

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
Акционерного общества
«ДИАКОН ДС»

Смирнов А.В.
«11» апреля 2016 г.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов для количественного определения глюкозы
гексокиназным методом в сыворотке и плазме крови, цельной крови и моче
(ГЛЮКОЗА ГК ДДС)

РУ № ФСР 2008/03660

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для количественного определения глюкозы в сыворотке и плазме крови, цельной крови и моче в клиничко-диагностических и биохимических лабораториях и научно-исследовательской практике.

Набор реагентов (ГЛЮКОЗА ГК ДДС) должен использоваться квалифицированным персоналом в области клинической лабораторной диагностики.

Количество определений зависит от объема фасовки и используемого биохимического анализатора.

Возможна поставка набора без реагента 3 (Депротеинизирующий раствор ДДС), необходимого для определения глюкозы в цельной крови.

МЕТОД

Ферментативный гексокиназный метод.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Гексокиназа при наличии АТФ катализирует реакцию фосфорилирования β -D-глюкозы с образованием эквимольных количеств глюкозо-6-фосфата. НАД-зависимая дегидрогеназа глюкозо-6-фосфата катализирует реакцию окисления глюкозо-6-фосфата до 6-фосфоглюконата, сопряженную с восстановлением НАД в НАДН.

Скорость восстановления НАД прямо пропорциональна содержанию глюкозы в пробе и измеряется фотометрически при длине волны 340/334 или 365 нм.

СОСТАВ НАБОРА

Вариант 1.

Реагент 1: буферный раствор (рН 7,8), содержащий трис, 100 ммоль/л; сульфат магния, 4,0 ммоль/л; АТФ, 2,1 ммоль/л; НАД, 2,1 ммоль/л; азид натрия, 0,095% – 4 флакона (по 20 мл), 5 флаконов (по 80 мл), 4 флакона (по 16 мл), 4 флакона (по 90 мл).

Реагент 2: ферментный раствор, содержащий сульфат магния, 4,0 ммоль/л; гексокиназу, ≥ 7500 Е/л; глюкозо-6-фосфат дегидрогеназу, ≥ 7500 Е/л; азид натрия, 0,095% - 1 флакон (20 мл), 1 флакон (100 мл), 2 флакона (по 8,0 мл), 1 флакон (90 мл).

Реагент 3: Депротеинизирующий раствор ДДС, содержащий перхлорную кислоту, 0,83 моль/л – 1 флакон (100 мл), 1 флакон (1000 мл), 1 флакон (80 мл), 1 флакон (900 мл).

Калибратор: калибровочный раствор глюкозы, 5,55 ммоль/л, содержащий азид натрия, 0,095% – 1 флакон (1,0 мл), 1 флакон (3,0 мл), 2 флакона (по 3,0 мл).

Вариант 2.

Реагент 1: буферный раствор (рН 7,8), содержащий трис, 100 ммоль/л; сульфат магния, 4,0 ммоль/л; АТФ, 2,1 ммоль/л; НАД, 2,1 ммоль/л; азид натрия, 0,095% – 2 флакона (по 68 мл), 6 флаконов (по 68 мл), 2 флакона (по 64 мл), 8 флаконов (по 60 мл), 2 флакона (по 65 мл), 4 флакона (по 65 мл), 4 флакона (по 38 мл), 6 флаконов (по 24 мл), 6 флаконов (по 16 мл), 5 флаконов (по 62 мл), 2 флакона (по 50 мл), 4 флакона (по 50 мл), 4 флакона (по 40 мл), 6 флаконов (по 40 мл), 4 флакона (по 22 мл), 4 флакона (по 39 мл), 1 канистра (10000 мл).

Реагент 2: ферментный раствор, содержащий сульфат магния, 4,0 ммоль/л; гексокиназу, ≥ 7500 Е/л; глюкозо-6-фосфат дегидрогеназу, ≥ 7500 Е/л; азид натрия, 0,095% - 2 флакона (по 17 мл), 6 флаконов (по 17 мл), 2 флакона (по 20 мл), 8 флаконов (по 15 мл), 4 флакона (по 20 мл), 2 флакона (по 22 мл), 3 флакона (по 13 мл), 6 флаконов (по 4,0 мл), 5 флаконов (по 18 мл), 1 флакон (25 мл), 2 флакона (по 25 мл), 2 флакона (по 32 мл), 4 флакона (по 7,0 мл), 4 флакона (по 12 мл), 1 канистра (2500 мл).

Калибратор: калибровочный раствор глюкозы, 5,55 ммоль/л, содержащий азид натрия, 0,095% – 1 флакон (3,0 мл), 2 флакона (по 3,0 мл) или 1 флакон (500 мл).

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

- Линейность в диапазоне от 0,35 до 28 ммоль/л (при 340/334 нм) или от 0,35 до 50 ммоль/л (при 365 нм).
- Отклонение от линейности не превышает 5%.
- Чувствительность – не более 0,3 ммоль/л.
- Коэффициент вариации – не более 5%.

Если значение превосходит верхнюю границу диапазона, то образцы сыворотки и плазмы и цельной крови должны быть разведены 1+2 физиологическим раствором (0,9% NaCl) и полученный результат должен быть умножен на 3.

Если значение превосходит верхнюю границу диапазона, то образец мочи следует развести 1+10 дистиллированной водой и полученный результат должен быть умножен на 11.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Для калибровки автоматизированных фотометрических систем рекомендуется мультикалибратор TruCal U фирмы DiaSys.

Для внутреннего контроля качества с каждой серией образцов проводите измерения контрольных сывороток TruLab N и P или для исследования мочи – TruLab Urine Уровень 1 и Уровень 2 производства DiaSys, Германия.

	Кат. №	Фасовка
TruCal U	5 9100 60 10 060	1×3 мл
TruLab N	5 9000 60 10 060	1×5 мл
TruLab P	5 9050 60 10 060	1×5 мл
TruLab Urine Уровень 1	5 9170 99 10 061	1×5 мл
TruLab Urine Уровень 2	5 9180 99 10 061	1×5 мл

Возможно использование других контрольных сывороток, аттестованных данным методом и не уступающих по своим свойствам рекомендуемому.

Калибровку рекомендуется проводить в следующих случаях: при нестабильности результатов контроля качества, в случае выхода значений контроля качества за пределы установленных диапазонов для используемого лота контрольного материала, использование нового набора.

НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

- В сыворотке крови взрослых людей (натощак, венозная кровь) 3,9-6,4 ммоль/л;

- В сыворотке крови детей (натощак, 1-6 лет) – 4,1-7,0 ммоль/л, 7-19 лет – 3,9-5,9 ммоль/л;
- В цельной крови – 3,9-5,6 ммоль/л;
- В моче – 0,84 ммоль/л.

Рекомендуется в каждой лаборатории уточнить диапазон значений нормальных величин для обследуемого контингента людей.

ОБРАЗЦЫ

Сыворотка или плазма крови, цельная кровь, моча.

Для сыворотки/плазмы: отделить от форменных элементов не позднее, чем через 1 ч после забора крови.

Стабильность в плазме после добавления ингибиторов гликолиза (фториды, манноза):

2 дня	при 15–25°C
7 дней	при 2–8°C
1 день	при –20°C

Стабильность в сыворотке (отделенная от форменных элементов, свободный гемолиз):

8 ч	при 15–25°C
72 ч	при 2–8°C

Стабильность в моче:

2 ч	при 15–25°C
2 ч	при 2–8°C

Загрязненные образцы хранению не подлежат.

Замораживать образцы можно не более одного раза!

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 2а (Приказ Минздрава РФ от 06.06.2012 № 4н).

Реагенты 1, 2 и калибратор содержат токсичный компонент – азид натрия, реагент 3 (Депротеинизирующий раствор ДДС) содержит перхлорную кислоту. При работе с ними следует соблюдать осторожность и не допускать попадания на кожу и слизистые; при попадании немедленно промыть пораженное место большим количеством проточной воды. При проглатывании следует выпить 0,5 л теплой воды и вызвать рвоту.

Меры предосторожности – соблюдение «Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения» (Москва, 1981 г.).

При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

Калибратор и реагент 3 (Депротеинизирующий раствор ДДС) готовы к использованию.

Биреагентная схема – запуск реакции субстратом.

Реагенты 1 и 2 готовы к использованию.

Монореагентная схема – запуск реакции образцом.

Для приготовления Рабочего реагента: смешать 4 объема Реагента 1 и один объем Реагента 2 (например, 20 мл Реагента 1 и 5 мл Реагента 2). Тщательно закрыть флаконы с Реагентами 1 и 2 после отбора аликвот. Оставить свежеприготовленный рабочий реагент на 20-30 мин при комнатной температуре (15-25°C) для уравнивания компонентов смеси.

Рабочий реагент хранить в темноте!

Стабильность рабочего реагента:

2 месяца при 2-8°C
2 недели при 15-25°C

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Монореагентная схема – запуск реакции образцом.

Компоненты реакционной смеси отбирать в количествах, указанных в таблице 1.

Таблица 1

Отмерить, мкл	Контрольная (холостая) проба	Калибровочная проба	Опытная проба
Вода дистиллированная	10	–	–
Калибратор/мультикалибратор	–	10	–
Образец	–	–	10
Рабочий реагент	1000	1000	1000
Перемешать, инкубировать 10 мин при 37°C или 20 мин при 15-25°C. Измерить оптическую плотность (А) опытной и калибровочной проб против контрольной (холостой) пробы при длине волны 340/334/365 нм в кювете с длиной оптического пути 10 мм не позднее, чем через 30 мин.			

$$\Delta A = A_{\text{образца/калибратора}}$$

Окраска растворов стабильна не более 30 минут при комнатной температуре (15-25°C).

Примечание. Схема дозирования при запуске реакции образцом рекомендуется только для анализаторов с коррекцией холостой пробы по сыворотке, так как необходимо исключить влияние сыворотки на величину экстинкции, чтобы избежать ошибки определения (завышения результата).

Биреагентная схема – запуск реакции субстратом.

Компоненты реакционной смеси отбирать в количествах, указанных в таблице 2.

Таблица 2.

Отмерить, мкл	Контрольная (холостая) проба	Калибровочная проба	Опытная проба
Вода дистиллированная	10	–	–
Калибратор/мультикалибратор	–	10	–
Образец	–	–	10
Реагент 1	1000	1000	1000
Перемешать, инкубировать 2 мин при 15-25/37°C, измерить оптическую плотность (А1) опытной и калибровочной проб против контрольной (холостой) пробы при длине волны 340/334/365 нм в кювете с длиной оптического пути 10 мм, затем добавить:			
Реагент 2	250	250	250
Перемешать, инкубировать 10 мин при 37°C или 20 мин при 15-25°C. Измерить оптическую плотность (А2) опытной и калибровочной проб против контрольной (холостой) пробы при длине волны 340/334/365 нм в кювете с длиной оптического пути 10 мм не позднее, чем через 30 мин.			

$$\Delta A = (A2 - A1)_{\text{образца/калибратора}}$$

Окраска растворов стабильна не более 30 минут при комнатной температуре (15-25°C).

Примечание. При использовании автоматических или полуавтоматических биохимических анализаторов количество реагентов и анализируемых образцов в зависимости от объема используемой кюветы может быть пропорционально изменено (соотношение сыворотки или плазмы крови к рабочему реагенту при запуске реакции образцом или к реагенту 1 при запуске реакции субстратом составляет 1:100).

Определение глюкозы в цельной крови.

Депротеинизацию цельной крови провести по схеме, представленной в таблице 3.

Таблица 3.

Компоненты	Добавить в центрифужные пробирки	
	калибровочная проба	опытная проба
Мультикалибратор (TruCal U)*	50	—
Цельная кровь	—	50
Реагент 3 (Депротеинизирующий раствор ДДС)	500	500

*Водный калибратор глюкозы можно не центрифугировать.

Содержимое центрифужных пробирок тщательно перемешать, затем центрифугировать при 3000 об./мин в течение 10 минут. Прозрачный супернатант использовать для определения глюкозы. Следует избегать попадания осадка при отборе супернатанта.

Для определения глюкозы в цельной крови компоненты реакционной смеси отбирать в количествах, указанных в таблице 4.

Таблица 4.

Отмерить, мкл	Контрольная (холостая) проба	Калибровочная проба	Опытная проба
Вода дистиллированная	100	—	—
Калибратор /супернатант пробы с мультикалибратором	—	100	—
Супернатант пробы крови	—	—	100
Рабочий реагент	1000	1000	1000
Перемешать, инкубировать 10 мин при 37°C или 20 мин при 15-25°C. Измерить оптическую плотность (А) опытной и калибровочной проб против контрольной (холостой) пробы при длине волны 340/334/365 нм в кювете с длиной оптического пути 10 мм не позднее, чем через 30 мин.			

Окраска растворов стабильна не более 30 минут при комнатной температуре (15-25°C).

РАСЧЕТЫ

Содержание глюкозы (в ммоль/л) в цельной крови, моче, сыворотке и плазме крови определить по формуле:

$$C = \frac{\Delta A_{оп}}{\Delta A_{кал}} \times C_{кал}$$

где: С — концентрация глюкозы в опытной пробе, ммоль/л;

$\Delta A_{оп}$ — оптическая плотность опытной пробы, ед. опт. пл.;

$\Delta A_{кал}$ — оптическая плотность калибровочной пробы, ед. опт. пл.;

$C_{кал}$ — содержание глюкозы в калибраторе/мультикалибраторе, ммоль/л.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ/ПОМЕХОУСТОЙЧИВОСТЬ

Аскорбиновая кислота до 30 мг/дл, билирубин до 40 мг/дл, гемоглобин до 500 мг/дл и липемия до 2000 мг/дл триглицеридов не влияют на точность анализа. Дополнительных веществ (АЛФ), устраняющих липемичность сыворотки, не требуется.

ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Транспортирование и хранение набора должно производиться при температуре 2-8°C в упаковке предприятия-изготовителя в течение всего срока годности. Допускается транспортирование и хранение набора при температуре до 25°C не более 5 суток. Замораживание компонентов набора не допускается.

Срок годности набора — 18 месяцев.

При соблюдении условий хранения все компоненты набора стабильны в течении всего срока годности.

Калибратор стабилен до конца указанного в сроке годности месяца при хранении при температуре 2-25°C.

Реагенты 1 и 2 после вскрытия флаконов можно хранить при температуре 2-8°C в защищенном от света месте в течение всего срока годности наборов при условии достаточной герметичности флаконов и отсутствии загрязнения.

Реагент 3 (Депротеинизирующий раствор ДДС) можно хранить при температуре 2-25°C в защищенном от света месте в течение всего срока годности наборов при условии достаточной герметичности флакона.

Калибратор после вскрытия флакона можно хранить при температуре 2-8°C в течение 3 месяцев при условии достаточной герметичности флакона и отсутствии загрязнения.

Рабочий реагент можно хранить при температуре 2-8°C не более 2 месяцев или при комнатной температуре (15-25°C) не более 2 недель.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

АО «ДИАКОН-ДС» гарантирует качество, эффективность и безопасность медицинского изделия, отсутствие недопустимого риска причинения вреда жизни, здоровью человека и окружающей среде при использовании набора реагентов по назначению в условиях, предусмотренных данной инструкцией по применению.

Гарантийные обязательства АО «ДИАКОН-ДС» распространяются с даты изготовления и на период срока годности медицинского изделия, при условии надлежащего транспортирования, хранения и эксплуатации.

УТИЛИЗАЦИЯ И УНИЧТОЖЕНИЕ

Набор реагентов **ГЛЮКОЗА ГК ДДС** предназначен для применения в клинко-диагностических лабораториях и биохимических лабораториях и научно-исследовательской практике. При работе с набором следует соблюдать требования ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».

Утилизацию, уничтожение и дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПин 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

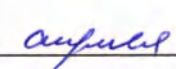
По вопросам, касающимся качества набора **ГЛЮКОЗА ГК ДДС**, следует обращаться в АО «ДИАКОН-ДС» по адресу: 142290, г. Пушкино, Московской обл., Ул. Грузовая 1а; тел. (495) 980-63-38, т/факс (495) 980-66-79.

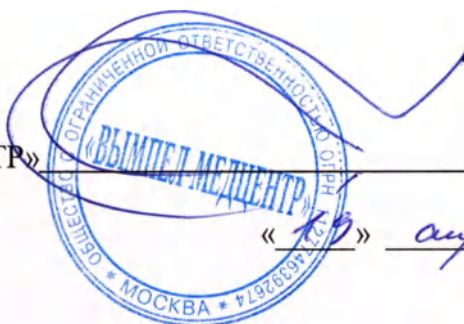
Начальник отдела исследований и разработок
АО «ДИАКОН-ДС»

 к.б.н. О.Ю. Гудкова

«СОГЛАСОВАНО»
Генеральный директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

П.К. Варнавичус

« 19 »  20 16 г





ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 6 ЛИСТОВ
«19» апреля 2016 год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ – МЕДЦЕНТР»

П.К. Варнавичус

