

## GLUCOSE-FRUCTOSE

Per uso diagnostico in Vitro

**DETERMINAZIONE QUANTITATIVA UV del GLUCOSIO E DEL FRUTTOSIO su SIERO, LIQUIDO CEREBROSPINALE (CSF) e URINE con Analizzatore MINDRAY BS-300**

580 tests (5 x 20mL)

REF NCGF8815

### I. DESTINAZIONE D'USO

Il glucosio è la principale fonte di energia dei tessuti viventi; deriva dalla dieta, dall'idrolisi del glicogeno epatico e dalla conversione degli aminoacidi in glucosio. La concentrazione ed il metabolismo del glucosio sono strettamente regolati dall'insulina, un ormone peptidico prodotto dalle cellule B del pancreas che facilita anche l'ingresso del glucosio nei tessuti. Una diminuzione del livello o dell'attività dell'insulina determina un aumento del glucosio nel sangue. Una elevata concentrazione plasmatica di glucosio è presente nei pazienti con diabete mellito (insulino-dipendente o non insulino-dipendente). L'ipoglicemia è causata dal prolungato digiuno, la somministrazione di alcuni farmaci o difetti congeniti del metabolismo.

Fruttosio e glucosio sono monosaccaridi, quando accade una carenza o l'assenza di enzimi che partecipano al metabolismo dei carboidrati, si può avere un accumulo di questi zuccheri, che viene eliminato nelle urine.

Il fruttosio è un monosaccaride semplice, come il glucosio ed il galattosio, che vengono assorbiti direttamente nel flusso sanguigno durante la digestione. Dopo l'assorbimento entra nella vena porta ed viene diretto verso il fegato.

Il catabolismo iniziale è in analogia con quello del glucosio; passa attraverso il fruttosio-1-fosfato fino a diidrossiacetone fosfato e gliceraldeide-3-fosfato che possono entrare nel percorso gluconeogenico del glucosio o nella sintesi del glicogeno o dell'acido grasso o la sintesi del trigliceride, oppure essere ulteriormente catabolizzate attraverso il percorso glicolitico del piruvato.

Uno studio recente ha scoperto che il consumo elevato di fruttosio o cibi e bevande ricchi di fruttosio sono associati alla gotta, alla sindrome metabolica ed alla insulino-resistenza.

Profonda attenzione è focalizzata sul bilancio energetico complessivo nella fertilità; l'energia per la motilità degli spermatozoi è derivata dal metabolismo del fruttosio portato nel liquido seminale.

### II. PRINCIPIO

In presenza di ATP, NADP e G6PDH (glucosio-6P-deidrogenasi) e HK (esochinasi) il Glucosio produce NADPH. L'intensità dell'assorbimento agli UV alla lunghezza d'onda indicata è proporzionale alla conc. del Glucosio nel campione. L'HK è in grado di fosforilare anche il Fruttosio.

Aggiungendo PGI (fosfoglucoisomerasi) si produce nuovo NADPH dalla conversione del fruttosio-6P in glucosio-6P. Il nuovo incremento dell'assorbimento UV- alla lunghezza d'onda indicata è proporzionale alla concentrazione del Fruttosio nel campione.

### III. PRECAUZIONI D'USO

1. Questo prodotto è stato formulato per uso diagnostico in vitro.
2. Una variazione proporzionale dei volumi di reazione non modifica il risultato.
3. NON miscelare tra loro Reagenti da diversi lotti di produzione.
4. Per concentrazioni di Glucosio+Fruttosio  $\geq 1000$  mg/L (500 mg/L Glucosio e 500 mg/L Fruttosio), diluire il campione 1:4 con acqua distillata, ritestare e moltiplicare il risultato x 4.
5. Oltre alle eventuali indicazioni di rischio, il Reagente contiene conservanti (sodio azide o altri), la cui concentrazione totale è inferiore ai limiti riportati nelle Dir. 67/548/CEE e 88/379/CEE e relative modifiche per la classificazione, etichettatura ed imballaggio di preparati pericolosi (Reagenti). Tuttavia si raccomanda di manipolare i reagenti con cautela, evitandone l'ingestione ed il contatto con gli occhi, la pelle e le mucose;

di seguire quindi le norme di buona pratica di laboratorio nell'utilizzo di questi materiali.

Nelle schede di sicurezza vengono descritte le procedure operative per la manipolazione di questo prodotto. Le schede di sicurezza vengono fornite su richiesta.

### ATTENZIONE!

- A) Le applicazioni su analizzatori di routine possono essere totalmente diverse da quanto sviluppato come determinazione manuale; inoltre le procedure sono specifiche per ciascun analizzatore.
  - B) Elevata attenzione deve essere data alle sostanze interferenti: alcuni farmaci ed altre sostanze potrebbero influenzare i livelli od il dosaggio di Glucosio e Fruttosio (cfr Bibliografia 2).
  - C) Il Reagente deve essere impiegato SOLO per l'uso indicato, da personale esperto e addestrato, seguendo le norme della buona pratica di laboratorio.
  - D) La diagnosi clinica non può essere fatta correttamente usando il risultato di un solo test, ma deve essere fatta integrando criticamente i risultati di diversi test di laboratorio con differenti dati clinici.
  - E) Una serie di fattori, quali la temperatura ambientale, la temperatura dei reagenti di lavoro, l'accuratezza dei lavaggi e il tipo di spettrofotometro, possono influire sulle prestazioni del test.
  - F) Il **R1 - BUFFER** è fornito in eccesso.
  - G) Per campioni proteici potrebbe rendersi necessaria una deproteinizzazione (il liquido spermatico ad esempio).
  - H) La curva di calibrazione deve essere sempre ripetuta ad ogni cambio di lotto del Reagente e/o del calibratore.
  - I) Per la manipolazione dei Reagenti devono essere osservate le precauzioni normalmente adottate in laboratorio.
- Tutti i calibratori e controlli vanno considerati come campioni umani, quindi potenzialmente infettivi; devono quindi essere adottate tutte le misure di protezione adeguate allo scopo di evitare ogni tipo di potenziale rischio biologico.

### IV. REAGENTI E MATERIALI FORNITI

**Composizione del kit:**

REF NCGF8815

**R1 - BUFFER****3 x 70 mL**

Tampone Good &gt; 20 mmol/L

**R2 - NADP, ATP****5 x 20 mL**

NADP &gt; 0.2 mmol/L

ATP &gt; 2 mmol/L



**R3 - HK, G6PDH 1 x 2.5 mL**

(PRONTO ALL'USO)  
HK > 10 U/L  
G6PDH > 5 U/L

**R4 - PGI 1 x 2.5 mL**

(PRONTO ALL'USO)  
PGI > 50 U/L  
NaN<sub>3</sub> < 0.1%

**V. CONSERVAZIONE E STABILITÀ**

I reagenti chiusi sono stabili fino alla data di scadenza indicata sulle etichette, se conservati a 2-8°C nel loro contenitore primario integro, se non esposti a fonti termiche e/o variazioni di pressione. In caso di danneggiamento del contenitore primario provvedere allo smaltimento.

**VI. REAGENTI AUSILIARI PER IL CONTROLLO QUALITÀ**

Per garantire l'adeguata prestazione del test utilizzare i seguenti kit (vedere le relative informazioni d'uso (IFU)):

- SUBSTRATE ELEVATED CONTROL Iyo **REF OG3005**

- SUBSTRATE LOW CONTROL Iyo **REF OG3006**

La curva di calibrazione deve essere sempre ripetuta ad ogni cambio di lotto del Reagente e/o del calibratore.

**VII. PREPARAZIONE DEL REAGENTE DI LAVORO**

Dissolvere un vial di **R2 - NADP, ATP** con 20 mL di **R1 - BUFFER**, mescolare gentilmente evitando la formazione di schiuma. Portare i Reagenti alla temperatura di lavoro prima dell'uso. Chiudere immediatamente dopo l'impiego. I prodotti vanno manipolati in modo adeguato, tale da evitare ogni contaminazione.

L'uso non competente ci solleva da ogni responsabilità.

**VIII. STABILITÀ DEL REAGENTE DI LAVORO**

Il REAGENTE DI LAVORO è stabile:

- 10 giorni a 2-8°C;

- 40 giorni a -20°C. Dopo ricostituzione, NON VANNO CONGELATI/SCONGELATI per più di una volta.

In caso di contaminazione microbica i preparati devono essere eliminati.

**IX. MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI**

Normale attrezzatura da laboratorio.

Micropipette in grado di erogare da 3 a 1000 µL.

Puntali monouso per micropipette.

Provette in vetro trasparente per la diluizione dei campioni.

Acqua distillata, Controlli.

Acido perclorico (0.33N).

Spettrofotometro od analizzatore automatico di chimica clinica.

**X. CAMPIONI**

• Siero fresco non emolizzato e non lipemico.

• Urine;

• Liquido cerebrospinale (CSF).

Raccolta dei campioni in accordo con CLSI (NCCLS) (cfr Bibliografia 3).

I campioni possono essere conservati fino a 6 giorni a 2-8°C (cfr. Bibliografia 1).

**XI. PREPRATTAMENTO DEI CAMPIONI**

• Usare campioni limpidi; se necessario filtrare.

• Usare campioni a pH neutro; neutralizzare i campioni acidi ad un pH neutro (max pH ≤ 8.0);

**XII. SMALTIMENTO DEI MATERIALI**

Per lo smaltimento dei Reagenti attenersi agli ordinamenti locali vigenti.

**XIII. PROCEDURA ANALITICA**

- Lunghezza d'onda: 340 nm (334-365 nm)
- Cammino ottico: 1 cm
- Lettura: contro aria o acqua distillata
- Temperatura: 37°C
- Metodo: end-point
- Reazione: 8 - 18 minuti
- Rapporto campione/reagente: 1/40/1/1

**Portare i reagenti alla temperatura di lavoro prima dell'uso.**



Pipettare nelle provette o nelle cuvette così etichettate:

R/B: bianco reagente; S: Campione

	R/B	S
<b>REAGENTE DI LAVORO</b>	1000 µL	1000 µL
Acqua distillata	25 µL	----
Campione	----	25 µL

Miscelare e incubare per circa 3 minuti a 37°C. Misurare l'assorbanza AS0 e AR/B0. Per il GLUCOSIO poi aggiungere:

<b>R3 - HK, G6PDH</b>	25 µL	25 µL
-----------------------	-------	-------

Miscelare e aspettare la fine della reazione. (5-10 min.). Leggere AS1 e AR/B1. Per il FRUTTOSIO iniziare la reazione con:

<b>R4 - PGI</b>	25 µL	25 µL
-----------------	-------	-------

Miscelare gentilmente e aspettare la fine della reazione (5-15 min.). Leggere AS2 e AR/B2.

Calcolare per il Campione Glucosio:

ASG = (AS1 - AS0);

Calcolare per il Reagente/Bianco del Glucosio:

AR/BG = (AR/B1 - AR/B0).

**Calcolare la differenza per il GLUCOSIO  $\Delta AG = ASG - AR/BG$ .**

Calcolare per il Campione Fruttosio

ASF = (AS2 - AS1);

Calcolare per il Reagente/Bianco del Fruttosio

AR/BF = (AR/B2 - AR/B1).

**Calcolare la differenza per il FRUTTOSIO  $\Delta AF = ASF - AR/BF$ .**

**ATTENZIONE!**

**Il kit è sperimentato per spettrofotometro manuale e per sistemi HITACHI e MINDRAY.**

**Le applicazioni su analizzatori automatici possono essere totalmente diverse da quanto sviluppato come determinazione manuale.**

#### XIV. VALORI DI RIFERIMENTO (cfr Bibliografia 1)

Valori normali GLUCOSIO adulti:

- siero 740 - 1060 mg/L
- urina < 500 mg/24h
- fluido cerebrospinale (CSF) 400 - 700 mg/L

Valori normali FRUTTOSIO adulti:

- siero 10 - 60 mg/L
- urina < 30 - 65 mg/24h

Poiché i valori normali dipendono dall'età, dal sesso, dalla dieta, dall'area geografica e da altri fattori, ogni laboratorio deve stabilire i propri valori normali per questa procedura.

#### XV. CALCOLO PER IL GLUCOSIO

Usare la formula generale per calcolare la concentrazione:

**Glucosio conc. (g/L) =  $V/v \times 1/\epsilon d \times MW/1000 \times \Delta AG$**

V = totale volume test = 1.050 mL

v = volume campione = 0.025 mL

d = cammino ottico = 1 cm

$\epsilon$  = coeff molare NADH = 6.3 L / mmol x cm

MW = glucosio MW = 180.16

**Così diventa:**

**Glucosio conc. (g/L) = 1.201 x  $\Delta AG$**

#### XVI. CALCOLO PER IL FRUTTOSIO

Usare la formula generale per calcolare la concentrazione

**Fruttosio conc. (g/L) =  $V/v \times 1/\epsilon d \times MW/1000 \times \Delta AF$**

V = volume totale test = 1.075 ml

v = volume campione = 0.025 ml

d = cammino ottico = 1 cm

$\epsilon$  = coeff. molare NADH = 6.3 L / mmol x cm

MW = fruttosio MW = 180.16

**Così diventa:**

**Fruttosio conc. (g/L) = 1.230 x  $\Delta AF$**



## XVII. PRESTAZIONI ANALITICHE (validate su MINDRAY BS300)

Le prestazioni del Reagente **GLUCOSE-FRUCTOSE** sono state sperimentate con un analizzatore MINDRAY BS300. I dati, pur rappresentando le caratteristiche del prodotto, potrebbero variare per ogni singolo laboratorio e per i diversi analizzatori.

**Limitazioni del metodo:** non sono conosciute limitazioni.

**Linearità del metodo:** il test è lineare fino a 1000 mg/L

(500 mg/L per Glucosio e 0.500 mg/L per Fruttosio). Per concentrazioni  $\geq 1000$  mg/L (0.500 per Glucosio e 0.500 mg/L per Fruttosio), diluire il campione 1:4 con acqua distillata, ripetere la determinazione e moltiplicare il risultato x 4.

**Sensibilità del metodo (LoD) GLUCOSIO:** il limite di sensibilità, ovvero la concentrazione minima che può essere distinta dallo zero è 5 mg/L.

**Sensibilità del metodo (LoD) GLUCOSIO+FRUTTOSIO:** il limite di sensibilità, ovvero la concentrazione minima che può essere distinta dallo zero è 13 mg/L.

**Interferenze nel metodo GLUCOSIO:** cfr Bibliografia punto 2.

Criterio delle prove di interferenza: recupero  $\pm 10\%$  del valore iniziale. Non si sono osservate interferenze su campioni con:

- bilirubina totale fino a 40 mg/dL;
- acido ascorbico fino a 12.5 mg/dL.

**Interferenze nel metodo GLUCOSIO+FRUTTOSIO:** cfr Bibliografia punto 2.

Criterio delle prove di interferenza: recupero  $\pm 10\%$  del valore iniziale. Non si sono osservate interferenze su campioni con:

- bilirubina totale fino a 40 mg/dL;
- acido ascorbico fino a 12.5 mg/dL.

**Precisione nella serie GLUCOSIO:** determinata su 20 replicati di due campioni.

I risultati ottenuti sono i seguenti:

Campione	Media (mg/L) $\pm 2s$	CV%
Umano 1	501 $\pm$ 8	0.7
Umano 2	245 $\pm$ 6	1.3

**Precisione tra le serie GLUCOSIO:** determinata per 5 giorni su 20 replicati al giorno per due campioni.

I risultati ottenuti sono i seguenti:

Campione	Media (mg/L) $\pm 2s$	CV%
Umano 1	493 $\pm$ 7	0.7
Umano 2	243 $\pm$ 4	0.9

**Precisione nella serie GLUCOSIO+FRUTTOSIO:** determinata su 20 replicati di due campioni.

I risultati ottenuti sono i seguenti:

Campione	Media (mg/L) $\pm 2s$	CV%
Umano 1	893 $\pm$ 8	0.5
Umano 2	444 $\pm$ 6	0.8

**Precisione tra le serie GLUCOSIO+FRUTTOSIO:** determinata per 5 giorni su 20 replicati al giorno per due campioni.

I risultati ottenuti sono i seguenti:

Campione	Media (mg/L) $\pm 2s$	CV%
Umano 1	887 $\pm$ 10	0.6
Umano 2	445 $\pm$ 6	0.8

**Accuratezza per GLUCOSIO:** un gruppo di 20 sieri è stato testato con questa procedura ed usando un reagente simile disponibile in commercio. Il confronto ha dato i seguenti risultati:











Regressione lineare  $y = 1.0028x - 0.007$   
 Coefficiente di correlazione  $r = 0.9998$   $n = 20$

**Accuratezza per FRUTTOSIO:** un gruppo di 20 sieri è stato testato con questa procedura ed usando un reagente simile disponibile in commercio. Il confronto ha dato i seguenti risultati:

Regressione lineare  $y = 1.0061x - 0.014$   
 Coefficiente di correlazione  $r = 0.9998$   $n = 20$

## XII. BIBLIOGRAFIA

1. Textbook of Clinical Chemistry, Ed. by N.W. Tietz, W.B. Saunders Co., Philadelphia (1999).
2. Young D.S., Effect of drugs on Clinical Lab. Test, 5th Ed. AACCC Press (2000).
3. Tietz Textbook of Clin. Chem. and Molecular Diagnostics, W.B. Saunders Co., Philadelphia (2012), (119; 154; 581).

 IVD	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	 Limiti di temperatura	 LOT	Codice del lotto (XXX)	 Fabbricante	 Mantenere asciutto	 Non sterile
 i	Consultare le istruzioni per l'uso	 Utilizzare entro (anno/mese)	 REF	Numero di catalogo	 Non riutilizzare	 Fragile, maneggiare con cura	 Tenere lontano dal calore

Codice Ramo CND W01010211



## GLUCOSE-FRUCTOSE

For *in Vitro* Diagnostic use only**GLUCOSE and FRUCTOSE QUANTITATIVE UV ASSAY on SERUM, CEREBROSPINAL FLUID (CSF), and URINE with Analizzatore MINDRAY BS-300**

580 tests (5 x 20mL)

REF NCGF8815

### I. INTENDED USE

Glucose is the main source of energy of the living tissues; it derives from diet, from hydrolysis of hepatic glycogen and from conversion of aminoacids to glucose. Concentration and metabolism of glucose are strictly regulated by insulin, a peptide hormone produced by pancreatic B-cells that also facilitates the entry of glucose into the tissues. A decrease of insulin level or activity determines an increase of glucose in the blood. Elevated plasma concentration of glucose are found in patients with diabetes mellitus (insulin dependent or no insulin dependent). Hypoglycemia is caused by prolonged fast, administration of some drugs or congenital defects of the metabolism.

Fructose and Glucose are monosaccharides; when happens a deficiency or an absence of enzyme(s) that participates to carbohydrate metabolism, may have an accumulation of these sugars, who overflow into the urine.

Fructose is a simple monosaccharides, along with glucose and galactose, that are absorbed directly into the bloodstream during digestion. After absorption it enters the hepatic portal vein and is directed toward the liver.

The initial catabolism is in analogy with that one of glucose; it passes through fructose-1-phosphate till dihydroxyacetone phosphate and glyceraldehyde-3-phosphate who can enter the gluconeogenic pathway for glucose or glycogen synthesis as well as fatty acid and triglyceride synthesis; or to be further catabolized through the glycolitic pathway to pyruvate.

A recent study found that the elevated consumption of fructose or fructose rich foods and drinks are associated to the gout, metabolic syndrome and insulin resistance.

Deep attention is focused on total energy balance in fertility; the energy for sperm motility is derived from the metabolism of fructose carried in the seminal fluid.

### II. PRINCIPLE

In the presence of ATP, NADP and G6PDH (glucose-6P-dehydrogenase) and HK (hexokinase) the glucose produces NADPH. The intensity of the UV-colour at this wavelength is proportional to the conc. of GLUCOSE in the sample. The HK is able to phosphorylate also Fructose.

Adding PGI (phosphogluc. isomerase) new NADPH is produced from the changes of fructose-6P in glucose-6P. The new increase of the UV-colour at this wavelength is proport. to the conc. of FRUCTOSE in the sample.

### III. PRECAUTION FOR USE

1. This product has been formulated for *in vitro* diagnostic use.

2. A proportional variation of the reaction volumes does not change the result.

3. DO NOT mix Reagents from different Production lots.

4. For concentration of Glucose-Fructose  $\geq 1000$  mg/L (500 mg/L for Glucose and 500 mg/L for Fructose), dilute the sample 1:4 with distilled water, repeat the determination and multiply the result by 4.

5. In addition to the possible risk indications, the Reagent can contain preservatives (as sodium azide or others), which total concentration is lower than the limits mentioned in Dir. 67/548/CEE e 88/379/CEE and following modifications regarding classification, labelling and packaging of dangerous preparations (Reagents). However it is recommended to handle the reagents carefully, avoiding ingestion and contact with eyes, mucous membranes and skin; to use reagents according to good laboratory practice. On the material safety data sheet are detailed the operating procedures for the manipulation of this product. Material safety data sheet should be supplied on request.

#### ATTENTION!

A) Applications on routine analyzers may be totally different from what developed as manual determination; in addition the procedures are specific for each analyzer.

B) Very deep attention must be given to interfering substances: certain drugs and other substances are able to influence levels of Glucose and Fructose (see References 2).

C) The reagent must be used ONLY for the intended destinations, by expert and trained people and in according to good laboratory practice.

D) The clinical diagnosis cannot be done correctly using the result of only one test, but have to be done integrating critically the results of different laboratory tests and clinical data.

E) A lot of factors, as ambient temperature, the working reagent temperature, wash accuracy and the type of spectrophotometer, may affect the tests performances.

F) The R1 - BUFFER is supplied in surplus

G) For proteic samples may be required deproteinization (spermatic liquid for instance).

H) The calibration curve has to be always repeated at each change of the lot of the Reagent and/or calibrator.

I) All the precautions normally used in the laboratory must be respected for reagents handling.

All the calibrators and controls must be considered as human sample, so potentially infectious; all the protection actions must be applied to avoid any potential biological risk.

### IV. REAGENTS AND MATERIALS PROVIDED

#### Kit composition:

REF NCGF8815

**R1 - BUFFER** 3 x 70 mL

Good Buffer &gt; 20 mmol/L

**R2 - NADP, ATP** 5 x 20 mL

NADP &gt; 0.2 mmol/L

ATP &gt; 2 mmol/L

**R3 - HK, G6PDH** 1 x 2.5 mL

(READY TO USE)

HK &gt; 10 U/L

G6PDH &gt; 5 U/L

**R4 - PGI** 1 x 2.5 mL

(READY TO USE)

PGI &gt; 50 U/L

NaN3 &lt; 0.1%



### V. STORAGE AND STABILITY

The Reagents are stable up to the expiry date mentioned on the labels, stored at 2-8°C, if closed and kept in their intact primary container; if not exposed to heat sources and/or pressure variations.  
In case of damaging of the primary container organize the waste disposal.

### VI. AUXILIARY REAGENTS FOR QUALITY CONTROL

To grant the right performances use following kits (see the relative information for use (IFU)):

- SUBSTRATE ELEVATED CONTROL Iyo **REF OG3005**
- SUBSTRATE LOW CONTROL Iyo **REF OG3006**

The calibration curve has to be always repeated at each change of the lot of the Reagent and/or calibrator.

### VII. PREPARATION OF THE WORKING REAGENT

Dissolve a vial of **R2 - NADP, ATP** with 20 mL of **R1 - BUFFER**, mix gently avoid foaming.

Let the reagent reach the room temperature before use.

Close immediately after handling.

The Reagents have to be used correctly, to avoid contamination.

An incompetent handling relieves us from any responsibility.

### VIII. STABILITY OF THE WORKING REAGENT

The WORKING REAGENT is stable:

- 7 days at 2-8°C;
- 40 days at -20°C. After reconstitution FREEZE only ONE TIME, DO NOT REPEAT FREEZING.

In case of microbial contamination the preparations must be eliminated.

### IX. MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Normal laboratory equipment.

Micropipettes to deliver from 3 to 1000 µL.

Disposable micropipettes tips .

Transparent glass tubes for sample dilution.

Distilled water, Controls.

Perchloric acid.

Spectrophotometer or automatic analyzer for Clinical Chemistry.

### X. SAMPLES

- Not haemolysed and not lipemic fresh serum.
- Urine.
- Cerebrospinal fluid (CSF).

For samples collection see References 3).

The sample can be stored at 2-8°C, up to 6 days. (see References 1).

### XI. SAMPLES PRETREATMENT

- Use limpid samples; If necessary, filter the samples.
- Use samples at neutral pH; neutralize the Acidic Samples at a neutral pH (max pH ≤ 8.0).

### XII. WASTE DISPOSAL

Observe all federal, state and local environmental regulations for waste disposal.

### XIII. ANALYTICAL PROCEDURE ON MANUAL SPECTROPHOTOMETER

- Wavelength: 340 nm (334 - 365 nm)
- Pathlength: 1 cm
- Reading: against air or distilled water
- Temperature: 37°C
- Method: end-point
- Reaction: 8 + 18 minutes
- Sample/reagent: 1/40/1/1

**Let reagents reach the working temperature before use.**

Pipette in a test tube or cuvette so labelled:

R/B: Reagent Blank, S: Sample

	R/B	S
<b>WORKING REAGENT</b>	1000 µL	1000 µL
Distilled water	25 µL	----
Sample	----	25 µL

Mix and incubate for about 3 minutes at 37°C. Measure the absorbance AS0 and AR/B0. For the GLUCOSE then add:

<b>R3 - HK, G6PDH</b>	25 µL	25 µL
-----------------------	-------	-------

Mix and wait the end of the react. (5-10 min.). Read AS1 and AR/B1. For the FRUCTOSE start the reactions with:

<b>R4 - PGI</b>	25 µL	25 µL
-----------------	-------	-------

Mix carefully and wait the end of the reaction (5-15 min.).

Read AS2 and AR/B2.





Calculate for the Sample Glucose

$$ASG = (AS1 - AS0);$$

Calculate for the Reagent/Blank Glucose

$$AR/BG = (AR/B1 - AR/B0).$$

**Calc. the difference for GLUCOSE  $\Delta AG = ASG - AR/BG$ .**

Calculate for the Sample Fructose

$$ASF = (AS2 - AS1);$$

calculate for the Reagent/Blank Fructose

$$AR/BF = (AR/B2 - AR/B1).$$

**Calc. the difference for FRUCTOSE  $\Delta AF = ASF - AR/BF$ .**

### ATTENTION!

The kit is tested for a manual spectrophotometer and for HITACHI and MINDRAY systems. The applications on automatic analyzers could be completely different by what has been developed as manual determination.

### XIV. REFERENCE VALUES (see References 1)

Normal Values GLUCOSE adults:

- serum	740 - 1060 mg/L
- urine	< 500 mg/24h
- cerebrospinal fluid (CSF)	400 - 700 mg/L

Normal Values FRUCTOSE adults:

- serum	10 - 60 mg/L
- urine	< 30 - 65 mg/24h

Since the normal values depend on age, sex, diet, geographic area and other factors, each laboratory should establish its own normal values for this procedure.

### XV. CALCULATION FOR GLUCOSE

Use this general formula to calculate the concentration:

$$\text{Glucose conc. (g/L)} = V/v \times 1/\epsilon d \times MW/1000 \times \Delta AG$$

V = total test volume = 1.050 ml

v = sample volume = 0.025 ml

d = pathlength = 1 cm

$\epsilon$  = molar coeff. NADH = 6.3 L / mmol x cm

MW = glucose MW = 180.16

so it becomes:

$$\text{Glucose conc. (g/L)} = 1.201 \times \Delta AG$$

### XVI. CALCULATION FOR FRUCTOSE

Use this general formula to calculate the concentration:

$$\text{Fructose conc. (g/L)} = V/v \times 1/\epsilon d \times MW/1000 \times \Delta AF$$

V = total test volume = 1.075 ml

v = sample volume = 0.025 ml

d = pathlength = 1 cm

$\epsilon$  = molar coeff. NADH = 6.3 L / mmol x cm

MW = fructose MW = 180.16

so it becomes:

$$\text{Fructose conc. (g/L)} = 1.230 \times \Delta AF$$

### XVII. ANALYTICAL PERFORMANCES (Validate on MINDRAY BS300)

The performances of the Reagent **GLUCOSE-FRUCTOSE** have been tested with a MINDRAY BS300 analyzer. The data, while representing the characteristics of the product, could be different for each laboratory and for different analyzers.

**Method Limitations:** are not know limitations.

**Method Linearity:** the test is linear up to 1000 mg/L (500 mg/L for Glucose and 500 mg/L for Fructose). For concentration of Glucose-Fructose  $\geq 1000$  mg/L (500 mg/L for Glucose and 500 mg/L for Fructose), dilute the sample 1:4 with distilled water, repeat the determination and multiply the result by 4.

**Method Sensitivity (LoD) GLUCOSE:** the sensitivity limit, that is the minimum concentration that can be distinguished by zero, is 5 mg/L.

**Method Sensitivity (LoD) GLUCOSE+FRUCTOSE:** the sensitivity limit, that is the minimum concentration that can be distinguished by zero, is 13 mg/L.

**Interferences on GLUCOSE method:** see References 2.

Interference test criterion: recovery  $\pm 10\%$  of initial value. No interference found on samples with:

- total bilirubin up to 10 mg/dL;

- ascorbic acid up to 12.5 mg/dL.

**Interferences on GLUCOSE+FRUCTOSE method:** see References 2.

Interference test criterion: recovery  $\pm 10\%$  of initial value. No interference found on samples with:

- total bilirubin up to 10 mg/dL;

- ascorbic acid up to 12.5 mg/dL.

**Within-run Precision GLUCOSE:** determined on 20 replications of 2 samples.



The results obtained are following:

Sample	Mean (mg/L) ± 2s	CV %
Human 1	501 ± 8	0.7
Human 2	245 ± 6	1.3

**Run-to-run Precision GLUCOSE:** determined for 5 days with 20 replications for each days, for two samples.

The results obtained are the following:

Sample	Mean (mg/L) ± 2s	CV %
Human 1	493 ± 7	0.7
Human 2	243 ± 4	0.9

**Within-run Precision GLUCOSE+FRUCTOSE:** determined on 20 replications of 2 samples.

The results obtained are following:

Sample	Mean (mg/L) ± 2s	CV %
Human 1	893 ± 8	0.5
Human 2	444 ± 6	0.8

**Run-to-run Precision GLUCOSE+FRUCTOSE:** determined for 5 days with 20 replications for each days, for two samples.

The results obtained are the following:

Sample	Mean (mg/L) ± 2s	CV %
Human 1	887 ± 10	0.6
Human 2	445 ± 6	0.8

**Accuracy for GLUCOSE:** a group of 20 sera has been tested using this procedure and using a similar reagent available on the market. The comparison gave these results:

Linear regression equation  $y = 1.0028x - 0.007$

Correlation coefficient  $r = 0.9998$   $n = 20$












**Accuracy for FRUCTOSE:** a group of 20 sera has been tested using this procedure and using a similar reagent available on the market.

The comparison gave these results:

Linear regression equation  $y = 1.0061x - 0.014$

Correlation coefficient  $r = 0.9998$   $n = 20$

## XII. REFERENCES (see Italian version)

 IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device	 Temperature limitation	 LOT	Batch code (XXX)	 Manufacturer	 Keep dry	 Non-sterile
 Consult Instructions for use	Use by (year/month)	 REF	Catalogue number	 Do not reuse	 Fragile, handle with care	 Keep away from heat	

EDMA (EDMS) CODE 11020111

