

# GLICOSE ENZIMÁTICA LÍQUIDA

BIOQUÍMICA CLÍNICA

## FINALIDADE

Sistema enzimático para determinação da glicose no soro, plasma e demais líquidos biológicos.

**Somente para uso diagnóstico *in vitro*.**

## PRINCÍPIO

Ao adicionar-se glicose em uma solução tampão de fosfatos, contendo p-Hidroxibenzoato, 4-Aminoantipirina (4-AAP), Glicose Oxidase e Peroxidase processam-se as seguintes reações:



O produto formado pela oxidação de 4-Aminoantipirina (4-Antipirilquinonimina) é de coloração avermelhada e sua intensidade, diretamente proporcional à concentração de glicose na solução. A cor avermelhada, formada pela reação, é medida em espectrofotômetro ou fotocolorímetro, com absorção máxima em 510nm, ou filtro verde.

## PARTICULARIDADES DO SISTEMA

O reagente glicose enzimática líquida apresenta-se **pronto para uso**. Sua simplicidade torna-o método eleito para rotina de laboratórios, sendo ainda aplicável aos diversos sistemas de automação.

## METODOLOGIA

Glicose Oxidase.

## REAGENTES

**Reagente de Cor:** solução tampão de fosfatos 0,05M, pH 7,45 +/- 0,1, Aminoantipirina 0,03mM e 15mM de p-Hidroxibenzoato de sódio. Contém, ainda, um mínimo de 12kU de glicose oxidase e 0,8 KU de Peroxidase por litro.

**Solução padrão 100mg/dL:** solução aquosa contendo 100mg/dL de glicose.

## APRESENTAÇÃO

	Ref. A	Kitão
Reagente de Cor	2 x 250mL	3 x 500mL
Solução padrão 100mg/dL	1 x 3mL	1 x 3mL

## NÚMERO DE TESTES

### Ref. A

Manual	250 testes (20µL amostra/2mL Reag. de cor)
	500 testes (10µL amostra/1mL Reag. de cor)
Automação (*)	1.200 testes

### Kitão

Manual	750 testes (20µL amostra/2mL Reag. de cor)
	1.500 testes (10µL amostra/1mL Reag. de cor)
Automação (*)	3.600 testes

(\*) A quantidade de testes na automação é variável de acordo com o equipamento.

**Protocolos de automação encontram-se disponíveis no site Doles ou através do Serviço de Atendimento ao Consumidor.**

## EQUIPAMENTOS E MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO FORNECIDOS

Espectrofotômetro capaz de medir a absorvância em 510nm ou fotocolorímetro com filtro verde (490-540nm).

Tubos de ensaio.

Pipetas graduadas.

Pipeta semiautomática 20µL.

Banho maria (37°C).

Cronômetro.

Ponteiras descartáveis.

## ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

**Reagente de Cor:** armazenar à temperatura de 2-8°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, se obedecidas as condições de armazenamento.

**Solução padrão 100mg/dL:** armazenar à temperatura de 2-8°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, se obedecidas as condições de armazenamento.

## CUIDADOS E PRECAUÇÕES COM O USO DOS REAGENTES

Todos os reagentes são somente para **uso diagnóstico *in vitro***. Seu manuseio deve ser cuidadoso, evitando-se contato com pele e mucosas. Em caso de contaminação acidental, lavar a parte afetada em água corrente. O descarte do material utilizado deverá ser feito obedecendo-se aos critérios de biossegurança estabelecidos pelo laboratório, de acordo com as normas locais, estaduais ou federais.

Observar ainda a simbologia constante nos rótulos do produto:



Irritante

## AMOSTRA

Soro, plasma, líquido e outros líquidos biológicos. A amostra deverá ser colhida com o paciente em jejum. Para obtenção de plasma utilizar anticoagulante contendo fluoreto - **Anticoagulante Glicose Doles**.

**Todas as amostras biológicas devem ser consideradas como potencialmente infectantes.**

## PROCEDIMENTO TÉCNICO

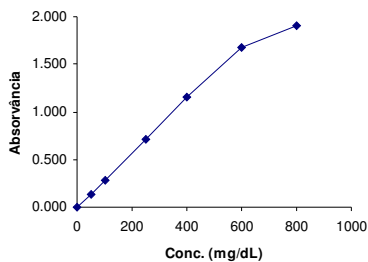
Rotular 3 tubos de ensaio com **B (branco), T (teste) e P (padrão)**.

Proceder como segue:

	B	T	P
<b>Reagente de cor</b>	2,0mL	2,0mL	2,0mL
<b>Solução padrão</b>	-	-	20 µL
<b>Amostra</b>	-	20 µL	-

Misturar por agitação e incubar por 05 minutos em banho maria, a 37°C. Proceder à leitura das absorvâncias em **espectrofotômetro** ou **fotocolorímetro**, em **510nm** ou **filtro verde**, zerando o aparelho com o **branco**. A cor final da reação permanece estável por 20 minutos, à temperatura ambiente (20 - 30°C).

## CURVA DE CALIBRAÇÃO



Padrão	Absorvância	Conc. (mg/dL)
1	0,000	0
2	0,137	50
3	0,280	100
4	0,715	250
5	1,150	400
6	1,680	600
7	1,900	800

### Obs.: Não utilizar esta curva para determinar o resultado de seu ensaio

- A curva de calibração é a representação gráfica entre os valores das absorvâncias com os valores das concentrações de um conjunto de soluções padrão. São necessários três passos para confeccioná-la: (1) preparo das soluções padrão; (2) medição dos valores de absorvância das soluções padrão, de acordo com o especificado no procedimento técnico da presente instrução de uso, e (3) montagem de um gráfico em papel especial, linear, onde são relacionados os valores de absorvância com os de concentração, conforme demonstrado na figura acima. As dosagens para montagem da curva foram feitas em um espectrofotômetro "Ultrospec III", Pharmacia Biotec, comprimento de onda de 510nm e cubetas com passagem de luz de 10mm.
- A curva de calibração demonstra a linearidade da reação até uma determinada concentração, na qual pode ser determinado um fator de calibração (F), de acordo com a Lei de Beer.
- A reação é linear até 600mg/dL (ver curva acima). Obtendo-se valores mais elevados, dilui-se a amostra com solução fisiológica e procede-se à nova dosagem. Multiplicar o valor encontrado pelo fator de diluição.**
- O kit de Glicose Enzimática Líquida Doles possui padrão no intervalo de linearidade da metodologia de Glicose Oxidase. O laboratório deve realizar o ensaio com o padrão que acompanha o kit e calcular seu fator de calibração (F), a exemplo do demonstrado nos cálculos abaixo.**
- O fator deve ser refeito periodicamente e a cada lote do produto.**
- Os padrões utilizados na montagem da curva de calibração foram preparados com produto de referência D-Glucose Standard Reference Material 917a procedência NACIONAL INSTITUTE of STANDARDS & TECHNOLOGY (NIST).

## CÁLCULOS

$$\text{Glicose (mg/dL)} = \frac{\text{absorvância teste}}{\text{absorvância padrão}} \times 100$$

### Exemplo:

Leitura

Padrão: 0,280

Teste: 0,230

$$\text{Glicose (mg/dL)} = \frac{0,230}{0,280} \times 100 = 82$$

Como a reação corada segue estritamente a lei de Beer, basta que se determine um **fator (F)** para cálculo dos resultados.

100

$$\text{Fator (F)} = \frac{100}{\text{absorvância padrão}}$$

$$\text{Glicose mg/dL} = \text{absorvância teste} \times F$$

Para obtenção do fator, recomenda-se dosar em triplicata o padrão, ler as absorvâncias e tirar a média aritmética das mesmas.

### Exemplo:

Leituras:

Padrão: 0,283; 0,285; 0,284

$$\text{Média aritmética} = \frac{0,283 + 0,285 + 0,284}{3} = 0,284$$

$$\text{Fator (F)} = \frac{100}{0,284} = 352$$

Leitura do teste: 0,270

$$\text{Glicose (mg/dL)} = 0,270 \times 352 = 95$$

## EXPRESSÃO DOS RESULTADOS EM UNIDADES S.I.

$$\text{Glicose (mmol/L)} = \text{Glicose (mg/dL)} \times 0,0555$$

## LIMITAÇÕES DO SISTEMA

- Para se obter ótimo desempenho do sistema, é necessário que o procedimento técnico seja rigorosamente seguido conforme instruções de uso. Qualquer alteração poderá levar a resultados errôneos.
- A cafeína pode elevar os níveis de glicose.
- Algumas drogas como: antidepressivos tricíclicos, bloqueadores beta adrenérgicos, corticosteroides, diuréticos, estrógenos, glucagon, isoniazida, fenotiazinas, fenitoína e salicilatos, podem elevar o nível de glicose.
- Algumas drogas como: acetaminofeno, álcool, esteroides anabolizantes, insulina e inibidores da MAO, podem reduzir os níveis de glicose.
- Quando detectada hiperglicemia, recomenda-se investigação mais criteriosa, através de: dosagem de hemoglobina glicosilada, glicemia pós-prandial e, a critério médico, prova de tolerância oral à glicose.
- A separação do plasma deverá ocorrer até duas horas após a coleta.
- No plasma refrigerado (2-8°C), a glicose permanece estável por três dias. Na ausência de fluoreto, a glicose é consumida pelo fenômeno da glicólise a um ritmo de 5% por hora.

## CONTROLE DA QUALIDADE DO SISTEMA

- A limpeza e a secagem adequada do material a ser utilizado são de fundamental importância para a estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.
- A água utilizada na limpeza do material, no preparo dos reagentes e na dosagem, deve ser de boa qualidade.
- Colunas deionizadoras saturadas liberam íons diversos, aminas e agentes oxidantes, que deterioram os reagentes.
- As pipetagens devem ser precisas.
- O nível da água do banho maria deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio. A temperatura (37°C) deve ser rigorosamente observada.
- O uso de soro controle de referência deve ser uma prática rotineira do laboratório. Recomenda-se utilizar um soro controle com valor na faixa de normalidade (**soro controle N - Doles**) e outro soro controle de valor elevado (**soro controle P - Doles**).



## VALORES DE REFERÊNCIA

É recomendado que cada laboratório estabeleça sua própria faixa de valores de referência na população atendida.

Como orientação, sugerimos os seguintes valores:

Plasma:(jejum de 8 horas) 70 - 99 mg/dL  
Líquor: 40 - 70 mg/dL

**Informações sobre os critérios para diagnóstico de diabetes podem ser obtidas no site da Sociedade Brasileira de Diabetes: [www.diabetes.org.br](http://www.diabetes.org.br).**

## SIGNIFICADO CLÍNICO

A dosagem da glicose sanguínea é o teste bioquímico mais realizado em laboratório. **Suas alterações não são simples marcadores de doença, mas o reflexo de profundas alterações no meio ambiente biológico.** A quantificação da glicose no sangue reflete apenas o ponto de equilíbrio momentâneo entre sua produção, utilização e estocagem.

O Diabetes representa um grupo de distúrbios metabólicos onde a glicose, mal utilizada, resulta em hiperglicemia. Os números que indicam a incidência de diabetes no Brasil são desconhecidos, mas admite-se que 5% da nossa população seja portadora de diabetes em seus diversos níveis. Atualmente, distingue-se no diabetes duas variedades principais:

**Diabetes mellitus tipo 1 (IDDM- diabetes mellitus, insulino dependente).**

Deficiência de insulina (insulino dependentes). Há destruição de mais de 90% das células b das ilhotas de Langherans. Presença de anticorpos anti-insulina e anti-ilhotas de Langherans. Vírus e toxinas químicas são os prováveis agentes causais. Ocorre geralmente em jovens (abaixo dos 30 anos) e representa, aproximadamente, 10% dos diabéticos. As complicações são frequentes.

**Diabetes mellitus tipo 2 (NIDDM- diabetes mellitus não dependente de insulina).**

Níveis variados de insulina. Ausência de anticorpos anti-insulina e anti-ilhotas. Em geral os pacientes são obesos, com a presença de componente familiar. Incidência maior a partir dos 40 anos.

Considere-se ainda:

**Diabetes mellitus secundária:** síndrome diabética secundária à pancreatite, síndrome de Cushing, feocromocitoma, insuficiência hepática grave, terapia por corticoides, etc..

**Diabetes mellitus gestacional:** diabetes que se exterioriza durante a gravidez.

**Tolerância de glicose alterada:** glicemia basal entre 110 e 120 mg/dL, com alterações de curva glicêmica, ainda não conclusiva, de diabetes.

**Grupos de risco:** pacientes com hiperglicemia transitória, espontânea ou secundária a estímulos. Irmão monozigótico de portador de diabetes tipo 2. Pessoas com histórico familiar de diabetes. Obesos e membros de grupos raciais ou étnicos com alta incidência de diabetes.

A hipoglicemia tem como causas principais: o excesso de insulina pancreática, hipotireoidismo, insuficiência suprarenal, alcoolismo, uso não controlado de hipoglicemiantes orais, sendo ainda encontrada nas insuficiências hepáticas graves.

## CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

**Especificidade:** Foram realizados 71 testes em amostras cujo teor de glicose se situava no intervalo de 50 a 600mg/dL. Esses ensaios foram realizados em paralelo com uma metodologia similar (glicose oxidase). A comparação da Glicose Enzimática Líquida Doles (Y) com a metodologia mencionada (X) deu origem a seguinte equação de regressão linear:  $y = 1,055X - 3,122$ , sendo o coeficiente de correlação de 0,999.

**Sensibilidade:** A sensibilidade foi verificada através de ensaios com teores 0,1 a 100mg/dL, sendo observado sensibilidade a partir de 0,39mg/dL. A sensibilidade do sistema está diretamente relacionada com a do aparelho utilizado no laboratório.

**Diluição da matriz:** O efeito de diluição da matriz foi verificado através de ensaios de diluições seriadas de amostra humana. Constatou-se com este ensaio que diluições sucessivas da matriz não interferem na sensibilidade diagnóstica do método.

**Ensaio de Recuperação:** A capacidade de recuperação do produto foi verificada através de misturas de proporções variadas de 02 amostras humanas com teores de 53 e 615mg/dL de glicose. Este estudo demonstrou índice de recuperação de 98 a 106%.

## Reprodutibilidade:

Foram realizados 20 ensaios de três amostras distintas, em diferentes dias, obteve-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração (mg/dL)	75,89	128,96	330,11
Desvio padrão	1,69	3,34	8,46
Coefficiente de variação (%)	2,23	2,59	2,56

## Repetitividade:

Foram realizados 20 ensaios sucessivas, com três amostras, obteve-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração (mg/dL)	45,94	89,05	292,24
Desvio padrão	1,04	1,04	3,11
Coefficiente de variação (%)	2,26	1,17	1,06

**Substâncias interferentes:** soros lipêmicos, hemolisados e ictericos podem causar resultados falsamente elevados. Nesses casos, é recomendado que seja feito um branco da amostra (2,0mL do reagente de cor + 20µL do soro, leitura imediata). O uso de soros pode provocar valores falsamente diminuídos de glicose, quando não são separados em tempo hábil. Tal fato deve-se à presença de enzimas glicolíticas, degradantes da glicose. Para evitar tal ocorrência, recomenda-se a utilização de plasma colhido com fluoreto, o que irá impedir o fenômeno da glicólise. Certas drogas e outras substâncias podem afetar os valores da glicose (ver em limitações do sistema). Para controle de interferências, é recomendado que o paciente seja questionado quanto ao uso de medicamentos.

## BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- Trinder, P.: *Ann. clin. biochem.*, 6-24, 1969.
- D. Barham e P. Trinder: *Analyst* 97, 1972.
- Jacobs D.S.: Kasten B.L.: Dematt W.R., Walfson W.L: *Laboratory test handbook*, 2ª ed, 113, 1990.
- Pagana, K.D.: *Mosby's diagnostic and laboratory test reference*, 379 - 381, 1992
- Cockayne, Susan: *Clinical chemistry: Concepts and applications*, 156-158, 1993.

- Tibúrcio, H.M.: *Controle interno da qualidade analítica*, 1ªed. março/1995
- Henry, John Bernard: *Clinical diagnosis and management by laboratory methods*, 19ª ed, 194-207,423-426,1996.
- Doles: dados de arquivo

#### **TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA DA QUALIDADE DO PRODUTO**

As garantias do fabricante ao consumidor seguem estritamente as relacionadas na Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1.990 - **Código de Defesa do Consumidor**.

Todos os reagentes que compõem este sistema para diagnóstico são garantidos na sua performance, reprodutibilidade e qualidade até a data de vencimento dos mesmos, se obedecidas as condições abaixo:

- 1.O usuário do sistema seguir, rigorosamente, o procedimento técnico.
- 2.As condições de armazenamento deverão estar de acordo com o estabelecido nas instruções de uso.
- 3.Os materiais necessários e não fornecidos deverão estar em boas condições técnicas.

**Todos os produtos que apresentarem problemas técnicos comprovados serão substituídos, sem ônus para o consumidor.**

Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratórios Ltda.  
CNPJ: 01.085.513/0001-05  
Rodovia BR 153, Km 1273, Lt.07, Chácara Retiro  
Caixa Postal 1051  
CEP: 74001-970 Goiânia - GO - Brasil  
e-mail: doles@doles.com.br  
www.doles.com.br

M.S.: nº 10231810084

Revisão: 08 (06/2009)

**NBR ISO 9001:2000**  
**Sistema da Qualidade**  
**certificado desde 1999**

