

	Јавна здравствена установа Болница „Свети Врачеви“ Бијељина Српске војске 53			MI-10-028
Упутство за методу испитивања глукозе				
Страна 1 од 7	Издање:	Важи од:	Одобрио	Копија број
	2	2023-03-22	мр пх Анђела Митровић руководилац Службе за хематолошку и биохемијску дијагностику	Е

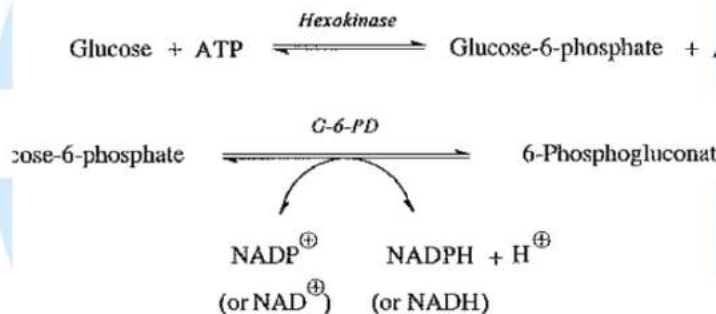
1. СВРХА ИСПИТИВАЊА

Глукоза тест се користи за квантитативно одређивање глукозе у хуманом серуму, плазми, мокраћи или ликвору. Одређивање глукозе у крви спада међу најчешће лабораторијске претраге у клиничкој хемији, која се користи при дијагнози и лијечењу дијабетеса. Повишене вриједности глукозе (хипергликемија) срећу се и код неоплазме гуштераче, хипертиреозе, аденокортикалне хиперфункције те других поремећаја. Снижене вриједности глукозе (хипогликемија) могу се појавити због примјене превеликих доза инсулина те код различитих болести јетре.

2. ПРИНЦИП И МЕТОД ПРОЦЕДУРЕ КОЈА СЕ КОРИСТИ ЗА ИСПИТИВАЊЕ

Глукоза се фосфорилише под утицајем хексокиназе (HK) у присутности аденозин-трифосфата (ATP) и магнезијумових јона при чему настају глукоза-6-фосфат (G-6-P) и аденозин-дифосфат (ADP). Затим глукоза-6-фосфат дехидрогеназа (G-6-PDH) оксидише G-6-P у 6-фосфоглуконат, а никотинамид-аденин-динуклеотид (NAD) при томе прелази у редуковани облик никотинамид-аденин-динуклеотид (NADH). Количина насталог NADH у микромолима одговара количини глукозе у микромолима. NADH апсорбује свјетлост на 340 nm, што се може мјерити спектрофотометријски као пораст апсорбанције.

Методологија: Спектрофотометријска метода; кинетички UV тест



3. КАРАКТЕРИСТИКЕ ПЕРФОРМАНСИ

3.1 Линеарност

Глукоза тест за узорке серума линеаран је у опсегу од 0,28 до 44,40 mmol/L.

3.2.Граница детекције (LOD- eng. Limit of Detection)

LOD је најмања количина анализата у узорку која се може одредити уз вјероватноћу од 95%. LOD за глукозу у серуму је 0,139 mmol/L.

3.4. Граница квантификације (LOQ)

Граница квантификације (LOQ) је концентрација анализата која се може одредити уз KV=20 %. (%KV-коэффициент варијације) LOQ за глукозу у серуму је 0,278 mmol/L.

3.5. Прецизност

Прецизност Глукоза теста је $\leq 5\%$ укупног %KV за узорке серума. Репрезентативни резултати испитивања прецизности теста помоћу CLSI-овам протокола NCCLS EP5-A14 приказани су у табели 1.

Табела 1. Резултати прецизности теста

Болница Бијељина	Страна 2 од 7	Издање:	Важи од:	МИ-10-028
		2	2023-03-22	

Контрола		Ниво 1	Ниво 2
N		80	80
средња вриједност (mmol/L)		4,42	15,61
у серији	SD	0,09	0,10
	% KV	1,98	0,65
између серија	SD	0,04	0,14
	% KV	0,84	0,93
између дана	SD	0,00	2,80
	% KV	0,00	0,99
укупно	SD	0,09	0,24
	% KV	2,15	1,51

SD-стандардна девијација; %KV-коэффициент варијације

3.6. Тачност

Одступање вриједности глукозе у серуму је $\leq 6\%$ или $\pm 0,0555$ mmol/L, а укупна грешка за узорке серума је $\leq 16\%$.

3.7. Поређење метода

Резултати добијени одређивањем глукозе у серуму на *ARCHITECT cSystem* анализатору упоређени су са резултатима добијеним на *AEROST System* анализатору. Коэффициент корелације између двије методе износи $r=0,9996$.

4. ВРСТА УЗОРКА

Врста узорка: За тестирање се могу користити узорци серума, плазме, урина и ликвора.

Стабилност узорака: Глукоза се у пуној крви на собној температури разграђује брзином око 5% на сат. Гликолиза се може инхибирати узорковањем у епрувете са натријум флуоридом/калијум оксалатом. По могућности анализа узорака се врши у што краћем року. Избегава се вишекратно замрзавање и одмрзавање узорака. Стабилност узорака приказана је у табели 2.

Табела 2. Стабилност узорака

Температура	Максимално вријеме чувања		
	серум/плазма	урин	ликвор
20 до 25 °C	2 дана	2 сата	5 сати
2 до 8 °C	7 дана	2 сата	3 дана
-20 °C	3 мјесеца	2 дана	>1 мјесеца

5. ПРИПРЕМА ПАЦИЈЕНАТА

Препорука је да се узорак крви узима наште, ујутру најмање 12 сати након последњег оброка, као и да вријеме за вађења крви буде између 7 и 10 h. Дан прије вађења крви треба узимати уобичајне оброке, али не премасне. За вечеру конзумирати лакшу храну. Вечера треба да буде најкасније до 19 h. Послије 19 h може се пити течност, изузев алкохола, кафе и претјерано заслађених напитака. Дан прије узимање крви треба избјегавати интензивну физичка активност. На дан узимања крви, ујутру, не треба ништа јести, пити ни пушити. Уобичајну терапију узети након вађења крви уколико лекар није другачије одредио. Уколико неки лијекови значајно утичу на концентрацију глукозе у крви, треба ако је могуће, избјегавати њихово узимање најмање два дана прије узорковања крви, у консултацији са лекаром. Такође, потребно је избјегавати дијететске суплементе и биљне препарате, које лекар није одредио као обавезне, као и интензивну физичку активност, конзумирање алкохолних и енергетских пића, два до три дана прије узимања узорка крви.

Болница Бијелина	Страна 3 од 7	Издање:	Важи од:	МИ-10-028
		2	2023-03-22	

6. ВРСТА ПОСУДЕ И АДТИВИ

За узорковање крви се користе пластичне епрувете, односно вакутајнери. За добијање серума користе се епрувете са активатором когулације (црвени чеп). Када се глюкоза одређује из плазме узорковање крви се врши у епрувету са литијум/натријум хепарином као антикоагулансом (сиви чеп). 24-часовни урин се сакупља у бочице у које се претходно додато 5 mL глациране сирћетне киселине.

7. ОПРЕМА И РЕАГЕНСИ

Од опреме и регенаса за извођење овог теста потребне су: заштитне рукавице, заштитна одјећа, аутоматска пипета, наставци за пипету, реакционе чашице, реагенс сет и анализатор ARCHITECT генерације. Сет реагенаса за одређивање глюкозе је у течном облику, спреман за употребу и садржи један реагенс, чије су компоненте приказане у табели 3.

Табела 3. Компоненте реагенса

Реактивне компоненте	Концентрација
R1 ATP 2Na	9,0 mg/mL
NAD	5,0 mg/ml
G-6-PDH	3.000 U/L
хексокиназа	15.000 U/L
Неактивне компоненте: R1 садржи натријум азид (0,05%) као конзерванс.	

Додатни материјали за спровођење теста су: *Multiconstituent Calibrator*, контролни материјал, физиолошки раствор.

8. УПРАВЉАЊЕ УСЛОВИМА СРЕДИНЕ И БЕЗБЈЕДНОШЋУ

Обезбјеђивање услова радне средине представља систем мјера и активности за остваривање услова које захтјевају испитивања која се спроводе, прописане су у упутству УП-10-138: *Обезбјеђење и праћење услова средине у процесу испитивања*. У просторији у којој је смјештен апарат, температура је прилагођена условима који су прописани од стране произвођача опреме и захтјевима испитивања. Температура се одржава на вриједностима до 25 ° C, што се евидентира у обрасцу ОБ-10-221: *Евиденција температуре*.

Упутством УП-10-137: *Мјере заштите на раду у Служби за хематолошку и биохемијску дијагностику*, прописују се мјере заштите на раду.

Овај тест захтијева руковање хуманим узорцима. Сваки узорак крви или другог биолошког материјала који се достави у лабораторију је потенцијално инфективан, па је неопходно да се са овим материјалом крајње пажљиво рукује. То значи да приликом манипулације узорцима и при раду са апаратом треба користити рукавице за једнократну употребу, као и друга заштитна средства.

Реагенс садржи конзерванс натријум азид (0,05%), који у реакцији са киселинама (pH<6) ослобађа отрован гас. При руковању овим реагенсом и отпадом потребно је предузети мјере предострожности. Реагенс садржи малу концентрацију натријум азида при којој се не ствара отровни гас у количинама штетним за оператера. Такође, pH концентрованог пуфера је виша од 6, а и систем је затворен што доприноси додатној заштити од азида. Уколико се отпад од реагенса пушта у одвод лабораторије, потребно га је испрати неколико пута водом, како би се спријечило стварање експлозивних азида. Реагенс се користи у затвореним системима, гдје је контакт оператера са реагенсом сведен на минимум, такође у питању се веома мале концентрације штетних материја, што доприноси мањој изложености. При руковању овим реагенсом и отпадом потребно је предузети мјере предострожности, носити заштитне рукавице, одијело и заштиту за очи. Уколико дође до контакта са реагенсом треба поступити према препорукама произвођача.

Болница Бијелина	Страна 4 од 7	Издање:	Важи од:	МИ-10-028
		2	2023-03-22	

9. ПРОЦЕДУРЕ КАЛИБРАЦИЈЕ (МЕТРОЛОШКА СЛЕДЉИВОСТ)

Калибрација се врши методом линеарне регресије, гдје се као калбратори користе *Multiconstituent Calibrator 1* и *2* и дејонизована вода као нулти калибратор. Калибрација остаје стабилна око 30 дана, а поновна калибрација је потребна након сваке промјене серије реагенса (лот) и ако су контроле изван прихватљивих распона концентрација. Ова метода је стандардизована са референтним материјалом NIST^a SRM^b 965 по референтној методи ID-GC/MS^c-у.

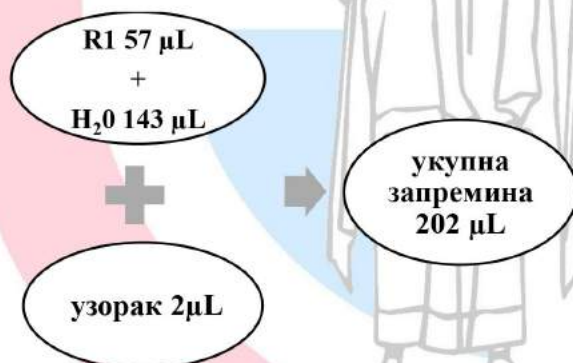
NIST^a –National Institute of Standards and Technology

SRM^b –Standard Reference Matrial

ID-GC/MC^c –Isotope Dilution-Liquid Chromatography Mass Spectrometry

10. КОРАЦИ ПРОЦЕДУРЕ

1. Провјерава се доступност свих потребних реагенаса за извођење теста.
2. Реагенс сет се поставља у апарат ACHTECT cSystem.
3. Прије анализе узорака, спроводи се интерна контрола квалитета и по потреби калибрација.
4. Узорци се стављају у епрувете или чашнице са бар кодовима пацијената на носаче, сталке (*carrier*).
5. Након постављања узорака на транспортни модул врши се њихова идентификација скенирањем бар кода, након чега се врше аналитички процеси испитивања узорка.
6. При стандардном одређивању глукозе, запремине које се пипетирају и чине реакциону смјесу приказане су дијаграмом.



11. ПРОЦЕДУРЕ КОНТРОЛЕ КВАЛИТЕТА

Контрола квалитета спроводи се примјеном контролних материјала које препоручује произвођач, а то су *Technopath Multichem S Plus* ниво 1, *Technopath Multichem S Plus* ниво 2 и *Technopath Multichem S Plus* ниво 3. Интерна контрола квалитета се спроводи континуирано, сваког дана, прије почетка спровођења рутинских анализа. Такође, контрола квалитета се спроводи при промјени серије реагенса или калибратора (лот). Резултати статистичке обраде при интерној провјери аутоматски се приказују на контролној карти која се креира за сваки параметар посебно, чиме се оцјењује значајност разлике између вриједности која се добија анализирањем контролног материјала и очекиване вриједности за тај материјал. Ако је вриједност контролног узорка унутар двије стандардне девијације метода је под контролом и резултати пацијената се могу издати.

На крају мјесеца се штампају контролне карте за дати параметар. Апарат аутоматски рачуна средњу вриједност и стандардну девијацију, док коефициент варијације (KV%) рачуна

Болница Бијељина	Страна 5 од 7	Издање:	Важи од:	МИ-10-028
		2	2023-03-22	

одговорни биохемичар и пореди са коефициентом варијације препорученом од стране произвођача, при чему се одређује поузданост и прецизност методе.

12. ИНТЕРФЕРЕНЦЕ (НА ПРИМЈЕР, ЛИПЕМИЈА, ХЕМОЛИЗА, БИЛИРУБИНЕМИЈА, ЛИЈЕКОВИ) И УНАКРСНЕ РЕАКЦИЈЕ

Критеријум: Прихватљиви критеријум за интерференцију износи $\pm 6\%$ одступања од циљане вриједности.

Иктерус: нема значајне интерференције за одређивање глукозе при концентрацији билирубина од 513-1026 $\mu\text{mol/L}$

Хемолиза: нема значајне интерференције за одређивање глукозе при концентрацији хемоглобина од 10-20 g/L

Липемија: нема значајне интерференције за одређивање глукозе при концентрацији триглицерида од 10-20 g/L

Лијекови (прихватљив критеријум $\pm 6\%$): нема значајне интерференције за одређивање глукозе при концентрацији сулфапиридина (300 mg/L), сулфасалазина (300 mg/L), темозоламида (20 mg/L).

13. ПРИНЦИПИ ПРОЦЕДУРЕ ЗА ИЗРАЧУНАВАЊЕ РЕЗУЛТАТА, А КАДА ЈЕ ТО РЕЛЕВАНТНО И МЈЕРНА НЕСИГУРНОСТ ИЗМЈЕРЕНИХ КВАНТИТАТИВНИХ ВРИЈЕДНОСТИ

Принцип одређивања и израчунавања концентрације глукозе се заснива на линеарној регресији, гдје анализатор мјери апсорбације калибратора и генерише калибрациону криву, док при анализи мјери апсорбацију анализата коју анализатор аутоматски преводи у концентрацију.

Мјерна несигурност за глукозу–Multichem S, ниво 1 је $\pm 3,96\%$, а за глукозу–Multichem S, ниво 2 је $\pm 4,74\%$.

14. БИОЛОШКИ РЕФЕРЕНТНИ ИНТЕРВАЛИ И ВРИЈЕДНОСТИ КЛИНИЧКОГ ОДЛУЧИВАЊА

Референтни интервал за глукозу у серуму/плазми наташте, приказан је у табели 4:

Табела 4. Референтни интервал

Старосна доб	Распон (mmol/L)
недоношчад	1,11 до 3,33
новорођенчад	1,67 до 3,33
новорођенчад, 1 дан	2,22 до 3,33
новорођенчад, > 1 дан	2,78 до 4,44
дјеца	3,33 до 5,55
одрасли	3,89 до 5,83
> 60 година	4,44 до 6,38
> 70 година	4,61 до 6,10

15. ИНТЕРВАЛ ИЗВЈЕШТАВАЊА О РЕЗУЛТАТИМА ИСПИТИВАЊА

Резултати мјерења глукозе су у широком распону вриједности и сходно да је линеарност теста у опсегу од 0,28 до 44,4 mmol/L, овај распон вриједности представља интервал извјештавања.

Болница Бијељина	Страна 6 од 7	Издање:	Важи од:	МИ-10-028
		2	2023-03-22	

16. УПУТСТВА ЗА ОДРЕЂИВАЊА КВАНТИТАТИВНИХ РЕЗУЛТАТА КАДА РЕЗУЛТАТ НИЈЕ У ОКВИРУ ИНТЕРВАЛА МЈЕРЕЊА

Узорци у којима је вриједност глукозе виша од 44 mmol/L, треба разблажити аутоматским или ручним поступком. Ако се користи протокол за аутоматско разблаживање узорка, анализатор сам то врши у омјеру 1:5 (20 μ L узорка и 80 μ L 0,85 % до 0,9% NaCl) и аутоматски исправља концентрацију множењем резултата са одређеним фактором разблажења. Ручно разблаживање узорка се проводи коришћењем физиолошког раствора (0,85 % до 0,90 % NaCl). Код задавања теста оператер мора уписати фактор разблажења узорка, како би се множењем добијеног резултата са унесеним фактором добила аутоматски исправљена концентрација. Када оператер не унесе фактор разблажења, резултат се множи са одговарајућим фактором прије издавања налаза.

Фактор ручног разблажења=(волумен узорка+волумен реагенса за разблажење)/волумен узорка.

17. АЛАРМАНТНЕ/КРИТИЧНЕ ВРИЈЕДНОСТИ, КАДА ЈЕ ОДГОВАРАЈУЋЕ

Алармантне вриједности глукозе за одрасле износе <2,5 или >27,8 mmol/L, док је за новорођенчад <1,7 или >18 mmol/L.

18. КЛИНИЧКО ТУМАЧЕЊЕ ЛАБОРАТОРИЈЕ

За постављање дијагнозе и праћење тока болести, потребно је узети у обзир карактеристике пацијента, тренутну клиничку слику, ранија и тренутна обољења или патолошка стања, терапију коју пацијент прима и др., како би се лабораторијски налаз исправно интерпретирао.

Повишене вриједности: дијабетес тип 1 и 2, хипертиреоидизам, хиперпитuitarизам, Cushing-ов синдром, феохромоцитом, панкреатитис и неоплазме панкреаса, лијекови (супституциони лијекови за тироидеу, диуретици типа тиазида, ацетозоламид, хормонски препарати са глюкокортикоидним дејством..).

Снижене вриједности: инсулином, хиперплазија Langerhans-ових острваца, метаболичке болести, тешке болести јетре, недостатак глукагона, катехоламина, инсуфицијенција хипофизе и надбубрега, лијекови (инсулин, орални антидијабетици, алкохол).

19. ПОТЕНЦИЈАЛНИ ИЗВОРИ ВАРИЈАЦИЈА

Билошка варијабилност:

- повишена концентрација: старија животна доб, умјерена физичка активност, стрес, гојазност, одређена исхрана, кофеин
- смањена концентрација: акутни унос алкохола, новорођенчади

Егзогени фактори варијабилности:

- дуже стајање узорка на собној температури доводи до гликолизе (смањује се концентрација глукозе за 0,5 mmol/L на сат)
- контаминација узорка инфузионим раствором који садржи глукозу
- ацетилсалицилна киселина повећава концентрацију глукозе

20. РЕФЕРЕНЦЕ

- Glucose, Упутство произвођача за одређивање глукозе на ARCHITECT cSystems анализаторима-преведен на српском. 2012.
- Мајкић-Синг Н. (2006). Медицинска биохемија, друго допуњено издање. Друштво медицинских биохемичара Србије, Београд
- Спасић С., Јелић Ивановић З., Спасојевић-Калимановска В. (2005). Практикум за вјежбе из медицинске биохемије, за студенте Фармацеутског факултета. Фармацеутски факултет, Београд
- Хонових, Ј. (2013). Зашто нам је важна и како проводити квалитетну пријеманалитичку фазу лабораторијске дијагностике?. Гласник пулске болнице, 10(10), 21-25. Преузето с <https://hrcak.srce.hr/130676>
- Architect System Operations Manual. Abbott Laboratories, 2013.

Болница Бијељина	Страна 7 од 7	Издање:	Важи од:	МИ-10-028
		2	2023-03-22	

6. Ћорић, J. (2014). Контрола квалитета рада у лабораторијској медицини. Факултет здравствених студија, Сарајево.

7. Don-Wauchope, A. C., & Chetty, V. T. (2009). Laboratory defined critical value limits: how do hospital physicians perceive laboratory based critical values?. *Clinical biochemistry*, 42(9), 766–770.

