



BIOLABO
www.biolabo.fr

FABRICANT :
BIOLABO SAS,
Les Hautes Rives
02160, Maizy, France

G6-PDH lyophilisée Méthode cinétique U.V.

Réactif pour le dosage quantitatif de l'activité Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6-PDH)
[EC 1.1.1.49] dans le sérum humain, le plasma ou les érythrocytes.

REF 97099 R1 20 x 3 mL R2 3 x 1 mL R3 1 x 70 mL R4 1 x 20 mL

SUPPORT TECHNIQUE ET COMMANDES

Tel : (33) 03 23 25 15 50

Fax : (33) 03 23 256 256



CODE CNQ : XX

IV USAGE IN VITRO

INTERET CLINIQUE (1) (2)

La Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6-PDH) est une enzyme contenue dans les érythrocytes et intervenant dans la glycolyse. Différents variants de G6-PDH, définis selon leurs profils électrophorétiques et cinétiques, sont fréquemment rencontrés et ont des conséquences cliniques dans différents groupes ethniques. Une déficience en G6-PDH peut conduire à une anémie hémolytique suite à l'ingestion de 8-aminoquinoline antimalarienne, d'acide nalidixique, de nitrofurantoïne, phénacétine, de forte dose de vitamine C ou de certains sulfonamides ou sulfones. La déficience peut entraîner la maladie hémolytique du nouveau-né dans les populations asiatiques et méditerranéennes.

PRINCIPE (4) (5).

Le schéma de la réaction (méthode de Beutler et al.) est le suivant :



L'augmentation de la concentration en NADPH mesurée à 340 nm est proportionnelle à l'activité G-6-PDH dans le spécimen.

REACTIFS

flacon R1	COENZYME lyophilisé
NADP ⁺	310 mmol/L
flacon R2	SUBSTRAT lyophilisé
Glucose 6 phosphate	0,6 mmol/L
flacon R3	TAMPON DE RECONSTITUTION
Tampon Tris pH 8,0	100 mmol/L
MgCl ₂	10 mmol/L
EDTA	0,5 mmol/L
Conservateur	
flacon R4	SOLUTION HEMOLYSANTE
Digitonine	0,2 g/L

PRECAUTIONS

Les réactifs BIOLABO sont destinés à du personnel qualifié, pour un usage in vitro.

- Vérifier l'intégrité des réactifs avant utilisation.
- Utiliser des équipements de protection (blouse, gants, lunettes). Ne pas pipeter avec la bouche.
- En cas de contact avec la peau ou les yeux, rincer abondamment à l'eau et consulter un médecin.
- Les réactifs contiennent de l'azide de sodium (concentration < 0,1%) qui peut réagir avec les métaux tel que le cuivre ou le plomb des canalisations. Rincer abondamment.
- La fiche de données de sécurité peut être obtenue sur simple demande.
- Elimination des déchets : respecter la législation en vigueur.

Par mesure de sécurité, traiter tout spécimen comme potentiellement infectieux. Respecter la législation en vigueur.

PREPARATION DES REACTIFS

Ajouter sans délai 3 mL de tampon (flacon R3) au contenu du flacon R1 (Coenzyme) et 1 mL de tampon (flacon R3) au contenu du flacon R2 (Substrat).

Agiter doucement jusqu'à complète dissolution avant d'utiliser les réactifs (environ 2 minutes).

La solution hémolysante (flacon R4) est prête à l'emploi.

STABILITE ET CONSERVATION

Stocker à 2-8°C, bien rebouché dans le flacon d'origine et à l'abri de la lumière.

- Avant ouverture, stockés et utilisés comme indiqué dans la notice, les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
 - Après reconstitution, les réactifs de travail (flacon R1 et R2) sont stables au moins 6 mois en l'absence de contamination.
 - Ne pas utiliser les réactifs de travail après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Ne pas utiliser les réactifs s'ils sont troubles.

PRELEVEMENT ET PREPARATION DU SPECIMEN (1)

Sérum non hémolysé, plasma (hépariné ou EDTA). L'oxalate et le fluorure ne doivent pas être utilisés.

Erythrocytes : Utiliser un hémolysat de sang total préparé comme suit :

(Mode opératoire détaillé disponible sur demande)

1. Déterminer le taux d'hémoglobine (Hb en g/dL).
2. Laver 3 fois 0,2 mL de sang homogénéisé avec 2 mL de NaCl à 9 g/L. Centrifuger entre chaque lavage et éliminer le surnageant (veiller à ne pas éliminer d'érythrocytes).
3. Après le dernier lavage, remettre les érythrocytes en suspension dans 0,9 mL de solution hémolysante (flacon R 4).
4. Placer 15 minutes à 2-8°C puis centrifuger à nouveau. Utiliser le surnageant (Hémolysat) dans l'heure qui suit.

INTERFERENCES (2) (3)

Ce dosage reflète également l'activité de la 6-Phosphogluconate déshydrogénase (6-PGD) laquelle génère une molécule de NADPH par molécule de 6-Phosphogluconate formée.

Résultats des tests d'interférence réalisés en technique manuelle ou sur Cobas Mira :

G6PDH (UI/L) à 37°C dans le spécimen	Interférent	Résultats
169 UI/L	Acide ascorbique	Pas d'interférence jusqu'à 250mg/L
1756,7 UI/L	Turbidité	Pas d'interférence jusqu'à 0,2 %
1846,7 UI/L	Glucose	Pas d'interférence jusqu'à 11 g/L
2003,3 UI/L	Bilirubine	Interférence négative à partir de 75 mg/L

Young D.S. a publié une liste des substances interférant avec le dosage.

REACTIFS ET MATERIEL COMPLEMENTAIRES

1. Equipement de base du laboratoire d'analyses médicales.
2. Sérums ou hémolysats de contrôle normaux et pathologiques.

CALIBRATION

La validité des résultats dépend de l'exactitude de la calibration de l'instrument, du juste décompte du temps, du respect du rapport volume réactif / volume spécimen et du contrôle de la température. Il est recommandé d'utiliser le facteur théorique (§ **CALCUL**) ou d'utiliser un calibrateur raccordé sur une méthode de référence ou un hémolysat de référence.

CONTRÔLE DE QUALITE

CODE CNQ : XX

- **REF** 95089 Contrôle Normal G6-PDH
- **REF** 95289 Contrôle Déficient G6-PDH
- Tout sérum de contrôle humain ou échantillon de sang total titré pour cette méthode.
- Programme externe de contrôle de la qualité.

Il est recommandé de contrôler dans les cas suivants :

- Au moins un contrôle par série.
- Au moins un contrôle par 24 heures.
- Changement de flacon de réactif.
- Après opération de maintenance sur l'analyseur.

Lorsqu'une valeur de contrôle se trouve en dehors des limites de confiance recommandées, appliquer les actions correctives suivantes :

1. Répéter le test en utilisant le même contrôle.
2. Si la valeur obtenue reste en dehors des limites, préparer un contrôle fraîchement reconstitué et répéter le test.
3. Si la valeur obtenue reste en dehors des limites, vérifier les paramètres de l'analyse : longueur d'onde, température, volume spécimen/volume réactif, temps de mesure et facteur de calibration.
4. Si la valeur obtenue reste en dehors des limites, utiliser un autre flacon de réactif et répéter le test.
5. Si la valeur obtenue reste en dehors des limites, contacter le service technique BIOLABO ou le revendeur local.

INTERVALLES DE REFERENCE (2)

Dans les érythrocytes à 37°C

Unités conventionnelles	Unités internationales
UI/g d'Hb : 12,1 ± 2,09	MUI/mol d'Hb : [0,78 ± 0,13]
UI/10 ¹² Erythrocytes : 351 ± 60,6	nUI/Erythrocytes : [0,35 ± 0,06]
UI/mL d'érythrocytes : 4,11 ± 0,71	KUI/L d'érythrocytes : [4,11 ± 0,71]

Il est recommandé au laboratoire de définir ses propres valeurs usuelles.

Dans le sérum à 37°C

Valeurs normales : Activité G6-PDH non détectable

PERFORMANCES

Etudes réalisées sur hémolysats (Cobas Mira) :

Intra-série n=20	Taux bas	Taux moyen	Taux élevé
Moyenne (U/L)	478	925	2280
S.D. (U/L)	13,3	33,2	31,2
C.V. %	2,8	3,6	1,4
Critères CV%	< 4.5%	< 4.5%	< 3.8%

Inter-série	Taux bas (n=15)	Taux moyen (n=15)	Taux élevé (n=30)
Moyenne (U/L)	276	535	918
S.D.(U/L)	16,0	25,5	35,5
C.V. %	5,8	4,8	3,9
Critères CV%	< 6%	< 6%	< 5%

Limite de détection : environ 21 UI/L.

Sensibilité : 0.020 ΔAbs /1000 UI.L⁻¹ de sang

Comparaison avec réactif du commerce (méthode cinétique UV) :

102 hémolysats situés entre 110 et 1500 UI/L ont été testés avec les 2 réactifs sur Cobas Mira :

$$y = 0,9992x - 6,5933$$

$$r = 0,9874$$

LIMITE DE LINEARITE

Au-delà de 4000 UI/L (0.080 abs), diluer le spécimen (sérum, plasma, hémolysat) avec une solution NaCl à 9 g/L et refaire le dosage en tenant compte de la dilution dans le calcul du résultat. La limite de linéarité dépend du rapport de volume spécimen/réactif.

MODE OPERATOIRE (TECHNIQUE MANUELLE)

Ramener les réactifs et échantillons à température ambiante.

Distribuer dans des cuves de lecture thermostatées à 37°C :	Dosage sur Sérum	Dosage sur Hémolysat (1)
Réactif 1	2 mL	3 mL
Sérum	1 mL	
Hémolysat		50 µL
Mélanger et incuber 5 minutes à 37°C (30°C, 25°C)		
Réactif 2	100 µL	100 µL
Mélanger et lire l'absorbance initiale après 30 secondes à 340 nm puis toutes les minutes pendant 3 minutes. Calculer la moyenne des variations d'absorbance par minute (ΔAbs/min). Si l'activité est faible, le temps de mesure peut être allongé.		

Remarque (1) :

- 1-Préparation de l'hémolysat : voir § **PRELEVEMENT ET PREPARATION DU SPECIMEN**.
- 2- Sur hémolysat, le test peut être réalisé directement dans le flacon de R1

CALCUL (2)

Calculer l'activité de la G6-PDH en utilisant les formules suivantes :

Sérum : $UI/L = (\Delta Abs/min) \times 492$

Erythrocytes : $UI/L \text{ de sang} = (\Delta Abs/min) \times 50\,000$

Résultats en unités par gramme d'Hémoglobine

$$UI/g \text{ d'Hb} = \frac{(\Delta Abs/min \times 5\,000)}{Hb \text{ exprimée en g/dL}}$$

Exemple : Si ΔAbs/min = 0,030 et Hb = 14.5 g/dL

$$UI/g \text{ d'Hb} = \frac{0,030 \times 5000}{14,5} = 10,3$$

Résultats en unités pour 10¹² Erythrocytes (# Résultat en UI/g d'Hb x 29)

$$UI/10^{12} \text{ Erythrocytes} = \frac{(\Delta Abs/min \times 50\,000)}{\text{Nombre d'érythrocytes en } 10^{12} / \text{Litre}}$$

Exemple : si ΔAbs/min = 0,030 et nombre d'érythrocytes = 4,2 . 10¹²/L

$$UI/10^{12} \text{ Erythrocytes} = \frac{0,030 \times 50\,000}{4,2} = 357$$

Résultats en unités par mL d'Erythrocytes (# Résultats UI/g Hb x 0,34)

$$UI/mL \text{ d'Erythrocytes} = \frac{(\Delta Abs/min \times 5\,000)}{\text{Hématocrite (\%)}}$$

REFERENCES

- (1) TIETZ N.W. *Textbook of clinical chemistry*, 3rd Ed. C.A. Burtis, E.R. Ashwood, W.B. Saunders (1999) p. 1645-1650.
- (2) *Clinical Guide to Laboratory Test*, 4th Ed., N.W. TIETZ (2006) p. 457-458.
- (3) YOUNG D.S., *Effect of Drugs on Clinical laboratory Tests*, 4th Ed. (1995) p. 3-294
- (4) BEUTLER et Al., *International committee for standardisation in Haematology : « Recommended Methods for Red Cell Enzyme Analysis » British Journal of Haematology*, (1977), 35, p.331-340.
- (5) BEUTLER E., *Red cell metabolism, : A manual of biochemical methods* (3rd Ed.) Orlando, Grune et Stratton (1984), p.68-70