

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

Juego de Reactivos para Glucosa Oxidasa

JUEGO DE REACTIVOS PARA GLUCOSA OXIDASA (LIBRE DE FENOL)

Para determinación cuantitativa de glucosa en suero.

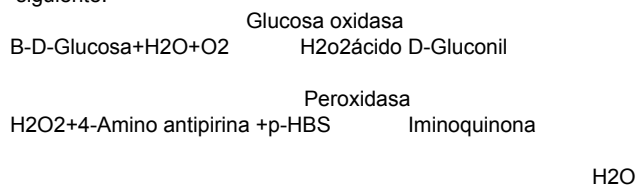
INTRODUCCIÓN

La glucosa es el carbohidrato que aparece en mayor concentración en la sangre periférica. La oxidación de la glucosa es la mayor fuente de energía celular del organismo. Las determinaciones de glucosa están mayormente encaminadas a auxiliar en el diagnóstico y tratamiento de la diabetes mellitus. Los niveles elevados de glucosa se asocian a la pancreatitis, disfunciones de la pituitaria y la tiroides, fallos renales y hepatopatías, mientras que niveles bajos de glucosa pueden asociarse con insulinoma, hipotituarismo, neoplasma o hipoglucemia insulínica inducida.

Los métodos para determinación de glucosa utilizan la glucosa oxidasa para catalizar la oxidación de la glucosa. Keston modificó este método en 1950 utilizando glucosa oxidasa/peroxidasa como sistema enzimático y o-dianisidina como sistema cromógenos. El método de Trinder reemplaza a la carcinogénica o-dianisidina con el fenol más 4-amino antipirina. Este método es menos afectado por sustancias interferentes.

PRINCIPIOS

La Secuencia enzimática empleada en el examen de glucosa es la siguiente:



La B-D-Glucosa es oxidada por la glucosa oxidasa para producir ácido D-Gluconico y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno entonces se acopla a la 4-amino antipirina y al sustituto del fenol, el p-HBS, y en presencia de la peroxidasa se forma un compuesto rojizo de quinoneimina. La cantidad de composición formada es proporcional

a la concentración de glucosa y puede ser medida fotocolorimétricamente.

COMPOSICIÓN DEL REACTIVO.

Cuando se reconstituye según lo indicado, el reactivo para glucosa contiene lo siguiente:

- (la concentración se refiere al reactivo reconstituido)
Glucosa Oxidasa 15 u/ml. Peroxidasa 1.2 u/ml Mutar olaza 4.0 U/7ml 4-Amino antipirina 0.38 mM. p-Hidroxibenenceno sulfonato 10mM. e ingredientes no reactivos.
- ESTANDAR DE GLUCOSA: (100 mg/dl B-D-Glucosa)

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Precaución: los reactivos para diagnóstico In Vitro pueden ser peligrosos. Manipúlese de acuerdo a un correcto procedimiento de laboratorio y evítese la ingestión y el contacto con ojos y piel.

- Las muestras deben considerarse infecciosas y manipularse adecuadamente.
- Utilice agua destilada o desionizado cuando se indique.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Tanto el reactivo como el estándar deben almacenarse entre 2° - 8° C. antes de reconstituirse. El reactivo debe utilizarse hasta la fecha de expiración indicada en la etiqueta del frasco. El reactivo reconstituido debe almacenarse en frasco ámbar entre 2° - 8° C. y es estable durante 30 días cuando se almacena cuando se indica. El reactivo debe ser claro e incoloro.

DETERIORO DEL REACTIVO

El Reactivo debe desecharse si:

- Presente turbidez. La turbidez puede ser signo de contaminación.
- Ha penetrado humedad en el frasco.
- Falla el reactivo para obtener la linealidad o recuperar los valores establecidos en el rango de control.

RECOLECCION DE LAS MUESTRAS

- Los sueros deben ser libres de hemólisis.
- No puede usarse plasma citratado, heparinizado, oxalatado o con EDTA.
- El suero debe separarse del coágulo lo antes posible pues el rango de disminución de la glucosa es de aproximadamente un 7% por hora de sangre total.
- La glucosa en suero o plasma es estable por 24 horas cuando almacena entre 2° - 8° C.

SUSTANCIAS QUE INTERFIEREN

El suero fuertemente lipémico o icterico darán falsos valores de glucosa y de ocurrir se requerirá un blanco de muestra. Prepare el blanco de muestra agregando 0.2ml (20ul) de suero del paciente a 3.0ml de agua destilada y léase contra blanco de agua. Reste la absorbancia del blanco muestra del examen en cuestión para corregir el icterio o la lipemia. Young y colaboradores aportaron una lista de drogas que interfieren en el examen.

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS

- Pipetas de precisión con los volúmenes requeridos.
- Porta tubos.
- Reloj.
- Bloque térmico o baño María a 37° C.
- Espectrofotómetro capaz de leer absorbancias a 500nm.

INSTRUCCIONES GENERALES

El reactivo para glucosa se usa tanto para método automatizado como para el manual en un espectrofotómetro adecuado.

PROCEDIMIENTO MANUAL

1. Prepare el reactivo de acuerdo a las instrucciones.
2. Rotule los tubos blanco, estándar, control, pacientes, etc.
3. Pipetee 10 ul. de suero en el tubo paciente, 10 ul de estándar al tubo estándar, y 10ul de agua destilada en el tubo blanco.
4. Añada 1 ml de reactivo de glucosa a todos los tubos e incube a 37° C. por 15 minutos.
5. Después de incubados, ajuste el espectrofotómetro con el blanco de reactivo. Lea y anote las absorbancias de todos los tubos a 500 nm (500 – 540 nm).
6. El color es estable al menos durante 30 minutos. Si el espectrofotómetro usado requiere un volumen final mayor de 1.0ml para lecturas precisas, utilice 0.2ml (20ul) de muestra y 2.0 o 2.5 ml de reactivo. Igualmente al patrón. Desarrolle la técnica tal y como se describe.

LIMITES DEL PROCEDIMIENTO

El reactivo es lineal hasta 500 mg/dl. Muestras con valores de glucosa mayores de 500 mg/dl. Deben diluirse con agua a 1:1 vueltos a analizar y los resultados multiplicarlos por 2.

A = Absorbancia

$$\frac{A(\text{paciente}) \times \text{Conc. del estándar}}{A(\text{estándar})} = \text{Conc. de la muestra} \quad (\text{mg/dl})$$

Ejemplo: A (paciente) = 0.37, A (estándar) = 0.28
Concentración del Estándar = 100 mg/dl.

$$0.42 \times 100 = 132 \text{ mg/dl} \\ 0.28$$

Para obtener los resultados en unidades internacionales, multiplique el valor obtenido por 10 para convertir dl. a litros y divida el valor entre 180, o sea, el peso molecular de la glucosa.

$$\text{Mg/dl} \times 10 = \text{mg/dl} \times 0.0556 \\ 180$$

Ejemplo = 132 mg/dl x 0.0556 = 7.34 mmol/L.

CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda incluir controles en cada corrida de exámenes. Existen controles comerciales con valores conocidos de glucosa que pueden utilizarse como control debe confirmarse con el método señalado. Si no se obtiene el rango adecuado de valores ello puede indicar deterioro del reactivo, fallos instrumentales o mal procedimiento de técnicas.

VALORES ESPERADOS

Entre 70 – 105 mg/dl.

Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango normal.

CARACTERISTICAS DEL EXAMEN

1. Linealidad: 500 mg/dl.
2. Comparación: Un estudio comparativo entre éste método y otro método libre de fenol arrojó una ecuación de regresión de $y = 1.02x + 3.1$ con un coeficiente de correlación de 0.99
3. Precisión:

Dentro de la corrida

Valor	D.S.	C.V. %
87	4.2	4.8
282	5.4	1.9

De Corrida a corrida

Valor	D.S.	C.V.
85	3.7	4.3
287	9.6	3.3