

G6PDH

Présentation

Référence	Composition du Kit			
1 7900 99 10 026	R1	1 x 20 mL	+	R2 4 x 5 mL
	R3	1 x 40 mL		
1 7900 99 10 040		2 x 0,5 mL		TruCal G6PDH
		Calibrants à 2 niveaux de concentration		

Emploi Prévu

Réactif diagnostique pour le dosage quantitatif in vitro de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) dans le sang total sur systèmes photométrique.

Intérêt Clinique

La glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) est une enzyme cytosolique qui catalyse la conversion du glucose-6-phosphate (G-6-P) en 6-phosphogluconate dans la première étape de la voie du phosphate pentose. La voie du phosphate pentose est la principale source du NADPH nécessaire aux processus anabolisants. Le NADPH est nécessaire en tant que donneur d'hydrogène pour de nombreux processus réducteurs ainsi que pour la stabilité de la catalase et la préservation et la régénération de la forme réduite du glutathion. La catalase et le glutathion sont tous deux essentiels à la désintoxication cellulaire et à la protection des cellules contre le stress oxydatif. Comme les globules rouges n'ont pas d'autre source de NADPH et dépendent uniquement de la G6PDH, l'enzyme primaire de la voie du phosphate pentose.

Le déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) est l'une des enzymopathies génétiques humaines les plus courantes. Les personnes atteintes d'un déficit en G6PDH sont à risque d'anémie hémolytique dans les états de stress oxydatif, d'infections et après ingestion de certains médicaments ou fèves. [1]

Méthode

Méthode enzymatique UV (photométrique)

Principe

La glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) catalyse la première étape du shunt phosphate pentose, oxydant le glucose-6-phosphate (G-6-P) en 6-phosphogluconate (6-PG) et réduisant NADP en NADPH.

L'augmentation de l'absorbance du NADPH est proportionnelle à la concentration de G6PDH dans l'échantillon.

Le réactif contient des inhibiteurs de 6PGDH (6-phosphogluconate déshydrogénase) qui empêchent la production d'un deuxième équivalent molaire de NADPH par la 6-phosphogluconate déshydrogénase érythrocytaire.

Réactifs

Composants et Concentrations

R1 :	Tampon de Good modi	pH 7,65	> 20 mmol/L
R2 :	NADP		> 0,19 mmol/L
R3 :	G-6-P	pH 7,65	> 0,1 g/L

Conservation et Stabilité

Les réactifs sont stables jusqu'à la fin du mois de la date de préemption indiquée, conservés entre +2 °C et +8 °C en évitant toute contamination. Ne pas congeler les réactifs.

Avertissements et Précautions d'Emploi

- Dans de très rares cas, des spécimens de patients souffrant de gammopathie peuvent conduire à des résultats faussés. [2]
- Les réticulocytes ont des taux de G6PDH plus élevés que les globules rouges matures ; il n'est pas recommandé d'effectuer le dosage après une crise hémolytique grave, car le G6PDH peut sembler faussement élevé.

- Se référer aux fiches de sécurité et prendre les précautions nécessaires pour l'utilisation de réactifs de laboratoire. Pour le diagnostic, les résultats doivent toujours être exploités en fonction de l'historique médical du patient, des examens cliniques ainsi que des résultats obtenus sur d'autres paramètres.
- Uniquement à usage professionnel.

Gestion des Déchets

Se référer aux exigences légales nationales

Préparation du Réactif

Dissoudre un flacon de R2 avec 5 mL de réactif R1 (réactif reconstitué), mélanger délicatement et éviter la formation de mousse.

Stabilité :

5 jours de +2 à +8 °C

R3 est prêt à l'emploi.

Laisser le réactif atteindre la température ambiante avant utilisation. Fermer immédiatement après manipulation.

Matériels Nécessaires

Équipement général de laboratoire

Spécimen

Sang total recueilli sur EDTA, l'héparine ou d'ACD (acide-citrate dextrose).

Prélèvement d'échantillons conformément au CCRS (NCCLS) [3]

Préparation du Spécimen

Pour cette préparation, utiliser G6PDH Solution hémolysante de DiaSys (Référence 1 7900 99 10 113) comme suit :

Solution hémolysante :	9 parts
Spécimen/Calibrant/Contrôles :	1 part

Mélanger doucement, éviter la formation de mousse et doser immédiatement.

Attention

L'activité de G6PDH est exprimée en unités par gramme d'hémoglobine [U/g Hb] ; par conséquent, la concentration d'hémoglobine doit être déterminée avant d'effectuer le test G6PDH.

Stabilité

L'érythrocyte G6PDH est stable dans le sang total pendant une semaine à une température de +2 à +8 °C, mais il est instable dans l'hémolysat de globules rouges. Un précipité peut apparaître 20/30 minutes après dilution (voir préparation de l'échantillon avec la solution hémolysante G6PDH), probablement en raison de la variabilité biologique de l'échantillon du patient.

La congélation du sang n'est pas recommandée. [4,5]

Mode Opérateur

Des notices d'application spécifiques aux systèmes automatisés sont disponibles sur demande.

Longueur d'onde	340 nm (334 – 365 nm)
Trajet optique	1 cm
Température	+37 °C
Mesure	Contre l'air ou de l'eau distillée

	Calibrant		Echantillon
	Niveau 1	Niveau 2	
Réactif reconstitué	1000 µL	1000 µL	1000 µL
Calibrant	10 µL	10 µL	-
Echantillon	-	-	10 µL
Mélanger doucement et laisser incuber pour 10 minutes à +37 °C, puis ajouter :			
R3	2000 µL	2000 µL	2000 µL
Mélanger doucement. Lire l'absorbance (A1) après exactement 2 minutes. Lire à nouveau (A2) après 5 minutes.			

Calcul

Calcul manuel de l'activité G6PDH (U/L – +37 °C)

ΔA Calibrant niveau 1 = A2 calibrant niv. 1 – A1 calibrant niv. 1

ΔA Calibrant niveau 2 = A2 calibrant niv. 2 – A1 calibrant niv. 2

ΔA Échantillon = A2 échantillon – A1 échantillon. Calculer toujours ΔA /minute (ΔA /min) : ΔA /min = (A2 – A1) / 5

G6PDH (U/L, 37 °C) = ΔA /min x (Volume total/Volume d'échantillon) x (1/é d) x 1000

Volume total = (1 + 001 + 2) = 3,01 mL

Volume d'échantillon = 0,01 mL

é = 6,3 = Absorption millimolaire de NADPH à 340 nm

d = 1 cm = longueur de trajet optique

1000 = Facteur pour convertir l'activité à litres

G6PDH (U/L, 37 °C) = ΔA /min x (3,01/0,01) x (1/6,3 x 1) x 1000 = ΔA /min x (301 x 1000) / 6,3

= ΔA /min x (301000) / 6,3

= ΔA /min x 47778

Calcul manuel de l'activité G6PDH activité (U/g hémoglobine à 37 °C)

Compte tenu de la valeur de l'hémoglobine totale (Hb totale) de chaque échantillon [g/dL], appliquer la formule suivante:

$$\text{G6PDH [U/g Hb]} = \frac{\text{G6PDH [U/L, 37 °C]}}{\text{Total Hb [g/dL]} \times 10}$$

Calibrants et Contrôles

TruCal G6PDH est recommandé pour la calibration. Les valeurs du calibrant TruCal G6PDH ont été assignées à base d'un test commercialement disponible. Utiliser TruLab G6PDH pour le contrôle de qualité interne. Chaque laboratoire établira la procédure à suivre si les résultats se situent en dehors des limites de confiances.

	Référence	Présentation
TruLab G6PDH (3 niveaux)	1 7900 99 10 045	3 x 0,5 mL

Performances

Données évaluées sur MINDRAY BS300

Les données exemplaires citées en bas peuvent varier légèrement en cas de conditions de mesure déviantes.

Domaine de mesure jusqu'à 3200 U/L Au-delà de cette valeur, utiliser la moitié du volume d'échantillon et multiplier le résultat par 2.	
Limite de détection *	29 U/L

* Concentration mesurable la plus basse qui peut être distinguée de zero ; Moyenne + 3 SD (N = 20= d'un spécimen exempt d'analyte.

Substance interférente	Interférences < 10 % jusqu'à
Cuivre	Inhibiteur fort
Sulfate	Inhibiteur fort
Acide ascorbique	50 mg/dL
Bilirubine (totale)	40 mg/dL
Lipémie (Intralipid®) (triglycérides)	4000 mg/dL
Pour plus d'information au sujet des interférences, voir Young DS. [6]	

Précision		
Intra série (n=20)	Echantillon 1	Echantillon 2
Moyenne [U/L]	191	1374
CV [%]	1,4	0,7
Inter série (n=20)	Echantillon 1	Echantillon 2
Moyenne [U/L]	192	1373
CV [%]	1,7	0,9

Comparaison de méthode (Sang; n=21)	
Test x	G6PDH concurrent
Test y	G6PDH de DiaSys
Pente	0,988
Ordonnée à l'origine	-13 U/L
Coefficient de corrélation	r = 0,991

Facteur de Conversion

G6PDH [U/L] x 0,0167 = G6PDH [µkat/L]

Valeurs Usuelles [7]

Adultes : 7,9 – 16,3 U/g Hb

Chaque laboratoire devrait vérifier si les valeurs usuelles sont transmissibles à sa propre population patiente et déterminer ses propres valeurs de référence si besoin est.

Références Bibliographiques

- Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE editors. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics 4th ed. Elsevier Saunders 2006. p. 626-27, 630-31.
- Bakker AJ, Mücke M. Gammopathy interference in clinical chemistry assays: mechanisms, detection and prevention. ClinChemLabMed 2007;45(9):1240-1243.
- NCCLS. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens; Approved Guideline—Third Edition. NCCLS document H18-A3 (ISBN 1-56238-555-0). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
- 2004.Beutler E. et al., Brit. J. Haem. 43, 469 (1979)
- Castro SM, Weber R, Dadalt V, Santos VF, Reclos GJ, Pass KA, Giugliani R. Evaluation of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Stability in Blood Samples under different Collection and Storage Conditions. Clinical Chemistry 2005 51(6): p. 1080.
- Young DS. Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests. 5th ed. Volume 1 and 2. Washington, DC: The American Association for Clinical Chemistry Press 2000.
- Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE editors. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics 4th ed. Elsevier Saunders 2006. p. 2271.
- Lowe M.L. et al., Clin. Chem. 18, 440 (1972)
- Pinto P.V.C. et al., J. Clin Invest. 45, 823 (1966)



DiaSys Diagnostic Systems GmbH
Alte Strasse 9 65558 Holzheim Allemagne
www.diasys-diagnostics.com