

Método

GOD – Trinder.

Finalidade

Sistema enzimático para a determinação da glicose no sangue, líquido e líquidos ascítico pleural e sinovial por reação cinética ou de ponto final. **Somente para uso diagnóstico in vitro.**

Princípio

A Glicose oxidase catalisa a oxidação da glicose de acordo com a seguinte reação:

$$\text{Glicose} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{GOD}} \text{Ácido Glucônico} + \text{H}_2\text{O}_2$$

O Peróxido de Hidrogênio formado reage com 4 - Aminoantipirina e Fenol, sob ação catalisadora da peroxidase, através de uma reação oxidativa de acoplamento formando uma antipirilquinonimina vermelha cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose na amostra.

$$2\text{H}_2\text{O}_2 + 4\text{-Aminoantipirina} + \text{Fenol} \xrightarrow{\text{POD}} \text{Quinonimina} + 4\text{H}_2\text{O}$$

Significado Clínico

A homeostase glicêmica é controlada pela ação de diversos hormônios, especialmente a insulina, que mantém o equilíbrio da concentração de glicose. Alterações hormonais e outros fatores levam a variações nesta homeostase, desencadeando hiperglicemia e hipoglicemia.

A Hiperglicemia ocorre em vários tipos de Diabetes Mellitus, onde são frequentes retinopatias, lesões renais, neuropatias e aterosclerose.

O Diabetes Mellitus é classificado em: Diabetes mellitus insulino dependente (Tipo I), Diabetes mellitus insulino não dependente (Tipo II), Diabetes mellitus associado a certas condições e síndromes (classificado anteriormente como diabetes secundário) e Diabetes gestacional.

Nas Hipoglicemias (HG) os níveis glicêmicos que levam às suas manifestações são extremamente variáveis. As manifestações podem ocorrer no jejum ou pós-prandial. Ocorre HG de jejum no insulinoma, tumores não pancreáticos, doenças hepáticas, hipoadrenalinismo (doença de Addison), hipopituitarismo (doença de Simmond), enfermidade do armazenamento retardado do glicogênio (doença de Von Gierke).

A hipoglicemia pós-prandial ocorre devido a causa reativa (sintomas de HG 1 a 3 horas após a refeição), podendo ainda ser de origem alimentar ou em consequência do diabetes mellitus Tipo II e de intolerância à Glicose.

Reagentes

Reagente nº 1 - Reagente de Cor - Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Tampão Fosfato (pH 7,5) 36 mmol/L, 4 - Aminoantipirina 0,3 mmol/L, Azida Sódica 7,7 mmol/L, Fenol 10 mmol/L, Glicose Oxidase > 10.000 U/L, Peroxidase > 700 U/L.

Reagente nº 2 - Padrão - Conservar entre 2 e 8°C. Manter vedado. Contém: Glicose 100,0 mg/dL e Azida Sódica 0,05 g/L.

Estabilidade, Condições de Armazenamento e Transporte

Os reagentes são estáveis até a data de validade impressa no rótulo do produto, quando conservados na temperatura recomendada (2 a 8°C), bem vedados e se evitado de contaminação durante o uso. Antes de serem abertos, os reagentes podem ser transportados em temperatura que não exceda 30°C, até um limite de 120 horas. **Não congelar.**

Cuidados Especiais e Precauções

- As amostras a serem analisadas devem ser tratadas como material potencialmente infectante.
- Utilizar os EPI's de acordo com as Boas Práticas de Laboratório Clínico.
- O Reagente de Cor (1) e o Padrão (2) contêm azida sódica que é tóxica e irritante para pele e mucosa.
- As informações de Descarte, Segurança e Primeiros Socorros estão descritas na Ficha Individual de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ) deste produto, disponível em www.bioanalitica.com.br ou pelo telefone 0800 006 8111.
- Reagentes de lotes diferentes não devem ser misturados.
- Não trocar as tampas dos frascos dos reagentes, a fim de evitar contaminação cruzada.
- Evitar deixar os reagentes fora das condições de armazenamento especificadas, quando os mesmos não estiverem em uso.
- O tempo de reação, pipetagens e temperatura de trabalho são muito importantes para obtenção de resultados corretos.
- Usar pipetas de vidro e ponteiros descartáveis específicas para cada amostra, controle, padrão/calibrador e reagente.
- O nível de água do banho-maria deve ser superior ao dos tubos de ensaio que contém as reações.

Materiais Necessários e Não Fornecidos

- Analizador bioquímico automático, semiautomático ou espectrofotômetro;
- Pipetas de vidro e/ou automáticas;
- Ponteiras;
- Tubos de ensaio;
- Cronômetro;
- Banho-maria.

Amostra

Plasma (Fluoreto), soro, líquido, líquido (ascítico, pleural e sinovial). O soro deverá ser centrifugado imediatamente após a colheita. Em outros líquidos biológicos adicionar um inibidor da glicólise na mesma proporção descrita para o sangue, centrifugando a amostra antes de iniciar a dosagem.

No plasma, soro ou outros líquidos separados das células, a glicose é estável por 3 dias armazenada entre 2 e 8°C, quando livres de contaminação.

Para descarte dos reagentes e materiais biológicos deve-se seguir as normas locais, estaduais ou federais de proteção ambiental.

Interferências e Limitações

O uso de medicamentos como o Ácido Ascórbico (Vitamina C) interferem na reação, pois competem com o consumo de H₂O₂, fornecendo valores falsamente diminuídos. Por esta razão, deve-se suspender o seu uso pelos menos 24 horas antes da coleta da amostra.

Concentrações de bilirrubina até 13,50 mg/dL e triglicérides até 1216 mg/dL não produzem interferências significativas. Valores de hemoglobina maior que 200 mg/dL e ácido ascórbico até 4,0 mg/dL produzem interferências significativas nas amostras.

Preparação dos Reagentes

Reagentes prontos para uso.

Procedimento Técnico

Equipamentos Automáticos

Para uso em analisadores automáticos, verificar o protocolo de automação no site www.bioanalitica.com.br ou através do SAC.

Nota: Recomendamos o uso do Calibrador – Ref. BA052 para calibração. Para avaliar a precisão das dosagens, recomendamos o uso do Controle N – Ref. BA115 e Controle P – Ref. BA118.

Método de Ponto Final

Identificar 3 tubos de ensaio: B (Branco), A (Amostra), P (Padrão) e proceder como a seguir:

	Branco	Amostra	Padrão
Amostra	---	10 µL	---
Padrão (2)	---	---	10 µL
Reagente de Cor (1)	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Homogeneizar bem e colocar em banho-maria 37°C por 10 minutos. Ler a absorbância da Amostra e do Padrão em 505 nm (490 - 550 nm), acertando o zero com o Branco. A cor é estável por 30 minutos.

Cálculos

Glicose (mg/dL) = (Absorbância da Amostra ÷ Absorbância do padrão) × Concentração do Padrão

Fator de Calibração = Concentração do Padrão ÷ Absorbância do Padrão

Exemplo com Padrão

Absorbância da Amostra = 0,340

Absorbância do Padrão = 0,355

Concentração do Padrão = 100 mg/dL

Glicose = (0,340 ÷ 0,355) × 100 = 95,8 mg/dL

Exemplo com Fator de Calibração

Fc = 100 ÷ 0,355 = 282

Glicose = 0,340 × 282 = 95,8 mg/dL

Método Cinético

Esta técnica utiliza uma cinética de dois pontos e não requer branco da reação. Deve ser utilizado em todas as amostras lipêmicas. É importante que sejam observados rigorosamente o intervalo de tempo entre a mistura da amostra ou padrão com o reagente e o início da medição no fotômetro. Para a reprodutibilidade dos resultados, é absolutamente fundamental e indispensável o controle da temperatura da reação. O tempo de reação é muito pequeno, fazendo se necessário a utilização de um fotômetro com cubeta termostaticada com controle de temperatura a 37 °C.

Ajustar o zero do fotômetro em 505 nm (490 a 550) com água deionizada ou destilada. Adicionar 0,01 mL da amostra ou Padrão a 1,0 mL do Reagente de Cor (1) previamente aquecido a 37°C. Misturar e iniciar imediatamente a medição. Efetuar uma leitura da absorbância aos 30 segundos e outra aos 90 segundos mantendo a reação com temperatura controlada em 37 °C.

Cálculos

$$\Delta A \text{ (Teste ou Padrão)} = \text{Absorbância}_{90} - \text{Absorbância}_{30}$$

$$\text{Glicose (mg/dL)} = \frac{\Delta A \text{ da Amostra}}{\Delta A \text{ do Padrão}} \times 100$$

Exemplo:

$$A_{30} \text{ Amostra} = 0,104 \quad A_{30} \text{ Padrão} = 0,095$$

$$A_{90} \text{ Amostra} = 0,181 \quad A_{90} \text{ Padrão} = 0,178$$

$$\text{Glicose (mg/dL)} = \frac{0,181 - 0,104}{0,178 - 0,095} \times 100 = 93$$

Características do Desempenho

Comparação de Métodos

O método foi comparado com outro produto com metodologia semelhante através de 40 amostras de soro humano. Através de modelos estatísticos, os resultados foram analisados e resultaram na equação de regressão linear onde Método Bioanalítica (y) = 0,099 + 0,996 * Método comparativo (x) e coeficiente de correlação igual a 0,993.

Sensibilidade

Uma amostra proteica não contendo Glicose, foi utilizada para calcular o limite de detecção do ensaio. A média encontrada foi 1,7900 mg/dL equivalente a 20 determinações, com desvio padrão de 0,2254 mg/dL.

A sensibilidade, que indica o limite de detecção do método, corresponde à média mais 3 vezes o desvio padrão, que é igual a 2,4661 mg/dL.

Linearidade

A reação é linear até 600 mg/dL. Para amostras com valores acima de 600 mg/dL, diluir a amostra com Cloreto de Sódio 0,85%, repetir a dosagem e multiplicar o resultado obtido pelo fator de diluição.

Repetibilidade

A repetibilidade foi calculada a partir de 20 determinações sucessivas, utilizando 3 amostras com concentrações diferentes, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração Média (mg/dL)	43,66	86,64	258,28
Desvio Padrão (mg/dL)	0,31	0,46	2,26
Coeficiente de Variação (%)	0,71	0,53	0,90

Reprodutibilidade

A reprodutibilidade foi calculada a partir de 20 determinações sucessivas durante 20 dias consecutivos, utilizando 3 amostras com concentrações diferentes, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração Média (mg/dL)	37,80	89,49	260,49
Desvio Padrão (mg/dL)	0,86	3,64	6,47
Coeficiente de Variação (%)	2,28	4,07	2,49

Valores de Referência

Estes valores de referência devem ser usados apenas como orientação. Sugere-se que cada laboratório estabeleça seus próprios valores para população atendida. Os resultados dos testes devem ser analisados por um profissional responsável.

Plasma	Prematuro	20 a 60 mg/dL
	0 a 1 dia	40 a 60 mg/dL
	>1 dia	50 a 80 mg/dL
	Crianças e adultos	65 a 99 mg/dL
Líquor		50 a 70 mg/dL

Para converter os valores de mg/dL em mmol/L (SI) multiplicar por 0,0556.

Controle Interno da Qualidade

O laboratório clínico deve possuir um programa interno de controle da qualidade, para assegurar que todos os procedimentos, normas, limites e tolerância para variações sejam claramente definidos. Ressaltamos que todos os sistemas de medição apresentam uma variabilidade analítica, que deve ser monitorada pelos laboratórios. Portanto, é recomendável a utilização de controles, que permitem avaliar a precisão e a exatidão das dosagens. Sugere-se utilizar soluções estabilizadas da linha de controles e calibradores da Bioanalítica.

Observações

- A limpeza e secagem adequadas do material usado são fatores fundamentais para a estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.
- A água utilizada na limpeza do material deve ser recente e isenta de agentes contaminantes. A limpeza da vidraria deve ser feita com detergente neutro. O enxágue deve ser exaustivo sendo os últimos com água destilada ou deionizada.
- A água utilizada no laboratório deve ter a qualidade adequada a cada aplicação. Assim, para preparar reagentes e usar nas medições, a água deve ser do Tipo II, com resistividade > 1 megaohms/cm ou condutividade < 1 microsiemens/cm e concentração de silicatos < 0,1 mg/L. Para o enxágue inicial da vidraria, a água pode ser do Tipo III, com resistividade > 0,1 megahoms ou condutividade < 10 microsiemens.
- No enxágue final, utilizar água do Tipo II. Coluna deionizadora com sua capacidade saturada libera água alcalina, vários íons e também substâncias com grande poder de oxidação ou redução que deterioram os reagentes em poucos dias ou mesmo horas, alterando de maneira imprevisível os resultados. Assim, é fundamental estabelecer um programa de controle da qualidade da água.

Referências Bibliográficas

- Trinder, P., Ann. Clin. Biochem., 6-24, 1969.
- Bergmeyer HU. Methods of Enzymatic Analysis, 3ª edição, Vol VI, Deerfield Beach:VCH, 1968:178-184.
- Tonks, D. B., Quality Control in Clinical Laboratories, 1983.
- Sachs DB, Bruns DE, Goldstein DE, Maclaren NK, McDonald JM, Parrot M Clin Chem 2002;48:436-72.
- Carl, A. B. and Edward R. A., Tietz Textbook of Clinical Chem. 2nd ed., 928-997,
- Bioanalítica: Dados internos de arquivo do P&D.

Termos e Condições de Garantia

A Bioanalítica Diagnóstica garante o desempenho e a qualidade deste produto, dentro das especificações, até a data de expiração indicada nos rótulos, desde que utilizados, armazenados e transportados nas condições adequadas.

Apresentações

Ref.	Volume	Reagente 1	Reagente 2
BA244-500	500 mL	2 x 250 mL	1 x 3 mL
BA244-1000	1000 mL	4 x 250 mL	1 x 3 mL

Bioanalítica Diagnóstica S/A.

Rua Álvares da Silva, 12 - União
CEP: 31160-360 – Belo Horizonte MG - Brasil
Tel. +55 31 3657-0051
www.bioanalitica.com.br
E-mail: bioanalitica@bioanalitica.com.br
CNPJ: 20.264.948/0001-61 – Indústria Brasileira
SAC: 0800 006 8111
E-mail: sac@bioanalitica.com.br

Revisão: Junho / 2022.