

9. Wissenschaftliche Tabellen, Ciba-Geigy AG, Basel 1976, p44: Toleranzfaktoren.
10. Ricos C, Garcia-Lario J, Minchinela J. Biological Variation Database. <http://www.westgard.com/guest17.htm>.
11. Fraser CG. Biological variation: from principles to practice. AACC press. ISBN 1-890883-49-2.
12. Thienpont LM, Stöckl D, Friederecký B, Kratochvíla J, Budina M. Trueness verification in European external quality assessment schemes: time to care about the quality of the samples, *Scand J Clin Lab Invest* 2003; 63 (3): 195-201.
13. Petersen PH, Fraser CG, Jørgensen L, Brandslund I, Stahl M, Gowans E, Libeer JC, Ricós C. Combination of analytical quality specifications based on biological within- and between-subject variation. *Ann Clin Biochem* 2002; 39 (Pt 6): 543-550.
14. Stockl D, Baadenhuijsen H, Fraser CG, Libeer JC, Petersen PH, Ricos C. Desirable routine analytical goals for quantities assayed in serum. Discussion paper from the members of the external quality assessment (EQA) Working Group A on analytical goals in laboratory medicine. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995; 33 (3): 157-169.

Summary

Steigstra H, Cobbaert C, Baadenhuijsen H. Statistics and scoring system SKML round robins. Introduction of audit levels. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2008; 33: 98-104.

This article introduces the concept of 'audit level' to achieve a standardized way in the determination of the accuracy of an analytical test. Also the calculation procedure for the consensus values and the scores is described.

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2008; 33: 104-109

Diagnostiek van glucose-6-fosfaatdehydrogenasedeficiëntie in ontwikkelingslanden

A.L. PETERS en C.J.F. van NOORDEN

Wereldwijd lijden 400 miljoen mensen aan glucose-6-fosfaatdehydrogenase (G6PD)-deficiëntie, een aandoening die X-chromosomaal wordt overgedragen. Door lyonisatie komen bij heterozygoot-deficiënte vrouwen een normale en een G6PD-deficiënte populatie erythrocyten voor. Dit maakt diagnostiek bij vrouwen gecompliceerd. Malariagenesismiddelen veroorzaken bij G6PD-deficiëntie (ernstige) hemolyse. Om hemolyse te voorkomen bij de behandeling van malaria, is een test nodig voor goedkope en betrouwbare diagnostiek van G6PD-deficiëntie. Op basis van een kritische analyse van de literatuur wordt voorgesteld om voor de diagnostiek van mannen en vrouwen twee verschillende testen te gebruiken. De fluorescentiespottest is goedkoop en gemakkelijk uit te voeren maar alleen betrouwbaar voor de diagnostiek bij mannen. Voor de diagnostiek bij vrouwen is alleen de cytochemische assay betrouwbaar. Deze test is echter lastiger uit te voeren, maar kan bij heterozygoten de G6PD-deficiënte populatie erythrocyten betrouwbaar detecteren.

Trefwoorden: glucose-6-fosfaatdehydrogenase; deficiëntie; diagnostiek; ontwikkelingslanden; malaria

Halverwege de vorige eeuw werd het antimalariamiddel primaquine geïntroduceerd. Dit middel bleek bij sommige patiënten een hemolytische anemie te veroorzaken. Deze patiënten bleken deficiënt te zijn voor

het enzym glucose-6-fosfaatdehydrogenase (G6PD). Dit enzym, sleutelenzym in de oxidatieve pentosefosfaatroute, zet nicotinamide-adeninedinucleotidofosfaat (NADP⁺) om in zijn gereduceerde vorm NADPH. NADPH is voor de erythrocyt met name noodzakelijk voor de bescherming tegen oxidatieve stress. Deficiëntie van G6PD veroorzaakt verhoogde gevoeligheid van de erythrocyt voor superoxides, wat zich kan uiten in een hemolytische anemie, favisme of een chronische niet-sferocytische hemolyse (1). Een aantal medicijnen en chemicaliën (tabel 1), waaronder primaquine (2, 3) en (het eten van) tuinbonen, kunnen hemolyse bij G6PD-deficiënte individuen induceren. Deficiëntie van G6PD wordt X-chromosomaal overgedragen. De detectie van G6PD-deficiëntie kan bij homozygote vrouwen en hemizygoten mannen met een aantal testen betrouwbaar uitgevoerd worden. De diagnose G6PD-deficiëntie bij heterozygote vrouwen levert echter problemen op en de aandoening wordt in een groot deel van deze groep patiënten gemist (4, 5). G6PD-deficiëntie geeft met name bij de behandeling van malaria problemen. In ontwikkelingslanden waar malaria endemisch is, is standaard gebruik van niet-hemolytische medicijnen (te) duur en zijn er weinig mogelijkheden om G6PD-deficiëntie op te sporen (6). Hierdoor kunnen er bij de behandeling van malaria met het standaardmiddel primaquine bij G6PD-deficiënte individuen problemen ontstaan. Het is noodzakelijk dat er in deze landen een eenduidige en goedkope test wordt gebruikt, waarmee ook heterozygote vrouwen opgespoord kunnen worden. Er is echter geen test die én geschikt is voor screening, én ook heterozygote vrouwen betrouwbaar diagnosticeert. De drie meest gangbare testen voor diagnostiek van G6PD-deficiën-

Correspondentie: Anna-Linda Peters, Academisch Medisch Centrum Amsterdam, Universiteit van Amsterdam, Afdeling Celbiologie en Histologie, kamer L3-111, Meibergdreef 15, 1105 AZ Amsterdam, Nederland.
E-mail: beo_al@hotmail.com

tie zijn de fluorescentiespottest (7), de spectrofotometrische assay (8) en de cytochemische assay (9, 10). De fluorescentiespottest en de spectrofotometrische assay zijn goedkoop en makkelijk uit te voeren, maar ook matig betrouwbaar voor heterozygote vrouwen. De cytochemische assay is wel betrouwbaar voor diagnostiek van heterozygote vrouwen (tabel 2) (11, 12), maar deze test duurt lang en is een stuk ingewikkelder. In dit overzicht wordt geanalyseerd welke van deze testen het meest geschikt is voor diagnostiek van G6PD-deficiëntie in ontwikkelingslanden.

Genetica van glucose-6-fosfaatdehydrogenase

Het gen dat voor G6PD codeert ligt op de lange arm van het X-chromosoom (q28) waar ondermeer ook de genen liggen die kleurenblindheid (13), hemofilie A (14) en het fragiele X-syndroom (15) veroorzaken. Het gen is 18kb lang, het bevat 13 exons en 12 introns waarvan de lengtes tussen de 12 bp en 236 bp liggen (16). Er zijn 150 verschillende varianten van het gen bekend (1). Doordat G6PD-deficiëntie X-chromosomaal overgedragen wordt, zijn mannen hemizygoot aangedaan voor de deficiëntie en kunnen vrouwen homozygoot of heterozygoot aangedaan zijn. Heterozygote vrouwen hebben door de willekeurige uitschakeling van een van de twee X-chromosomen een gemengde populatie van erythrocyten met een goed functionerend enzym en erythrocyten met een slecht functionerend enzym (17, 18).

Er zijn inmiddels ongeveer 450 verschillende mutaties bekend, 299 hiervan zijn door de WHO erkend (19). Van 140 mutaties is de DNA-volgorde bekend (20). De meeste zijn puntmutaties en kleine deleties, die structuurdefecten veroorzaken. Op één mutatie na, waarbij een frameshift is opgetreden, zijn er geen grote deleties of andere expressiedefecten bekend, inclusief mutaties in de promotorregio. Dit doet vermoeden dat totale uitschakeling van G6PD niet verenigbaar is met het leven. De mutaties zorgen in de meeste gevallen

voor instabiliteit van het eiwit maar ook het katalyserende vermogen van het eiwit kan aangedaan zijn (21). Over het algemeen worden de mutaties van ouder op kind doorgegeven maar ook nieuwe mutaties zijn in de literatuur beschreven (22).

Enzymologie van glucose-6-fosfaatdehydrogenase

In inactieve vorm is G6PD een monomeer van 515 aminozuren lang met een molecuulgewicht van ruim 59 kd (23). Het actieve enzym bestaat uit een dimeer en bevat stevig gebonden NADP⁺ (24). De aanwezigheid van NADP⁺ is een voorwaarde voor het vormen van actief enzym. NADP⁺ is hiermee zowel substraat van het actieve enzym als onderdeel hiervan.

G6PD katalyseert de eerste stap in de oxidatieve pentosefosfaatroute. In deze route wordt glucose-6-fosfaat omgezet in ribose-5-fosfaat, precursor van ondermeer DNA, RNA en ATP, en wordt NADP⁺ omgezet in NADPH. NADPH is het belangrijkste reducerende agens in het cytoplasma en is nodig voor de biosynthese en detoxificatie. Wanneer de oxidatieve pentosefosfaatroute slechter functioneert door G6PD-deficiëntie, zullen lichaamcellen meer G6PD gaan produceren om de deficiëntie te compenseren. Trombocyten en erythrocyten hebben echter geen kern meer, waardoor in deze cellen geen transcriptie voor nieuwe eiwitten kan plaatsvinden. Deze cellen zullen de deficiëntie niet kunnen compenseren en naarmate de cel ouder wordt, neemt de hoeveelheid G6PD in de erythrocyt af en worden de cellen kwetsbaarder voor oxidatieve stress (25).

Glucose-6-fosfaatdehydrogenase in de erythrocyt

Hemolyse van de erythrocyt bij G6PD-deficiëntie wordt veroorzaakt doordat de cel bij gebrek aan NADPH geen superoxides meer kan reduceren. Glutathionperoxidase reduceert peroxides in cellen. Dit enzym gebruikt gereduceerd glutathion als substraat dat over het algemeen in geoxideerde vorm in de cel voorkomt.

Tabel 1. Een aantal medicijnen en chemicaliën die bij G6PD-deficiënte personen (ernstige) hemolyse kunnen veroorzaken (1, 2). Een volledige lijst is in te zien op (41)

Acetanilide	Isobutylnitriet	Phenazopyridine	Sulfanilamide
Chloramfenicol	Methyleenblauw	Phenylhydrazine	Sulfapyridine
Ciprofloxacine	Naftaleen	Primaquine	Sulfasalazine
Dapson	Nalidixinezuur	Quinacrine	Thiazolesulfon
Doxorubicine	Niridazol	Sulfacetamide	Trinitrotolueen
Furazolidon	Nitrofurantoïne	Sulfadimidine	Uraatoxidase
Glibenclamide	Pamaquine	Sulfamethoxazol	

Tabel 2. Testeigenschappen van de fluorescentiespottest, de spectrofotometrische assay en de cytochemische assay van G6PD-activiteit bij hemizygoote mannen, homozygote vrouwen en heterozygote vrouwen (11, 12)

	Sensitiviteit (%)		Specificiteit (%)	
	homo-/hemizygoot	heterozygoot	homo-/hemizygoot	heterozygoot
Fluorescentiespottest	100	32	99	99
Spectrofotometrische assay	100	11	99	99
Cytochemische assay	?	85	?	100

NADPH is nodig voor de reductie van geoxideerd glutathion (GSSG) door glutathionreductase waarbij gereduceerd glutathion (GSH) en NADP⁺ ontstaan. Naast glutathionperoxidase kan ook catalase peroxides reduceren maar dit enzym is niet zo efficiënt als glutathionperoxidase. Voor de activatie van catalase is eveneens NADPH nodig. Bij G6PD-deficiëntie kan er niet voldoende NADPH geproduceerd worden in de erythrocyt en komt de cel onder oxidatieve stress te staan waardoor deze kan hemolysen.

De ernst van G6PD-deficiëntie wordt over het algemeen in vier klassen ingedeeld (1, 26). Deze worden als volgt omschreven: klasse I (ernstige mutaties), klasse II (intermediair), klasse III (mild) en klasse IV (asymptomatisch). Klasse-I-defecten worden waarschijnlijk veroorzaakt door mutaties in de regio van het enzym waar NADP⁺ of G6P bindt. Van de overige klassen is nog niet bekend welke mutaties aan de deficiëntie ten grondslag liggen. Klasse-I-mutaties zijn zeldzaam en kunnen zodanig ernstig zijn dat de patiënt transfusie-afhankelijk is. Klasse-III-defecten hebben de hoogste prevalentie. Hemolyse is in deze klasse self-limiting, doordat alleen de oudere erythrocyten door de oxidatieve stress te gronde gaan (27).

Prevalentie van glucose-6-fosfaatdehydrogenase-deficiëntie

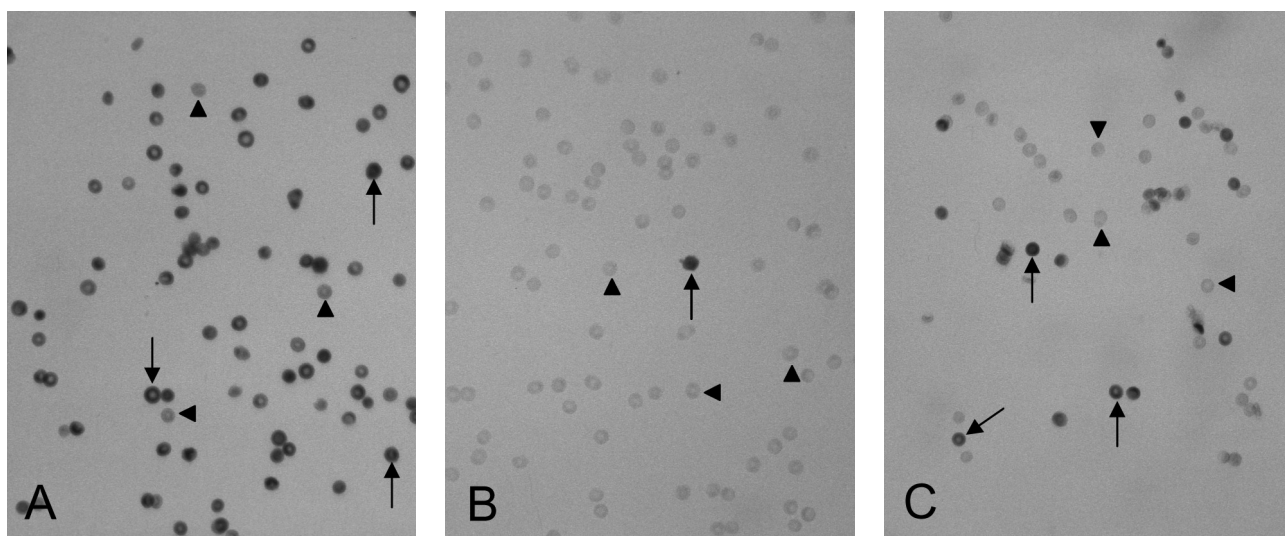
Wereldwijd zijn 400 miljoen mensen drager van een deficiënt G6PD-gen (26). De frequentie van mutatie verschilt sterk per bevolkingsgroep. G6PD A- is de meest voorkomende mutatie bij Afrikanen en Afro-Amerikanen. Deze mutatie heeft een frequentie van 11% en valt onder de klasse-III-mutaties. G6PD B- (Mediterranea) is een ernstiger vorm van deficiëntie uit de klasse-II-mutaties waarbij tijdens hemolyse niet alleen oudere maar ook jongere cellen te gronde gaan. Deze variant wordt vooral rond de Middellandse Zee gevonden. De prevalentie van G6PD Mediterranea varieert sterk, frequenties van 2 tot 20% worden

in Griekenland, Turkije en Italië gevonden. De hoogste prevalentie van G6PD-deficiëntie (70%) wordt bij Koerdische joden gevonden (28).

G6PD-deficiëntie komt voornamelijk voor in bevolkingsgroepen waar malaria endemisch is, of in het verleden endemisch is geweest (Afrika, Azië, mediterraan Europa) (29). Dit doet vermoeden dat de deficiëntie bescherming biedt tegen malaria. Onderzoek lijkt deze hypothese te ondersteunen. Hemizygote mannen en homozygote vrouwen die geïnfecteerd zijn met *Plasmodium falciparum* zijn minder ernstig ziek en de infectie is, in tegenstelling tot bij niet-G6PD-deficiënte individuen, meestal niet letaal (30). Mogelijk komt dit doordat erythrocyten die niet G6PD-deficiënt zijn, meer *Plasmodium falciparum* parasieten bevatten dan erythrocyten die wel G6PD-deficiënt zijn (31). Dit voordeel is alleen bij hemizygote mannen en homozygote vrouwen herkend, heterozygote vrouwen lijken dit voordeel niet te hebben (32).

Detectie van glucose-6-fosfaatdehydrogenase-deficiëntie

Er zijn verschillende testen die gebruikt kunnen worden voor de detectie van G6PD-deficiëntie, slechts een aantal hiervan zijn betrouwbaar voor diagnostiek van heterozygote vrouwen. Momenteel wordt er veel onderzoek gedaan naar DNA-testen waarbij er met behulp van primers nagegaan wordt of het G6PD-gen een afwijking bevat (33, 34). Dit soort testen zijn voor zowel homo-, hemi- en heterozygoten uiterst betrouwbaar maar kennen wel de grote beperking dat slechts één mutatie met één primer geanalyseerd kan worden. Zeldzame of nieuwe mutaties zullen met een DNA-test niet snel opgespoord worden. DNA-testen zijn (momenteel) alleen geschikt voor het screenen naar veel voorkomende en bekende varianten van G6PD-mutaties (bijvoorbeeld G6PD A-)(35). Deze testen zijn bovendien duur en ingewikkeld en daarmee ongeschikt voor diagnostiek op grote schaal. Testen die



Figuur 1. Erythrocyten na cytochemische kleuring voor G6PD-activiteit. De erythrocyten bij de pijlpunten zijn G6PD-deficiënt, de erythrocyten bij de pijlen zijn normaal. **A.** Erythrocyten van een persoon zonder G6PD-deficiëntie. De ongekleurde erythrocyten zijn oud en bevatten onvoldoende actief G6PD om NADP⁺ in NADPH om te zetten. **B.** Erythrocyten van een persoon met homozygote G6PD-deficiëntie. De gekleurde erythrocyt is zeer jong en bevat nog actief G6PD. **C.** Erythrocyten van een persoon met heterozygote G6PD-deficiëntie.

in principe wel geschikt zijn om alle soorten mutaties op te sporen zijn testen voor de NADPH-productiecapaciteit van G6PD. De meest gangbare testen op dit gebied zijn de fluorescentiespottest, de spectrofotometrische assay en de cytochemische test.

Fluorescentiespottest

Bij de diagnostiek van G6PD-deficiëntie door middel van de fluorescentiespottest, maakt men gebruik van de fluorescentie van NADPH dat door G6PD is geproduceerd als het bij 340 nm geëxciteerd wordt terwijl NADP⁺ niet fluoresceert (7, 36).

De fluorescentiespottest is betrouwbaar voor diagnostiek bij hemizygoten mannen en homozygote vrouwen, maar niet geschikt voor diagnostiek bij heterozygote vrouwen. Bij deze laatste groep zal G6PD in de normale populatie erythrocyten voldoende NADP⁺ in NADPH omzetten om de spots te laten fluoresceren. Voor de detectie van heterozygote vrouwen is in eerdere studies een sensitiviteit van 32% en een specificiteit van 99% gevonden (tabel 2).

Spectrofotometrische assay

Bij de diagnostiek van G6PD-deficiëntie door middel van de spectrofotometrische assay, maakt men ook gebruik van het feit dat het door G6PD geproduceerde NADPH bij 340 nm absorbeert en NADP⁺ niet.

De spectrofotometrische test is voor hemizygoten mannen en homozygote vrouwen betrouwbaar. Voor heterozygote vrouwen is de test echter niet geschikt aangezien hier hetzelfde probleem speelt als bij de fluorescentiespottest: het G6PD in de populatie erythrocyten, die niet aangedaan is, zorgt ervoor dat er voldoende NADPH geproduceerd wordt (37). De test heeft voor de detectie van heterozygote vrouwen slechts een sensitiviteit van 11%, terwijl de specificiteit 99% is (tabel 2).

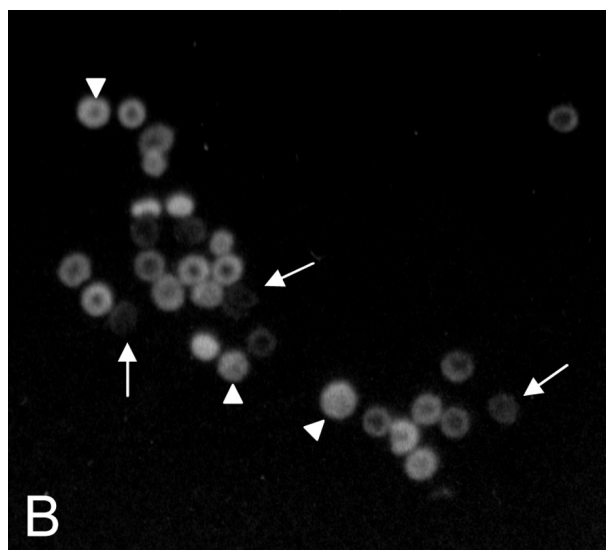
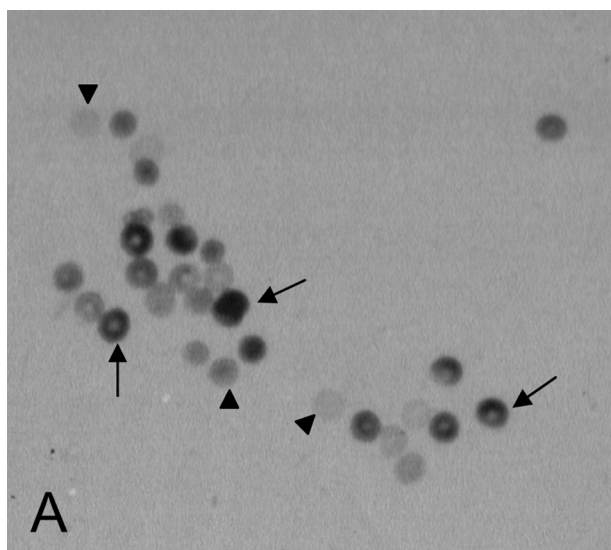
Cytochemische assay

De eerste cytochemische test is in 1968 ontwikkeld

door Fairbanks en Lampe (38), waarbij G6PD-activiteit voor kleuring van de individuele erythrocyt zorgt. Ongekleurde erythrocyten hebben geen of te weinig G6PD-activiteit, hetgeen met een microscoop vastgesteld kan worden. De test bleek niet geheel betrouwbaar te zijn, omdat het kleurproduct voor een deel weglekte uit G6PD-positieve cellen, maar optimalisering van de kleurprocedure door Van Noorden et al. (7) verbeterde de betrouwbaarheid omdat het weglekken voorkomen werd. De test is gebaseerd op de reductie van wateroplosbaar ongekleurd tetranitroblauwtetrazolium (TNBT), via de elektronencarrier 1-methoxyfenazinemetosulfaat, in zijn wateronoplosbare donkerpaarse granules in de erythrocyt ontstaan (7, 8). Bij G6PD-deficiëntie wordt er onvoldoende NADPH in de cel geproduceerd om TNBT te reduceren en zullen er in de erythrocyt weinig of geen paarse granules ontstaan (figuur 1).

Het voordeel van de cytochemische test is dat vastgesteld kan worden of de individuele erythrocyt G6PD-deficiënt is. Hierdoor kunnen ook heterozygote vrouwen gediagnosticeerd worden. Onder de microscoop zullen twee populaties erythrocyten te herkennen zijn: een met paarse granules en een met weinig of geen paarse granules (figuur 1). De test is daarmee betrouwbaar voor de diagnose van hemi-, homo- en heterozygote deficiëntie (39). Omdat handmatig tellen van positieve en negatieve cellen veel tijd kost en niet altijd objectief gebeurt, hebben Van Noorden et al. in 1989 (40) een nieuwe procedure voor het aflezen van de cytochemische assay ontwikkeld. Bij deze procedure wordt gebruik gemaakt van het feit dat de formazankristallen die ontstaan in niet-G6PD-deficiënte cellen, autofluorescentie van erythrocyten uitdoven, hetgeen door flowcytometrie snel en betrouwbaar kan worden vastgesteld (figuur 2).

Een groot nadeel van de cytochemische assay is dat deze aanzienlijk langer duurt dan de fluorescentiespot-



Figuur 2. Erythrocyten van een heterozygoot G6PD-deficiënte patiënt na cytochemische kleuring. De erythrocyten bij de pijlen zijn normaal, de erythrocyten bij de pijlpunten zijn G6PD-deficiënt. **A.** Lichtmicroscopische opname. **B.** Fluorescentieopname. Fluorescentie wordt gedoofd door formazan, waardoor een omgekeerde relatie is ontstaan tussen G6PD-activiteit en fluorescentie.

test en de spectrofotometrische assay en technisch ingewikkelder is. De assay neemt bijna drie uur in beslag en er moeten veel verschillende handelingen verricht worden. Het verdient aanbeveling deze test te vereenvoudigen voor commercieel gebruik.

Conclusie

G6PD-deficiëntie in ontwikkelingslanden geeft voornamelijk bij de behandeling van malaria problemen. De standaardbehandeling met primaquine veroorzaakt bij deze mensen immers (ernstige) hemolyse. Het is zaak patiënten, wanneer malaria-infectie vermoed wordt, vóór behandeling op G6PD-deficiëntie te testen. Deze test moet derhalve goedkoop, snel en eenvoudig uit te voeren zijn, maar moet ook voor vrouwen betrouwbaar zijn.

De fluorescentiespottest, de spectrofotometrische test en de cytochemische assay doen in kosten niet veel voor elkaar onder. De kosten van alle drie de testen zijn hooguit 5 dollar per assay waarbij de fluorescentiespottest de goedkoopste is en de cytochemische assay de duurste. Van de drie testen is de fluorescentiespottest het makkelijkst en snelst uit te voeren, maar deze is niet betrouwbaar voor de diagnostiek bij vrouwen. De cytochemische assay is dat wel, maar deze test duurt lang.

Om de kosten zo laag mogelijk te houden maar ook vrouwen betrouwbaar te kunnen diagnosticeren, raden de auteurs aan twee testen te gebruiken voor diagnostiek van G6PD-deficiëntie: een voor mannen en een voor vrouwen. De goedkoopste en eenvoudigste test, de fluorescentiespottest, voldoet uitstekend voor betrouwbare diagnostiek bij mannen. Vanwege de normale populatie erythrocyten bij heterozygote vrouwen, raden wij aan de cytochemische assay te gebruiken bij vrouwen. Deze test is duurder dan de fluorescentiespottest en is lastiger uit te voeren, maar alleen deze test is betrouwbaar voor de diagnostiek bij heterozygote vrouwen.

Referenties

1. Beutler E. G6PD deficiency. *Blood* 1994; 84: 3613-3636.
2. Mason PJ, Bautista JM, Gilsanz F. G6PD deficiency: The genotype-phenotype association. *Blood Rev* 2007; 21: 267-283.
3. Clyde DF. Clinical problems associated with the use of primaquine as a tissue schizontocidal and gametocytocidal drug. *Bull World Health Organ* 1981; 59: 391-395.
4. Reclos GJ, Hatzidakis CJ, Schulpis KH. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency neonatal screening: Preliminary evidence that a high percentage of partially deficient female neonates are missed during routine screening. *J Med Screen* 2000; 7: 46-51.
5. Zaffanello M, Rugolotto S, Zamboni G, Gaudino R, Tato L. Neonatal screening for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency fails to detect heterozygote females. *Eur J Epidemiol* 2004; 19: 255-257.
6. Bryan JP. Cost considerations of malaria chemoprophylaxis including use of primaquine for primary or terminal chemoprophylaxis. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 75: 416-420.
7. Tan IK, Whitehead TP. Automated fluorometric determination of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) activities in red blood cells. *Clin Chem* 1969; 15: 467-478.

8. Beutler E. A series of new screening procedures for pyruvate kinase deficiency, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, and glutathione reductase deficiency. *Blood* 1966; 28: 553-562.
9. Van Noorden CJF, Vogels IMC, James J, Tas J. A sensitive cytochemical staining method for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in individual erythrocytes. I. Optimization of the staining procedure. *Histochemistry* 1982; 75: 493-506.
10. Van Noorden CJ, Vogels IM. A sensitive cytochemical staining method for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in individual erythrocytes. II. Further improvements of the staining procedure and some observations with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Br J Haematol* 1985; 60: 57-63.
11. Wolf BH, Weening RS, Schutgens RB, Van Noorden CJ, Vogels IM, Nagelkerke NJ. Detection of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in erythrocytes: A spectrophotometric assay and a fluorescent spot test compared with a cytochemical method. *Clin Chim Acta* 1987; 168: 129-136.
12. Tagarelli A, Piro A, Bastone L, Condino F, Tagarelli G. Reliability of quantitative and qualitative tests to identify heterozygotes carrying severe or mild G6PD deficiency. *Clin Biochem* 2006; 39: 183-186.
13. Filosa S, Calabrò V, Lania G, Vulliamy TJ, Brancati C, Tagarelli A, Martini G. G6PD haplotypes spanning Xq28 from F8C to red/green color vision. *Genomics* 1993; 52: 527-536.
14. Boyer SH, Graham JB. Linkage between the X chromosome loci for glucose-6-phosphate dehydrogenase electrophoretic variation and hemophilia A. *Am J Hum Genet* 1965; 17: 320-324.
15. Oberlé I, Camerino G, Wrogemann K, Arveiler B, Hanauer A, Raimondi E, Mandel JL. Multipoint genetic mapping of the Xq26-q28 region in families with fragile X mental retardation and in normal families reveals tight linkage of markers in q26-q27. *Hum Genet* 1987; 77: 60-65.
16. Martini G, Toniolo D, Vulliamy T, Luzzatto L, Dono R, Viglietto P, Paonessa G, D'Urso M, Persico MG. Structural analysis of the X-linked gene coding human glucose-6-phosphate dehydrogenase. *EMBO J* 1986; 5: 1849-1855.
17. Lyon F. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* 1961; 190: 372-373.
18. Davidson RG, Nitowsky HM, Childs B. Demonstration of two populations of cells in the human female heterozygous for glucose-6-phosphate dehydrogenase variants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1963; 50: 481-484.
19. World Health Organization. Standardization of procedures for the study of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1967; 366: 1-53.
20. Beutler E, Vulliamy TJ. Hematologically important mutations: Glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Blood Cells Mol Dis* 2002; 28: 93-103.
21. Luzzatto L. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency: From genotype to phenotype. *Hematol J* 2006; 91: 1303-1306.
22. Roos D, Zwieter R van, Wijnen JT, Gómez-Gallego F, Boer M de, Stevens D, Pronk-Admiraal CJ, et al. Molecular basis and enzymatic properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase Volendam, leading to chronic nonspherocytic anemia, granulocyte dysfunction, and increased susceptibility to infections. *Blood* 1999; 94: 2955-2962.
23. Rattazzi MC. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes: Molecular weight determination by gel filtration. *Biochem Biophys Res Commun* 1968; 31: 16-24.
24. Wrigley NG, Heather JV, Bonsignore A, De Flora A. Human erythrocyte glucose 6-phosphate dehydrogenase: Electron microscope studies on structure and interconversion of tetramers, dimers and monomers. *J Mol Biol* 1972; 68: 483-499.

25. Marks PA, Johnson AB, Hirschberg E. Effect of age on the enzyme activity in erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1958; 44: 529-536.
26. World Health Organization. Working Group Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Bull WHO* 1989; 67: 601-611.
27. Beutler E, Dern RJ, Alving AS. The hemolytic effect of primaquine. IV. The relationship of cell age to hemolysis. *J Lab Clin Med* 1954; 44: 439-442.
28. Beutler E. G6PD: Population genetics and clinical manifestations. *Blood Rev* 1996; 10: 45-52.
29. Tishkoff SA, Varkonyi R, Cahinhinan N, Abbes S, Argypoulos G, Destro-Bisol G, Drousiotou A, et al. Haplotype diversity and linkage disequilibrium at human G6PD: Recent origin of alleles that confer malarial resistance. *Science* 2001; 293: 455-462.
30. Tripathy V, Reddy BM. Present status on the G6PD deficiency and natural selection. *J Postgrad Med* 2007; 53: 193-202.
31. Luzzatto L, Usanga EA, Reddy S. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficient red cells: Resistance to infection by malarial parasites. *Science* 1969; 164: 839-842.
32. Guindo A, Fairhurst RM, Doumbo OK, Wellemes TE, Diallo DA. X-Linked G6PD deficiency protects hemizygous males but not heterozygous females against severe malaria. *PLoS Med* 2007; 4: 516-522.
33. Ko CH, Yung E, Li K, Li CL, Ng PC, Fung KP, Wong RP, Chui KM, Gu GJ, Fok TF. Multiplex primer extension reaction screening and oxidative challenge of glucose-6-phosphate dehydrogenase mutants in hemizygous and heterozygous subjects. *Blood Cells Mol Dis* 2006; 37: 21-6.
34. Lin Z, Fontaine JM, Freer DE, Naylor EW. Alternative DNA-based newborn screening for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Mol Genet Metab* 2005; 86: 212-219.
35. Bang-Ce Y, Hongqiong L, Zhensong L. Rapid detection of common Chinese glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations by microarray-based assay. *Am J Hematol* 2004; 76: 405-412.
36. Beutler E. *Red cell metabolism: A manual of biochemical methods*. 2e ed. New York: Grune and Stratton, 1971.
37. Vogels IM, Van Noorden CJ, Wolf BH, Saelman DE, Tromp A, Schutgens RB, Weening RS. Cytochemical determination of heterozygous glucose-6-phosphate dehydrogenase in erythrocytes. *Br J Haematol* 1986; 63: 402-405.
38. Fairbanks VF, Lampe LT. A tetrazolium-linked cytochemical method for estimation of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in individual erythrocytes: Applications in the study of heterozygotes for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Blood* 1968; 31: 589-603.
39. Gurbuz N, Aksu TA, Van Noorden CJ. Biochemical and cytochemical evaluation of heterozygote individuals with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Acta Histochem* 2005; 107: 261-267.
40. Van Noorden CJF, Dolbeare F, Aten J. Flow cytometric analysis of enzyme reactions based on quenching of fluorescence by the final reaction product: detection of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in human erythrocytes. *J Histochem Cytochem* 1989; 9: 1313-1318.
41. <http://www.gs.im3.fr/G6PD/G6PD.Medica2.html>

Summary

Peters AL, Van Noorden CJF. Diagnosis of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in developing countries. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2008; 33: 104-109.

Worldwide, 400 million people suffer from glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency, a disorder that is transmitted X-chromosomally. As a result of lyonization, women that are heterozygously deficient have a normal and a G6PD deficient population of erythrocytes, which complicates diagnosis. Antimalaria drugs cause (severe) haemolysis in G6PD deficient individuals. In order to prevent haemolytic disorders when treating malaria, a cheap and reliable test is necessary for diagnosing G6PD deficiency. The authors recommend the use of two different tests for diagnosing men and women. The fluorescent spot test is cheap and easy to perform but only reliable when used for detecting G6PD deficiency in men. The cytochemical assay is more expensive and difficult to perform, but this is the only test that can detect G6PD deficiency reliably in heterozygote women.

Keywords: glucose-6-phosphate dehydrogenase; deficiency; diagnosis; developing countries; malaria