

Diagnostika diabetu pomocí plasmatické glukózy. Nerozřešený problém laboratorní medicíny.

Friedecký B., Palička V., Kratochvíla J.

Mezi laboratorními výsledky a jejich klinickým dopadem by měla existovat hluboká souvislost. Rychle se rozvíjející genomika, proteomika, metabolomika, nanotechnologie poskytují kromě rychlých technologických pokroků také velkou dávku neporozumění až esoteriky pro klinické i nezasvěcené laboratorní pracovníky a ztěžují racionální použití výsledků laboratorních metod v klinické praxi. Zajištění žádoucího stupně propojení laboratorních a klinických pracovišť se věnuje „translační medicína“. Týká se však potřeba „translace“ laboratorních výsledků z laboratoří ke klinickým pracovníkům jen těch moderních analytických technik a postupů? Na příkladě dlouhodobě používaného diagnostického procesu u diabetu lze nicméně ukázat, jaké rezervy v sepětí mezi laboratoří a klinikou lze nalézt i tam, kde by to hned tak někdo neočekával, a navíc v oblasti, považované běžně za medicínu, založenou na důkazech (EBM).

V Tabulce 1 jsou shrnuty celosvětově používané diagnostické rozhodovací limity k diagnóze diabetu pomocí hodnot plasmatické glukózy na lačno [1]. Metody měření jsou standardizované a vykazují metrologickou návaznost na certifikovaný referenční materiál SRM 965 NIST s hodnotami koncentrací (4 vzorky), stanovenými referenční metodou ID/GC-MS [2]. Analytické procesy lze při stanovení plasmatické glukózy považovat za vyřešené a bezproblémové.

Velký problém však spočívá v nestabilitě koncentrace glukózy, způsobené glykolýzou erytrocytů. Nástroji její eliminace jsou:

- včasná separace plasmy od elementů,
- odběr krve do účinných inhibitorů glykolýzy.

Jak jsou formulovány způsoby eliminace glykolýzy v současných textech tří vybraných doporučení k diagnostice diabetu

- American Association of Clinical Chemistry (AACC 2011) doporučuje oddělení plasmy od erytrocytů do 30 minut a vzorky odebrané krve ponořit do vodní ledové tříště [3]

- Německá společnost laboratorní medicíny a Německé diabetologické společnosti (DGKL+ DDG 2016) doporučuje oddělení plasmy do 30 minut, odběr vzorků krve do gelových zkumavek nebo do směsi citrát-NaF [4]
- Česká společnost klinické biochemie s Českou diabetologickou společností (ČSKB + CDS-2016) vyžaduje oddělení plasmy do 30 minut nebo odběr do zkumavek citrát + NaF [5].

Jak je to s odběrem vzorků krve do směsi antikoagulačního činidla a NaF?

Používalo se po řadu let k inhibici glykolýzy v odebrané krvi. Přitom bylo již dlouhou dobu známo, že inhibice pomocí NaF není dostatečně účinná, zejména v první, asi jednu hodinu trvající fázi skladování po odběru. V roce 2001 bylo navrženo skandinávskými autory, aby byly vzorky krve odebrané pro stanovení glukózy skladovány do centrifugace v ledové vodní tříšti [6]. Avšak teprve po uveřejnění práce Gambina [7] se začala otázka inhibice glykolýzy po odběru vzorků řešit s důrazem a dnes, po dalších 10 letech je zřejmé, že problém dosud vyřešen není, navzdory postavení diabetu jako celosvětového problému [8, 9].

Data o diferencích mezi inhibitory s citrátem a bez citrátů ukazují díky omezení (zábraně) glykolýzy jednoznačně vyšší hodnoty při použití inhibitorů NaF + citrát. Podle Montagnanové a Lippiho se v 10 pracích interval diferencí mezi odběry do NaF a odběry do směsi citrátu-NaF pohyboval v intervalu +5,5 až +10,7 % [8]. Důvodem zvýšené inhibiční účinnosti směsi citrát-NaF vůči samotnému NaF je skutečnost, že první z nich inhibuje glykolýzu na dvou místech (aktivitu hexokinázy a enolázy), zatímco NaF inhibuje pouze aktivitu enolázy na konci reakčního schématu glykolýzy.

Inhibiční aditiva se do odběrových zkumavek přidávají buď v pevném stavu (Venosafe Terumo) nebo v kapalné formě (Glucomedic, Sarstedt GlucoEACT). Proto musí být součástí pracovního postupu při odběru vzorků krve důkladný popis promíchávání obsahu,

Table 1: Commonly used decision limits of plasma glucose for diagnosis of diabetes mellitus

Non diabetes		< 5.6 mmol/L
Prediabetes		5.6 - 6.9 mmol/L
	2 h oGTT	7.8 – 11.0 mmol/L
Diabetes		≥ 7.0 mmol/L
	2 h oGTT	≥ 11.1 mmol/L
Gestational diabetes		≥ 5.1 mmol/L
	1 h oGTT	≥ 10.0 mmol/L
	2 h oGTT	≥ 8.5 mmol/L

zásady dodržení objemu odebraného vzorku (minimum 0,5 ml) a použití korekčního faktoru ředění u zkumavek s kapalnými formami inhibitoru.

Z řady experimentů je vidět nedostatečná srovnatelnost výrobců různých odběrových systémů. Opakovaně byla pozorována diference mezi systémy Venosafe Terumo vs. Glucomedica Greiner, kdy hodnoty Terumo jsou o 3,2 až 3,8 % nižší [8]. Naopak shoda výsledků Sarstedt GlucoEXACT (kapalné aditivum) a Venosafe Terino (pevné aditivum byla velmi dobrá [10, 11].

Na konci roku 2015 udávalo 48 % účastníků kontrolního programu SEKK (cyklus AKS 4/15), že měří glukózu nalačno ve 48 % případů v séru, ve 44 % v plasmě po odběru do NaF a pouze 2 % účastníků používalo odběr do plasmu s reálně účinným inhibitorem citrát-NaF.

Nestabilita hodnot glukózy u séra, způsobená glykolýzou v intervalu mezi odběrem a centrifugací, je však značná. Zhang a spol. našli úbytek glukózy po 10 hodinách -13,4 %, zatímco při odběru do citrátu-NaF šlo o pouze -2 % [12].

V důkladné studii chorvatských autorek byl kvantifikován úbytek glukózy vlivem glykolýzy - 1,6 % po třech hodinách při použití Glucomedica Greiner (NaF/citrát), zatímco u séra to bylo -12 %. U séra byl pozorován významný úbytek už po jedné hodině o -6 % [13].

Nové generace odběrových zkumavek firmy Becton-Dickinson mají za cíl maximálně zkrátit dobu srážení u séra (Vacutainer RST) nebo dobu získání kvalitní Li heparinové plasmu (Barricor). Obojí by mohlo hrát významnou roli při redukci doby, v níž probíhá glykolýza. Například při použití séra, získaného odběrem do zkumavek BD RST (srážení po 5 minut) byl vliv glykolýzy v porovnání s odběrem do BD SST (srážení 30 minut) průkazně potlačen [14]. Možnost získat plasmu do tří minut u zkumavek BD Barricor by mohla vyloučit potřebu přidavku antiglykolytického aditiva při odběru.

Harmonizace odběrové části preanalytické fáze u měření plasmatické glukózy optimalizací času mezi odběrem a centrifugací a inhibicí glykolýzy vede k významnému zvýšení koncentrací glukózy. Následně vzniká problém, zda a jak mnoho se změní velikosti současných diagnostických kritérií. Švédští autoři našli zvýšení počtu výsledků plasmatické glukózy nad 6,1 mmol/l u velkého souboru výsledků (461 000) ze 48 % na 55 % [15]. K požadavku nutnosti revize hodnot diagnostických rozhodovacích limitů dospěli i další autoři. Jedna skupina pozorovala nárůst počtu výsledků nad 5,6 mmol/l (prediabetes) z 27 % na 45 % a výsledků nad 7 mmol/l (diabetes) z 18 % na 23 % [9]. Jiní autoři odhadli zvýšení prevalence diabetu při odběrech do zkumavek Greiner Glucomedics o 10,6 % [16]. Závěrem další studie je naléhavý, ale kvantitativně nespecifikovaný požadavek na změnu hodnot rozhodovacích limitů [17].

Závěry renomovaných autorů nabádají však k opatrnosti při realizaci této změny a ke spolupráci s diabetology a internisty [18] a upozorňují, že není k dispozici jednoduchý způsob, jak tuto změnu realizovat [19]. Nicméně harmonizovat odběr vzorku plasmatické glukózy nalačno je nezbytné bez odkladu a v tomto smyslu by měly být aktualizovány i texty příslušných doporučení.

V kontextu s problémy neharmonizované preanalytické fáze a z ní plynoucí nejistoty hodnot rozhodovacích limitů lze lépe pochopit před časem publikovaný, o 46 % nižší počet nediagnostikovaných pacientů při diagnóze pomocí glukózy ve srovnání s diagnózou pomocí HbA_{1c} [20].

Závěr

Standardizace měření glukózy v plasmě musí být nezbytně doprovázena harmonizací preanalytického procesu a teprve pak se vytvoří podmínky i pro harmonizaci postanalytické, interpretační fáze, a tím i pro potřebnou translaci laboratorních výsledků do klinického procesu.

Nové, optimistické, inovativně bohaté postupy, založené na převratných analytických technologiích připravují budoucnost medicíny. Nemělo by se však zapomínat na nedostatky, které za sebou zanechávajíme z minulých období.

Literatura

- Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care* 2017, 40, S1-S-135
- <http://www.nist.gov/srm> (available in August 2016).
- Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *NACB* 2011. Přístupné na <http://www.aacc.org>
- Muller-Wieland, D., Petermann, A., Nauck, M., Heinemann, L., Kerner, W., Muller, U. A., Landgraf R.** *Diabetologie* 2016, 11(Suppl 2), p. 578-581
- Doporučení ČSKB-CDS. Diabetes mellitus: laboratorní diagnostika a sledování stavu u pacientů - 2016. Přístupné na <http://www.cskb.cz>
- Stahl, M., Joergensen, L. G., Hyltoft Petersen, P., Branslund, I., de Fine Oliverius, N., et al.** Optimization of preanalytical conditions and analysis of plasma glucose. 1. Impact of new WHO and ADA recommendations on diagnosis of plasma glucose. *Scand. J Clin. Lab. Invest.*, 2001, 61, p. 169-179
- Gambino, R.** Glucose: a simple molecule that is not simple to quantify. *Clin. Chem.*, 2007, 53, p. 2040-2041.
- Montagnana, M., Lippi, G.** Overcoming preanalytical issues for diagnosing diabetes with fasting plasma glucose. *Ann. Transl. Med.*, 2017. doi:21037/atm.2017.05.19.
- Pasqualetti, S. et al.** Pre-analytical and analytical aspects affecting clinical reliability of plasma glucose results. *Clin. Biochem.*, 2017, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmbiochem-2017.03.009>.
- Bonetti, G., Cancelli, V., Cocoli, G., Brognoni, D., Caimi, L., Carta, M.** Which sample tube should be used for routine glucose determination? *Prim. Care Diabetes*, 2016, 10, p. 227-232
- Fobker, M.** Stability of glucose in plasma with different anticoagulants. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2014, 52, p. 1057-1060.
- Zhang, X., Rong, C., Li, H., Ruin, X., Li, S., Chen, P.** Glucose stability study: NaF/citrate plasma vs serum. *Clin. Lab.*, 2016, 62, p. 389-393.
- Juricic, G., Bakliza, A., Saracevic, A., Kopicinovic, M., Dobrievic, S., Dmic, S.** Glucose is stable during prolonged storage in un-centrifuged Greiner tubes with

- liquid citrate buffer, but not in serum and NaF/KOx tubes. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2016, 54, p. 411-418
14. **Kocijancic, M., Cergonija, J., Pelic-Knezevic, A.** Evaluation of the BD Vacutainer RST blood collection tube for routine chemistry analytes: clinical significance of differences and stability studies. *Biochem. Med. (Zagreb)* 2014, doi.10.11613/BM.2014.039.
 15. **Ridefelt, P., Akerfeldt, T., Helmussa-Karlqvist, J.** Increased plasma glucose levels after change of recommendation from NaF to citrate blood collection tubes. *Clin. Biochem.* 2014, 47, p. 625-628
 16. **Juricic, G., Kopicinovic, L. M., Saracevic, A., Bakliza, A., Simundic, A. M.** Liquid citrate acidification introduces significant glucose bias and leads to misclassification of patients with diabetes. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2016, 54, p. 363-371.
 17. **Norman, M., Jones, I.** The shift from fluoride/oxalate to citric acid/fluoride blood collection tubes for glucose testing-the impact upon patient results. *Clin. Biochem.*, 2014, 47, p. 683-685.
 18. **Pasqualetti, S., Panteghini, M.** Clinical impact of glycolysis inhibition on plasma glucose results requires caution. *Ann. Clin. Biochem.*, 2017, 54, p. 302-303
 19. **Gambino, R., Bruns, D. E.** Stabilization of glucose in blood samples: out with the old, in with new. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2013, 51, p. 1883-1885.
 20. **Nielsen, A. A., Hyltoft Petersen, P., Christensen, C., Christensen, H., Branslund, I.** Changing from glucose to HbA1c for diabetes diagnosis: predictive values of one test and importance of analytical bias and imprecision. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2014, 52, p. 1069-1077.

Do redakce došlo 14. 7. 2017

Adresa pro korespondenci
RNDr. Bedřich Friedecký, Ph.D.
Střelnická 1680
182 00 Praha 8
e-mail: friedecky@sekk.cz