ATP Hexocinasa FS *

Reactivo para la determinación cuantitativa *In Vitro* de ATP en sangre y concentrados de eritrocitos con el método de la hexocinasa en sistemas fotométricos

Información de pedido

Nº de pedido	Tamaño del envase				
1 6201 99 10 021	R1	5 x	20 mL	+ R2	1 x 25 mL
1 6200 99 10 065	3 x 3 mL	Estándar	100 µmol/dL		

Resumen [1,2]

El contenido de ATP en sangre y concentrados de eritrocitos proporciona información acerca de la viabilidad de los eritrocitos. Se ha demostrado que el contenido de ATP en los eritrocitos se correlaciona con la tasa de supervivencia de 24 horas de los eritrocitos [1].
Dado que los costes de medición son relativamente bajos, se recomienda utilizar el contenido de ATP como criterio para la prueba analítica de la efectividad de los concentrados de eritrocitos [2].

Principio

$$\text{Glucosa} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{HK}} \text{glucosa-6-fosfato} + \text{ADP}$$

$$\text{Glucosa-6-fosfato} + \text{NAD}^+ \xrightarrow{\text{G6P-DH}} \text{gluconato-6-P} + \text{NADH} + \text{H}^+$$

Conservación y estabilidad de los reactivos

Los reactivos y el estándar se pueden conservar a una temperatura de 2 a 8 °C hasta el final del mes de caducidad indicado en el envase, siempre que se evite la contaminación una vez abiertos los frascos. No se deben congelar los reactivos.

Advertencias y medidas de precaución

1. Los reactivos contienen como conservante azida de sodio (0,95 g/L). No ingerir. Evitar el contacto con la piel y las mucosas.
2. Observar todas las medidas de precaución necesarias para la manipulación de reactivos de laboratorio.

Preparación de los reactivos

Los reactivos y el estándar ya están listos para usar.

Concentraciones de los reactivos

R1:	Solución tampón TRIS	pH 7,8	0,1 mol/L
	Mg^{2+}		4 mmol/L
	Glucosa		20 mmol/L
	NAD		2,1 mmol/L
R2:	Mg^{2+}	pH 7,0	4 mmol/L
	Hexocinasa (HK)		≥ 7,5 kU/L
	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P-DH)		≥ 7,5 kU/L

Preparación de las muestras

Pipetear 1,0 mL de sangre o de concentrado de eritrocitos con 1,0 mL de ácido tricloracético al 12% (p/v) en un tubo de centrífuga, mezclar bien y colocar durante aprox. 5 minutos en un baño de hielo. Centrifugar la solución de muestra durante 5 a 10 minutos a aprox. 3000 g. Utilizar 250 µL del sobrenadante claro inmediatamente después de la centrifugación para el análisis. El estándar ATP puede añadirse para su análisis sin realizar ninguna preparación.

Nota:

La ATP presente en las muestras es inestable. El contenido de ATP en la heparina o la sangre con EDTA disminuye en el plazo de 24 horas a 2 a 8 °C hasta un 80%. La conservación de las muestras a las que se ha añadido ácido tricloracético a -20 °C causa resultados erróneos. Utilizar lo más pronto posible el concentrado de eritrocitos precipitado con el ácido tricloracético.

Procedimiento

Longitud de onda	340 nm, Hg 365 nm, Hg 334 nm
Paso óptico	1 cm
Temperatura	20 - 25 °C
Método de medida	respecto al aire o al agua

	Valor de referencia	**Muestra/ estándar**
Muestra/estándar	-	250 µL
Agua destilada	250 µL	-
Reactivo 1	2400 µL	2400 µL
Mezclar, incubar durante 3 - 5 min. a 25 °C, leer la absorbancia A1 del valor de referencia y muestra / estándar y, a continuación, añadir:		
Reactivo 2	600 µL	600 µL
Mezclar, incubar durante aprox. 15 min. a 25 °C. Leer la absorbancia A2 del valor de referencia y muestra / estándar en un periodo de 30 minutos.		

*Fluid Stable = líquido estable

Cálculo

$\Delta A = [A_2 - A_1]_{muestra\ /\ estándar} - [A_2 - A_1]_{valor\ de\ referencia}$

Para calcular la concentración de ATP se multiplica ΔA con el correspondiente factor F de la siguiente tabla:

	Con preparación de las muestras [μmol/dL]	**Sin preparación de las muestras** [μmol/dL]
340 nm	412,70	206,35
Hg 334 nm	420,71	210,36
Hg 365 nm	764,71	382,35

F = (V x f x 100) / (ε x v x d) [μmol/dL]

V	= volumen total en la cubeta [μl]	= 3250
f	= factor de dilución en la preparación de las muestras	= 2,0
d	= paso óptico de la cubeta [cm]	= 1,00
v	= volumen de la muestra [μl]	= 250
ε	= coeficiente ext. NADH [l x cm^{-1} x $mmol^{-1}$]	= 6,3 a 340 nm = 3,4 a 365 nm = 6,18 a 334 nm

Control de calidad

Para controlar la precisión y exactitud del test se recomienda el empleo del estándar DiaSys ATP (número de pedido 1 6200 99 10 065, 3 x 3 mL).

Equipo adicional necesario

Solución de ácido tricloracético al 12% (pp/v)
Equipo usual de laboratorio

Rango de referencia [3]

Sangre ATP 38 - 62 μmol/dL

Bibliografía

1. Högmann CF, de Verdier CH, Ericson A: Studies on the mechanism of human red cell loss of viability during storage at 4°C in vitro. 1. Cell shape and total adenylate concentration as determinant factors for posttransfusion survival. Vox Sang 48: 257-268, 1985
2. Heiden M., Seitz R: Zulassung von Blutkomponenten zur Transfusion. Bundesgesundheitsbl– Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz. 42: 150–155 Springer Verlag, 1999
3. Dennemann H: Enzymatische Bestimmung von Adenosin-triphosphat in Vollblut. Z Gesamte Experimentelle Medizin 134:335, 1961

Características

Rango de medida

El test es adecuado para medir concentraciones de ATP de 37 a 370 μmol/dL a 365 nmo bien concentraciones de 20 a 400 μmol/dL a 334/340 nm. Si se sobrepasan estos valores, debe reducirse el volumen de la muestra a 125 μl y ajustarlo al nuevo volumen para calcular el factor F.

Interferencias

La preparación de las muestras con ácido tricloacético no causa interferencias con lipidemia, hemoglobina, ácido ascórbico hasta 30 mg/dL y bilirrubina hasta 60 mg/dL.

Límite de prueba

El límite inferior de prueba es de 1,5 μmol/dL. El límite de prueba se corresponde con la concentración inferior detectable de ATP que puede distinguirse de cero. Se calcula a partir de tres desviaciones estándar de 20 replicados de una muestra negativa.

Precisión

Como muestras se utilizó concentrado de eritrocitos y muestras de suero reconstituidas.

En la serie n = 20	Valor medio [μmol/dL]	Desviación estándar (DE) [μmol/dL]	Coeficiente de variación (CV) [%]
Muestra 1	9,3	0,12	1,31
Muestra 2	34,6	0,29	0,82
Muestra 3	58,5	1,07	1,82

De un día a otro n = 20	Valor medio [μmol/dL]	Desviación estándar (DE) [μmol/dL]	Coeficiente de variación (CV) [%]
Muestra 1	43,7	1,56	3,57
Muestra 2	88,5	3,19	3,60
Muestra 3	182,8	6,48	3,55

Tasa de recuperación

La tasa de recuperación de los concentrados de eritrocitos reconstituidos con ATP es de aprox. 92%.

Eliminación de residuos

Obsérvese la normativa legal al respecto.

Fabricado por

DiaSys Diagnostic Systems GmbH
Alte Strasse 9 65558 Holzheim Alemania