

## Změny v laboratorní diagnostice a při sledování diabetu

Friedecký B.<sup>1,2</sup>, Vávrová J.<sup>1</sup>, Kratochvíla J.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ÚKBD LF UK a FN Hradec Králové

<sup>2</sup> SEKK Pardubice

### SOUHRN

Článek poskytuje stručné recentní literární informace o závažných změnách, ke kterým dochází v současné době při laboratorní diagnostice a sledování diabetu. Týká se změn v postanalytické fázi glukózy a glykovaného hemoglobinu. U plazmatické glukózy nalačno jsou popsány přetrvávající problémy s nestabilitou analytu ve vzorcích krve a problémy s kritérii způsobilosti laboratoří v programech externích hodnocení kvality. Jsou komentovány názory na nedostatečnou kvalitu glukometrů při sledování diabetiků a jiných pacientů v kritickém stavu. Je zmíněna nadějná možnost monitorování glukózy minimálně invazivními metodami s aplikací podkožních senzorů. U glykovaného hemoglobinu je shrnut současný stav standardizace, návaznosti a vydávání výsledků měření. Je uvedena informace o nové roli HbA<sub>1c</sub> jako nástroje laboratorní diagnostiky diabetu. U obou analytů je zhodnocena současná úroveň jejich analytického měření a kritéria analytické způsobilosti klinických laboratoří. Publikace je zamýšlena jako pramen informací pro pracovníky laboratoří, oddělení, ambulancí a také jako zdroj dat k případné inovaci soudobého již zastaralého doporučení o laboratorní diagnostice a terapii diabetu.

*Klíčová slova:* glukóza, HbA<sub>1c</sub>, diagnostika diabetu, sledování pacientů.

### SUMMARY

**Friedecký B., Vávrová J., Kratochvíla J.: Laboratory diagnostic changes in diabetes**

Short communication deals with recent information on significant changes in diagnosis and managing the diabetes. Instability of sample for measurement fasting plasma glucose, different and unsuitable criteria for external quality assessment, low analytical quality of personal glucometers and possibilities for continual monitoring the glucose in interstitial fluid are objectives of presentation. New measurement units after finished standardization and newly proposed using the HbA<sub>1c</sub> as diagnostic tool for diabetes are introduced. By means of results in some EQA schemes are also demonstrated levels of precision, bias and state of used control limits.

*Key words:* glucose, HbA<sub>1c</sub>, diagnosis of diabetes, patients monitoring.

V roce 2003 bylo uveřejněno a v roce 2005 aktualizováno Doporučení o laboratorní diagnostice a sledování diabetu jako společný dokument České společnosti klinické biochemie ČLS JEP a České diabetologické společnosti ČLS JEP; jeho text je přístupný na <http://www.cskb.cz> a v tištěné formě publikovaný o rok později [1]

Roky poté přinesly řadu zásadních změn v laboratorní diagnostice a sledování diabetu.

Nejpodstatnější jsou ty, které se týkají plazmatické (sérové) glukózy a glykovaného hemoglobinu HbA<sub>1c</sub>. Cílem sdělení je shrnout aktuální stav v analytice a interpretaci těchto dvou analytů, a podat tak včasnou informaci o závažných změnách u klíčových laboratorních vyšetření diagnostiky a terapie diabetu. Nepřetržitě a včasné sledování vývoje a trendů diagnostiky této typické „civilizační“ choroby si vynucuje neustále se zvyšující počet osob diabetem postižených. Data NHANES (National Health and Nutrition Examination Study) uvádějí v roce 2006 pro populaci USA 7,7 % diagnostikovaných diabetiků, 5,1 % diabetiků nedagnostikovaných a 29,5 % osob s aktuálním rizikem diabetu v populaci. Ve srovnání s rokem 2002 je celkový počet souboru takových jedinců o 20 % vyšší [2]. Tato čísla je možno bez přehánění považovat za otřesná.

### Glukóza nalačno v plasmě – stabilita a požadavky na analytickou kvalitu

Interpretace výsledku měření plazmatické glukózy nalačno (FPG) při diagnostice diabetu je stále zatížena některými nevyřešenými problémy. Jak píše Gambino ve své publikaci z konce roku 2007: „kvantifikace této jednoduché molekuly není jednoduchá“ [3]. Podle výsledků klinických studií, jejichž cílem bylo odhadnout vztah mezi hodnotou plazmatické glukózy nalačno (fasting plasma glucose – FPG) a rizikem vzniku diabetu, zvýšení FPG o 0,28 mmol/l (z 4,55 na 4,83 mmol/l) údajně zvýší riziko diabetu typu II téměř dvojnásobně.

Běžně se za standardní způsob zabezpečení stability glukózy ve vzorcích krve pro měření FPG považuje její odběr do NaF, obvykle v kombinaci s EDTA. Nestabilita glukózy ve vzorku krve obsahujícího NaF a bez něj je však v první hodině po odběru stejná a pokles glukózy se pohybuje mezi 5–7 %, bez ohledu na přítomnost nebo nepřítomnost NaF. To představuje u kritické koncentrace plazmatické glukózy 5,6 mmol/l, považované za hranici mezi standardním a zvýšeným rizikem diabetu, hodnotu 0,28–0,39 mmol/l, tedy významně vyšší hodnotu než údajně prognosticky kritické zvýšení FPG 0,28 mmol/l. V literatuře doporu-

čovaný způsob zábrany glykolýzy vložením zkumavky s odebranou krví do ledové tříště je v rutinní praxi v podstatě neproveditelný.

Je ironií osudu, že antiglykolytická směs, bezpečně inhibující glykolýzu ihned, a bránící tak počátečnímu poklesu glukózy v čase, již řadu let existuje, je dokonce na trhu (odběrové zkumavky pro glukózu Terumo), ale není v obecném používání ani povědomí. Tato směs obsahuje kromě obvyklých složek NaF a EDTA ještě citrát sodný a kyselinou citronovou [4].

Dalším problémem stanovení glukózy je velká různost kontrolních limitů hodnocení způsobilosti laboratoří v programech externího hodnocení kvality a tím i jejich hodnocení v akreditačních procesech. Existují programy EHK s kontrolním limitem 6% (Labquality, Finsko), vedle programů s kontrolním limitem 10% (CLIA/CAP USA, Austrálie/RCPA, ČR/SEKK) a také program, který používá hodnotu 15% (RILIBA/EK/DGKL). Pro potřeby měření FPG existuje definovaný systém návaznosti s dobře validovanými existujícími referenčními materiály a metodami. Jsou tedy vytvořeny podmínky pro používání cílových hodnot, získaných s použitím referenčních metod měření. Zatímco programy EHK (Labquality, DGKL, SEKK, RCPA) je skutečně používají, v největším programu EHK USA CAP (College of American Pathologists) je hodnocení způsobilosti měření glukózy v klinické laboratoři prováděno ve stejnorodých skupinách, do nichž jsou laboratoře rozděleny podle použitého reagenčního kitu a měřicí instrumentace. V důsledku takového přístupu lze např. v konkrétním kontrolním cyklu považovat za způsobilé laboratoře, které dosahují výsledků v intervalu 7,75–8,91 mmol/l [3]. V tomto případě se toleruje diference 1,16 mmol/l, která je mnohonásobně vyšší, než je uvedená hodnota 0,28 mmol/l.

Ignorování cílových hodnot získaných referenčními postupy měření znamená rezignaci na verifikaci návaznosti a pravdivosti bias výsledků měření a jak se zdá, zpětně ústí do určité ztráty důvěry diabetologů ve schopnost vyšetření glukózy diagnostikovat diabetes.

## Glukóza jako nástroj sledování stavu diabetiků

Otázka sledování diabetu pomocí osobních glukometrů, a to jak při samosledování diabetiků, tak i při sledování pacientů s diabetem nacházejících se v kritickém zdravotním stavu [5, 6], zůstává problematická. Stále je k dispozici málo typů glukometrů se zárukou dostatečné analytické kvality. Následkem toho jsou kritéria kvality pro osobní glukometry stále příliš benevolentní. Toleruje se odchylka  $\pm 20\%$  (respektive  $\pm 0,83$  mmol/l pro koncentrace pod 4,3 mmol/l) od hodnoty získané v klinické laboratoři [7]. Řízení léčby kritických pacientů pomocí glukometrů o takové analytické kvalitě může vést ke komplikacím (hypoglykémie), a dokonce i k formulování nesouhlasných cílových terapeutických hodnot v různých studiích [5].

Velkou budoucnost lze očekávat od metod kontinuálního sledování glukózy pomocí podkožních senzorů, měřících glukózu v intersticiální tekutině. Pokročilé soudobé systémy mohou pracovat s velkým množstvím dat získaných v průběhu dostatečně dlouhých časových intervalů a po vyhodnocení poskytovat mnohem podrobnější informace o stavu pacienta a o případné změně terapeutické intervence. Výhodou je i systém alarmů varující před možnými komplikacemi (např. hypoglykemií). K vyhodnocování výsledků bude výhledově možné využívat metod telemedicíny [6]. Senzory jsou také součástí některých druhů inzulínových pump. Limitujícím faktorem je bezesporu potřeba periodické kalibrace takového systému na „dobrý“ osobní glukometr, tedy častá potřeba kalibrace na nedostatečně spolehlivou referenci. Nicméně i tak se některé systémy tohoto druhu osvědčují natolik, že jejich používání je oficiálně schváleno jak pro nemocniční péči, tak i pro samosledování diabetiků. Lze uvést systémy Guardian Real-Time Minimed a další [8].

## Glykovaný hemoglobin a jeho standardizace

Ukončený proces celosvětové standardizace je písemně zafixován ve dvou základních, obecně dostupných dokumentech. Prvním je společné stanovisko (Consensus statement) Americké diabetické asociace (ADA), Evropské asociace pro studium diabetu (EASD), Mezinárodní federace klinické chemie a laboratorní medicíny (IFCC a Mezinárodní federace pro diabetes (IDF), publikované v časopise Diabetes Care [9] a dostupné na [www.ifcc.org](http://www.ifcc.org). Druhým dokumentem, který v podstatě akceptuje stanovisko diabetologů a klinických chemiků, je dokument producentů laboratorních diagnostik (10), dostupný rovněž na [www.ifcc.org](http://www.ifcc.org) (Implementation of standardization of HbA<sub>1c</sub>).

Podle obou těchto mezinárodně schválených stanovisek je jedinou akceptovatelnou jednotkou měření HbA<sub>1c</sub> mmol/mol HbA<sub>1c</sub>. Pokud použije laboratoř staré kalibrace NSGP (National Serum Glycated), pak se výsledky získané v % NGSP na jednotku mmol/mol dodatečně přepočtou podle známé „master equation“, používané k tomuto účelu už řadu let. V České republice, kde je standardizace metody IFCC platná již téměř šest let a povinnost používat SI jednotek dána zákonem od roku 1980, stačí pro přepočet dosavadních výsledků na standardizované SI jednotky velmi jednoduchý vztah:

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

**Schválený konsenzus mezinárodních organizací [9] počítá při vydávání výsledků HbA<sub>1c</sub> v SI jednotkách mmol/mol se zaokrouhlováním číselných hodnot na celá čísla.**

Hitem sezony je snaha používat k samosledování diabetiků namísto glukózy POCT zařízení pro měření HbA<sub>1c</sub>. Dosavadní zjištěná data však ukazují, že systémy POCT pro HbA<sub>1c</sub> prozatím nedosahují potřebné přesnosti měření, vykazují významné hodnoty bias vůči laboratorním standardizovaným metodám a vysokou variabilitu výrobních šarží reagentů [11].

## HbA<sub>1c</sub> jako nástroj diagnostiky diabetu

Zcela nově se HbA<sub>1c</sub> stává mimo ukazatele kompenzace pacienta také ukazatelem diagnózy diabetu. Autory doporučení jsou experti ADA (American Diabetes Association), EASD (European Association for the Study of Diabetes) a IDF (International Diabetes Federation). Jako důvody doporučení jsou uváděny: úroveň standardizace měření, zajišťující potřebnou analytickou úroveň kvality a srovnatelnosti výsledků; vysoká stabilita analytu ve vzorku po odběru; nepatrné ovlivnění věkem a pohlavím a velmi příznivá hodnota intraindividuální biologické variability ve srovnání s glukózou [12, 13]. HbA<sub>1c</sub> vykazuje intraindividuální variabilitu 1,9%, zatímco glukóza nalačno 5,7%. Rozhodovací limity HbA<sub>1c</sub> pro diagnózu diabetu byly publikovány [12] (po zaokrouhlení na celá čísla) následovně:

- Nediabetici < 42 mmol/mol
- Diabetes > 47 mmol/mol
- Zvýšené riziko 42–47 mmol/mol

Podle očekávání bylo doporučení o diagnostice diabetu pomocí HbA<sub>1c</sub> záhy podrobena kritice [14]. Kritika nového doporučení poukazuje na vysoké riziko falešně snížených hodnot HbA<sub>1c</sub> v případech hemoglobinopatií, hemolytických anémií, chronických infekčních stavů a ledvinových chorob. Naopak nebezpečí falešně snížených hodnot lze očekávat u některých etnik (např. afrokaribské) a u lidí nad 70 let. Je poukazováno na nedostatek studií, na nichž je doporučení založeno. Jde o tři studie, sledující riziko retinopatií, při nichž však vždy vyšší klinickou efektivitu než HbA<sub>1c</sub> vykazovaly hodnoty postprandiální (po 2 hodinách) plazmatické glukózy. Námitky jsou závažné a k problému lze očekávat ještě velkou diskusi.

## Současný stav analytické kvality měření glukózy

### Reprodukovatelnost měření glukózy v séru klasickými laboratorními metodami (hodnoty CV%)

- SEKK (2009) 2,1–2,7 %
- DGKL (2009) 3–4 %
- CAP (2003) 3–5 %
- Centre of Biomedical Research (Itálie 2008) 3,8 %

### Bias měření glukózy v séru klasickými laboratorními metodami

- SEKK, DGKL do 2 %
- CAP do 4 %

Nejsou signifikantní rozdíly mezi metodami založenými na různých měřících principech. Nejsou ani signifikantní rozdíly dané použitím lyofilizovaných kontrolních materiálů a směsi nativních sér dárců krve použitých v experimentu CAP.

### Kontrolní limity pro hodnocení způsobilosti u glukózy

Finský cyklus Labquality používá kontrolní limit 6 %, účastníci AKS 3/09 vyhodnocení podle tohoto kritéria dosáhli úspěšnost 86 %. Kontrolní limit odvozený z biologických variabilit je 6,6 %. Při jeho použití byla hodnota

úspěšnosti 90%. Stejně úspěšnosti bylo dosaženo také v italském kontrolním programu CBR (Center for bioanalytical research, prof. M. Plebani).

Standardní 10% kontrolní limit používaný ve většině světových programů EHK poskytl úspěšnost 99%. Kontrolní limit 10% je možné považovat za nevhodně benevolentní a bez motivujícího efektu v procesu zlepšování kvality.

## Současný stav analytické kvality měření HbA<sub>1c</sub>

V roce 2009 se v programu EHK SEKK pohybovala reprodukovatelnost měření u metod HPLC v intervalu CV% = 3,1–4,4 a u imunochemických metod v intervalu 4,7–6,4. Systematické difference mezi metodami HPLC a imunochemickými metodami byly v roce 2009 -3,4 až -7,3 %.

V programu EHK Centre of Bioanalytical Research (Itálie) byla průměrná hodnota reprodukovatelnosti CV% = 3,2.

Bias (jako difference průměru od cílových hodnot RMP) zjištěný v italském programu Centre of Bioanalytical Research v roce 2008 byl:

- u metod HPLC -3,4 % až 0,7 %,
- u imunochemické metody Roche 5,1–8,5 %,
- u imunochemické metody Olympus 8,3–14,4 %.

Hodnoty bias v kontrolním systému IFCC pro referenční laboratoře (RELA) se pohybovaly kolem hodnoty 1 %.

Kontrolnímu limitu 4,3 %, odvozenému z biologických variací, odpovídala v roce 2008 úspěšnost cca 75% (Centre of Bioanalytical Research).

## Závěr

- Stabilita vzorků krve k stanovení plazmatické glukózy nalačno je neuspokojivá a vyžaduje změnu složení antiglykolytického činidla přidáním citrátu sodného a kyseliny citronové.
- K hodnocení způsobilosti klinických laboratoří v programech EHK je u glukózy i HbA<sub>1c</sub> nezbytné používat cílové hodnoty získané referenčními metodami.
- V konfrontaci se současným stavem analytických parametrů měření glukózy a HbA<sub>1c</sub> jsou současně používané kontrolní limity příliš benevolentní bez motivačního efektu.
- Jedním z důsledků dokončené standardizace HbA<sub>1c</sub> je potřeba vydávat výsledky v SI jednotkách mmol/mol.
- Sledování diabetiků a pacientů v kritických stavech ukazuje přetrvávající nedostatek analytické kvality glukometrů.
- Používání podkožních senzorů měřících glukózu v intersticiální tekutině je v kombinaci s telemetrickým přenosem dat a případně inzulinovými pumpami pro sledování stavu diabetiků perspektivní.
- Doporučení o diagnostice a sledování pacientů s diabetem bude nutné velmi podstatným způsobem přepracovat.

## Literatura

1. **Friedecký, B., Buryška, J., Franeková, J., Jabor, A., Pelikánová, T., Škrha, J., Vávrová, J.** Diagnostika a sledování diabetes mellitus. *Klin. Biochem. Metab.*, 2006, 14, p. 54–65.
2. New study growing burden of diabetes. *Clinical Laboratory News*, 2009, 35, p. 5.
3. **Gambino, R.** Glucose: a simple molecule that is not simple to quantify. *Clin. Chem.*, 2007, 53, p. 2040–2041.
4. **Gambino, R., Piscitelli, J., Aekattupathil, T. A., Therient, J. L., Andrin, R. D. et al.** Acidification of blood is superior to sodium fluoride alone as an inhibitor of glycolysis. *Clin. Chem.*, 2009, 55, p. 1019–1021.
5. **Sacks, D. B.** Tight glucose control in critically ill patients: should glucose meter be used? *Clin. Chem.*, 2009, 55, p. 1580–1583.
6. **Montagnana, M., Caputo, M., Giavarina, D., Lippi, G.** Overview on self-monitoring of blood glucose. *Clin. Chim. Acta.*, 2009, 402, p. 7–13.
7. ISO 15197 (2003). *In vitro diagnostic test systems-requirements for blood glucose monitoring systems for self-testing in managing diabetes mellitus.*
8. **Petersen, K.** Invasivní a neinvazivní metody kontinuálního monitorování koncentrace glukosy. *FONS*, 2008, 2, p. 12–17.
9. Consensus statement on the worldwide standardization of the hemoglobin A<sub>1c</sub> measurement. *Diabetes Care*, 2007, p. 302399–302400. Dostupné na: [www.ifcc.org](http://www.ifcc.org)
10. *Implementation of standardization of HbA<sub>1c</sub> measurement.* Summary of the meeting with manufacturers held in Milan, Italy, Dec. 12, 2007. Dostupné na: [www.ifcc.org](http://www.ifcc.org)
11. **Lanters-Westra, E., Slingerland, R. J.** Six of 8 hemoglobin A1c point-of-care instruments do not meet the general accepted analytical performance criteria. *Clin. Chem.*, 2010, 56, p. 44–52.
12. International expert committee report on the role of the A<sub>1c</sub> assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*, 2009, 32, p. 1–7.
13. **Sacks, D. B.** The diagnosis of diabetes is changing: how implementation of hemoglobin A<sub>1c</sub> will impact clinical laboratories? *Clin. Chem.*, 2009, 55, p. 1612–1614.
14. **Kilpatrick, E. S., Bloomgarden, Z. T., Zimmet, P. Z.** International expert committee report on the role of the A<sub>1c</sub> assays in the diagnosis of diabetes. Response to the international expert committee. *Diabetes Care*, 2009, 12, p. c159
15. **Miller, G. W., Myers, G. L., Ashwood, E. R., Killeen, A. A., Wang, E. et al.** State of art in trueness and interlaboratory harmonization for 10 analytes in general clinical chemistry. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 2008, 132, p. 838–846.

Práce byla podpořena výzkumnými záměry MZO 00179906.

Do redakce došlo 24. 11. 2009.

Adresa pro korespondenci:  
RNDr. Bedřich Friedecký, Ph.D.  
ÚKBD LF UK a FN  
Sokolská 581  
500 05 Hradec Králové  
e-mail: [friedecky@sekk.cz](mailto:friedecky@sekk.cz)