



ENSAYO PARA γ -GLUTAMILTRANSFERASA

CATALOGO NUMERO: 307-06*
307-20

TAMAÑO: 10 x 6.5 mL
12 x 20 mL

USO

Para la determinación cuantitativa in vitro de γ -glutamyltransferasa en suero.

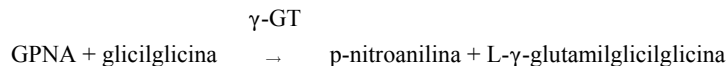
ANTECEDENTES

La actividad de la γ -glutamyltransferasa (γ -GT) es muy alta en el tejido renal, pero la medición de la actividad de la γ -GT en suero se usa más comúnmente en el diagnóstico y tratamiento de trastornos del hígado. El suero de la γ -GT se eleva antes que otras enzimas del hígado en enfermedades tales como colecistitis aguda, pancreatitis aguda, necrosis del hígado aguda y subaguda, y neoplasmas en los cuales estén presentes metástasis del hígado. La γ -GT permite la diferenciación de enfermedades del hígado en condiciones en las cuales la fosfatasa alcalina del suero es elevada. (1)

Para determinar la actividad de la γ -GT originalmente se utilizó glutatión como un sustrato, y más tarde fue reemplazado por la L-glutamylnaftilamida y la L-glutamylanilida. En la actualidad la L- γ -glutamyl-p-nitroanilida (GPNA) es usada como un sustrato porque permite una medición del índice de reacción directa sin desproteización o sin ningún tratamiento químico del producto de clivaje: la p-nitroanilina. La Sociedad Escandnava de Química Clínica y de Fisiología Clínica (Scandinavian Society of Clinical Chemistry and Clinical Physiology) (2) recomendó usar la GPNA para la determinación de γ -GT. Szasz ha publicado un método para el índice de reacción para la γ -GT en suero (3). Este método está basado en las condiciones optimizadas publicadas por Szasz.

PRINCIPIO

La GPNA y la glicilglicina son convertidas, a través de la acción de la γ -GT, a p-nitroanilina y L- γ -glutamylglicilglicina.



El índice de aumento de absorbancia a 405 nm debido a la liberación de p-nitroanilina, es directamente proporcional a la actividad de γ -GT.

REACTIVOS

Reactivo γ -GT: una solución (después de ser reconstituída) conteniendo al menos 125 mM de glicilglicina, 4.2 mM de GPNA, "buffer" (pH 8.0 a 25°C), estabilizador y un preservativo.

PRECAUCIONES

El reactivo proporcionado es para uso de diagnóstico in vitro. No pipeteé el reactivo con la boca y evite su contacto con los ojos.

PREPARACION DEL REACTIVO

Agregue el volumen requerido de agua desionizada al número requerido de viales del reactivo γ -GT. Deje pasar 5 minutos para su reconstitución y proceda a mezclar suavemente.

ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO DEL REACTIVO

El reactivo proporcionado es estable hasta la fecha de caducidad especificada en las etiquetas mientras se mantenga almacenado a una temperatura de 2-8°C.

El reactivo reconstituído es estable durante 5 días cuando se mantenga a una temperatura de 18-26°C, o hasta que la absorbancia del reactivo sea mayor a 0.800 al leerse contra agua desionizada a 405 nm.

Un precipitado puede aparecer en el reactivo activo a temperaturas menores a 18°C. Al calentar el reactivo a 50-60°C se volverá a disolver cualquier material que haya sido precipitado.

Elevating Chemistry to a Fine Art

DETERIORO DEL REACTIVO

La solución del reactivo debe ser clara. La turbidez indicaría deterioro.

La absorbancia del reactivo reconstituido no deberá exceder 0.800 al ser leída contra agua desionizada a 405 nm.

INSTRUMENTOS

Puede usarse cualquier instrumento con control de temperatura de $\pm 0.5^\circ\text{C}$ que sea capaz de leer la absorbancia con exactitud, con una sensibilidad de 0.001 de absorbancia a 405 nm. El ancho de la banda deberá ser de 10 nm o menos, la desviación de la luz de 0.5% o menos y la exactitud de longitud de onda dentro de los 2 nm.

El reactivo puede adaptarse a instrumentos automáticos. Favor de referirse al manual para los operadores de cada instrumento y de contactar al Depto. de Servicio Técnico de DCL para recibir asistencia.

COLECCION Y PREPARACION DE LA MUESTRA

La muestra de elección es un suero fresco, claro y no hemolizado.

Las muestras para análisis pueden ser almacenadas a una temperatura de 18-26°C o hasta por una semana a una temperatura de 2-8°C.

SUBSTANCIAS DE INTERFERENCIA

Se puede encontrar un resumen de la influencia de las drogas en pruebas de laboratorios clínicos consultando el Young, D.S. (4).

PROCEDIMIENTO

Materiales Proporcionados

Se incluye el reactivo necesario para la determinación de la γ -GT.

Materiales Requeridos

1. Un instrumento que reúna los requisitos mencionados en la sección de instrumentos.
2. Cubetas de 1 cm o una celda de flujo capaz de transmitir luz a 405 nm.
3. Tubos de ensayo de 3 mL.
4. Pipetas capaces de depositar volúmenes de 2 mL y de 200 μL .
5. Agua desionizada para la reconstitución del reactivo y para la preparación del blanco.
6. Un cronómetro con incrementos de 1 minuto.

Condiciones

Longitud de onda	405 nm
Temperatura	30 o 37°C
Paso de luz	1 cm
Tipo de reacción	cinética
Tiempo de reacción	3-5 minutos
Volumen de la muestra	200 μL
Volumen de reactivo	2.0 mL
Volumen total	2.2 mL
Relación muestra/reactivo	1/10

Procedimiento

1. Prepare el volumen requerido de reactivo γ -GT.
2. En tubos de ensayo separados, pipetee 200 μL del suero a muestrear.
3. Agregue 2.0 mL del reactivo, mézclelo e incube de 3 a 5 minutos. Se reducirá el tiempo de reacción si se precalienta el reactivo a la temperatura de incubación.
4. Registre la absorbancia a intervalos de 1 minuto hasta que el cambio de la absorbancia sea constante.

CALIBRACION

No se utiliza un estándar para calibrar el procedimiento de γ -GT. Los resultados son calculados usando la fórmula dada.

CONTROL DE CALIDAD

Se debe analizar un suero control con nivel normal y anormal en cada serie de muestras. Los resultados deberán caer dentro de desviaciones estándar ± 2 del valor establecido.

CALCULO Y RESULTADOS

Resultados

La actividad de la γ -GT se expresa en U/L.

Cálculo

$$\begin{aligned}\gamma\text{-GT U/L} &= \frac{\Delta A/\text{min.} \times \text{volumen del ensayo (mL)} \times 1000}{9.9 \times \text{paso de luz (cm)} \times \text{volumen de la muestra (mL)}} \\ &= \Delta A/\text{min.} \times 1111\end{aligned}$$

$\Delta A/\text{min}$ = cambio en absorbancia por minuto
Volumen del ensayo = volumen total de la reacción expresado en mL
1000 = convierte las U/mL a U/L
9.9 = coeficiente de absorbancia de la p-nitroanilina a 405 nm
Paso de luz = longitud del paso de luz expresada en cm. (usualmente 1.0)
Volumen de la muestra = volumen de la muestra expresado en mL
1111 = factor derivado de las constantes en la ecuación

Ejemplo

$$\begin{aligned}\gamma\text{-GT U/L} &= \frac{0.020 \times 2.2 \times 1000}{9.9 \times 1 \times 0.2} \\ &= 0.020 \times 1111 \\ &= 22 \text{ U/L}\end{aligned}$$

0.020 = cambio en absorbancia por minuto
2.2 = volumen de la reacción total expresado en mL
1000 = convierte U/mL a U/L
9.9 = coeficiente de absorbancia de la p-nitroanilina a 405 nm
1 = distancia del paso de luz expresada en cm
0.2 = volumen de la muestra expresada en mL
1111 = factor derivado de las constantes en la ecuación

Limitaciones

Una muestra con una actividad de γ -GT que exceda el límite de linealidad deberá diluíse con una solución salina al 0.9% y deberá volverse a muestrear incorporando el factor de dilución en el cálculo del resultado.

VALORES ESPERADOS (3)

Mujeres: 4-25 U/L a 30°C 5-32 U/L a 37°C
Hombres: 7-40 U/L a 30°C 9-52 U/L a 37°C

Se sugieren estos valores como referencia. Se recomienda que cada laboratorio establezca el rango normal para el área en que está localizado.

EVALUACION DEL METODO

Estas interpretaciones del método se obtuvieron en los laboratorios de DCL usando procedimientos automáticos.

Rango Lineal

El procedimiento manual es lineal a 250 U/L. La linealidad al usar procedimientos automáticos dependerá de la proporción muestra/reactivo utilizada.

Estudios de Precisión

La precisión de día en día se estableció ensayando 2 sueros control dos veces al día por 7 días.

γ -GT	Media U/L	Desviación Estándar U/L	Coefficiente de Variación %
Suero 1	44	1.4	3.2
Suero 2	84	1.3	1.5

La precisión dentro de la serie se estableció muestreando 2 sueros control 25 veces cada uno.

γ -GT	Media U/L	Desviación Estándar U/L	Coefficiente de Variación %
Suero 1	41	0.8	2.0
Suero 2	82	1.1	1.3

Exactitud

Se hizo una comparación entre este método y otro método de Szasz de dos reactivos, usando 50 muestras con un rango de 7.3 U/L a 797 U/L. El coeficiente de correlación fué 0.9972. El análisis de regresión lineal dió la siguiente ecuación:

$$\text{Este método} = 1.15 (\text{método de referencia}) + 2.8 \text{ U/L.}$$

*Producto de exportación de distribución limitada.

REFERENCIAS

1. Kaplan, L.A.; Pesce, A.J., Clinical Chemistry: Theory, Analysis, and Correlation, The C.v. Mosby Company, Toronto, 435-436 (1984).
2. Scandinavian Society for Clinical Chemistry and Clinical Physiology, Recommended Methods for the Determination of γ -glutamyltransferase in Blood, Scand. J. Clin. Lab. Invest. 36, 119-125 (1976).
3. Szasz, G., Reaction Rate Method for γ -glutamyltransferase Activity in Serum, Clin. chem. 22, 2051-2055 (1976).
4. Young, D.S., Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests, AACC Press, Third Edition, Washington, 1990.

IN30720S-6
Marzo 3, 2000