativas na prevalência entre estados, possivelmente relacionado a população de estudo.

Uma triagem pioneira realizada em Campo Grande - MS revelou uma baixa prevalência de deficiência enzimática (1,1%) e uma parcela da população com atividade intermediária (15,2%). Esses achados sugerem que o estado não apresenta um alto risco para a condição, mas são necessárias investigações adicionais para melhor caracterização da população.

Referências:

[1] LUZZATTO, L.; NANNELLI, C.; NOTARO, R. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. **Hematology/Oncology Clinics,** v. 30, n. 2, p. 373-393, 2016. ISSN 0889-8588.

[2] LUZZATTO, L.; ALLY, M.; NOTARO, R. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. **Blood,** v. 136, n. 11, p. 1225-1240, 2020. ISSN 0006-4971.

[3] BEUTLER, E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a historical perspective. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology,** v. 111, n. 1, p. 16-24, 2008. ISSN 0006-4971.

[4] SANTANA, M. S. et al. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency in an Endemic Area for Malaria in Manaus: A Cross-Sectional Survey in the Brazilian Amazon. **PLoS ONE,** v. 4, n. 4, p. e5259, 2009. ISSN 1932-6203. Disponível em: < https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0005259 >.

[5] NASCIMENTO, J. R. et al. Prevalence of glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency in highly malaria-endemic municipalities in the Brazilian Amazon: A region-wide screening study. **The Lancet Regional Health-Americas,** v. 12, p. 100273, 2022. ISSN 2667-193X.

[6] FERREIRA, N. S. et al. G6PD deficiency in blood donors of Manaus, Amazon Region, northern Brazil. **International Journal of Laboratory Hematology,** v. 43, n. 6, p. e290-e293, 2021. ISSN 1751-5521.

[7] SANTANA, M. S. et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient variants are associated

with reduced susceptibility to malaria in the Brazilian Amazon. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene,** v. 107, n. 5, p. 301-306, 2013. ISSN 1878-3503.

[8] DOMBROWSKI, J. G. et al. G6PD deficiency alleles in a malaria-endemic region in the Western Brazilian Amazon. **Malaria journal,** v. 16, n. 1, p. 1-9, 2017. ISSN 1475-2875.

[9] 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. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia,** v. 26, p. 268-273, 2004. ISSN 1516-8484.

[10] OLIVEIRA, H. S. S. D. et al. Molecular genotyping of G6PD mutations and Duffy blood group in Afro-descendant communities from Brazilian Amazon. **Genetics and Molecular Biology,** v. 41, p. 758-765, 2018. ISSN 1415-4757.

[11] MOURA NETO, J. P. D. et al. A novel c. 197T® A variant among Brazilian neonates with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. **Genetics and Molecular Biology,** v. 31, p. 33-35, 2008. ISSN 1415-4757.

[12] DOMINGOS, I. et al. Prevalence and molecular defect characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Brazilian blood donors. **International journal of laboratory hematology,** v. 37, n. 5, 2015. ISSN 1751-5521.

[13] IGLESSIAS, M. A. C. et al. Erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in male newborn babies and its relationship with neonatal jaundice. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia,** v. 32, n. 6, p. 434-438, 2010. ISSN 1516-8484.

[14] MAIA, U. M. et al. Prevalência da deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase em doadores de sangue de Mossoró, Rio Grande do Norte. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia,** v. 32, n. 5, p. 422-423, 2010. ISSN 1516-8484.

[15] SOARES, L. F. et al. Atividade de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) em membros de povos de terreiros de umbanda na cidade de Teresina, Piauí. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada,** v. 34, n. 3, 2013. ISSN 2179-443X.

[16] DA COSTA, K. M. et al. Deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) em recém-nascidos, numa maternidade pública da cidade de Campina Grande, Estado da Paraíba, Brasil. **Research, Society and Development,** v. 9, n. 11, p. e6399119855-e6399119855, 2020. ISSN 2525-3409.

[17] FERREIRA, M. D. F. D. C. **Triagem neonatal de deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase e prevalência das mutações G202A (G6PD A-) e C563T (G6PD Mediterrâneo) em Mato Grosso/Brasil**. 2014. Universidade de São Paulo

[18] PEREIRA, L. L. M. D. et al. Prevalence of G6PD deficiency and molecular characterization of G202A, A376G and C563T polymorphisms in newborns in Southeastern Brazil. **Einstein (São Paulo),** v. 17, 2019. ISSN 1679-4508.

[19] COMPRI, M. B.; SAAD, S. T.; RAMALHO, A. S. G-6-PD deficiency in a Brazilian community: an investigation involving epidemiological genetics and molecular techniques. **Cadernos de Saúde Pública,** v. 16, n. 2, p. 335-342, 2000. ISSN 0102-311X.

[20] NICOLIELO, D. B.; FERREIRA, R. I.; LEITE, A. A. Atividade da 6-fosfogliconato desidrogenase em deficientes de glicose-6-fosfato desidrogenase. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia,** v. 28, p. 135-138, 2006. ISSN 1516-8484.

[21] FERREIRA, R. I. P.; LEITE, F. R. M.; LEITE, A. A. Polimorfismo genético da glicose-6-fosfato desidrogenase na população da região de Araraquara, Estado de São Paulo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada,** v. 35, n. 3, 2014. ISSN 2179-443X.

[22] BELISÁRIO, A. R. et al. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficiency in Brazilian children with sickle cell anemia is not associated with clinical ischemic stroke or high-risk transcranial Doppler. **Pediatric Blood & Cancer,** v. 63, n. 6, p. 1046-1049, 2016. ISSN 1545-5009.

[23] CASTRO, S. et al. Prevalence of G6PD deficiency in newborns in the south of Brazil. **Journal of medical screening,** v. 13, n. 2, p. 85-86, 2006. ISSN 0969-1413.

[24] CASTRO, S. M. D. et al. Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in patients from the southern Brazilian city of Porto Alegre, RS. **Genetics and Molecular Biology,** v. 30, p. 10-13, 2007. ISSN 1415-4757.

[25] GUTIERREZ CARVALHO, C. et al. Glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency and its correlation with other risk factors in jaundiced newborns in Southern Brazil.

ANEXO III – POP: Controle de fatores pré-analíticos para a dosagem da enzima G6PD em papel filtro.

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP): Controle de fatores pré-analíticos para a dosagem da enzima G6PD em papel filtro.	
Versão	
Número do Documento:	
Data de Confecção:	Data de Vigor:
Preparado por: _____ _____	Revisado por: _____ _____

1. Objetivo

Estabelecer os procedimentos para garantir a viabilidade das amostras de papel filtro para a dosagem adequada da enzima G6PD. Desta forma, minimizar as chances de resultados falso-positivos e necessidade de re-coletas.

2. Abrangência

Este POP aplica-se a todos os envolvidos no processo de coleta, transporte, armazenamento e dosagem da enzima G6PD. Sendo, enfermeiros, técnicos de enfermagem e/ou laboratório, farmacêuticos, biomédicos, assistentes e demais membros da equipe.

3. Referências Normativas

- RDC nº 302/2005 da ANVISA – Regulamento Técnico para funcionamento de Laboratórios Clínicos.
- RDC nº 153/2004 da ANVISA – Normas para procedimentos hemoterápicos.
- Manual do Ministério da Saúde sobre Triagem Neonatal – Regula a coleta e análise de exames em recém-nascidos.

4. Definições

- G6PD: Glicose 6-fosfato desidrogenase

- RN: recém-nascido
- Amostra biológica: Material coletado do paciente para análise laboratorial.
- Papel filtro: Material poroso utilizado para coleta de amostras de sangue seco.
- Fator pré-analítico: Qualquer variável que possa interferir no resultado antes da análise laboratorial.
- Biossegurança: Conjunto de medidas para minimizar riscos biológicos no manuseio de amostras.

5. Procedimentos

5.1. Treinamento e Autorização

- Todos os envolvidos devem, antes de quaisquer ações, receber treinamento quanto a coleta e as boas práticas laboratoriais. Todos os treinamentos deverão ser registrados e arquivados;

5.2. Coleta em papel filtro

- O papel filtro utilizado para coleta, Whatman 903, deve ser mantido em ambiente protegido de umidade e sujidades.
- O espaço onde a amostra é absorvida, deve estar delimitado com uma circunferência de 2,0 cm de diâmetro.
- Deve-se fazer a antissepsia em local da coleta, no RN na porção calcânea do pé, já na infância e nos adultos no dedo anelar.
- Com uma lanceta, faça a perfuração, com movimentos de ordenha, deixei que a gota seja formada e então coloque o papel filtro em contato com a gota, para que este a absorva.
- O volume a ser absorvido deve ser suficiente para ultrapassar o papel filtro, são cerca de 40 ul de sangue por circunferência.
- Evitar: Sobreposição de gotas e completar amostras com sangue total coletado com anticoagulantes.

5.4. Secagem

- Após a coleta o material deve ser distribuído em estantes, sem que haja contato entre amostras;

- O papel filtro deve ser mantido em temperatura ambiente até completa secagem. Não deve ser submetido a secagem mecânica, com ventiladores, ar condicionado ou estufas.
- O tempo médio para completa secagem é de 3 horas, mas pode variar devido as condições climáticas do ponto de coleta;

5.5. Armazenamento

As amostras devem ser armazenadas protegidas da umidade, devem ser colocadas em sacos plásticos de zíper na presença de sílica. Além disso, a incidência de luz solar ou calor afetam diretamente a viabilidade da amostra, por isso, quando em temperatura ambiente devem permanecer protegidas desses fatores.

Prazos para análise conforme temperatura de armazenamento:

- Temperatura ambiente: Análise em até 48 horas após a coleta.
- Refrigeração (2 a 8°C): Análise em até 7 dias. Evitar ciclos de aquecimento e resfriamento.
- Congelamento (-20°C): Análise em até 15 dias.

5.7. Transporte

- Amostras coletadas foram do local de análise devem ser submetidas a refrigeração ou congelamento;
- O transporte deve ser realizado em caixa de transporte, com função de proteção térmica, 12 litros e termômetro para controle de temperatura acoplado.
- Para manter a temperatura entre 2 a 8 °C por 6 horas são necessários 3.650 Kg de gelo reciclável, para transportes de até 8 horas são necessários 4.500 kg de gelo reciclável.

5.8. Controle e Calibração de Equipamentos

- Os termômetros utilizados no transporte devem ser calibrados periodicamente. E os registros arquivados

- As caixas térmicas devem ser avaliadas quanto à integridade e isolamento térmico.

5.8. Critérios para Rejeição de Amostras

- Volume insuficiente.

- Amostra contaminada ou degradada.
- Secagem inadequada.
- Presença de coágulos.
- Uso de papel filtro inadequado.

5.9. Ações Corretivas

- Em caso de erro na coleta, deve-se realizar nova amostra conforme os padrões estabelecidos.
- Caso o transporte ultrapasse o tempo máximo recomendado, deve-se ter cautela e avaliar o resultado antes de libera-lo
- Registros de não conformidade devem ser preenchidos e revisados periodicamente.

6. Responsabilidades

- Equipe envolvida: Cumprir os protocolos de Boas Práticas Laboratoriais e de biossegurança;
- Seguir o procedimento descrito neste POP;

7. Disposições Finais

- Este POP deve ser revisado periodicamente e atualizado conforme necessário.

Título:	Número:
Data Efetiva:	Página

Título:	Número:
Data Efetiva:	Página