



TECO GRAM S.A.
Av. San Jorge 428 y 10ma.
Guayaquil - Ecuador
042396966 – 042397979 – 042396610
tecogram@gye.satnet.net

Juego de Reactivos para Gamma Gt (Substrato Soluble)

JUEGO DE REACTIVOS PARA GAMMA GT.

Para determinación cuantitativa de Gamma Gt. en suero.

INTRODUCCIÓN

La gamma – glutamil – transferrasa (gamma gt) es una del gran grupo de enzimas conocidas como peptidasas. Una peptidasa es una enzima que cataliza el enlace hidrolítico de los péptidos para formar amino ácidos o pequeños péptidos. La gamma Gt cataliza la transferencia de grupos Gamma Glutámicos de péptidos o de péptido como compuesto a un antecesor péptido molecular. La gamma Gt originalmente fue nombrada como una transeptidasa pero más tarde cambió su nomenclatura a una más apropiada como la transferrasa.

Aunque el tejido renal posee los mayores niveles de Gamma gt, la mayor fuente de esta enzima presente en el suero es de origen hepático. Los niveles elevados de Gamma Gt se asocian con desordenes hepatobiliares y pancreáticos. En los alcohólicos y bebedores fuertes, en los desórdenes del miocardio y en los diabéticos.

Se han empleado varios métodos para la determinación de la actividad de la γ Gt. La glutamil se usa para determinar su actividad en tiempos pasados. Se ha utilizado mucho más en un substrato de Gamma Glutamil nitro anilina (GGPNA). La glicilglicina se introdujo como un activador y Szaez adaptó este activador y el GGPNA a un método cinético fotométrico a 30° C. Rosalski adaptó las concentraciones óptimas del activador y del substrato de GGPNA a un método colorimétrico cinético de punto final a 37° C.

PRINCIPIOS

L- γ -Glutamyl-p-nitroanilida + Glicilglicina
 γ - Gt

Glicilglicina p-nitro anilina + γ glutámico

La γ -GT cataliza la transferencia de un grupo γ -glutámico a GGPNA. El rango de la liberación de p-nitro anilina se relaciona directamente a la actividad de la γ -GT en la muestra y se cuantifica midiendo el incremento de absorbancia a 405 nm.

COMPOSICIÓN DEL REACTIVO.

Reactivo para γ -GT (las concentraciones se refieren al reactivo reconstituido, γ -glutamyl-p-nitroanilida 4.79 mM, glicilglicina 100 mM, tris 180 mM a pH 8.2 + 0.1.

Precaución: Evite el contacto. No lo pipetee con la boca.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Este reactivo es para diagnóstico in Vitro solamente.
2. La p-nitro anilina es tóxica y puede absorberse por la piel.
3. Evite la ingestión y el contacto con la piel.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

Reconstituya el reactivo con el volumen de agua señalado en el frasco.

ALMACENAMIENTO DEL REACTIVO

Manténgase entre 2° - 8° C. el Reactivo reconstituido es estable por 14 días entre 2° - 8° C. (refrigerado).

Nota: el reactivo puede que tenga que ser recalentado después de refrigerarlo para disolver el substrato.

DETERIORO DEL REACTIVO

El Reactivo debe desecharse si:

1. Ha penetrado la humedad en el frasco.
2. El reactivo reconstituido tiene una absorbancia mayor de 0.85 a 405 nm leído contra blanco de agua.

RECOLECCION DE LAS MUESTRAS Y ALMACENAMIENTO.

Obtenga la sangre total por venipuntura y déjela coagular. Centrifugue y separe el suero. Si no se va analizar de inmediato, mantenga las muestras refrigeradas entre 2 – 8° C. o en congelación a -20° C. Los anticoagulantes, particularmente los fluoruros, oxalatos y citratos no deben usarse pues inhiben la actividad de la γ -GT. La γ -GT en el suero mantiene una estabilidad de por lo menos unas 8 horas a 25° C. tres días entre 2 – 8° C. y una semana a -20° C.

MATERIALES PROVISTOS

Reactivo para γ -GT

MATERIALES REQUERIDOS Y NO PROVISTOS

1. Pipetas de precisión con volúmenes adecuados.
2. Reloj.
3. Tubos de ensayo y porta tubos.
4. Incubador a 37° C.
5. Espectrofotómetro capaz de leer a 405 nm.

PROCEDIMIENTO AUTOMATIZADO

1. Solicite las instrucciones adecuadas que tenemos a su disposición.
2. El procedimiento se desarrolla cinéticamente y está estandarizado de acuerdo a la absorbancia molar de la p-nitro anilina tomado a 9.90×10^3 a 405 nm bajo las condiciones de trabajo especificadas.

PROCEDIMIENTO CINETICO.

1. Reconstituya el reactivo de acuerdo a las instrucciones.
2. Ajuste a cero el espectrofotómetro con agua destilada a 405 nm.
3. Prepare la temperatura de la cubeta a 30° o 37° C.
4. Pipetee 1.0 ml de reactivo de trabajo en los tubos. Agregue 0.05 ml (50ul) de suero de paciente, controles, etc. a los tubos respectivos con reactivo, mezclase e inmediatamente viértalo en la cubeta térmica.
5. Espere 30 segundos y tome las absorbancias a intervalos de exactamente 1 minuto en los próximos 2 minutos.
6. Calcule el promedio de cambio de absorbancias por un minuto y use este valor para cálculo.
7. Si se ha utilizado el procedimiento arriba descrito multiplique A/min por el factor 2121.
8. Repita el procedimiento para cada muestra.

NOTAS DEL PROCEDIMIENTO

Muestras con valores por encima de los 600 UI/L deben diluirse en 1:1 con 0.9% de salinidad. Reanalícelas y multiplique el resultado final por dos.

CALCULOS

$$\frac{A/\text{min} \times 10^3 \times TV \times 100}{E \times SV \times LP} = \text{UI/L}$$

A/min = Cambio en la absorbancia por minuto.
 103 = Conversión de milinoles a micromoles.
 TV = Volumen total del reactivo.
 E = Absorbancia molar de la p-nitro anilina a 405 nm (9.9×10^3 litros /mol x cm.)
 SV = Volumen de la muestra (1.0ml)
 LP = Paso de luz (1cm.)

$$\frac{A/\text{min} \times 10^3 \times 1.05 \times 100}{9.9 \times 10^3 \times 0.05 \times 1} = A/\text{min} \times 2121$$

Ejemplo: una muestra dio un cambio de absorbancia al minuto de intervalo luego.

$$0.010 \times 2121 = 21.1 \text{ UI/L}$$

Nota: si alguno de los parámetros arriba señalados se cambian debe calcularse un nuevo factor.

DEFINICIÓN DE UNA UNIDAD ENZIMÁTICA

Una unidad internacional (UI) de γ -GT es la cantidad de enzima que transforma un micromol de glutamato por minuto y por litro de muestra con la presencia de 1 micromol de p-nitro anilina bajo condiciones específicas de procedimiento.

CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda incluir controles en cada corrida de exámenes. Existen controles comerciales con valores conocidos de γ -GT que pueden utilizarse como control de calidad. El valor del control comercial debe verificarse por este método. Si no se obtiene el valor adecuado de valores en los exámenes ellos puede significar el deterioro del reactivo, mal funcionamiento instrumental o errores de técnica.

LIMITES DEL PROCEDIMIENTO

Este procedimiento está estipulado para media γ -GT en suero independiente de su fuente de origen.

VALORES ESPERADOS

Hombres entre 0 – 45 UI/L.

Mujeres entre 0 – 30 UI/L

Es muy recomendable que cada laboratorio establezca su propio rango normal.

CARACTERISTICAS DEL EXAMEN

1. Linealidad: 600 mg/dl.
2. Sensibilidad: Basada en una resolución instrumental de 0.001 éste procedimiento tiene una sensibilidad de 0.02 mg/dl.
3. Precisión:
 Dentro de la corrida: dos sueros comerciales fueron analizados 20 veces y se obtuvo la siguiente precisión:

	Nivel 1	Nivel 2
Valor	20.2	65.9
S.D.	1.7	2.5
C.V.%	8.4	3.8

De corrida a corrida: Fueron analizados dos sueros controles comerciales durante 5 días consecutivos (con muestras duplicadas en cada nivel) y se obtuvo la siguiente precisión:

	Nivel 1	Nivel 2
Valor	21.8	65.4
S.D.	1.5	2.8
C.V.%	6.8	4.3