

GLUCOSA OXIDASA (LÍQUIDA)

Uso:

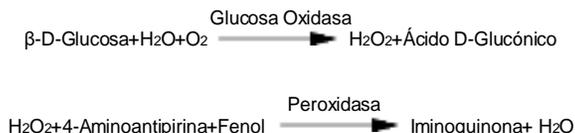
Para la determinación cuantitativa de glucosa total en suero.

Introducción:

La glucosa es el principal carbohidrato presente en la sangre periférica. La oxidación de la glucosa es la fuente principal de energía celular en el cuerpo. Determinaciones de glucosa se ejecutan principalmente para ayudar en el diagnóstico y tratamiento de la diabetes mellitus. Los niveles elevados de glucosa pueden estar asociados con pancreatitis, disfunción pituitaria o tiroides, insuficiencia renal y enfermedad hepática, mientras que los niveles bajos de glucosa pueden estar asociados con insulinooma, hipopituitarismo, neoplasias, o la insulina inducida por hipoglucemia.^{1, 2} Los primeros métodos enzimáticos para la determinación de glucosa involucraron glucosa oxidasa para catalizar la oxidación de la glucosa. Keston modificó este método en la década de 1950, utilizando un sistema de enzima glucosa oxidasa/peroxidasa y un sistema cromógeno o-dianisidina.³ Desde entonces, varios sistemas de cromógenos alternativos han sido propuestos. El método de Trinder reemplaza cancerígeno o-dianisidina con fenol más 4-aminoantipirina.⁴ Este método está menos influenciado por las sustancias que interfieren y no sufre de los muchos inconvenientes de los métodos anteriores.

Principio:

La secuencia de reacción enzimática empleada en este análisis de la glucosa es la siguiente:



β -D-Glucosa se oxida por la glucosa oxidasa para producir ácido D-glucónico y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno es entonces oxidativamente acoplado con el sustituto 4-aminoantipirina y fenol, p-HBS, en presencia de peroxidasa para producir un colorante quinoneimina rojo. La cantidad de complejo de color formado es proporcional a la concentración de glucosa y se puede medir fotométricamente.

Composición del Reactivo:

1. Reactivo de glucosa (líquido): Glucosa Oxidasa 15 IU/mL, peroxidasa (rábano picante) 1.2 IU/mL, 4-aminoantipirina 0.2 mM, fenol 4 mM, ingredientes no-reactivos y conservantes.

Preparación del Reactivo:

Todos los reactivos están listos para su uso.

Advertencias y Precauciones:

- Para el uso de diagnóstico in vitro. PRECAUCIÓN: Los reactivos de diagnóstico in vitro pueden ser peligrosos. Manipular de acuerdo con los procedimientos de laboratorio que determinan evitar la ingestión y el contacto con los ojos o la piel.
- Las muestras deben ser consideradas infecciosas y manejadas apropiadamente.
- Use agua destilada o desionizada donde se indique.

Almacenaje y Estabilidad del Reactivo:

El reactivo líquido debe conservarse a 2-8°C. El reactivo puede usarse hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del envase.

Deterioro del Reactivo:

El reactivo debe ser desechado si:

- Turbidez se ha producido; la turbidez puede ser un signo de contaminación.
- El reactivo no cumple con las reclamaciones de linealidad o no recupera los valores de control en el rango indicado.

Recolección de la Muestra:

- Las muestras de prueba deben ser suero y libres de hemólisis.
- El suero debe ser separado del coágulo rápidamente ya que la tasa de disminución de la glucosa es de aproximadamente 7% por hora en sangre.
- La glucosa en suero o plasma es estable durante veinticuatro (24) horas cuando se almacena a 2-8°C.⁵

Sustancias Interferentes:

Sueros altamente lipémicos o ictericos causarán falsos valores de glucosa y requieren el uso de un blanco de suero.⁵ Añadir 0.02 mL (20 μ L) de suero del paciente a 3.0 mL de agua destilada y leer contra un blanco de agua. Restar esta absorbancia de la absorbancia de prueba del paciente para corregir la lipemia o ictericia. Young, et al. da un examen exhaustivo de las interferencias de drogas.⁶

Materiales Provistos:

- Reactivo de Glucosa (Líquido).

Materiales Requeridos pero no Provistos:

- Pipetas para medir con precisión volúmenes requeridos. Tubos de ensayo/estantes.
- Reloj cronómetro.
- Bloque calentador/Baño de agua (37°C)
- Espectrofotómetro capaz de medir absorbancias con precisión a 500 nm.

Instrucciones Generales:

El reactivo de glucosa líquida se destina para el uso como un procedimiento automatizado en instrumentos de química o como un procedimiento manual en un espectrofotómetro adecuado.

Procedimiento Automatizado:

Consulte el manual de aplicación apropiado disponible.

Procedimiento Manual:

- Rotule los tubos: blanco, estándar, control, paciente, etc.
- Pipetear 1.0 mL de reactivo de trabajo a todos los tubos y colóquelos en un baño de calentamiento a 37°C por lo menos cinco (5) minutos.
- Añadir 0.01 mL (10 μ L) de muestra a los tubos respectivos, mezcle e incube a 37°C durante exactamente diez (10) minutos.
- Después de la incubación, cero el espectrofotómetro con el blanco de reactivo. Lea y registre las absorbancias de todos los tubos a 500 nm (rango de longitud de onda: 500-520 nm).

* Un calibrador multiusos puede ser utilizado para reemplazar el estándar.

Nota: Si el espectrofotómetro utilizado requiere un volumen final mayor de 1.5 mL para una lectura precisa, utilice 0.02 mL (20 μ L) de muestra a 3.0 mL de reactivo. Realizar la prueba como se describe anteriormente.

Calibración:

Los procedimientos se calibran con la solución. Su absorbancia se utiliza para calcular los resultados. Se recomienda establecer una curva de linealidad hasta 500 mg/dL con otras soluciones estándar comerciales disponibles para verificar el rendimiento de los instrumentos y reactivos.

Limitaciones:

El reactivo de glucosa es lineal a 500 mg/dL. Las muestras que tienen valores de glucosa superior a 500 mg/dL se deben diluir con agua 1:1, y analizarse de nuevo y los resultados multiplicarlos por 2.

Cálculos:

(A = Absorbancia), (pac= paciente), (est=estándar).

$\frac{A(\text{paciente})}{A(\text{estándar})} \times \text{Conc. de estándar} = \text{Conc. de desconocido (mg/dL)}$

Ejemplo:

A (pac) = 0.37, A (est) = 0.28, Conc. de estándar = 100 mg/dL.

$$\frac{0.37}{0.28} \times 100 = 132 \text{ mg/dL}$$

UNIDADES SI: Para obtener resultados en unidades SI (mmol/L), multiplique el resultado en mg/dL por diez (10) para convertir dL a litro y se dividen por el valor 180, el peso molecular de la glucosa.

$$\text{mg/dL} \times \frac{10}{180} = \text{mg/dL} \times 0.0556$$

Ejemplo: 132 mg/dL x 0.0556 = 7.34 mmol/L

Control de Calidad:

Se recomienda que los valores altos y bajos de glucosa en los controles se incluyan en cada serie de pruebas. Material de control disponible comercialmente con valores de glucosa establecidos pueden ser utilizados para el control de calidad. El valor asignado del material de control debe ser confirmado por la aplicación elegida. Si no se obtiene el rango apropiado de valores en la prueba de material de control puede indicar deterioro del reactivo, mal funcionamiento del instrumento o errores de procedimiento.

Valores Esperados:

70 – 105 mg/dL.⁵

Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango normal.

Características de Desempeño:

- Linealidad: 500 mg/dL.
- Sensibilidad: Un cambio de absorbancia de 0.001 a 500 nm corresponde a 0.5 mg/dL bajo la condición indicada de este sistema de ensayo.
- Comparación: Una comparación entre este reactivo en forma líquida y en forma de polvo produjo una ecuación de regresión de: $y = 1.00x + 2.54$ (N=64) con un coeficiente de correlación de 0.99.
- Precisión:

Entre Corridas:

Promedio (mg/dL)	S.D.	C.V. (%)
83	4.7	5.6
313	18.8	6.0

Corrida a Corrida:

Promedio (mg/dL)	S.D.	C.V. (%)
83	7.0	8.4
285	24.0	8.5

Referencias:

- Holvey, D.N., ed.: *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy*, erck and Co., Inc. Rahway, N.J. (1972).
- Cooper, G.R., *CRC Crit Rev. Clin Lab. Sci.* 4:101 (1973).
- Keston, A.S., Colorimetric, "Enzymatic Reagents for Glucose." *Abstracts of Papers, 129th Meeting ACS*, 131C (1956).
- Trinder, P., "Determination of blood glucose using 4-aminophenazone." *J. Clin. Path.* 22:246 (1969).
- Tietz, N.W., *Fundamentals of Clin. Chem.*, Philadelphia, W.B. Saunders (1970).
- Young, D.S. et al., *Clin. Chem.* 21:5 (1975).



