

Diabetes mellitus - laboratorní diagnostika a sledování stavu pacientů

Toto doporučení vydávají společně Česká společnost klinické biochemie ČLS JEP a Česká diabetologická společnost ČLS JEP

Schváleno výborem ČSKB 9. 12. 2015

Autoři: Bedřich Friedecký, Josef Kratochvíla, Drahomíra Springer, Martin Prázný, Tomáš Zima

1. Laboratorní diagnostika a sledování stavu pacientů

1.1. Stanovení glukózy jako nástroje pro určení diagnózy diabetu mellitu

Koncentrace FPG je nástrojem pro:

- určení diagnózy diabetu mellitu
- vyhledávání osob se zvýšeným rizikem diabetu mellitu

1.1.1. Diagnostická kritéria diabetu [1, 2, 3]

- Kombinace klinických symptomů s náhodným stanovením koncentrace glukózy v plazmě $\geq 11,1$ mmol/l.
- Koncentrace glukózy v plazmě nalačno $\geq 7,0$ mmol/l.
- Koncentrace glukózy v plazmě při orálním glukózovém tolerančním testu $\geq 11,1$ mmol/l.

K učinění závěru o diagnóze diabetu je nezbytné potvrdit výsledek opakovaným měřením z dalšího odběru v některém z příštích dnů.

Grafické schéma rozhodovacího algoritmu pro laboratorní screening DM u dospělých uvádí Příloha 1.

Vyhledávání osob se zvýšeným rizikem diabetu

Zvýšené riziko diabetu je charakterizováno hodnotami FPG v intervalu hodnot 5,6 – 7,0 mmol/l. Tento stav je označován jako Impaired Fasting Glucose (IFG), zvýšená koncentrace glukózy nalačno, případně jako prediabetes.

1.1.2. Vztahy mezi koncentrací glukózy v krvi (B-glukóza), plazmě (FPG) a séru (S-glukóza) [6]

$FPG = 1,11 \cdot B\text{-glukóza}$

jestliže je vzorek krve před analýzou ředěn hemolyzačním nebo deproteinačním činidlem

$FPG = 0,94 \cdot B\text{-glukóza}$

jestliže je vzorek krve měřen bez ředění

Naprostá většina literárních dat považuje hodnoty koncentrací glukózy v plazmě a séru za rovnocenné. Doporučení WHO a ADA zmiňují pouze použití plazmy a vůbec nezmiňují krevní sérum.

Rozdíl mezi žilní a kapilární krví je dále uveden v kapitole Glukózový toleranční test (oGTT).

1.1.3. Rozhodovací meze

FPG [mmol/l]	Interpretace
< 5,6	Vyloučení diabetu mellitu
5,6 až 6,9	Zvýšená FPG (IFG, zvýšená koncentrace glukózy nalačno)
$\geq 7,0$	Diabetes mellitus (nutno potvrdit opakovaným měřením)

Protože hodnota intraindividuální biologické variability činí v průměru 5 %, je nezbytné provést diagnostický závěr na podkladě aspoň dvou výsledků nezávislých měření.

Hodnoty FPG 5,6 mmol/l a vyšší by měly být vždy opakovány pro podezření z možného potvrzení diagnózy diabetu mellitu, respektive pacienti s takovými hodnotami by měli být vyšetřováni s vyšší frekvencí.

1.1.4. Vyšetření v těhotenství

U všech žen je doporučeno, co nejdříve na začátku těhotenství stanovit koncentraci glukózy nalačno v žilní plazmě standardní laboratorní metodou.

Při hodnotě koncentrace glukózy nalačno $\geq 7,0$ mmol/l (nebo $HbA_{1c} \geq 48$ mmol/mol) se jedná o **zjevný diabetes mellitus** (overt diabetes) v těhotenství.

Gestační diabetes mellitus (GDM) je diagnostikován při opakovaném zjištění FPG v rozmezí 5,1 – 6,9 mmol/l.

Diagnózu DM či GDM lze stanovit na základě stanovení FPG v případě dvou pozitivních nálezů (nelze stanovit týž den). V případě jednoho pozitivního a jednoho negativního nálezu je indikován orální glukózový toleranční test (oGTT odstavec 9.3.)

1.1.5. Požadavky na průkaz analytické způsobilosti laboratoře

Doložená úspěšná účast v programu externího hodnocení kvality akreditovaném dle ISO 17043 (minimálně 2x ročně).

1.2. Glykovaný hemoglobin HbA_{1c}

Koncentrace HbA_{1c} v krvi je považována za rutinní a efektivní nástroj sledování průběhu DM. Hodnotu glykovaného hemoglobinu je možno použít v rámci screeningu poruch glukózové homeostázy, zejména ve vztahu k prediabetu. Představuje vhodný způsob kontroly koncentrací glukózy u diabetiků, neboť je považována za její vážený dlouhodobý průměr.

Koncentrace HbA_{1c} v krvi je v současnosti velmi často považována za nástroj screeningu prediabetu. Ke zvýšení citlivosti diagnózy diabetu je výhodné kombinovat stanovení FPG (případně s 2hod -oGTT) se stanovením HbA_{1c}.

1.2.1. Jednotky měření

Jednotkou měření je **mmol/mol**.

Paralelně s touto jednotkou zůstává v platnosti jednotka % NGSP. Ta se vypočítá z hodnot v jednotce mmol/mol podle vztahu:

$$\text{výsledek}_{\text{NGSP}} = (0,09148 \times \text{výsledek}_{\text{IFCC}}) + 2,152$$

1.2.2. Nejistota výsledků měření

Hodnota intraindividuální biologické variability $CV_i = 2\%$ je významně nižší než u FPG ($CV_i = 5\%$). Na základě kombinace dílčích nejistot odpovídajících soudobým úrovním preciznosti, bias a hodnotě CV_i lze odhadnout, že výsledná kombinovaná nejistota výsledku měření HbA_{1c} (odpovídající 95% intervalu spolehlivosti) U_c leží v intervalu 3 až 5 mmol/mol HbA_{1c}.

1.2.3. Rozhodovací meze

Sledování stavu choroby

HbA _{1c} [mmol/mol]	Interpretace
20 až 42	Referenční interval (dospělí, negravidní).
43 až 53	Kompenzovaný diabetes (dospělí, negravidní).
> 53	Dekompenzovaný diabetes. Signál k změně terapie a režimu.

Literární údaje týkající se rozhodovacích mezí se mnohdy liší. Příčinou těchto rozdílů je i nejistota stanovení HbA_{1c}, která v závislosti na zvolené měřicí technice může dosahovat maximální velikosti $U_c = 5$ mmol/mol.

Plná krev odebraná ze žíly nebo kapilární krev odebraná po vpichu z prstu jsou rovnocenné materiály.

Diagnóza diabetu

V diagnostickém procesu se výsledky diskriminují podle hodnot cut off

HbA _{1c} [mmol/mol]	Interpretace
< 38	diabetes nepřítomen
38 až 48	hraniční hodnoty
> 48	diagnóza diabetu

1.2.4. Požadavky na průkaz analytické způsobilosti

Doložená účast v programu externího hodnocení kvality akreditovaném dle ISO 17043 (minimálně 2x ročně).

1.3. Preanalytika

Správný odběr krve a minimalizace glykolýzy ve vzorcích v době mezi odběrem a měřením koncentrace glukózy jsou zcela zásadním požadavkem, který ovlivňuje kvalitu diagnostiky diabetu. Minimalizace glykolýzy je možné dosáhnout:

- uložením odebraných vzorků do ledové tříště
- použitím antiglykolytického přípravku
- oddělením plazmy od krevních elementů do 30 minut od odběru

Pokud není možné zajistit oddělení plazmy od elementů do 30 minut, pak se vzorek žilní krve vždy odebírá do odběrové nádoby s obsahem inhibitoru glykolýzy. Nejvhodnější alternativou je odběr do nádobek obsahujících kromě fluoridu a EDTA i citrát sodný (k dosažení pH 5,7).

Takové odběrové zkumavky nabízí téměř všichni distributoři uzavřených odběrových systémů.

Další požadavky na preanalytickou fázi u jednotlivých analytů a možné interference jsou uvedeny v Příloze 4.

1.4. POCT

Koncentrace glukózy v kapilární krvi, stanovená pomocí osobního glukometru, je nástrojem sledování stavu všech diabetiků závislých na inzulínu (diabetes 1. typu) a některých vybraných skupin diabetiků 2. typu. Toto sledování nehraje žádnou roli v diagnostice diabetu a nemá s ní ani žádnou spojitost.

1.4.1. Základní požadavky na glukometri

Na trhu jsou k dispozici desítky různých typů glukometrů produkovaných řadou výrobců. Úroveň shody mezi výsledky dosaženými různými typy glukometrů je však doposud nedostatečná [10, 11]. Rozhodující při volbě glukometru je splnění požadavků na kvalitu podle kritérií normy ISO 15197:2013 [23], která vymezuje všechny zásadní požadavky. Základní analytické požadavky na glukometry jsou shrnuty v Doporučení k použití, výběru a kontrole glukometrů [24]. Další významné požadavky jsou:

- Používání nových typů instrumentace s vyloučením nutnosti odstraňovat přebytek krve, s akustickou kontrolou objemu vzorku, s automatickým časováním doby reakce, se čtečkou čárového kódu, s možností ukládat data výsledků vzorků a kontrolních analýz do paměti glukometru.
- Preferování glukometrů, uvádějících v průvodní dokumentaci základní metrologická data měření (preciznost, maximální bias, měřicí rozsah, způsob a možnosti provádění VKK a EHK).
- Preferování glukometrů, certifikovaných některým z k tomu pověřených institutů:
Scandinavian evaluation of laboratory equipment for primary health care - SKUP <http://www.skup.nu>
Referenční laboratoř ÚLBDL VFN a 1. LF UK, Praha. (<http://ulbd.lf1.cuni.cz/referencni-lab>)
Hodnoty rozhodovacích mezí a četnost měření nejsou striktně definovány.

Kontroly osobních glukometrů srovnáním s měřením v laboratoři se doporučuje provádět v pravidelných časových intervalech minimálně jednou ročně.

1.4.2. Požadavky na průkaz analytické způsobilosti

- Zavedený a fungující systém vnitřní kontroly kvality.
- Systém zácikvu a prověřování jeho účinnosti u osob používajících glukometry (zdravotnického nelaboratorního personálu a pacientů).
- Doložená účast v programu externího hodnocení kvality akreditovaném dle ISO 17043 (2 účasti ročně).
- Používání glukometru v souladu s Doporučením o POCT [13].

1.5. Kontinuální monitorování glukózy

Zvláštní problematiku tvoří používání systémů pro kontinuální monitoraci koncentrace glukózy, které pacientům poskytují dynamické informace o vývoji koncentrace glukózy a umožňují bezpečnější dosažení lepší kompenzace diabetu. Systém pro kontinuální monitorování koncentrace glukózy (CGM) měří koncentraci glukózy v reálném čase po 24 hodin denně. CGM se skládá ze snímače glukózy zavedeného pod kůži, který měří koncentraci glukózy, vysílače, který vysílá informace ze snímače do inzulinové pumpy a inzulinové pumpy, která zobrazuje koncentraci glukózy na displeji pumpy. Systém používá časné upozornění blížících se nízkých a vysokých hodnot a alarm při nízkých a vysokých hodnotách. Tyto systémy v současné době vyžadují denně kalibraci pomocí osobního glukometru.

Diference výsledků CGM od referenční hodnoty, stanovené laboratorní metodou v plazmě by měly být nižší než 15 %.

Doporučenými nástroji pro sledování albuminurie jsou stanovení poměru koncentrace albuminu a kreatininu (ACR) a stanovení koncentrace albuminu v časovaném sběru moče.

Kategorie	Albuminurie [mg/24 h]	ACR [g/mol kreatininu]	Proteinurie [mg/24 h]	PCR [g/mol kreatininu]
Fyziologická až mírně zvýšená (A1)	< 30	< 3	< 150	< 15
Zvýšená (A2)	30 až 300	3 až 30	150 až 500	15 až 50
Závažná (A3)	> 300	> 30	> 500	> 50

1.6. Albumin v moči

Měření koncentrace albuminu v moči diabetiků vykazuje významnou schopnost včasné predikce **diabetické nefropatie** a stanovení kardiovaskulárního rizika (parametr endotelové dysfunkce). Zvýšené vylučování albuminu močí, které předpovídá stav nefropatie, ale které není detekovatelné kvalitativními metodami realizovanými běžnými testovacími proužky pro průkaz proteinů v moči či jinými metodami kvalitativní analýzy, se dříve označovalo jako *mikroalbuminurie*.

Pacienti s diabetem by měli být testováni na přítomnost diabetického onemocnění ledvin jednou ročně. Screening je doporučen u pacientů s diabetem mellitem 1. typu (děti a adolescenti) od 5. roku od zjištění diagnózy diabetu každý rok. U pacientů s diabetem mellitem 2. typu je doporučeno provádět vyšetření 1x ročně.

1.6.1. Screening

Screening zahrnuje stanovení poměru albumin/kreatinin v prvním ranním vzorku moči. Vyšetření albuminu v moči sbírané 24 hodin se nedoporučuje, je však mož-

né vyšetřit albuminurii ve vzorku moči sbíraném během klidu na lůžku v noci; výsledek je pak vydáván v $\mu\text{g}/\text{min}$. V praxi se však dává přednost vyšetření v jednorázovém vzorku moči, výsledek se vztahuje ke koncentraci kreatininu v moči (g/mol kreatininu). Vzhledem k vysoké intraindividuální variabilitě (až 30 %) by pro diagnózu albuminurie měly být pozitivní alespoň 2 ze 3 po sobě následujících vzorků moči analyzovaných v intervalu 3 až 6 měsíců [1, 2].

Vyšetření by nemělo být prováděno při současné infekci močových cest, po zvýšené fyzické námaze a při menses.

Hodnoty přesahující horní hranice rozhodovacích mezí jsou označovány jako *proteinurie*. Ty lze již spolehlivě detekovat kvalitativními zkouškami na celkové bílkoviny prováděnými testovacími proužky. Naopak analýza vzorků s proteinurií je zcela nevhodná ke stanovení albuminurie imunochemickými metodami (je překročen pracovní rozsah měření a může dojít k „hook efektu“).

Kvalitativní a semikvantitativní zkoušky nejsou dostatečně citlivé, při pozitivním výsledku je nutno tento nález vždy ověřit v laboratoři. Kvalitativní detekce albuminurie může hrát roli pouze jako nástroj screeningu, avšak každý pozitivní nález musí být potvrzen kvantitativním měřením.

Podrobněji viz společné doporučení České společnosti klinické biochemie a České nefrologické společnosti **Doporučení k diagnostice chronického onemocnění ledvin (odhad glomerulární filtrace a vyšetřování proteinurie)** a mezinárodní doporučení **KDIGO 2012** [25, 26].

Jestliže je výsledek měření vyšší než hodnota rozhodovacího limitu, je diagnostický závěr možné učinit až na podkladě tří opakovaných měření.

1.6.2. Diabetická nefropatie

Diabetická nefropatie je klinický syndrom charakterizovaný persistentní albuminurií ($> 300 \text{ mg}/24 \text{ hod}$ nebo $> 200 \mu\text{g}/\text{min}$) prokázanou při alespoň dvou stanoveních, mezi kterými uplynulo 3 až 6 měsíců. Tento nález odpovídá nálezů proteinurie $> 500 \text{ mg}/24 \text{ hodin}$. U pacientů s diabetickou nefropatií se v průběhu onemocnění vyvíjí hypertenze (která může být přítomna již v době diagnózy), narůstá proteinurie a dochází k progresivnímu poklesu glomerulární filtrace a nakonec vývoji terminálního selhání ledvin.

1.6.3. Požadavky na průkaz analytické způsobilosti

Doložená účast v programu externího hodnocení kvality akreditovaném dle ISO 17043 (2 účasti ročně).

1.7. Koncentrace glukózy v moči

Stanovení glukózy v moči není doporučeno pro diagnostiku a sledování pacienta s diagnózou DM. Pohled na glykosurii se však zásadně mění v souvislosti s recentním používáním terapie pomocí inhibice Na-glukózového kotransportéru SGLT 2, kdy zvýšená exkrece glukózy močí je důsledkem této léčby [27].

1.8. Koncentrace ketolátek v moči a krvi

Stanovení ketolátek v krvi a moči má význam pro diagnózu diabetické ketoacidózy. Ketolátky mají být stanovovány u diabetických pacientů s hodnotou glukózy nad 16,7 mmol/l a též při výskytu klinických symptomů diabetické ketoacidózy. V krvi a moči jsou přítomny tři ketolátky: kyselina acetoctová, aceton a kyselina β -hydroxymáselná (3 hydroxybutyrát). Klasické testovací proužky jsou však schopné detekovat pouze kyselinu acetoctovou a aceton (ketony), nikoliv kyselinu β -hydroxymáselnou. Za normálního stavu jsou kyselina acetoctová a β -hydroxymáselná přítomny v krvi a moči v ekvimolárních množstvích. Avšak při tkáňové hypoxii je kyselina acetoctová redukována na kyselinu β -hydroxymáselnou a v důsledku toho klasické testovací proužky významně podhodnocují celkovou koncentraci ketolátek.

Shrnutí klinické interpretace

- Stanovení ketonů v moči klasickými metodami není podloženo důkazy při diagnostice diabetické ketoacidózy ani k sledování jejího průběhu.
- Stanovení ketonů v krvi klasickými metodami lze použít v procesu diagnózy diabetické ketoacidózy, nikoliv však k sledování jejího průběhu.
- Stanovení kyseliny β -hydroxymáselné lze doporučit jak k diagnostikování, tak ke sledování průběhu diabetické ketoacidózy, avšak případné výhody tohoto přístupu vůči tradičním metodám také nejsou dostatečně podloženy důkazy.

1.9. Glukózový toleranční test (oGTT)

Orální glukózový toleranční test se používá k potvrzení diagnózy diabetes mellitus v případech, že diagnóza není jednoznačně potvrzena nálezem FPG vyšším než 7,0 mmol/l. Jde jednak o stavy IFG (zvýšená glykemie nalačno) s hodnotami FPG 5,6 až 7 mmol/l, jednak v situacích s FPG nižší než 5,6 mmol/l, při nichž bylo vysloveno podezření na poruchu tolerance glukózy z předchozích vyšetření nebo jedná-li se o jedince se zvýšeným rizikem vzniku diabetu. Při nálezů porušené glukózové tolerance se oGTT opakuje ve dvouletých intervalech.

1.9.1. Provedení a vyhodnocení

Podle doporučení WHO lze oGTT doporučit jako doplňující diagnostickou zkoušku v případech, kdy se hodnota FPG pohybuje v intervalu 5,6 až 7,0 mmol/l. oGTT se však doporučuje k potvrzení diagnózy prediabetu a slouží k diagnóze gestačního diabetu.

1.9.2. Rozhodovací meze

Koncentrace plazmatické glukózy v plazmě žilní krve po 2 hodinách po zátěži 75 g glukózy.

Glukóza [mmol/l]	Interpretace
< 7,8	Vyloučení diabetu mellitu.
7,8 až 11	Porušená glukózová tolerance.
≥ 11,1	Diabetes mellitus.

K vyslovení diagnózy musí být překročení rozhodovacího limitu potvrzeno opakovaně.

1.9.3. oGTT u dětí

U dětí se standardně (dle WHO i ADA) počítá použitá dávka glukózy pro oGTT 1,75 g/kg tělesné hmotnosti do maxima 75 gramů.

1.9.4. oGTT a diagnostika gestačního diabetu

Používá se zátěž 75 g glukózy a hodnotí se koncentrace glukózy v plazmě před zátěží, 1 a 2 hodiny po zátěži. Gestační diabetes je laboratorně diagnostikován, je-li dosaženo aspoň jednoho ze tří uvedených kritérií:

- FPG ≥ 5,1 mmol/l
- P-glukóza po 1 hodině ≥ 10,0 mmol/l
- P-glukóza po 2 hodinách ≥ 8,5 mmol/l

oGTT se provádí ve 24. - 28. týdnu gravidity u všech těhotných žen, u nichž byl screening GDM na začátku těhotenství negativní.

Grafické schéma algoritmu pro laboratorní screening gestačního DM – viz Příloha 2.

1.10. C-peptid a inzulin

Stanovení C-peptidu a inzulinu není zakotveno v žádném doporučení pro diagnostiku diabetu a nemá význam při rutinním sledování pacientů s DM. Stanovení C-peptidu se provádí při rozhodování o vhodnosti volby terapie inzulinem u diabetu 2. typu, tj. při podezření na selhání sekrece inzulinu. Vyšetření inzulinu má význam při podezření na inzulinovou rezistenci u syndromu polycystických ovárií a při diagnostice inzulinomu.

1.11. Autoprotilátky

Tyto testy nejsou doporučovány jako nástroje rutinní diagnózy diabetu mellitu, ale jsou vhodné při podezření na autoimunitní původ diabetu. Slouží zejména při podezření na diabetes LADA (latentní autoimunitní diabetes dospělých, tj. pomalu progredující diabetes 1. typu) a dále též k vyhledávání vhodných dobrovolných dárců k provedení transplantace částí pankreatu pro indikované případy terapie diabetiků 1. typu. Protilátky jsou často prokázány dříve, než se klinicky projeví onemocnění. U 1 až 2 % populace se vyskytuje jeden typ protilátky a při tomto nálezů je riziko vzniku autoimunitního diabetu nízké. Při nálezů více autoprotilátek riziko stoupá až na 90 %. Vysokou výpovědní hodnotu má kombinované vyšetření tří autoprotilátek anti IAA, anti GAD a anti IA-2.

Screening autoprotilátek u příbuzných pacientů s diabetem mellitem 2. typu není doporučený.

Diabetes mellitus se může sdružovat s tyreopatiemi v rámci tzv. sdružených autoimunit. Přítomnost tyreopatie pak případně může ovlivnit i stav jeho kompenzace. Vzhledem k často subklinickému průběhu je screening tyreopatií vhodný. U každého diabetika má být

vyšetřen TSH a v případě diabetu 1. typu se provádí vyšetření protilátek proti tyreoglobulinu (anti TG) a proti tyroidální peroxidáze (anti TPO).

Riziko asymptomatické, němé formy celiakie je v populaci 1:200. U diabetu mellitu 1. typu, podobně jako u jiných autoimunitních onemocnění, je toto riziko 10x větší a popsána incidence je 1:20.

Význam diagnostiky celiakie je doložen pozitivním efektem dodržování bezlepkové diety. Při dodržování bezlepkové diety klesá riziko malignit zažívacího traktu a dochází ke zlepšení kontroly vlastního diabetu.

2. Teoretické podklady a analytické podmínky

2.1. Glukóza

2.1.1. Eliminace vlivu glykolýzy ve vzorcích odebrané krve

Glykolýza snižuje významně koncentraci glukózy ve vzorcích odebraných krví. Inhibice glykolýzy pomocí fluoridu sodného + EDTA je nedostatečná, zejména v první hodině po odběru. Přesto se této neúčinné inhibice v laboratořích i nadále používá. V roce 1988 byla vyvinuta a v USA patentována pro potřebu firmy Terumo zlepšená inhibice glykolýzy přidáním citrátu sodného a kyseliny citronové. Podstatou zlepšení je snížení pH v odběrové směsi na hodnotu 5,3 - 5,9. Enzymy závislé na pH, které způsobují glykolýzu ihned po odběru (hexokináza a fosfofruktokináza), jsou deaktivovány nízkým pH citrátu, zatímco fluoridy deaktivují jen enolázu (fosfopyruvát hydratáza), která je téměř na konci glykolytické metabolické cesty.

Na trhu je několik odběrových nádobek používajících zlepšené antiglykolytické směsi NaF, citrátu, EDTA (tyto jsou uvedeny v příloze 4 doporučení). Urgentní potřebu vyřešení problému glykolýzy a stability glukózy v krvi potvrzuje i článek uveřejněný v časopise Diabetes Care [33]. K dosažení minimalizace negativních efektů glykolýzy na diagnostiku diabetu jsou k dispozici účinné nástroje. Jejich obecné používání narazí na řadu organizačních a technických problémů, ale ty nepředstavují závažný důvod minimalizaci glykolýzy nedoporučit a neřešit.

2.1.2. Požadavky na analytickou kvalitu měření

Mezilehlá preciznost	Pravdivost (bias)	Celková chyba
CV < 2,5 %	b < 2,0 %	TE < 7,0 %

Z dat uvedených v tabulce plyne hodnota six-sigma $\sigma \geq 2,0$.

2.1.3. Metrologická návaznost

Referenční metody měření FPG jsou založeny na principu ID-GC(LC)/MS. Tyto referenční metody slouží pomocí nepřerušovaného řetězce metrologické návaznosti ke stanovení hodnot glukózy v referenčních materiálech, používaných ke kalibraci rutinních metod měření.

Certifikované referenční materiály mají hodnoty koncentrace glukózy stanovené referenční metodou v referenční laboratoři - disponují certifikovanými hodnotami

koncentrace glukózy včetně nejistoty této hodnoty a mají být testované na komutabilitu (má být prokázáno, že vlivy matrice jsou minimalizovány - zanedbatelné).

Klinické laboratoře mají používat pouze takové kalibrátory, jejichž výrobci jsou schopni dokumentovat v souladu se Směrnicí 98/79 ES a s nařízením vlády České republiky 458/2004 Sb., že hodnoty koncentrace glukózy v nich jsou určeny srovnáním s certifikovanými referenčními materiály. To značí, že kalibrátory rutinních metod mají mít dokumentovanou metrologickou návaznost na referenční metodu ID GC/MS. Výrobci mají uvádět nejistoty hodnot těchto kalibrátorů.

Hodnoty preciznosti a bias jsou odvozeny z hodnot biologických variabilit. Při dosažení těchto hodnot preciznosti a bias je dosaženo vysoké pravděpodobnosti, že četnost falešných diagnostických klasifikací nepřekročí hodnotu 5 % [7] pokud jsou provedena dvě nezávislá měření u jednoho pacienta.

2.1.4. Požadavky na analytickou kvalitu měření - POCT systémy

Celková chyba měření je vypočtena jako odchylka od výsledku akreditované klinické laboratoře při měření FPG: [12].

pro koncentrace $\geq 5,6$ mmol/l	< 15 %
pro koncentrace < 5,6 mmol/l	< 0,8 mmol/l

Tyto požadavky jsou převzaty z normy ISO 15197 (22) a mohou sloužit jako základní orientace při výběru osobních glukometrů v souladu s doporučeními POCT vypracovanými výborem České společnosti klinické biochemie [13].

2.1.5. Kontinuální monitorování glukózy (CGM)

Systém CGM se skládá z invazivního senzoru na jedno použití, který měří po dobu šesti (senzory Enlite, Medtronic) nebo sedmi dnů (senzory Platinum, Dexcom), dále transmiteru napojeného na senzor (vysílá data do přijímače) a vlastního přijímače, který signál vyhodnocuje a podle typu CGM buď data pouze uchová, nebo pacientovi v reálném čase ukazuje hodnoty glykémie včetně trendů a vydává varování při dosažení kritické koncentrace glukózy nebo rychlosti její změny. Přijímačem signálu může být i inzulinová pumpa (Paradigm Veo a 640G, Medtronic nebo Animas Vibe, Johnson&Johnson). Pumpy výrobce Medtronic mohou na základě uživatelského nastavení při současném použití senzoru zastavit podávání inzulinu při hypoglykémii (Paradigm Veo), nebo na základě predikce trendu ještě před ní (640G). Přesnost senzoru se v závislosti na typu senzoru a času od jeho zavedení pohybuje typicky v hodnotách MARD 10 – 15 %.

V současnosti jsou systémy CGM používány dvěma způsoby. Profesionální CGM je prováděno lékaři a probíhá v tzv. zaslepeném módu. Pacient se chová běžným způsobem, hodnoty koncentrace glukózy systém neukazuje a průběh monitorace je zjištěn až lékařem po stažení dat ze systému CGM. Na základě výsledků je možné provádět např. diagnostiku nočních a nerozpoznaných hypoglykemií nebo hodnotit compliance pacienta. Tento nástroj lze s výhodou použít k rozhodnutí o úpravě tera-

pie a hodnocení jejího efektu. Druhým způsobem použití je monitorace glukózy v reálném čase. Pacient je nepřetržitě (k aktualizaci hodnot dochází v pětiminutových intervalech) informován o aktuální hodnotě koncentrace glukózy, trendech a dosažení kritických hodnot. Tento způsob CGM je spojen se snížením výskytu hypoglykemií a glykemické variability, zvýšením podílu času stráveném v cílovém rozmezí glykémie a vede k poklesu hodnoty HbA_{1c}, ovšem pouze za podmínky, že je používán více než přibližně polovinu času.

Technologie CGM je velmi perspektivní a dá se očekávat, že v relativně blízké budoucnosti dojde k jejímu většímu rozšíření. Zatím mu na straně pacientů brání především vysoké náklady na trvalé použití a psychologické bariéry související s nutností věnovat systému CGM prakticky neustálou pozornost.

2.2. Glykovaný hemoglobin HbA_{1c}

Glykovaný hemoglobin HbA_{1c} vyjadřuje dlouhodobý stav glykémie za 8 až 12 týdnů, hodnota FPG zachycuje okamžitý stav glykémie. Okamžitá hodnota glykémie je ovlivněna řadou vnějších faktorů, hodnota HbA_{1c} může být zkrácena (snížena) vlivem zkrácení doby života erytrocytů.

2.2.1. Výhody stanovení glykovaného hemoglobinu HbA_{1c} ve srovnání s FPG

- není nutné lačnění pacienta
- odběr lze provést kdykoliv bez nějaké přípravné doby
- preanalytické podmínky jsou při stanovení HbA_{1c} mnohem jednodušší než u stanovení glukózy (například stabilita v čase, žádná glykolýza)
- biologická variabilita HbA_{1c} je významně příznivější (CV_i = 2,0%), než u FPG (CV_i = 5,0%)

2.2.2. Nevýhody stanovení glykovaného hemoglobinu HbA_{1c} ve srovnání s FPG

- změna střední doby života erytrocytu (zatím není spolehlivá metoda jejího měření)
- interference patologických hemoglobinů jsou závislé na metodě/přístroji a postupně jsou úspěšně řešeny. Aktualizované informace lze nalézt na <http://www.ngsp.org>

Rozdíly mezi stanovením HbA_{1c} a FPG ale nejsou důvodem k odmítnutí HbA_{1c} jako diagnostického nástroje diabetu, zachycují jen problémy mezi oběma analyty v celé šíři při všech jejich možných použití. Také dále uvedený vliv doby života erytrocytů ovlivňuje HbA_{1c} jak při použití pro sledování, tak i pro diagnostiku diabetu.

Střední doba života erytrocytů se pohybuje v rozmezí 100 až 140 dnů s průměrem 120 dnů. V literatuře je uváděna obvykle jako **120 ± 10 dnů**. Již tento rozptyl údajně způsobuje významnou variabilitu hodnot HbA_{1c} (viz tabulka).

Změny hodnot HbA_{1c} pro střední hodnotu HbA_{1c} = 53 mmol/mol při zvolené střední době života erytrocytů 120 dnů.

Střední doba života erytrocytů	110 dnů	120 dnů	130 dnů
Hodnota HbA _{1c}	46 mmol/mol	53 mmol/mol	60 mol/mol

2.2.3. Požadavky na analytickou kvalitu měření

Hodnoty indikátorů analytické kvality měření jsou převzaty z dat IFCC Task Force On Implementation of HbA_{1c} Standardization [30, 31] jsou uvedeny v následující tabulce:

Mezilehlá preciznost	Pravdivost (bias)	Celková chyba
CV < 3%	b < 2,0%	TE < 5 mmol/mol

Z dat uvedených v tabulce plyne hodnota six-sigma $\sigma \geq 2,0$.

Tyto požadavky bylo schopno v roce 2014 splnit 77% laboratoří Nizozemska, Belgie, Finska a Řecka a 12 testovacích souprav z 26 použitých (program CAP NGSP USA).

Existují difference mezi úrovní kvality dosažené různými diagnostiky a metodami.

Pořadí metod podle kvality lze v současnosti stanovit následovně (v uvedené řadě hodnoty indikátorů kvality klesají):

- kapilární elektroforéza
- afinitní HPLC
- ionexová HPLC
- imunoanalytické metody.

Podobný obraz byl získán při individuálním hodnocení jednotlivých laboratoří a také podle výsledků PT CAP / NGSP USA GH 2014 (www.ngsp.org).

Program RCPA Austrálie považuje za kritérium kvality hodnotu TE = 4 mmol/mol (pro HbA_{1c} ≤ 45 mmol/mol a 8% (pro HbA_{1c} > 45 mmol/mol).

Program CAP/NGSP používá kritérium D_{max} = 6% pro jednotky NGSP, což odpovídá hodnotě D_{max} = 8% pro výsledky v jednotkách IFCC (mmol/mol).

2.2.4. Přepočtové vztahy pro výsledky uvedené v jiných jednotkách

Přepočet z jednotky % IFCC (v ČR používána do 31. 12. 2011) na jednotku mmol/mol:

$$X_{\text{mmol/mol}} = 10 \cdot X_{\%IFCC}$$

Přepočet z jednotky % NGSP/DCCT (jednotka % NGSP/DCCT zůstává nadále v platnosti a používá se zejména v USA. V ČR není používána od 1. 1. 2004) na jednotku mmol/mol:

$$X_{\text{mmol/mol}} = (X_{\%NGSP/DCCT} - 2,152) / 0,09148$$

2.2.5. Metrologická návaznost

Rutiní metody měření mají vykazovat metrologickou návaznost na referenční metodu IFCC [7]. Referenční metoda IFCC je založena na principu HPLC/MS nebo alternativně HPLC/CE. **Certifikované referenční materiály** mají hodnoty HbA_{1c} stanovené referenční metodou - disponují tedy certifikovanými hodnotami HbA_{1c} včetně nejistoty této hodnoty a mají být testované na komutabilitu. Klinické laboratoře mají používat **kalibrátory**, jejichž výrobci jsou schopni dokumentovat v souladu se Direktivou 98/79 ES a s nařízením vlády České republiky 458/2004 Sb., že hodnoty HbA_{1c} v nich jsou určeny srovnáním s certifikovanými referenčními materiály.

Metody POCT jsou považovány až na výjimky za orientační a měly by být pravidelně ověřovány srovnáním s výsledky klinických laboratoří

2.2.6. Standardizace stanovení HbA_{1c}

Je založena na celosvětovém konsensu pěti mezinárodních lékařských organizací [8], zabývajících se diabetem:

- IDF (International Diabetes Federation)
- ADA (American Diabetes Association)
- EASD (European Association for the Study of Diabetes)
- IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine)
- ISPAD (International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes)

Uvedený konsenzus byl uveřejněn v roce 2010.

Hlavními rysy tohoto konsenzu jsou:

- Celosvětová platnost
- Jednotný referenční systém měření
- Použití základní jednotky měření mmol/mol HbA_{1c}
- Možnost přepočtu výsledků v měření v mmol/mol na jednotku % NGSP podle vzorce:
% NGSP = (0,0915 x IFCC) + 2,15
Referenční systém měření sestává z [28, 29] :
- referenční metody IFCC na bázi HPLC-MS (HPLC-CE)
- certifikovaných referenčních materiálů IRMM/IFCC 467 a 468
- sítě mezinárodních referenčních laboratoří (uvedena na <http://www.ngsp.org>).
- Klinická hodnota stanovení HbA_{1c} spočívá v:
- monitorování dlouhodobé hodnoty koncentrace glukózy v krvi
- nastavení odpovídající terapie DM
- posouzení kvality péče o diabetika
- hodnocení rizika vývoje mikrovaskulárních komplikací
- screeningu rizika diabetu a v diagnóze diabetu.

2.2.7. Doporučení WHO 2011 o diagnóze diabetu (stanovení HbA_{1c})

Považuje stanovení HbA_{1c} za základní nástroj diagnózy diabetu. Rozhodovacím limitem pro diagnózu je hodnota HbA_{1c} ≥ 48 mmol/mol.

Zmiňuje se také o použití POCT v diagnostice a konstatuje jeho striktní omezení na přístroje procházející úspěšně a dlouhodobě kontrolou kvality prováděnou srovnáním s hodnotami referenčních metod a s použitím komutabilních kontrolních materiálů. V současnosti se spektrum vhodných POCT přístrojů omezuje pouze na POCT systémy Afinion – ALERE a Siemens DCA Vantage. Nově jsou pozitivně testovány i POCT systémy B-Analyst (Menarini) a Cobas B101 (Roche), ale na jejich prověření se čeká.

Doporučení WHO 2011 však zpochybňuje použití glykovaného hemoglobinu HbA_{1c} k diagnóze v řadě případů:

- u dětí a adolescentů
- v těhotenství
- u renálních chorob

- u pankreatitidy
- u diabetu mellitu I
- v období akutní choroby (až do jejího odeznění)
- u anemických stavů.

WHO doporučení 2011 bylo přijato britskými diabetology (UK Department of Health Advisory Committee on Diabetes) a publikováno [32].

2.3. Albumin

Současné imunochemické metody poskytují výsledky, které jsou dostatečně kvalitní pro diagnostická rozhodování. Imunoturbidimetrie a imunonefelometrie převládá při stanovení albuminu v moči.

Vylučování albuminu močí, které může predikovat nefropatii, má být stanovováno v laboratoři metodami s těmito parametry:

Mezilehlá preciznost	Mez detekce
CV < 15 %	≤ 10 mg/l

Jako referenční metoda je navržena metoda LC-MS/MS.

Akceptovatelné hodnoty bias mají být zabezpečeny realizací metrologické návaznosti rutinní metody na mezinárodní referenční materiál ERM-DA470k/IFCC.

2.4. Ketolátky

Při diabetické ketoacidóze dochází ke tkáňové hypoxii, proto má pro její diagnózu mnohem větší význam stanovení kyseliny β-hydroxymáselné než klasické stanovení ketolátek standardními testovacími proužky.

Při stanovení ketonů v krvi klasickými testovacími proužky nebo tabletami na bázi nitroprussidové barevné reakce není kyselina β-hydroxymáselná detekována. K dispozici již jsou metody určené přímo k měření kyseliny β hydroxymáselné v krvi. Validní data o analytických znacích metody a ukazatelích analytické kvality nejsou dosud k dispozici nebo jsou kontroverzní.

2.5. C-peptid a inzulin

Oba parametry se stanovují imunoanalytickými metodami a výsledky závisí na použité metodě. Standardizace výsledků měření obou analytů je v současné době ve vývoji.

Pro stanovení C-peptidu se používá standard WHO IRR 84/510 [17]. Mezilaboratorní experiment, provedený ve 20 laboratořích s použitím 12 vzorků a 8 různých metod, ukázal rozdíly mezi výsledky metod měření C-peptidu až 90 % a nárůst chyby s rostoucí koncentrací. Souběžně prováděné přepočty na referenční materiál WHO IRR 84/510 nevedly k podstatnému zlepšení [20]. Studie stanovení C-peptidu na analyzátoru Architect ukázaly preciznost 2,1 - 6,5 % a hodnotu recovery 99 až 112 % [21]. Jiné údaje o imunochemických stanoveních C-peptidu došly k hodnotám preciznosti 8 - 12 % a chybě měření 25 %.

Pro inzulin byla navržena referenční metoda na principu ID LC/MS/MS. Bias rutinních metod pro stanovení inzulinu před standardizací byl vyšší než 16 %. Standardizace vedla ke zlepšení pouze po přepočtu na soupravu sér s hodnotami stanovenými metodou ID-MS [18]. Marcovinová a spol. udávají preciznost mezi

metodami v intervalu 12 % až 66 % a celkovou chybu u sedmi z deseti testovaných souprav nad 32 % (což je hodnota odvozená z biologických variabilit) [22].

3. Zkratky

ACE-I	Inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu
ACR	albumin-creatinine ratio (poměr koncentrace albuminu a kreatininu)
ADA	American Diabetes Association (Americká diabetologická společnost)
CRM	Certified Reference Material (Certifikovaný referenční materiál)
CV	Coefficient of Variation (variační koeficient, relativní směrodatná odchylka)
CV _a	Analytická preciznost vyjádřená jako variační koeficient (odhad preciznosti výsledků měření)
CV _g	Interindividuální biologická variabilita vyjádřená variačním koeficientem
CV _i	Intraindividuální biologická variabilita vyjádřená variačním koeficientem
DCCT	Diabetes Control and Complications Trial (Součást vědecké výzkumné báze Americké diabetologické společnosti)
DM	Diabetes mellitus
EASD	European Association for the Study of Diabetes (Evropská asociace pro studium diabetu)
EDTA	Sůl kyseliny etyléndiaminotetraoctové
EHK	Externí hodnocení kvality
ERM	European Reference Material (Evropský certifikovaný referenční materiál)
FPG	Fasting Plasma Glucose (plazmatická koncentrace glukózy v žilní krvi nalačno)
GDM	Gestační diabetes mellitus
HbA _{1c}	Glykovaný hemoglobin A _{1c}
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Vysokoúčinná kapalinová chromatografie)
HPLC/CE	High Performance Liquid Chromatography / Capillary Electrophoresis (Vysokoúčinná kapalinová chromatografie v kombinaci s kapilární elektroforézou)
HPLC/MS	High Performance Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry (Vysokoúčinná kapalinová chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií)
ID/MS	Isotopic dilution – Mass spektrometry (Hmotnostní spektrometrie s izotopovým zředěním)
IDF	International Diabetes Federation (Mezinárodní diabetologická federace)
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (Mezinárodní federace klinické chemie a laboratorní medicíny – vrcholný světový orgán laboratorní medicíny)
IFG	Impaired Plasma Glucose (mírně zvýšená plazmatická koncentrace glukózy v žilní krvi nalačno, často též označovaná jako prediabetes)
IGT	Impaired Glucose Tolerance (porušená glukózová tolerance)
IRMM	Institute for Reference Materials and Measurements (Ústav pro referenční materiály a měření v Geelu)
ISPAD	International Society for Pediatrics and Adolescent Diabetes (Mezinárodní společnost pro diabetes v pediatrii a u adolescentů)
K ₂ EDTA	Draselná sůl kyseliny etyléndiaminotetraoctové

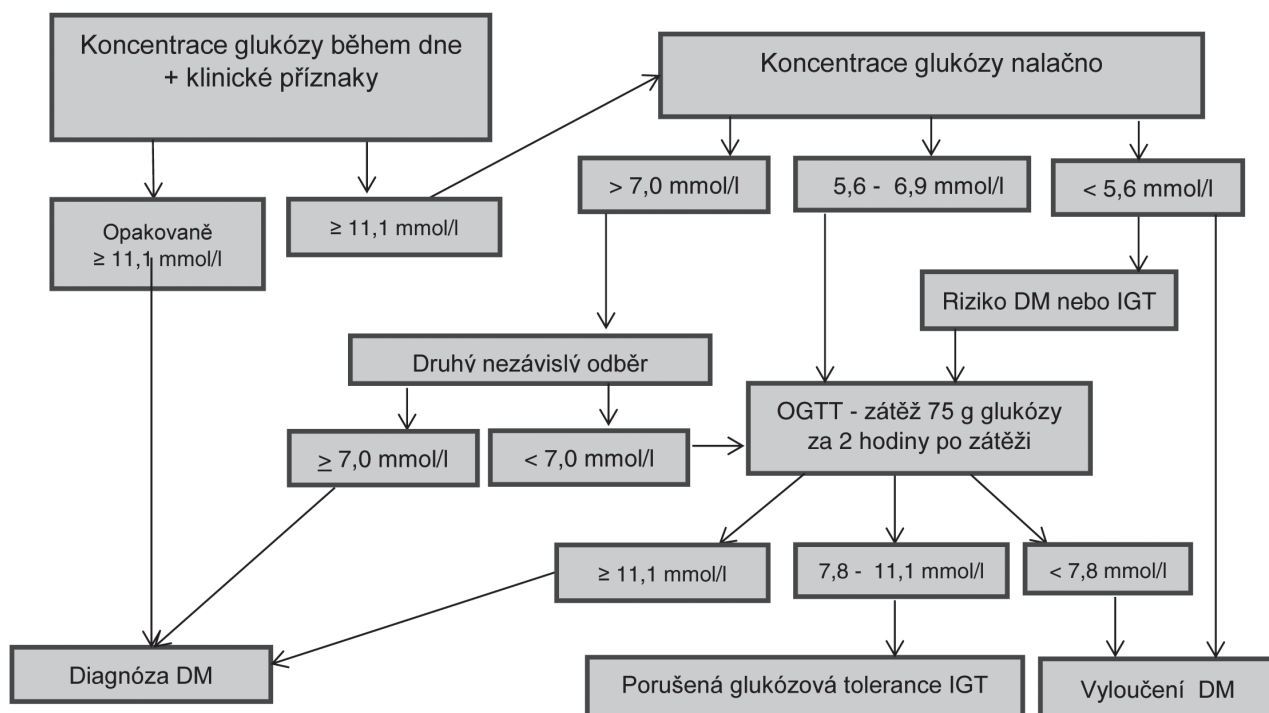
LC-MS/MS	Liquid Chromatography / Tandem Mass Spectrometry (Kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií)
MARD	Mean absolute relative difference
NGSP	National Glycohemoglobin Standardization Program (Národní program pro standardizaci glykovaného hemoglobinu HbA _{1c} v USA)
oGTT	Glukózový toleranční test
PCR	Protein - creatinine ratio (poměr bílkovina - kreatinin)
POCT	Point of Care Testing (testování u lůžka nemocného či v přímém kontaktu s ním)
U _c	Rozšířená kombinovaná nejistota výsledku měření
VKK	Vnitřní kontrola kvality

4. Literatura

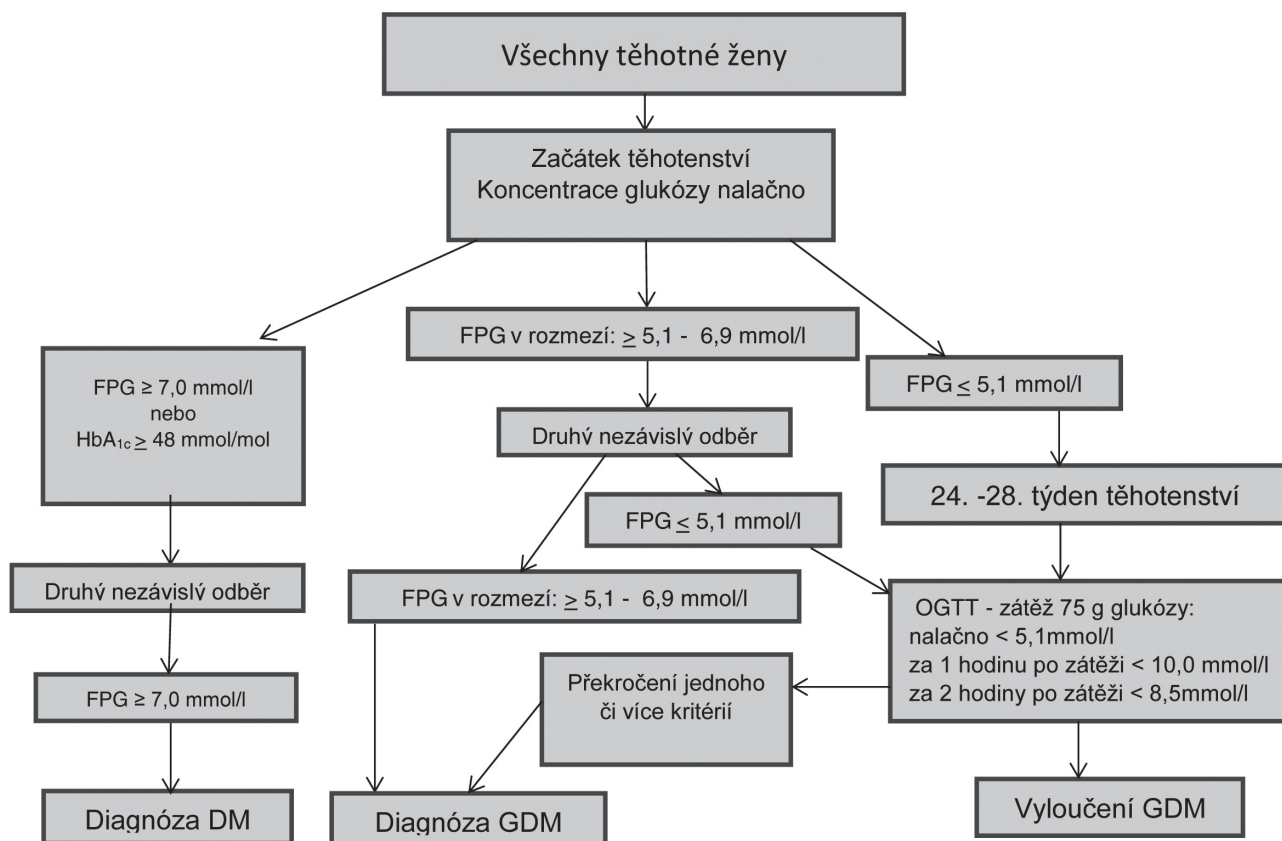
1. The National Academy of Clinical Biochemistry Guidelines and Recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. Ed. D.B.Sacks. January 2011. Dostupné na: http://www.aacc.org/members/nacb/LMPG/OnlineGuide/PublishedGuidelines/diabetes_update/Documents/DiabetesEntireLMPG.pdf
2. **Sacks, D. B., Arnold, M., Baktris, G. L. et al.** Executive Summary Guidelines and Recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clin. Chem.*, 2011, 57, p. 793-798.
3. Standards of Medical Care in Diabetes 2011. *Diabetes Care*, 2011, 34, Suppl 1, S1-S61.
4. **Stahl, M., Joergessen, L. G. M., Hyltoft Petersen, P. et al.** Optimization of preanalytical conditions and analysis of plasma glucose. 1. Impact of the new WHO and ADA recommendations on diagnosis of diabetes mellitus. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 2001, 61, p. 169-179.
5. **Gambino, R., Piscitelli, J., Ackatupatil, T. A. et al.** Acidification of blood is superior to sodium fluoride alone as an inhibitor of glycolysis. *Clin. Chem.* 2009, 55, p. 1019-1021.
6. **Burnett, R. W., D'Orazio, P., Fogh-Andersen, B., Kuwa, K., Kulpmann, W. R. et al.** IFCC recommendation on reporting results for blood glucose. *Clin. Chim. Acta*, 2001, 307, p. 205-209.
7. **Weykamp, C., John, W. G., Mosca, A. et al.** The IFCC reference measurement system for HbA_{1c}: A 6 year progress report. *Clin. Chem.*, 2008, 54, p. 240-248.
8. **Hanas, R., John, W. G.** Consensus statement on the worldwide standardization of the hemoglobin A_{1c} measurement. *Clin. Chem.*, 2010, 56, p. 1362-1364.
9. **Weykamp, C., Mosca, A., Gillery, P., Panteghini, M.** The Analytical Goals for Hemoglobin A_{1c} in IFCC units and National Glycohemoglobin Standardization Program units are different. *Clin. Chem.*, 2011, 57, p. 1204-1206.
10. **Scott, M. G., Bruns, D. E., Boyd, J. C., Sacks, D. B.** Tight glucose control in the intensive care unit. Are glucose meters up to the task? *Clin. Chem.*, 2009, 55(1), p. 18-20.
11. **Frenckmann, G., Baumstark, A., Jendrike, N. et al.** System accuracy evaluation of 27 blood glucose monitoring systems according to DIN EN ISO 15197. *Diabetes Technol. Ther.*, 2010, 12, p. 221-231.
12. **Skeie, S., Thruue, G., Nerhus, K., Sandberg, S.** Instruments for self-monitoring of blood glucose: comparison of testing quality achieved by patients and a technician. *Clin. Chem.*, 2002, 48, p. 994-1003.

13. Doporučení ČSKB. Správné zavádění a používání prostředků POCT. Dostupné na: <http://www.cskb.cz/cskb.php?pg=doporuceni>
14. **Miller, G. W., Bruns, D. E., Hortin, G. L. et al.** Current issues in measurement and reporting of urinary albumin excretion. *Clin. Chem.*, 2009, 55, p. 24-38.
15. **Lamb, E. J., MacKenzie, F., Stevens, P. E.** How should proteinuria be detected and measured, *Ann. Clin. Biochem.*, 2009, 46, p. 205-217.
16. Doporučení České nefrologické společnosti a České společnosti klinické biochemie k vyšetřování proteinurie. Dostupné na: <http://www.cskb.cz/cskb.php?pg=doporuceni>, publikováno také v *Klin. Biochem. Metab.*, 2010, 19(40), p. 28-35.
17. **Little, R. R., Rohlfing, C. L., Tennill, A. L. et al.** Standardization of C-peptide measurements. *Clin. Chem.*, 2008, 54, p. 1023-1026.
18. **Miller, G. W., Thienpont, L. M., van Uypfanghe, K. et al.** Toward standardization of insulin immunoassays. *Clin. Chem.*, 2009, 55, p. 1111-1118.
19. Doporučení ČSKB a ČDS: Změna jednotky pro stanovení glykovaného hemoglobinu A1c (HbA1c) a rozhodovacích mezí. Dostupné na: <http://www.cskb.cz/cskb.php?pg=doporuceni>
20. **Wiedmeyer, H. M., Polonski, K. S., Myers, G. L. et al.** International Comparison of C-peptide measurements. *Clin. Chem.*, 2007, 53, p. 784-786.
21. **Schultess, J., van Duren, C., Martens, M. et al.** Diagnostic performance of the Architect C-peptide immunoassay. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2009, 47, p. 834-841.
22. **Marcovina, S., Bowsher, R. R., Miller, W. G. et al.** Standardization of insulin immunoassays: Report of the American Association of Diabetes Workgroup. *Clin. Chem.*, 2007, 53, p. 711-716.
23. *EN ISO 15197:2013*. In vitro diagnostic test systems – Requirements for blood-glucose monitoring systems for self-testing in managing diabetes mellitus. Geneve 2013.
24. Doporučení k použití, výběru a kontrole glukometrů. *Klin. Biochem. Metab.*, 22 (43), 2014, No. 3, p. 155–164.
25. Doporučení k diagnostice chronického onemocnění ledvin (odhad glomerulární filtrace a vyšetřování proteinurie) 2014. Dostupné na <http://www.cskb.cz/cskb.php?pg=doporuceni-archiv#10>
26. National Kidney Disease Education Program. Laboratory Evaluation. Dostupné na <http://www.nkdep.nih.gov> dne 13. 10. 2013.
27. **Thomas, M. C., Jandeleit-Dahn, K., Bonnet, F.** Beyond glycosuria: Exploring the intrarenal effects of SGLT 2 inhibition in diabetes. *Diabetes Metab.*, 2014, 40, Suppl.1, S17-22.
28. **John, G., English, E.** IFCC standardized HbA1c: should the world be as one? *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2012, 50, p. 1243-1248.
29. **Sacks, D. B.** Measurement of Hemoglobin A1c. A new twist of the path of harmony. *Diabetes Care* 2012, 35, p. 2674-2680.
30. **Weykamp, C., John, G., Gillery, P., English, E., Ji, L., Leters-Westra, E., Little, R. R. et al.** Investigation of 2 Models to Set and evaluate Quality Targets for Glycated Hemoglobin. *Biological Variations and Sigma-Metrics. Clin. Chem.* 2015, doi:10.1373/clinchem.2014.235333.
31. **Sikaris, K. A.** The Role and Quality of HbA1c ! A Continuing Evolution. *Clin. Chem.*, 2015. doi:10.1373/clinchem.2015.239319.
32. **John, G.** Expert Position Statement. Use of HbA1c in the diagnosis of diabetes mellitus in the UK. The implementation of World Health Organization guidance 2011. *Diab. Med.*, 2012, 29, p. 1350-1357.
33. **Peake, M. J., Bruns, D. E., Sacks, D. B., Horvath, A. R.:** It's time for a better blood collection tubes to improve the reliability of glucose results. *Diabetes Care*, 2013, 36. DOI:10.2337/dc12-1312.
34. **Friedecký, B., Springer, D., Kratochvíla, J.** Stabilita glukózy ve vzorcích krve po odběru. *FONS* 2015, 1, p. 15-16.
35. Dostupné na: <http://www.ngsp.org>

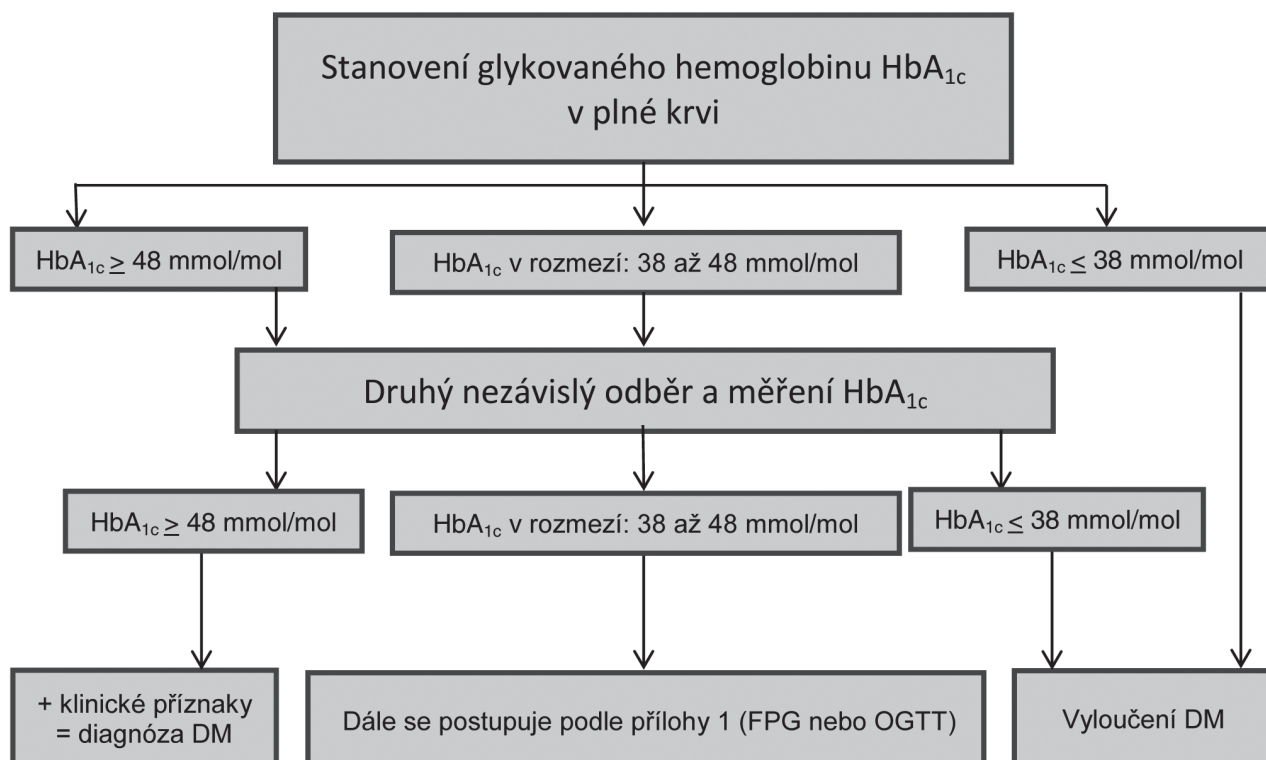
Příloha 1: Algoritmus pro screening DM u dospělých



Příloha 2: Algoritmus pro laboratorní screening gestačního DM



Příloha 3: Návrh algoritmu pro diagnózu diabetu pomocí stanovení HbA_{1c}



Příloha 4: Preanalytické podmínky a interference

Souhrn preanalytických podmínek

Analyt	Materiál	Odběr	Skladování
Glukóza	plazma žilní krve	Použití antiglykolytického přípravku složeného z NaF, EDTA a citrátové směsi.	Stabilní minimálně 24 hodin při pokojové teplotě nebo v chladničce. Pokud se nepoužije odběru do antiglykolytické směsi provede se oddělení plazmy od krevních elementů do 30 minut
oGTT	plazma žilní krve	Po zátěži glukózou je rozdíl mezi koncentrací glukózy v kapilární a žilní krvi okolo 25 %.	
HbA _{1c}	plná nebo kapilární krev jsou rovnocenné materiály.	Odběrové nádoby obsahují antikoagulační činidlo, obvykle EDTA.	Max. 1 týden při +4 °C Max. 6 měsíců při -20 °C Max. 1 rok při -80 °C
Albumin	první ranní vzorek moče	Vliv akutních stavů, uroinfekcí, zvýšené námahy, vysoké koncentrace glukózy, infekcí GIT, kardiálních chorob, arteriální hypertenzí. Vyšetření nemá být prováděno při menses.	Max. 1 týden při +4 až +8 °C Max. 1 měsíc při -20 °C (hodnota mírně klesá) Max. 6 měsíců při -70 °C
Ketolátky	sérum nebo plazma	Různá antikoagulancia.	1 týden při +4 °C několik týdnů při -20 °C
C-peptid	sérum	Vliv fyzické zátěže, kouření a užívání biotinu.	Max. 1 den při +4 až +8 °C Max. 1 měsíc při teplotě -20 °C a vzorek nesmí být opakovaně rozmrazován
Inzulin	sérum	Vliv fyzické zátěže, hemolýzy a užívání biotinu.	Max. 1 den při +4 až +8 °C Max. 6 měsíců při -20 °C Max. 2 roky při -70 °C

Stanovení glukózy [14, 34]

Krev se odebírá po hladovění (lačnění) přes noc, minimálně však po 8 hodinách. Jakákoliv fyzická námaha musí být vyloučena, stejně jako kouření. Pacient má být při odběru v klidové poloze (vsedě).

Vzorek žilní krve se odebírá do odběrové nádoby s obsahem inhibitoru glykolýzy. Obvyklou kombinací pro získání plazmy s dostatečnou stabilitou glukózy je směs fluoridu sodného a EDTA. K účinné inhibici glykolýzy je nutná koncentrace minimálně 2,5 mg fluoridu sodného na 1 ml krve. K bezpečné zábraně glykolýzy by měly být vzorky po odběru uloženy do nádoby s ledovou

tříští. Praktičtější alternativou, zajišťující stabilitu vzorku krve po odběru dostatečným potlačením in vitro glykolýzy, je odběr do antiglykolytického činidla obsahujícího kromě fluoridu a EDTA i citrát sodný (k dosažení pH 5,7). Potřebné odběrové nádoby vyrábějí přední výrobci Terumo, Greiner, Sarstedt a další a jejich typy a dostupnost (květen 2015) je uvedena v tabulce.

Odběr krve

V případě, že není použito odběru do antiglykolytika, mělo by být provedeno oddělení plazmy od krevních elementů optimálně do 30 minut. Transport do laboratoře je pak okamžitý.

Dostupné odběrové nádoby s antiglykolytickým přídavkem včetně citrátů pro stanovení glukózy v krvi

Výrobce	Označení/Popis	Objem	Antiglykolytické přísady	Poznámky
Sarstedt	S-Monovette-Gluco-EXACT	3,1 ml	NaF/Citrat/EDTA	Kapalná přísada Ředící faktor: 1,16
Greiner	Vacurette Glucomedics	2,0 ml	NaF/Citrat/EDTA azid sodný	Kapalná přísada Ředící faktor: 1,16
Kabe Labortechnik	Primavette S	2,6 ml	NaF/Citrat	Kapalná přísada Ředící faktor: 1,05
Kabe Labortechnik	Kabevette G	3,5 ml	NaF/Citrat	Kapalná přísada Ředící faktor: 1,05
Terumo	VenoSafe Glycemia	2,0 ml / 3,0 ml	NaF/Citrat/EDTA	Pevná přísada, důkladné promíchání nutné, bez korektury na ředění

Glukózový toleranční test (oGTT)

V plazmě kapilární krve je za běžných okolností stejná koncentrace glukózy jako v plazmě žilní krve. Po zátěži glukózou činí rozdíl mezi koncentrací glukózy v kapilární a žilní krvi 25 % i více. Pro hodnocení oGTT není možné použít hodnot naměřených v plné žilní nebo kapilární krvi. Reprodukovatelnost klasifikace diabetu mellitu pomocí jednoho provedení oGTT se pohybuje v rozmezí pouze 50 až 70 %. Malabsorpce, nauzea a kouření ovlivňují výsledek oGTT.

Stanovení glukózy metodami POCT

Vyžaduje se důkladná instrukce a zcvik zdravotnického personálu na klinických odděleních a pacientů před zahájením sledování. Nedílnou součástí instrukcí jsou postupy kontroly kvality.

Významné potenciální zdroje preanalytických chyb jsou:

- změny hodnot hematokritu,
- změny teploty a vlhkosti vnějšího prostředí,
- vysoké koncentrace triacylglycerolů v krevním séru,
- hypoxie a hypotenze pacienta,
- použití vzorku krve s obsahem glykolytického inhibitoru,
- rozdíly ve vlastnostech šarží reagenčních čipů (slidů, proužků, cartridge aj.),
- mikrobiologická kontaminace reagenčních čipů (slidů, proužků, cartridge aj.).

Glykovaný hemoglobin HbA_{1c}

K měření se používá vzorek nesrážlivé krve, obvykle odebraný do EDTA. Vlivy věku, pohlaví, etnicity, ročního období nejsou považovány za významné. Hemoglobinopatie ovlivňují výsledky měření, ale nesystematicky a v závislosti na metodě měření a přístroji. V případě neočekávaného výsledku je však třeba pomyslet i na ně. Záznamy chromatogramů (HPLC, LC) dávají dobrou možnost zpětné kontroly jejich výskytu.

Anémie a snížená koncentrace hemoglobinu mohou způsobovat snížené výsledky měření. Snížená hodnota doby života erytrocytů je příčinou falešně snížených hodnot HbA_{1c} v krvi. Faktory, negativně ovlivňující

výsledky měření HbA_{1c}, jsou uvedeny a aktualizovány na webu NGSP [35].

U uremických pacientů dochází ke karbamylaci, která působí silné interference při měření HbA_{1c} v závislosti na použité metodě a přístroji.

Albumin

Dle mezinárodních doporučení [33] je jednoznačně preferováno použití náhodný, nejlépe první ranní vzorek moče, protože v něm poměr albumin/kreatinin koreluje nejlépe s 24 hodinovým vylučováním albuminu. Vyšetření v moči sbírané 24 hodin se nedoporučuje (problematika kvality sběru, fragmentace albuminu, atd.). Při vyšetřování ve vzorku nesbírané moče se doporučuje stanovit poměr albumin/kreatinin (ACR). Pokud se používá sběr za kratší časový úsek, jde o sběr za čtyři hodiny. U diabetiků nevykazuje albumin v moči diurnální variabilitu.

Ketolátky

Falešně pozitivní výsledky při stanovení v moči mohou být způsobeny:

- silným zbarvením vzorků,
- některými léky (například ACE-I),
- poškozením proužků nevhodným zacházením (expozice vzduchem, teplota apod.),
- lačněním nebo sníženým kalorickým příjmem (redukční diety),
- těhotenstvím (u asi 30 % případů).

Falešně negativní výsledky mohou být způsobeny:

- velmi nízkým pH moči,
- vysokým příjmem kyseliny askorbové,
- mikrobiálním rozkladem a následným únikem těkavého acetonu.

C-peptid

Koncentraci C-peptidu ovlivňuje fyzická zátěž, kouření a užívání biotinu.

Inzulin

Koncentraci inzulinu ovlivňuje fyzická zátěž, užívání biotinu a hemolýza vzorku. U pacientů léčených inzulinem může docházet při stanovení k nespecifické reakci.