

Uso previsto

Determinazione quantitativa del glucosio nel siero. Esclusivamente per utilizzi diagnostici *in vitro*. **Solo su prescrizione.**

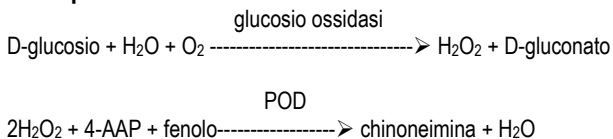
Interesse clinico

Le misurazioni del glucosio nel siero vengono eseguite principalmente per la diagnosi e il trattamento del diabete mellito.

Procedura di analisi

I primi metodi enzimatici per la determinazione del glucosio utilizzavano la glucosio ossidasi per catalizzare l'ossidazione del glucosio a perossido di idrogeno e acido gluconico.¹ Il perossido di idrogeno che si forma viene misurato mediante l'ossidazione di un cromogeno.² Sono stati studiati molti cromogeni, ma parecchi sono stati scartati a causa di possibile cancerogenicità, tossicità, instabilità o perché venivano influenzati da sostanze interferenti. Trinder³ ha modificato il metodo Emerson⁴ sviluppando un efficiente sistema perossidasi-fenolo-aminofenazone per la quantificazione del perossido di idrogeno mediante la formulazione del colorante rosso di chinoneimina. Il metodo è meno soggetto a sostanze interferenti e non presenta i numerosi inconvenienti dei metodi precedenti.

Principio



Il glucosio viene ossidato dalla glucosio ossidasi a gluconato e perossido di idrogeno. Fenolo + 4-AAP + perossido di idrogeno, in presenza di perossidasi, producono chinoneimina, un colorante che viene misurato a 500 nm. L'assorbanza a 500 nm è proporzionale alla concentrazione di glucosio nel campione.

Composizione dei reagenti

Glucosio ossidasi (microbica) 12.000 u/l, Perossidasi (rafano) > 1.000 u/l, 4-AAP >0,3mM, Fenolo 4mM, Tampone, pH 7,4 ± 0,1, stabilizzanti non reattivi, conservante. Si veda la sezione "Precauzioni".

Preparazione dei reagenti

Il reagente viene fornito pronto per l'uso.

Conservazione e stabilità dei reagenti

1. Conservare il reagente in frigorifero (2-8°C).
2. Se conservato seguendo le raccomandazioni, il reagente resta stabile fino alla data di scadenza indicata.

Precauzioni

1. Il reagente può essere utilizzato esclusivamente a fini diagnostici *in vitro*.
2. Il reagente non va usato se presenta torbidità o altri segni di crescita microbica.
3. Il reagente non va usato se non soddisfa le richieste di linearità o non riesce a mantenere i valori del controllo all'interno dell'intervallo indicato.
4. Tutti i campioni e i controlli devono essere trattati come potenzialmente infettivi, applicando procedure di laboratorio sicure. (NCCLS M29-T2).⁵

Raccolta e conservazione dei campioni

1. Si raccomanda di utilizzare siero non emolizzato o plasma eparinizzato.

2. Il siero va separato tempestivamente dal coagulo, perché nel sangue intero la velocità di diminuzione del glucosio è di circa il 7% all'ora.⁶
3. Se conservato in frigorifero (2-8°C), il glucosio nel siero è stabile per ventiquattro ore.
4. I campioni vanno raccolti secondo le raccomandazioni del documento NCCLS H4-A3.⁷

Interferenze

1. I campioni fortemente lipemici possono far risultare valori di glucosio falsamente elevati.
2. È stato riscontrato che livelli di bilirubina fino a 20 mg/dl e di emoglobina fino a 50 mg/dl producono un'interferenza trascurabile (< 3%) per questo esame. **NOTA:** il livello di glucosio era di 184 mg/dl nello studio del comportamento della bilirubina e di 188 mg/dl nello studio dell'emoglobina.
3. Young, et al.⁸ hanno pubblicato un elenco completo delle sostanze interferenti.

Materiali in dotazione

Reagente per glucosio.

Materiali necessari non in dotazione

1. Dispositivi per pipettaggio di precisione (1,0 ml e 10ul)
2. Provette
3. Timer (da 10 minuti)
4. Spettrofotometro per lettura a 500 nm
5. Blocco termico (37°C)
6. Controlli di siero con valori di glucosio normali e patologici noti.

Procedura (automatica generale)

Lunghezza d'onda:	500 nm
Tipo di analisi:	Endpoint
Rapporto campione/reagente:	1:101
Direzione reazione:	Incremento
Temperatura:	37°C
T. incubazione:	600 secondi
Valore basso/normale	70 mg/dl
Valore alto/normale	105 mg/dl

Procedura (manuale)

1. Etichettare le provette da analizzare: "Bianco", "Controllo", "Standard", "Paziente", ecc.
2. Pipettare 1,0 ml di reagente in tutte le provette e metterle a bagnomaria a 37°C per almeno cinque minuti.
3. Aggiungere 0,01 ml (10 ul) di campione nelle rispettive provette. Mescolare e incubare a 37°C per dieci minuti.
4. Al termine del periodo di incubazione, azzerare lo spettrofotometro con il reagente bianco. Leggere e registrare le assorbanze di tutte le provette a 500 nm (500-520 nm).
5. Per calcolare i risultati, consultare la sezione "Calcoli".

Limitazioni

1. Il reagente fornisce risultati lineari nell'intervallo 0-500 mg/dl. I campioni con più di 500 mg/dl vanno diluiti con pari volume di soluzione fisiologica e ri-analizzati. Moltiplicare i risultati per 2.
2. Se lo spettrofotometro utilizzato richiede un volume finale superiore a 1,0 ml per una lettura accurata, utilizzare 0,03 ml (30ul) di campione per 3,0 ml di reagente. Eseguire il test come descritto sopra.
3. Un campione lipemico può dare risultati falsamente elevati. Per correggere la lipemia è necessario eseguire un bianco di siero. Bianco di siero: aggiungere 0,01 ml (10ul) di campione in 1,0ml di acqua. Azzerare lo

Kit reagenti per glucosio (ossidasi) Pointe

spettrofotometro con acqua. Leggere e annotare l'assorbanza, poi sottrarla all'assorbanza del campione. Calcolare come di consueto.

Calibrazione

Utilizzare uno standard di glucosio (100mg/dl) o un calibratore di siero con tracciabilità NIST. La procedura va calibrata seguendo le istruzioni del produttore dello strumento. Se i risultati del controllo risultano fuori range, sarà necessario effettuare una ricalibrazione.

Calcoli

abs. = assorbanza

$$\frac{\text{abs. (paziente)}}{\text{abs. (standard)}} \times \text{concentrazione di standard} = \text{glucosio (mg/dl)}$$

Esempio:

$$\text{abs. (paziente)} = 0,300$$

$$\text{abs. (standard)} = 0,200$$

$$\text{concentrazione dello standard} = 100 \text{ mg/dl}$$

$$\text{Pertanto: } \frac{0,300}{0,200} \times 100 = 150 \text{ mg/dl}$$

Unità del SI

Per ricavare i risultati in unità SI (mmol/L), moltiplicare i risultati espressi in mg/dl per dieci (convertendo i dl in litri) e dividere il valore per 180, peso molecolare del glucosio.

$$\text{mg/dl} \times \frac{10}{180} = \text{mg/dl} \times 0,0556$$

$$\text{Esempio: } 150 \text{ mg/dl} \times 0,0556 = 8,34 \text{ mmol/L}$$

Controllo qualità

La bontà della reazione va monitorata utilizzando sieri di controllo con valori di glucosio normali e patologici noti. I controlli vanno eseguiti in ogni turno in cui si effettuano dosaggi del glucosio. I valori del controllo devono rientrare in intervalli appositamente definiti. Si raccomanda che ciascun laboratorio stabilisca la frequenza interna dei controlli.

Valori attesi⁹

70-105mg/dl

Si raccomanda che ciascun laboratorio definisca il proprio intervallo di normalità.

Prestazioni

- Intervallo di analisi: 0- 500 mg/dl
- Correlazione: i risultati ottenuti con questo reagente (y) in 132 campioni, con una concentrazione di glucosio compresa tra 32 e 297 mg/dl, sono stati confrontati con quelli ottenuti per gli stessi campioni utilizzando un reagente in polvere secca (x) su un analizzatore automatico. Dal confronto dei risultati risulta un coefficiente di correlazione pari a 0,999 e un'equazione di regressione $y = 1,027x - 1,13$. ($Sy-x=15,43$)
- Precisione: gli studi sulla precisione sono stati eseguiti seguendo una modifica delle linee guida contenute nel documento EP5-T2 dell'istituto NCCLS. 10

Intra-saggio			Inter-giorn.		
Media	D.S.	C.V.%	Media	D.S.	C.V.%
101	1,1	1,1	86	2,1	2,5
172	1,3	0,7	198	6,3	3,2
293	3,9	1,3	283	9,2	3,3

- Sensibilità: la sensibilità della glucosio ossidasi è stata studiata leggendo la variazione dell'assorbanza a 500 nm per un campione di soluzione fisiologica e di siero con concentrazioni note. Sono state eseguite dieci repliche per ogni campione. I risultati di questa indagine hanno indicato che, sull'analizzatore utilizzato, la glucosio ossidasi ha mostrato una deriva del reagente minima o nulla sul campione zero. Nelle condizioni di reazione descritte, 1 mg/dl di glucosio dà un'assorbanza di 0,002.

Riferimenti bibliografici

- Keston, A.S., Abstr., 129th Meeting Amer. Chem. Soc., p 31 (1956).
- Teller, J.D., Abstr., 130th Meeting Amer. Chem. Soc., Atlantic City, N.J., p 69c (1956).
- Trinder, P., Ann. Clin. Biochem. 6:24 (1969).
- Emerson, E.J., et al, J. Org. Chem. 3:153 (1938) and 8:417 (1943).
- Documento NCCLS "Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue", 2^a Ed. (1991).
- Tietz, N.W., Fundamentals of Clinical Chemistry, Philadelphia, W.B. Saunders, p. 243 (1976).
- Documento NCCLS "Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Skin Puncture", 3^a Ed. (1991).
- Young, D.S., et al, Clin. Chem. 21:1D (1975).
- Tietz, N.W., Fundamentals of Clinical Chemistry, Philadelphia, W.B. Saunders, p. 155 (1970).
- Documento NCCLS "Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices", 2^a Ed. (1992).

Legenda

Utilizzare entro (aaaa-mm-gg)	LOT Codice lotto e gruppo
REF N. catalogo	Fabbricante
IVD Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i>	Limiti di temperatura
Consultare il manuale utente	Rx Only: utilizzare solo su prescrizione
Marchio CE	EC REP Rappresentante autorizzato per la Comunità Europea

REF G7521	Prodotto da HORIBA Instruments Incorporated Research Drive Canton, MI 48188	2°C - 8°C	IVD
------------------	--	-----------	------------

Prodotto da HORIBA Instruments Incorporated – Marchio Pointe
5449 Research Drive, Canton, MI 48188

Rappresentante autorizzato per l'Europa:
Obelis s.a.

Boulevard Général Wahis 53
1030 Bruxelles, BELGIO

tel: (32)2.732.59.54 fax:(32)2.732.60.03 email: mail@obelis.net

Reagenti certificati

I reagenti Pointe sono certificati per essere stati prodotti conformemente ai parametri specificati. Se entro la data di scadenza un reagente Pointe dovesse risultare non conforme alle specifiche, sarà prontamente sostituito senza alcun addebito.