Diabetes mellitus - laboratorní diagnostika a sledování stavu pacientů

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

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

Obsah

1.Zkratky....1
2.Stanovení glukózy jako nástroje pro určení diagnózy diabetes mellitus....5
3.Glykovaný hemoglobin A1c - nástroj sledování průběhu léčby diabetu mellitu....7
4.Sledování stavu diabetiků měřením glukózy osobními glukometry....9
5.Albumin v moči....10
6. Koncentrace glukózy v moči....12
7.Koncentrace ketolátek v moči a krvi....12
8.Glukózový toleranční test (OGTT)....13
9.C-peptid a inzulin....14
10.Autoprotilátky....15
11.Genetické ukazatele....16
12.Literatura....16
Příloha 1 Doporučení ČDS a ČSKB....20
Příloha 2 Doporučení ČDS a ČSKB....22

1. Zkratky

ACE-I	Inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu
ACR	albumin-creatinine ratio (Albumin-kreatininový poměr)
ADA	American Diabetes Association (Americká diabetologická společnost)
B	Bias (vychýlení měření – hodnota odhadu systematické chyby měření)
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
ČDS	Česká diabetologická společnost ČLS JEP
ČSKB	Česká společnost klinické biochemie ČLS JEP
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)
HbA1c	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 zřeďováním)
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)
ISO	International Organization for Standardization (Mezinárodní organizace pro normalizaci – vydává mezinárodní normy)
ISPAD	International Society for Pediatrics and Adolescent Diabetes (Mezinárodní společnost pro diabetes v pediatrii a u adolescentů)
K	Koeficient rozšíření
K2EDTA	Draselná sůl kyseliny etyléndiaminotetraoctové
LC-MS/MS	Liquid Chromatography / Tandem Mass Spectrometry (Kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií)
NGSP	National Glycohemoglobin Standardization Program (Národní program pro standardizaci glykovaného hemoglobinu HbA1c v USA)
OGTT	Glukózový toleranční test
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
WHO	World Health Organization (Světová zdravotnická organizace)

2. Stanovení glukózy jako nástroje pro určení diagnózy diabetes mellitus

Koncentrace FPG je nástrojem pro:

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

Diagnostická kritéria diabetu [1, 2, 3]

- Kombinace klinických symptomů s náhodným stanovením koncentrace glukózy v plazmě ≥ 11,1 mmol/l.
- Koncentrace glukózy v plasmě na lačno ≥ 7,0 mmol/l.

- Koncentrace glukózy v plazmě při orálním glukózovém tolerančním testu ≥ 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 – viz 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 označovaný jako Impaired Fasting Glucose (IFG, též hraniční koncentrace glukózy na lačno - HGL), který se spolu s Impaired Glucose tolerance (IGT), nazývá také jako prediabetes.

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

FPG = 1,11 · B-glukóza	jestliže je vzorek krve před analýzou ředěn hemolyzačním nebo deproteinačním činidlem
FPG = 0,94 · B-glukóza	jestliže je vzorek krve měřen bez ředění

Z dostupných informací nelze zcela jednoznačně určit, zda mezi hodnotami koncentrací glukózy v séru a plazmě jsou významné systematické rozdíly. Naprostá většina literárních dat považuje obě hodnoty 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 části 8.

Rozhodovací meze

FPG [mmol/l]	***Interpretace***
< 5,6	Vyloučení diabetu mellitu.
5,6 až 6,9	Zvýšená FPG (IFG, prediabetes).
≥ 7,0	Diabetes mellitus (nutno potvrdit opakovaným měřením).

Nejistota výsledků měření
Dílčími složkami nejistoty, které musí být vzaty do úvahy při hodnocení výsledku měření jsou:

- nejistota preanalytických procesů (odběr, skladování, transport do laboratoře)
- dlouhodobá preciznost analytických měření
- bias analytických měření

I při dosažení požadovaných analytických ukazatelů (viz výše) a při předpokladu natolik optimalizovaného preanalytického procesu, že jeho variabilita nepřesahuje hodnotu CV = 1,0 %, nelze předpokládat, že kombinovaná rozšířená (k = 2) nejistota měření U_c poklesne pod 7,0 %. 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.

Preanalytické podmínky

Materiál:	Žilní krev
Odběr:	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 nádobky s obsahem inhibitoru glykolýzy. Obvyklou kombinací pro zisk 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 vodní tříští. Praktičtější alternativou je odběr do antiglykolytického činidla obsahujícího kromě fluoridu a EDTA i citrát sodný (k dosažení pH 5,7).
Oddělení plazmy od krevních elementů:	Co nejrychlejší,maximálně do 60 minut
Transport do laboratoře:	Okamžitý

Požadavky na analytickou kvalitu měření

Mezilehlá preciznost	CV < 2,5 %
Pravdivost (bias)	b < 2,0 %
Celková chyba	TE < 6,9 %
Metrologická návaznost výsledků měření	**Referenční metody** měření FPG jsou založeny na principu ID-GC(LC)/MS. Referenční metody slouží ke stanovení hodnot glukózy v referenčních materiálech, používaných ke kalibraci rutinních metod měření. **Certifikované referenční materiály** mají hodnoty koncentrace glukózy stanovené referenční metodou - 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 **kalibrátory**, jejichž výrobci jsou schopni dokumentovat v souladu se Direktivou 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 IDGC/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 % [9] pokud jsou provedena dvě nezávislá měření u jednoho pacienta.

Požadavky na průkaz analytické způsobilosti

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

3. Glykovaný hemoglobin A_{1c} - nástroj sledování průběhu léčby diabetu mellitu

Koncentrace HbA_{1c} v krvi je považována za rutinní a nejefektivnější 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.

Jednotky měření

Jednotkou měření je **mmol/mol.** Výsledky se vydávají obvykle jako celočíselné hodnoty.
Přepočtové vztahy pro výsledky uvedené v jiných jednotkách [19]:

Přepočet z jednotky % IFCC (byla v ČR používána do 31.12.2011) na jednotku mmol/mol:

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

Přepočet z jednotky % NGSP/DCCT (odvozená jednotka % NGSP/DCCT zůstává i nadále v platnosti a používá se zejména v USA. V ČR tato jednotka není používána od 1.1.2004) na jednotku mmol/mol:

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

Nejistota výsledků měření

Hodnota intraindividuální biologické variability CV_i = 1,9 % je významně nižší, než u FPG. Na základě kombinace dílčích nejistot odpovídajících preciznosti, hodnotě bias a hodnotě CV_i lze odhadnout výslednou kombinovanou nejistotu výsledku měření (odpovídající 95% intervalu spolehlivosti) na 6 až 9 %.

Rozhodovací meze

HbA_{1c} [mmol/mol]	***Interpretace***
20 až 42	Referenční interval (dospělí, negravidní).
43 až 53	Kompenzovaný diabetes (dospělí, negravidní).

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.

Preanalytické podmínky

Materiál:	Plná krev odebraná ze žíly nebo kapilární krev odebraná po vpichu z prstu jsou rovnocenné materiály.
Odběr:	Odběrové nádobky obsahují antikoagulační činidlo, obvykle 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. U uremických pacientů dochází ke karbamylaci, která působí silné interference při měření HbA_{1c} v závislosti na použité metodě a přístroji.
Skladová	Maximálně 1 týden při +4 °C.

ní:	Maximálně 6 měsíců při -20 °C. Maximálně 1 rok při -80 °C.

Požadavky na analytickou kvalitu měření

Mezilehlá preciznost	CV < 3,0 %
Pravdivost (bias)	b < 2,0 %
Celková chyba	TE < 8,6 %
Metrologická návaznost výsledků měření	Rutinní metody měření mají vykazovat metrologickou návaznost na referenční metodu IFCC [7, 8,9]. Referenční metoda IFCC je založena na principu HPLC/MS nebo alternativně HPLC/CE. **Certifikované referenční materiály** mají hodnoty HbA_{1c} stanovené referenční metodou - disponují certifikovanými hodnotami HbA_{1c} včetně nejistoty této hodnoty a mají být testované na komutabilitu (má být prokázáno, že vlivy matrice jsou minimalizovány - zanedbatelné). 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. To značí, že kalibrátory rutinních metod mají mít dokumentovanou metrologickou návaznost na referenční metodu. Výrobci mají uvádět rovněž nejistoty hodnot těchto kalibrátorů. Metrologická návaznost pracovních kalibrátorů má být ustanovena pomocí referenčních materiálů IRMM CRM 466 a CRM 467.

Hodnoty preciznosti a bias jsou odvozeny z hodnot biologických variabilit.

Požadavky na průkaz analytické způsobilosti

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

4. Sledování stavu diabetiků měřením glukózy osobními glukometry

Koncentrace glukózy v kapilární krvi, stanovená pomocí osobního glukometru, je nástrojem sledování stavu všech diabetiků závislých na inzulinu (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.

Základní požadavky na glukometry

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]. Základní analytické požadavky na glukometry lze shrnout následovně:

- 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 kalibrovaných tak, aby získané výsledky měření v krvi odpovídaly hodnotám glukózy v plasmě.

- Preferování glukometrů, uvádějících v průvodní dokumentaci základní metrologická data měření (preciznost, maximální bias, měřicí rozsah způsob a možnosti provádění VKK a EHK).

Hodnoty rozhodovacích mezí a četnost měření nejsou striktně definovány.

Preanalytické podmínky

Materiál:	Kapilární krev odebraná po vpichu z prstu.
Omezení:	Vyžaduje se důkladná instrukce a zácvik 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 hypotense pacienta, • použití vzorku krve s obsahem glykolytického inhibitoru. • rozdíly v kvalitě šarží reagenčních čipů (slidů, proužků, cartridge aj.) Soudobá měřící analytická technologie již částečně eliminovala preanalytické chyby pocházející ze špatného dávkování vzorku krve do měřícího prostoru glukometru, ze špatného časování reakce a z nevhodného způsobu odstraňování přebytku vzorku.

Požadavky na analytickou kvalitu měření [12]
Celková chyba měření (odchylka od výsledku laboratoře při měření FPG):

pro koncentrace ≥ 5,6 mmol/l	< 15 %
pro koncentrace < 5,6 mmol/l	< 0,8 mmol/l

Tyto požadavky mohou sloužit jako základní orientace při výběru osobních glukometrů v souladu s doporučeními POCT vypracovanými výborem České společnosti klinické biochemie [13].
Kontroly osobních glukometrů srovnáním s měřením v laboratoři se doporučuje provádět v pravidelných časových intervalech minimálně jednou ročně.

Požadavky na průkaz analytické způsobilosti

- Zavedený a fungující systém vnitřní kontroly kvality.
- Systém zácviku 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].

5. Albumin v moči

Měření koncentrace albuminu v moči diabetiků vykazuje významnou schopnost časné 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 označuje jako *mikroalbuminurie*.
Vyšetřovat mikroalbuminurii je doporučeno 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.
Mikroalbuminurii lze požadovat za prokázanou, jestliže je překročení rozhodovacích mezí dosaženo ve dvou ze tří po sobě následujících vzorcích moči analyzovaných v intervalu 3 – 6 měsíců [1, 2]. Potřeba zvýšeného počtu měření je dána vysokou hodnotou intraindividuální biologické variability albuminu v moči. 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 k stanovení mikroalbuminurie imunochemickými metodami (je překročen pracovní rozsah měření a může dojít k „hook efektu“).

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

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

Rozhodovací meze [14, 15, 16]

Vzorek		***Normální exkrece***	***Mikroalbuminurie***	***Proteinurie***
		ACR [g/mol kreatininu]		
Náhodný vzorek	Muž	< 2,5	2,5 až 30	> 30
	Žena	< 3,5	3,5 až 30	
Časovaný vzorek	**Vylučování albuminu [µg/min]**			
		< 20	20 až 200	> 200
Sběr moči	**Vylučování albuminu [mg/24 hod]**			
		< 30	30 až 300	> 300

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

Preanalytické podmínky

Materiál:	Doporučuje se vyšetření prvního ranního vzorku moče se stanovením poměru albumin/kreatinin (ACR) nebo stanovení v jiném náhodném vzorku moče či ve sběru za krátký časový úsek cca 4 hodiny. Dle mezinárodních doporučení [14] je jednoznačně preferováno použití náhodných, nejlépe ranních (první) vzorků moče. Vyšetření v moči sbírané 24 hodin se nedoporučuje (problematika kvality sběru, fragmentace albuminu, atd.). Při vyšetřování ve vzorku nesbírané moče se doporučuje vyšetřovat poměr albumin/kreatinin (ACR). Při aplikaci jednorázových vzorků jde vždy o vzorky první ranní moče. Vzorek ranní moče je nejvýhodnější neboť v něm poměr albumin/kreatinin koreluje nejlépe s 24 hodinovým vylučováním albuminu. U časovaných

	vzorků se jedná o sběr za 4 hodiny.
Sběr, odběr:	Koncentrace albuminu v moči jsou ovlivňovány akutními chorobnými stavy, infekcí močových cest, zvýšenou fyzickou námahou, zvýšenou koncentrací glukózy v krvi, infekcí GIT, kardiálními chorobami, arteriální hypertenzí. Vyšetření nemá být prováděno při menses. U diabetiků nevykazuje albumin v moči diurnální variabilitu.
Skladování:	Maximálně 1 týden při +4 až +8 °C. Maximálně 1 měsíc při -20 °C (hodnota mírně klesá). Maximálně 6 měsíců při -70 °C.

Požadavky na analytickou kvalitu měření

Mezilehlá preciznost	CV < 15 %
Mez detekce	≤ 10 mg/l
Metrologická návaznost výsledků měření	Jako referenční metoda je navržena LC-MS/MS. Akceptovatelné hodnoty bias mají být zabezpečeny realizací metrologické návaznosti rutinní metody na mezinárodní referenční materiál ERM-DA470k/IFCC, tedy odvozením hodnoty pracovního kalibrátoru porovnáním s materiálem ERM-DA470k/IFCC.

Současné imunochemické metody poskytují výsledky, které jsou dostatečně kvalitní pro diagnostická rozhodování. Imunoturbidimetrie a imunonefelometrie převládá při stanovení albuminu v moči. Další možná metoda je HPLC, která poskytuje o 20 až 30 % vyšší hodnoty než imunoanalytická stanovení. Příčinou může být částečně snížená imunoreaktivita albuminu v moči po exkreci anebo nespecifická eluce albuminu ze separační kolony.

Při pozitivitě celkové bílkoviny v moči testovacím proužkem se stanovení mikroalbuminurie neprovádí (je překročen pracovní rozsah měření a může dojít k „hook efektu“).

Požadavky na průkaz analytické způsobilosti

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

6. Koncentrace glukózy v moči

Stanovení glukózy v moči není doporučeno pro diagnostiku ani pro sledování pacienta s diagnózou DM.

7. 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 (3hydroxybutyrát). 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. 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.

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.

Preanalytické podmínky

Falešně pozitivní výsledky při stanovení v moči mohou být způsobeny:

- silným zbarvením vzorků
- některými léky (například inhibitory ACE)
- poškozením proužků nevhodným zacházením (expozice ovzduším, teplotou 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

Analytické podmínky

Při stanovení ketonů v krvi klasickými testovacími proužky nebo tabletami na bázi nitroprussidové barevné reakce není kyselina β-hydroxymáselná detekována. Jsou však k dispozici metody určené přímo k měření kyseliny βhydroxymáselné v krvi. Měření se provádí alternativně v krvi, séru nebo plasmě. V případě použití plasmy používají různí výrobci různých antikoagulancií. V séru/plasmě je stabilita analytu 1 týden při +4 °C a několik týdnů, skladuje-li se vzorek při -20 °C. Validní data o analytických znacích metody a ukazatelích analytické kvality nejsou dosud k disposici nebo jsou kontroverzní.

8. Glukózový toleranční test (OGTT)

Orální glukózový toleranční test se používá k potvrzení diagnózy diabetes mellitus v případě, že diagnóza není jednoznačně potvrzena nálezem FPG vyšší než 7,0 mmol/l. Jde jednak o stavy IFG (prediabetu) 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 nálezu porušené glukózové tolerance se OGTT opakuje ve dvouletých intervalech.

OGTT se dále používá v těhotenství u skupin se zvýšeným rizikem vzniku diabetu (viz Standardy péče o těhotné s diabetem). V tomto případě se test provádí ve 24. – 28. týdnu gravidity.

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.

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.

OGTT a diagnostika gestačního diabetu

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

- FPG ≥ 5,6 mmol/l
- P-glukóza po 2 hodinách ≥ 7,7 mmol/l

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

Preanalytické vlivy

Biologickým materiálem pro OGTT je plazma žilní krve. V plazmě kapilární krve je za běžných okolností stejná koncentrace glukózy jako v plazmě žilní krve. Avšak po zátěži glukózou činí rozdíl mezi koncentrací glukózy v kapilární a žilní krví 25 % i více. Také mezi koncentracemi glukózy v plné krvi a v plazmě jsou významné (a výše již uvedené) rozdíly. Uvedených hodnot rozhodovacích limitů nemůže být proto použito, je-li při OGTT použito plné žilní krve nebo materiálu získaného kapilárním odběrem. Reprodukovatelnost klasifikace diabetu mellitu pomocí jednoho provedení OGTT se pohybuje v rozmezí pouze 50 až 70 %.

Malabsorpce, nausea a kouření ovlivňují výsledek OGTT.

9. 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 diabetem mellitus. 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.

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]. Pro inzulin byla navržena referenční metoda na principu ID-LC/MS/MS [18].

C-peptid

Preanalytické vlivy	Koncentraci C-peptidu ovlivňuje fyzická zátěž, kouření a užívání biotinu.
Skladování	Maximálně 1 den při teplotě +4 až +8 °C Maximálně 1 měsíc při teplotě -20 °C a vzorek nesmí být opakovaně rozmrazován.
Analytické parametry	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 Cpeptidu na analyzátoru

	Architect ukázaly preciznost 2,1 - 6,5 % a hodnotu recovery 99 -112 % [21]. Jiné údaje o imunochemických stanoveních C-peptidu došly k hodnotám preciznosti 8 – 12 % a chybě měření 25 %.

Inzulin

Preanalytické vlivy	Koncentraci inzulinu ovlivňuje fyzická zátěž, užívání biotinu a hemolýza vzorku. U pacientů léčených inzulinem může docházet při stanovení k nespecifické reakci.
Skladování	Maximálně 1 den při teplotě +4 až +8 °C Maximálně 6 měsíců při teplotě -20 °C Maximálně 2 roky při teplotě -70 °C
Analytické parametry	Bias rutinních metod před standardizací byl vyčíslen jako 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 kitů nad 32 % (což je hodnota odvozená z biologických variabilit) [22].

10. 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 nálezu je riziko vzniku autoimunitního diabetu nízké. Při nálezu více autoprotilátek riziko stoupá až na 90 %. Vysokou výpovědní hodnotu má kombinované vyšetření tří autoprotilátek anti IAA, antiGAD a anti IA-2.

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

Přítomnost autoimunitního původu diabetu podporuje nález protilátek:

- ICA (protilátky proti cytoplazmě β-buněk)
- IAA (protilátky proti inzulinu)
- anti-GAD 65 A (protilátky proti dekarboxyláze)
- IA-2A, IA-2βA protilátky proti tyrosinfosfatáze

Četnost výskytu autoprotilátek u nově diagnostikovaných diabetiků 1. typu je následující:

- ICA 75 až 80 % (0,5 % zdravé populace)
- anti-GAD 70 až 80 % (asi u 10 % pacientů vedených původně jako diabetes 2. typu, u nichž přítomnost protilátek dokládá diabetes 1. typu, označovaný jako LADA)
- IA-2A, IA-2βA 50 %
- IAA u 90 % dětí s diabetem 1. typu do věku 5 let a < 40 % po věku 12 let

Klinická laboratoř stanovující autoprotilátky má mít dobře vypracovaný program vnitřní kontroly kvality a účastnit se programu externího hodnocení kvality akreditovaného dle ISO 17043 (2 účasti ročně). Metodická standardizace není zatím rozvinuta.

K dosažení potřebné úrovně klinické citlivosti a specifičnosti se doporučuje dosažení specifičnosti nad 99 % a dokumentace výsledků externího hodnocení kvality.

Screening tyreopatií

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).

Serologický screening asymptomatické, němé formy celiakie

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 popsaná 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.

Doporučen je screening sérologickými markery celiakie stanovením protilátky ke tkáňové transglutamináze IgA (atTGA-IgA) a stanovení koncentrace IgA k vyloučení deficitu IgA. Pokud existuje deficit, vyšetřují se protilátky ke tkáňové transglutamináze IgG (atTGA-IgG).

Při pozitivním nálezu je doporučeno provedení biopsie tenkého střeva a histologické vyhodnocení, které je spolehlivým diagnostickým průkazem celiakie.

11. Genetické ukazatele

Jejich určení nemá zatím prokázaný význam v rutinní diagnostice a kontrole terapie diabetu mellitu.

Detekce některých mutací HLA-DR/DQ souvisejících s některými diabetickými syndromy diabetu 1. typu může poskytnout cenné informace jak o stupni genetického rizika, tak o stupni protektivity individua pro diabetes 1. stupně. Cenná je identifikace alel souvisejících s monogenními formami diabetu, z nichž zejména MODY (maturity onset diabetes of youth) diabetes. se klasifikuje právě genetickými nástroji.

Rutinní genetické vyšetřování nemá význam u příbuzných s diabetem mellitem typu 2.

Materiálem pro detekci mutací jsou vzorky DNA získané z leukocytů krve. PCR je metodou volby, existuje však řada variant metodického postupu, aniž je dostatek údajů o jejich analytických znacích.

12. 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 DB,Arnold M,Baktris GL at al. Executive Summary Guidelines and Recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. Clin Chem 2011,57:793-798.
3	Standards of Medical Care in Diabetes 2011. Diabetes Care 2011,34,Suppl 1:S1-S61.
4	Stahl M,Joergessen LGM,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 2001,61:169-179.
5	Gambino R,Piscitelli J,Ackatupatil TA et al. Acidification of blood is superior to sodium fluoride alone as an inhibitor of glycolysis.Clin Chem 2009;55: 1019-1021.
6	Burnett RW, D´Orazio P, Fogh-Andersen B, Kuwa K, Kulpmann WR,et al. IFCC recommendation on reporting results for blood glucose. Clin Chim Acta

	2001;307:205-209.
7	Weykamp C,John WG,Mosca A et al.The IFCC reference measurement system for HbA1c: A 6 year progress report. Clin Chem 2008,54:240-248.
8	Hanas R,John WG. Consensus statement on the worldwide standardization of the hemoglobin A1c measurement. Clin Chem 2010,56:1362-1364.
9	Weykamp C,Mosca A,Gillery P,Panteghini M. The Analytical Goals for Hemoglobin A1c in IFCC units and National Glycohemoglobin Standardization Program units are different. Clin Chem 2011,57:1204-1206.
10	Scott MG,Bruns DE,Boyd JC,Sacks DB. Tight glucose control in the intensive care unit. Are glucose meters up to the task? Clin Chem 2009,55/1:18-20.
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 2010,12:221-231.
12	Skeie S,Thrue G,Nerhus K,Sandberg S. Instruments for self-monitoring of blood glucose:comparison of testing quality achived by patients and a technician. Clin Chem 2002,48:994-1003.
13	Doporučení ČSKB. Správné zavádění a používání prostředků POCT. Dostupné na: http://www.cskb.cz/cskb.php?pg=doporuceni
14	Miller GW,Bruns DE,Hortin GL et al.Current issues in measurement and reporting of urinary albumin excretion. Clin Chem 2009,55:24-38.
15	Lamb EJ,MacKenzie F,Stevens PE. How should prtoeinuria be detected and measured, Ann Clin Biochem 2009,46:205-217.
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/ 40:28- 35.
17	Little RR,Rohlfing CL,Tennill AL et al. Standardization of C-peptide measurements. Clin Chem 2008 54:1023-1026.
18	Miller GW,Thienpont LM,van Uypfanghe K et al.Toward standardization of insulin immunoassays. Clin Chem 2009,55:1111-1118.
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 HM,Polonski KS,Myers GL et al. International Comparison of C-peptide measurements. Clin Chem 2007,53:784-786.
21	Schultess J,van Duren C,Martens M et al. Diagnostic perfomance of the Architect C-peptide immunoassay. Clin Chem Lab Med 2009,47:834-841.
22	Marcovina S,Bowsher RR,Miller WG et al. Standardization of insulin immunoassays: Report of the American Association of Diabetes Workgroup. Clin Chem 2007,53:711-716.

Příloha 1 Doporučení ČDS a ČSKB

Příloha 2 Doporučení ČDS a ČSKB