

Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

Enzimático-UV

Determinación cuantitativa de G-6-PDH IVD

Conservar a 2-8°C

USO PREVISTO

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

PRINCIPIO DEL MÉTODO^{1,2,3}

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



SIGNIFICADO CLÍNICO

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

REACTIVOS

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

PRECAUCIONES

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

PREPARACION

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

CONSERVACION Y ESTABILIDAD

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

MATERIAL ADICIONAL

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

MUESTRAS

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

PROCEDIMIENTO

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

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

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

5. Añadir:

	Muestra
Reactivo 3 (µL)	15

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

CÁLCULOS

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

La actividad de G-6-PDH se expresa como mU/10⁹ eritrocitos o como mU/g hemoglobina. Para calcular la actividad de G-6-PDH como mU/10⁹ eritrocitos, para comparar con el valor normal, dividir la actividad calculada (mU/eritrocitos por mL sangre) por la cantidad de hematíes por mL.

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

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

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

Corrección de temperatura

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

Temperatura cubeta (°C)	TCF
25	2.076
30	1.515

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados:

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

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

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

VALORES DE REFERENCIA

En eritrocitos: 245 - 299 mU/10⁹ eritrocitos (37°C).

6,97 – 20,5 U/g Hb (37°C)

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

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

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

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

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

Precisión:

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

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

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

Los resultados obtenidos con 50 muestras fueron los siguientes:

Coefficiente de regresión (r)²: 0,9807.

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

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

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

NOTAS

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

BIBLIOGRAFÍA

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

PRESENTACIÓN

Ref: 1001420

Cont.

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