

GLUCOSE-6-PHOSPHATE DESHYDROGENASE (G6PDH)

REF 64 - Kit pour 20 mesures



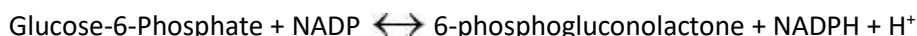
UTILISATION PREVUE & DOMAINE D'APPLICATION

Le Kit G6PDH de **Biosentec** est utilisé afin de déterminer l'activité G6PDH dans un échantillon sanguin (voir « Echantillon »), en ultraviolet à 340nm. La G6PD intervient dans la voie accessoire de la glycolyse dite « voie des pentoses ». Bien qu'accessoire dans le métabolisme du glucose (10 %), cette voie est importante, car son dysfonctionnement est presque toujours associé à une anémie hémolytique. La G6PD catalyse la première étape de cette voie : elle transforme le glucose- 6-phosphate en 6-phosphogluconolactone qui s'hydrolyse en 6-phosphogluconate.

RESUME

La glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) catalyse l'oxydation du glucose-6-phosphate en 6-phosphoglucono- δ -lactone. Cette réaction est couplée à la réduction d'une molécule de NADP⁺ en NADPH et constitue l'une des sources importantes de ce cofacteur cellulaire.

G6PDH



La quantité de NADPH formé par unité de temps est proportionnelle à l'activité G6PDH présente dans l'échantillon.

REACTIFS

REACTIF N°1	Tampon	pH 8.6	20mL
REACTIF N°2	NADP	1.5mmol/L	4mL
REACTIF N°3	Glucose-6-Phosphate	1mmol/L	2mL

VALEURS USUELLES

6 à 14 U/g Hb à 37°C

Il est recommandé que chaque laboratoire établisse un intervalle de référence tenant compte de la population étudiée.

STABILITE ET CONSERVATION

Si l'emballage extérieur est détérioré, vérifier que les flacons sont intacts. Dans ce cas, ils peuvent être utilisés. Dans le cas contraire, contacter Biosentec.

Fermés et stockés entre 2 et 8°, les réactifs sont stables jusqu'à la date inscrite sur les étiquettes. Une fois ouverts, ils doivent être utilisés sous 8 semaines et stockés entre 2 et 8°C.

La stabilité est garantie en l'absence de contaminations bactériennes.

Elimination des réactifs : se conformer à la fiche de sécurité du kit.

ECHANTILLON

Aucune méthode d'analyse connue ne permet de s'assurer que les échantillons humains de sang ne transmettent aucune infection. Tous les dérivés de sang doivent donc être manipulés avec attention.

Le prélèvement de sang doit être fait sur 1 tube ACD à température ambiante et le culot globulaire doit être réalisé dans les 3 heures.

La préparation du culot globulaire doit être réalisée jusqu'à 24h après le prélèvement si celui-ci est conservé à 4°C.

Mode opératoire pour la préparation des échantillons :

Préparation du culot globulaire : la température doit être maintenue à 4°C tout au long de la procédure

- a. Introduire dans chaque tube 2 ml de sang + 2 ml d'H₂O physiologique (NaCl 0.9%) à 4°C
- b. Répéter 2 fois :
 - Agiter doucement par inversion (2-3 fois) et centrifuger 5 mn à 3000 rpm à 4°C
 - Eliminer le surnageant ainsi que la couche de globules blancs soigneusement
 - Remplir à nouveau chaque tube avec 2 mL d' H₂O physiologique à 4°C
- c. Agiter doucement et centrifuger 10 mn à 3000 rpm à 4°C
- d. Eliminer le surnageant
- e. Répartir le culot de globules rouges en 4 fractions de 100µl

A ce stade, le culot globulaire peut être conservé à -80°C.

Préparation de l'hémolysât

- a. Ajouter 1,4 ml d'H₂O distillée à 4°C au tube contenant 100 µL de culot de globules rouges
- b. Vortexer énergiquement afin de favoriser la lyse
- c. Centrifuger 3 mn à 7000 rpm à 4°C afin d'éliminer le stroma des GR
- d. Utiliser le surnageant dans la procédure d'essai décrite ci-dessous

A ce stade, l'hémolysât doit être conservé à 4°C et doit être analysé au plus vite. Il est nécessaire de réaliser un dosage de l'hémoglobine du culot globulaire afin de pouvoir exprimer l'activité G6PDH par rapport à celle-ci.

PROCEDURE D'ESSAI

MATERIEL FOURNI

Voir la partie REACTIFS.

MATERIEL REQUIS

Des cuvettes utilisables à 340nm. Un spectrophotomètre capable de lire la Densité Optique à 340nm, avec un emplacement thermostaté à 37°C pour la cuvette de lecture. Des pipettes étalonnées permettant de prélever des volumes précis. Des cônes stériles. Du film Parafilm pour homogénéiser en mélangeant par inversion. Un chronomètre. L'équipement permettant de compter les globules rouges ou de déterminer la concentration en hémoglobine.

PROCEDURE

La température du mélange réactionnel doit être de 37°C et maintenue tout au long de la procédure. Avant utilisation, tous les réactifs du kit doivent être mélangés par inversion (2-3 fois).

1. Préparation du mélange réactionnel : dans une cuve, mettre en présence :
 - i. 1mL de REACTIF N°1
 - ii. 0.2mL de REACTIF N°2
 - iii. 0.6mL d'H₂O
 - iv. 0.1mL d'ECHANTILLON
2. Placer un morceau de parafilm sur l'ouverture et mélanger par inversion (2-3 fois)
3. Laisser équilibrer le mélange à 37°C (environ 5min) et prendre la **DO initiale** à 340nm
4. Ajouter au mélange en déclenchant le chronomètre.
 - v. 0.1mL de REACTIF N°3
5. Placer un morceau de parafilm sur l'ouverture, mélanger par inversion (2-3 fois), puis laisser incuber à 37°C
6. Prendre la **DO finale** à 340nm après **5 minutes** (précisément)

Merci de vous référer à la partie CALCULS pour déterminer l'activité Glucose-6-Phosphate dehydrogenase de l'échantillon.

Remarque : En cas de série de mesures, attention de bien prendre en compte les différentes étapes pour que le temps d'incubation de 5 minutes entre les prises de DO soit bien effectif pour chacune des mesures.

CONTROLE QUALITE

Les réactifs du kit de dosage de l'activité Glucose-6-Phosphate dehydrogenase doivent être validés par le dosage de contrôles (Biosentec #116 Set de contrôles Glucose-6-Phosphate dehydrogenase) devant être traités comme des échantillons après dilution adaptée ([voir la notice du Set de contrôles](#)).

Un dosage du contrôle hors des variations annoncées sur le flacon indique que l'analyse n'est pas correcte. Cette analyse doit être répétée en prenant soin d'éviter toute erreur de manipulation. La précision des volumes et des temps d'incubation est en effet cruciale. Si le problème persiste, contactez **Biosentec**.

CALCULS

L'activité G6PDH du contrôle :
$$G6PDH = \frac{V}{\varepsilon \times l \times v} \times \frac{\Delta DO}{\Delta t} \quad (\text{U/mL})$$

L'activité G6PDH de l'échantillon :
$$G6PDH = \frac{V}{\varepsilon \times l \times v} \times \frac{\Delta DO}{\Delta t} \times \frac{1}{Hb} \times 100 \quad (\text{U/g Hb})$$

ΔDO	=	[DO finale – DO initiale] échantillon
V	=	Volume total du mélange réactionnel (2mL)
ε	=	Coefficient d'extinction molaire du NADPH (6,22 – exprimé en L x mmol ⁻¹ x cm ⁻¹)
l	=	Longueur du trajet optique (1cm)
v	=	Volume d'échantillon (0.1mL)
Δt	=	Temps de l'analyse (5min)
Hb	=	Taux d'hémoglobine du culot globulaire (en g/dL)
100	=	Facteur de conversion (1 dl = 100 ml)

Soit pour le contrôle :

Soit pour l'échantillon :

$$G6PDH = 0.643 \times \Delta DO \text{ (U/mL)} \quad \text{ou} \quad G6PDH = 964.6 \times \frac{1}{Hb} \times \Delta DO \text{ (U/g Hb)}$$

EXEMPLE

Pour un ΔDO sur 5 minutes de 0.155 et un taux d'hémoglobine de 14.8 g/dL, l'activité correspondante en G6PDH dans l'échantillon est de $0.155 \times 964,6 / 14.8 = 10.1$ U/g Hb.

INTERPRETATION

Le kit ne permet de rendre un résultat précis que lorsque la valeur de ce dernier se trouve dans la gamme de linéarité. Si le résultat calculé est inférieur à la limite basse de linéarité, il doit uniquement être conclu qu'il y est inférieur. De même, si le résultat calculé est supérieur à la limite haute de linéarité, il doit uniquement être conclu qu'il y est supérieur.

PERFORMANCES

REPRODUCTIBILITE

Vingt analyses d'un même échantillon (étalon à 0.200 U/mL) ont été réalisées. L'activité G6PDH moyenne de ces analyses a été déterminée à 0.201 U/mL avec un coefficient de variation de 1.665%.

SENSIBILITE

L'estimation de la limite de détection est réalisée sur une série de 10 blancs. Elle est évaluée à 0.002 U/mL.

CORRELATION

Les résultats obtenus par la méthode décrite dans cette procédure ont été comparés à ceux obtenus avec ceux provenant d'une méthode de référence hospitalière sur une même série de 22 patients. Cette comparaison a été évaluée via une droite de régression linéaire dont l'équation est $y = 0.935x + 0.316$ et le coefficient de corrélation est 0.970.

LINEARITE

Les Densités Optiques mesurées par ce kit sont proportionnelles aux activités enzymatiques lorsqu'elles sont comprises entre 0.02 et 0.500 U/mL, soit entre 2.03 et 50.68 U/gHb pour un taux de 14.8g/dl.

INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES



Date d'expiration



Référence



Numéro de Lot



A conserver entre 2 et 8°C



BIOSENTEC
65 Allées Campferran
31320 Auzeville- Tolosane



IN VITRO DIAGNOSTIC