



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Studies

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta
Katedra laboratorních metod a informačních systémů

Bakalářská práce

Posouzení rozdílnosti stability glukózy ve dvou odběrových systémech

Vypracoval: Jana Dvořáková
Vedoucí práce: Ing. Jiří Kronika

České Budějovice 2014

Abstrakt

Sacharidy představují jednu ze základních stavebních složek všech organismů. Tato skupina organických látek je nejsnáze získatelným a nejpohotovějším zdrojem energie. Pro lidský organismus má základní fyziologický význam glukóza, která je nejrychlejším zdrojem energie pro všechny tělesné tkáně, pro buňky mozku a červené krvinky představuje jediný zdroj energie, bez kterého se neobejdou.

Při poruše metabolismu sacharidů vzniká onemocnění diabetes mellitus, česky řečeno cukrovka. Nárůst onemocnění diabetem v posledních letech vzrostl do epidemických rozměrů a stal se vážnou civilizační hrozbou lidského zdraví. Proto je stanovení hladiny glukózy v krvi základním biochemickým vyšetřením, které ukazuje na aktuální stav glukózové homeostázy. Stanovení glykémie má význam především pro prevenci, diagnostiku a dlouhodobé sledování pacientů s diabetem. Vlastní stanovení se provádí v plné krvi, séru nebo plazmě a to buď na lačno nebo postprandiálně. Pro správnou interpretaci výsledků je třeba vědět, že referenční hodnoty se liší podle typu analyzovaného materiálu. Hladinu glukózy v krvi si může změřit i sám pacient pomocí glukometru. Jsou to přístroje sloužící k rychlému, ale pouze orientačnímu měření krevního cukru, které pracují na principu vyhodnocování elektrochemického nebo fotometrického signálu. V laboratořích se ke stanovení glukózy nejčastěji používají metody enzymové (s hexokinázou a glukózooxidázou) nebo metody elektrochemické. Obrovský klinický význam stanovení glukózy v diagnostice diabetu má ale nedostatky v oblasti preanalytiky a stability glukózy ve vzorku. Pokud není glukóza vyšetřena okamžitě po odběru, dochází ke snížení její hladiny. Stabilitu glukózy lze dosáhnout okamžitým ponořením zkumavky se vzorkem do ledové tříště, ale tento způsob nelze uplatnit v rutinní praxi. Proto se používá známý inhibitor glykolýzy fluorid sodný (NaF). Pokud je k odběru použita zkumavka se separačním gelem, který po centrifugaci oddělí krevní elementy od séra, glukóza také vykazuje vyšší stabilitu. Nestabilita glukózy může vést k chybným diagnostickým závěrům.

Cílem mé práce bylo stanovení koncentrace glukózy a posouzení její stability v různých odběrových systémech u skupiny 50 osob. Původním záměrem bylo stanovení koncentrace glukózy pouze ve dvou typech zkumavek: ve zkumavce se stabilizátorem NaF a ve zkumavce se separačním gelem, (tento typ zkumavek je v ordinacích lékařů používán nejčastěji), ale pak jsem ještě použila třetí typ zkumavky bez stabilizátoru a bez separačního gelu pro ještě názornější představu (ne)stability glukózy v dalším typu odběrového systému. Měření jsem provedla ve třech časových intervalech: po 1, 6 a 24 hodinách po odběru pomocí nejmodernější laboratorní techniky a následně vyhodnotila a porovnála data naměřených hodnot v rozdílných souborech vzorků. Hladina glukózy měřená 1 hodinu po odběru byla ve všech třech typech zkumavek téměř shodná, podstatnější rozdíly byly naměřeny u vzorků změřených 6 a 24 hodin po odběru. Největší pokles hladiny glukózy byl naměřen u vzorků odebraných do zkumavek bez separačního gelu a stabilizátoru. Proto by krev na vyšetření glykémie měla být odebrána pouze do zkumavek se stabilizátorem nebo do zkumavek se separačním gelem a včas provedena centrifugace. Lékaři v ordinacích by při hodnocení výsledků měli brát v úvahu nestabilitu glukózy a tím i možné snížení naměřené hodnoty glykémie v závislosti na typu použitého odběrového systému a intervalu mezi odběrem a zpracováním vzorku.

Summary

Saccharides represent one of the basic building components of all organisms. This group of organic mass is the easiest available and the most ready source of energy. Glucose possesses the basic physiological meaning for the human organism. It is the most rapid source of energy for all body tissues. It represents the only source of energy for brain cells and erythrocytes they cannot do without.

The disease called diabetes mellitus originates in the disorder of saccharides metabolism. The increase in diabetes mellitus has become an epidemic recently and a serious civilisation threat of human health as well. The blood glucose estimation is therefore the basic biochemical examination that reflects the topical situation of glucose homeostasis. The blood glucose estimation is meaningful first of all for prevention, diagnostics and long-term follow-up of diabetes patients. The own estimation is performed from the whole blood, serum or plasma, either before or after meals. For the correct interpretation of results it is essential to know that the reference values differ according to the type of material analysed. The patients can measure themselves their blood glucose level by using a glucometer. This is a device serving for the quick but approximate measurement of blood sugar. It works on the principle of evaluating of the electrochemical or photometric signal. In laboratories, the enzyme methods (with hexokinase and glucoseoxidase) or electrochemical methods are mostly used for the glucose estimations.

The immense clinical meaning of glucose estimation in the diagnostics of diabetes mellitus is lacking in the field of pre-analysis and stability of glucose in the sample. If the glucose is not estimated immediately after the taking its level decreases. The stability of glucose can be achieved with an immediate immersion of the test-tube with the sample into the drift-ice but this way cannot be applied to the routine practise. That's why the glycolyse inhibitor NaF is used. If a test-tube with a separating gel is used for taking the gel separates the blood elements from serum and glucose presents a higher stability then. The instability of glucose can lead to false diagnostic conclusions.

The goal of my study was an estimation of glucose concentration and consideration of its stability in the different sample systems in a group of 50 persons. The original intention was to estimate the glucose concentrations only in two types of test-tubes: with the stabilizer NaF and with the separating gel (this one is mostly used in doctor's offices), but later on I used the third type of the test-tube for even more object imagination of a (non-)stability in the further type of taking system. I carried out the measurements in 3 time sections: after 1, 6 and 24 h respectively after taking with the help of the most modern laboratory device and then assessed and compared the values in different groups of samples. The glucose levels measured 1 hour after the taking were nearly identical in all 3 types of test-tubes. More significant differences were measured in samples assessed 6 and 24 h after the taking. The greatest decrease of the glucose level was measured in samples taken into test-tubes without separating gel and stabilizer. That's why blood for glucose estimation should be taken only into the test-tubes with the stabilizer or with separating gel and the centrifugation should be performed soon.

The physicians should take into consideration the instability of glucose while evaluating the results and a possible decrease of glycaemia measured value in dependence on the type of taking system and on the interval between taking and processing of the sample.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použité literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě Zdravotně sociální fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 5. 5. 2014

.....

podpis studenta

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především vedoucímu mé práce ing. Jiřímu Kronikovi za čas, trpělivost a odborné rady, které mi věnoval při sestavování této práce. Dále bych chtěla také poděkovat Mgr. Olze Dvořáčkové za její ochotu a pomoc při zpracování statistických dat.

1 Úvod.....	11
2 Teoretická část - současný stav	12
2.1 Sacharidy.....	12
2.2 Metabolismus sacharidů.....	12
2.3 Glukóza	13
2.4 Regulace hladiny glukózy v krvi.....	15
2.5 Diabetes mellitus	16
2.5.1 Klasifikace diabetu a porušené glukózové tolerance	17
3 Diabetes mellitus.....	18
3.1.1 Diabetes mellitus 1. typu (inzulin dependentní – IDDM).....	18
3.1.2 Diabetes mellitus 2. typu (non inzulin depedentní – NIDDM).....	18
3.1.3 Pokyny pro stanovení glukózy v diagnostice DM	19
3.1.4 Testy pro stanovení diagnózy DM	21
3.2 Metody sledování diabetu	22
3.2.2 Glykémie	22
3.2.3 Aktuální glykémie.....	23
3.2.4 Glykemický profil	23
3.2.5 Glykovaný hemoglobin.....	24
3.3 Další metody pro sledování komplikací diabetu.....	24
3.3.2 Glykosurie	24
3.3.3 Mikroalbuminurie.....	25
3.3.4 Inzulin a C- peptid.....	25
3.3.5 Stanovení autoprotilátek.....	26
3.4 Selfmonitoring.....	26
3.5 Přístroje a senzory pro (kontinuální) měření hladiny glukózy.....	26
3.6 Stabilita glukózy.....	27
3.7 Laboratorní metody stanovení glukózy.....	28
3.7.2 Redukční metody.....	28
3.7.3 Kondenzační metody.....	29

3.7.4	Enzymová metoda s glukózooxidázou.....	29
3.7.5	Enzymová metoda s hexokinázou.....	30
3.7.6	Enzymová metoda s glukózodehydrogenázou.....	30
3.7.7	Metody elektrochemické.....	31
3.7.8	Hmotnostní spektrometrie.....	31
4.	Hypotéza a cíl práce	33
4.1	Hypotéza.....	33
4.2	Cíl práce	33
5.	Metodika	34
5.1	Preanalytická část.....	34
5.1.2	Preanalytická fáze (mimolaboratorní).....	34
5.1.3	Příprava pacienta před odběrem.....	35
5.1.4	Preanalytická fáze (laboratorní)	35
5.2	Analytická fáze.....	35
5.2.2	Kontrola kvality.....	36
5.2.3	Validace.....	36
5.2.4	Verifikace	37
5.2.5	Aritmetický průměr.....	37
5.2.6	Směrodatná odchylka	37
5.2.7	Dosažená hladina významnosti.....	37
5.2.8	Rozptyl.....	38
5.3	Postanalytická fáze.....	38
5.4	Stanovení glukózy – provedení testu	38
5.4.2	Princip testu.....	38
5.4.3	Analyzátor Cobas Integra 800.....	39
5.4.4	Postup měření na analyzátoru Cobas Integra 800	39
5.4.5	Reagencie analyzátoru Cobas Integra 800	40
5.4.6	Kalibrace analyzátoru Cobas Integra 800	40
5.4.7	Kontrola kvality analyzátoru Cobas Integra 800.....	40

5.4.8	Referenční meze	41
5.4.9	Metrologické parametry	41
6.	Výsledky měření	42
6.1	Závislost stability glukózy na čase a typu použité "zkumavky"	42
6.2	Statistické hodnocení.....	46
6.3	Statistické rozdíly a statistická významnost naměřených dat	47
7.	Diskuze	48
8.	Závěr.....	49
	Seznam použité literatury	50
	Klíčová slova	53
	Přílohy	54

1 Úvod

Stanovení hladiny glukózy v krvi je základním biochemickým vyšetřením, které se běžně provádí v každé klinické laboratoři. Její hodnota podává základní informaci o sacharidovém metabolismu. Stanovení glykémie má význam především pro prevenci, diagnostiku a dlouhodobé sledování pacientů s diabetem. Vlastní stanovení se provádí v plné krvi, séru nebo plazmě a to buď na lačno nebo postprandiálně (náhodný odběr kdykoliv během dne nezávislý na příjmu potravy). Pro některé lidské buňky, zejména pro buňky mozku a červené krvinky, je glukóza jediným zdrojem energie. Její hladina v krvi není stálá a stabilita po odběru klesá. Pro inhibici glykolýzy se používá stabilizační činidlo (NaF). Pro diagnostiku diabetu je doporučeno používat plazmu nabranou pouze do zkumavek, které obsahují stabilizační činidlo (NaF). Vyšší stabilitu vykazuje glukóza v séru, pokud je k odběru použito zkumavek se separačním gelem, který během centrifugace oddělí sérum od krevních elementů. Cílem této práce bylo posoudit stabilitu glukózy v různých odběrových systémech. Vyšetření bylo provedeno u skupiny 50 pacientů, kterým byla odebrána krev do tří různých typů zkumavek: 1.) zkumavka se separačním gelem, 2.) zkumavka bez separačního gelu a bez přidaného stabilizátoru a 3.) zkumavka s přidaným antiglykolitickým činidlem (NaF). Měření bylo provedeno ve třech časových intervalech: po 1, 6 a 24 hodinách po odběru. Naměřené hodnoty byly vyhodnoceny, porovnány a statisticky zpracovány.

2 Teoretická část - současný stav

2.1 Sacharidy

Sacharidy jsou jednou ze základních stavebních složek všech organismů. Tvoří stavební kameny mnoha důležitých a nepostradatelných makromolekul (např. nukleových kyselin, glykolipidů, glykoproteinů aj.). Vyšší nerozpustné polysacharidy slouží jako strukturní a podpůrné složky buněk a pojivových tkání. Jsou také součástí buněčných membrán a určují mimo jiné specifickou antigenní determinantu na povrchu buněk. Tato rozsáhlá skupina organických látek představuje pro lidský organismus také nesmírně důležitou součást metabolických procesů - je nejsnáze získatelným a nejpohotovějším zdrojem energie. Sacharidy jsou skupinou polyhydroxy aldehydů a ketonů pod souhrnným označením mono, oligo a polysacharidy. Monosacharidy jsou nejjednoduššími sacharidy a nelze je již dále hydrolyticky štěpit na menší jednotky. Oligosacharidy obsahují 2-10 monosacharidů a polysacharidy se skládají z 11 a více monosacharidových jednotek (Štern et al. 2005).

2.2 Metabolismus sacharidů

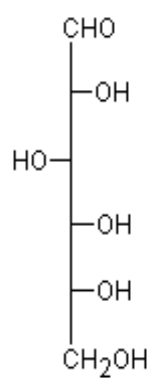
Sacharidy patří mezi jednu z hlavních složek lidské stravy. V přijaté potravě jsou ve formě polysacharidů a disacharidů. Ty jsou pak v zažívacím traktu rozkládány na cukry jednoduché - glukózu, fruktózu a galaktózu. K tomu dochází při procesu trávení. Slinná alfa amyláza nemá pro trávení sacharidů žádný velký význam, trávicí pochody začínají až ve dvanáctníku prostřednictvím aktivity pankreatické alfa amylázy (Štern et al. 2005). Takto vzniklé monosacharidy jsou buňkami tenkého střeva resorbovány do krevní sítě prostřednictvím střevních vlásečnic, odkud jsou odváděny do vrátnicové žíly a nakonec do jater. Pak podle řízené regulace hladiny glukózy jsou transportovány do tkání, kde probíhá jejich metabolismus. Pro lidský organismus má základní fyziologický význam právě glukóza (Trojan, Schreiber 2007). Pro člověka ale nejsou sacharidy v pravém slova smyslu nepostradatelnou složkou potravy. Procesem glukoneogeneze (novotvorba glukózy) se v lidském organismu syntetizují nezbytné sacharidy z

nesacharidových zdrojů, především glykogenních aminokyselin. Ale je prokázáno, že například při nízké sacharidové dietě může dojít k metabolické nerovnováze. Strava s minimem sacharidů a relativní převahou lipidů vede k metabolické acidóze a nízké sacharidová strava s nadbytkem bílkovin vede k nadměrným ztrátám dusíkatých látek močí a tomu lze zabránit právě zvýšením obsahu sacharidů v potravě (Štern et al. 2005).

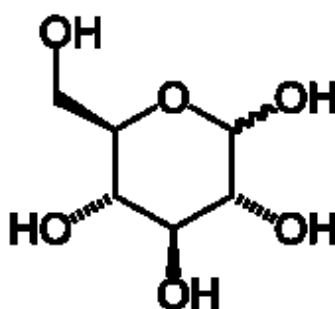
2.3 Glukóza

Glukóza je nezbytná pro fungování lidského těla; je základním a nejrychlejším zdrojem energie pro všechny tělesné tkáně. Pro některé lidské buňky, zejména pro buňky mozku a červené krvinky, je glukóza jediným zdrojem energie, bez kterého se neobejdou. Tyto tkáně spotřebují za 24 hodin přibližně 150 g glukózy. Při poklesu hladiny glukózy se ze žláz s vnitřní sekrecí (z pankreatu a nadledvinek) začnou uvolňovat kontraregulační hormony (glukagon a adrenalin), které mobilizují její tvorbu. Glykogen je uložen především v játrech a také ve svalstvu v množství od 150 do 400 g, podle situace, ve které se organizmus nalézá. V případě, že jsou zásoby glykogenu vyčerpány, vytváří si organizmus nezbytné množství glukózy přeměnou tělesného tuku pomocí glukoneogeneze. Při stresu a při delším hladovění se jako zdroj pro tvorbu glukózy využívá také bílkovin ze svalů i za cenu oslabování jejich funkce. Po chemické stránce je glukóza tzv. aldohexózou, v lékařské terminologii známá jako dextróza, nebo také krevní cukr, o sumárním vzorci $C_6H_{12}O_6$. Strukturální vzorce glukózy jsou pak známé v několika projekcích:

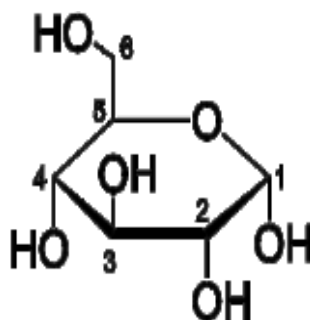
D-glukóza



Obr. č. 1: D-glukóza - aldehydická forma (ve Fischerově projekci)



Obr. č. 2: D-glukóza - hemiacetalová forma (standardní strukturní vzorec)



Obr. č. 3: D-glukóza - hemiacetalová α -forma (v Haworthově projekci)

Za daných fyziologických okolností může organismus získávat glukózu různými způsoby:

- příjem potravou, buď volně anebo jako součást disacharidů a polysacharidů, to znamená, že z trávicího traktu se do krve vstřebává pouze volná glukóza
- je-li příjem v potravě nižší nebo nerovnoměrný, chybějící glukózu získává organismus štěpením zásobního glykogenu procesem zvaným glykogenolýza, tj. metabolická reakce, ve které molekula glukózy vzniká štěpením jaterního glykogenu, v případě, že jsou zásoby glykogenu vyčerpány, vytváří si organismus glukózu přeměnou tělesného tuku pomocí glukoneogeneze, glukoneogeneze je metabolická dráha, při které dochází k syntéze glukózy z necukerných prekurzorů (glykogenních aminokyselin, laktátu, glycerolu aj.), potřebná energie pro tuto syntézu se získává beta oxidací mastných kyselin s tvorbou ketolátek (Musil 1994).

2.4 Regulace hladiny glukózy v krvi

Hladina glukózy v krvi je ovlivňována několika významnými hormony, které regulují rychlost jednoho nebo více metabolických pochodů, ve kterých je přeměňována. Fyziologická hladina glukózy v krvi (glykemie) se pohybuje v rozmezí od 3,6–5,6 mmol/l. Na udržení fyziologického rozmezí koncentrace glukózy v krvi se podílí tyto hormony:

1. inzulín – snižuje hladinu glukózy
2. glukagon, adrenalin, kortizol, somatotropin - zvyšují hladinu glukózy
3. somatostatin – snižuje produkci inzulínu a glukagonu

Inzulín - patří mezi peptidy a je sekretován beta buňkami z Langerhansových ostrůvků pankreatu jako hormonální odpověď na zvýšenou hladinu glukózy v krvi. Je jediným hormonem, který hladinu glukózy snižuje. Inzulín zvyšuje propustnost buněčné

membrány pro glukózu tím, že se naváže na specifické receptory na povrchu jaterní, svalové a tukové buňky a tím umožní vstup glukózy dovnitř buňky. Sekrece inzulínu je regulována koncentrací glukózy v krvi. Pokud se hladina glukózy zvýší, inzulín se vylučuje, naopak pokles hladiny glukózy v krvi brzdí uvolňování inzulínu. Množství inzulínu potřebného k určitému snížení hladiny glukózy je individuální, závisí na stavu výživy u daného jednotlivce. Lidé s nadváhou vyžadují vyšší koncentraci inzulínu než lidé s normální hmotností. Glukagon – polypeptid sekretovaný alfa buňkami Langerhansových ostrůvků pankreatu jako odpověď na nízkou hladinu glukózy v krvi. Je hlavním hormonem, který zajišťuje rychlé zvýšení koncentrace glukózy v krvi, k tomu dochází stimulací glykogenolýzy a glukoneogeneze v játrech, neovlivňuje ale glykogen ve svalu. Adrenalin – katecholamin sekretovaný dřením nadledvin, zvyšuje hladinu glukózy v krvi stimulací glykogenolýzy a působí jako náhrada za glukagon, jeho hladina se zvyšuje při fyzickém nebo emočním stresu, jeho zvýšená hladina vyvolává ihned okamžitou produkci glukózy spolu se zvýšením krevního tlaku, srdeční akce a dalších fyziologických efektů.

Kortizol – sekrece v kůře nadledvin, zvyšuje koncentraci glukózy hlavně stimulací glukoneogeneze.

Somatostatin – inhibuje sekreci inzulínu a glukagonu.

Různé poruchy metabolismu sacharidů mohou být spojeny se zvýšenou hladinou glukózy (hyperglykémie), nebo se sníženou hladinou glukózy (hypoglykémie) v krvi (Novák 2002).

2.5 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus (DM), česky úplavice cukrová, krátce cukrovka, je souhrnný název pro skupinu chronických onemocnění, která se projevují poruchou metabolismu, charakterizovaná zvýšenou glykemií a glykosurií. Jedná se o závažné onemocnění,

jehož hlavní příčinou je nedostatek inzulínu nebo jeho úplná ztráta v organismu. Diabetes mellitus je pravděpodobně jedním z nejstarších rozpoznávaných onemocnění, podle dochovaných záznamů bylo známo již v období starého Egypta (Okoloba et al. 2012).

Nárůst onemocnění diabetem v posledních desetiletích vzrostl do epidemických rozměrů. Vzhledem k chronickému průběhu DM 2. typu, spojovaného s cévními komplikacemi je významným fenoménem nárůstu morbidity a mortality. Stal se vážnou civilizační hrozbou lidského zdraví a také značnou ekonomickou zátěží pro zdravotní péči (vysoké výdaje na léčbu). Proto nejdůležitějším úkolem je primární prevence k potlačení nárůstu onemocnění a ke snížení ekonomické zátěže na zdravotní péči (Abdul-Ghani et al. 2011).

2.5.1 Klasifikace diabetu a porušené glukózové tolerance

Podle WHO (Světové zdravotnické organizace) se diabetes mellitus dělí na samostatné typy, které se od sebe odlišují etiologií, patogenezi, klinickým obrazem a následně vyžadují také odlišný přístup k diagnostice a léčebným postupům.

Diabetes mellitus 1. typu

Diabetes mellitus 2. typu

Sekundární diabetes mellitus – prvotní příčinou mohou být onemocnění pankreatu nebo endokrinní syndromy

Snížená glukózová tolerance

Těhotenský diabetes mellitus – v průběhu gravidity (Chlup 2000).

3 Diabetes mellitus

3.1.1 Diabetes mellitus 1. typu (inzulin dependentní – IDDM)

Stav, kdy jsou sekreční beta buňky zcela nebo z velké části zničeny a pacient je závislý na přívodu exogenního inzulínu. DM 1. typu je autoimunitní onemocnění, kdy spouštěcím momentem může být nějaká virová infekce (virus Coxackie B, virus epidemické parotitidy, viry chřipky typu A), dojde k tvorbě protilátek proti beta buňkám pankreatu, imunitní reakci a výsledkem je destrukce beta buněk pankreatu, silné omezení nebo zánik produkce inzulínu. Obvykle začíná v dětství nebo u mladistvých, proto byl dříve označován jako juvenilní diabetes, ale bylo prokázáno, že se může vyskytnout i v pozdějším věku. Vzácně se popisuje rodinný výskyt a souvislost s určitým typem HLA systému. Častými klinickými příznaky diabetu 1. typu jsou polyurie a následná žízeň spolu s hubnutím, únavností a slabostí. V laboratorním nálezu nacházíme hyperglykémii, glykosurii a metabolický rozvrat se sklonem ke ketoacidóze.

3.1.2 Diabetes mellitus 2. typu (non inzulín dependentní – NIDDM)

Představuje 80 až 90 procent všech onemocnění diabetem. Nejčastěji se vyskytuje ve středním a vyšším věku. Jde o polygenní typ dědičnosti, kde se na jeho vzniku podílí i další vnější faktory a patří mezi civilizační choroby. Velká část diabetiků 2. typu má snížený počet nebo poruchu funkce inzulínových receptorů na membránách cílových tkáňových buněk (souvisí s nadměrným obsahem tukové tkáně). Onemocnění začíná zpravidla mírně a nenápadně, často je objeveno jen díky náhodnému vyšetření glykémie nebo glykosurie. Projevuje se podobně jako IDDM, pouze příznaky nastupují později a zvolna. Teprve neléčený rozvinutý diabetes se projeví slabostí a únavou, svěděním kůže, mravenčením až bolestmi v dolních končetinách, špatnou hojivostí drobných poranění a zvýšeným výskytem zánětlivých afekcí na kůži a sliznicích. Mezi nejzávažnější chronické komplikace NIDDM patří makroangiopatie (poškození stěny větších cév) a rozvoj aterosklerotických změn. V laboratorním nálezu nacházíme

hyperglykémii a glykosurií. Rozvinuté onemocnění má sklon k hyperosmolárnímu kómatu (Štern 2005). Je prokázáno, že diabetes mellitus 2. typu je jakési vyvrcholení metabolického syndromu. Typický diabetik 2. typu je obézní a trpí hypertenzí (Svačina 2000). Cestu od obezity k diabetu prožívá ve svém životě asi 20 % naší populace. Jevy, které přitom nastávají, jsou složité, týkají se změny poměru spalování živin, kdy začne stoupat spalování tuků na úkor cukrů, a změn citlivosti na inzulín. Svaly a tuková tkáň se stávají na inzulín méně citlivé, a diabetes vzniká v okamžiku, kdy dochází k poruše sekrece inzulínu. Tento jev může mít více příčin. Například vyčerpání slinivky, protože musela zvýšením sekrece inzulínu překonávat celý život necitlivost na inzulín. Ostrůvky beta buněk pankreatu se mění, usazují se zde některé látky, dochází ke změně struktury jejich membrán. Na beta buňky Langerhansových ostrůvků pravděpodobně působí toxicky i vysoká hladina tuků v krvi a vysoká glykémie. Sekrece inzulínu nezaniká rychle jako u diabetu 1. typu, ale slinivka neumí vydávat inzulín včas, vydává ho nepravidelně, pozdě a dlouho a tím se dále vyčerpává (Svačina 2003).

3.1.3 Pokyny pro stanovení glukózy v diagnostice DM

Národní akademie klinické biochemie (NACB) vydala Pokyny a doporučení pro laboratorní analýzy v diagnostice a řízení diabetes mellitus v roce 2008. Tato doporučení jsou zaměřena především pro laboratorní profesionály, praktické lékaře a zdravotní sestry, kteří jsou zapojeni do péče o diabetické pacienty. Z hlediska validace byly doporučeny ověřené postupy pro vyšetření a přesné stanovení obsahu glukózy v krvi:

- 1) Pokud je vyšetření používáno ke stanovení diagnostiky diabetes mellitus, měla by být glukóza měřena v žilní plazmě.
- 2) Krev pro analýzu plazmatické glukózy by měla být odebrána v ranních hodinách, poté, co jedinec nepřijímal žádnou potravu, ani tekutiny (slazené), nejméně 8 hodin před vlastním odběrem.

- 3) Pro minimalizaci glykolýzy, je třeba oddělit krevní buňky od plazmy do 30 minut od odběru. Pokud to není možné, měla by zkumavka na vyšetření obsahovat inhibitor glykolýzy - fluorid sodný (Sacks et al. 2011).

K podezření na diabetes vede anamnéza, somatické vyšetření anebo laboratorní nález. Definitivní diagnóza se stanovuje opakovaným zjištěním hyperglykémie nalačno, pomocí glukózového tolerančního testu nebo případně vyšetřením glykovaného hemoglobinu.

Pro diagnózu diabetu musí být splněna jedna ze tří následujících podmínek:

- a) glykémie nalačno – obsah stanovené glukózy je opakovaně 7,0 mmol/l a více,
- b) glykémie odebraná kdykoliv v průběhu dne u pacienta s klinickými příznaky – obsah stanovené glukózy je 11,1 mmol/l a více,
- c) glykémie při OGTT ve 120. minutě – obsah stanovené glukózy je 11,1 mmol/l a více (Chlup 2000).

Podle mezinárodních kritérií pro stanovení diagnózy diabetu na základě hladiny glykémie stanovené kdykoliv během dne platí, že přítomnost diabetu je nepravděpodobná, pokud je glykémie nižší než 5,5 mmol/l a naopak je vysoká pravděpodobnost diagnózy diabetu, pokud je nález glykémie vyšší než 11,1 mmol/l. Opakovaný nález glykémie nalačno, stanovené za standardních podmínek a přesahující hodnotu 7,8 mmol/l v kapilární krvi, je podle kritérií SZO dostačující pro určení diagnózy DM, zvláště, pokud má pacient současně charakteristické příznaky diabetu (Perušičová et al. 1996). Společným patognomickým nálezem všech typů diabetu je chronická hyperglykémie, proto je vyšetřování hladiny glukózy základním laboratorním vyšetřením pro stanovení diagnózy diabetu (Perušičová et al. 1996).

3.1.4 Testy pro stanovení diagnózy DM

Orální glukózový toleranční test (OGTT)

je vyšetřovací metodou, která se používá k diagnostice diabetu mellitu, gestačního diabetu a porušené glukózové tolerance. Při provedení testu je nutné zajistit, aby výsledky testu nebyly ovlivněny nesprávnými postupy. Pacient musí být nalačno před začátkem testu a po celou jeho dobu trvání nesmí nic jíst, pít, kouřit, ani provádět žádnou fyzickou aktivitu. Princip testu při diabetu nebo porušené glukózové toleranci organismu spočívá v kinetice zpracování přijaté glukózy - pacientovi se tedy podá určité množství glukózy a následně se odebírají vzorky žilní krve v určitých časových intervalech. Zjišťují se hodnoty glukózy a poté vyhodnocuje schopnost organismu vyrovnat se s touto zátěží. Test se provádí následovně: pacientovi se odebere vzorek žilní krve, pak se mu podá perorálně 75 g glukózy rozpuštěné v hořkém čaji nebo vodě (250 – 300 ml), u dětí se podává 1,75 g glukózy na 1 kg váhy. Po dvou hodinách se pacientovi opět odebere vzorek žilní krve. Oba vzorky by měly být odebrány do zkumavek, které obsahují stabilizační činidlo zabraňující glykolýze (NaF), (Philips et al. 2012). Validita výsledku OGTT a stanovení diagnózy DM závisí na přísném dodržení všech zásad provádění testu:

- 1) Test je nutné provádět ráno a pacient má být vsedě.
- 2) Nejméně 3 dny před testem by pacient neměl držet redukční dietu, příjem sacharidů má být 150 g/den a více.
- 3) Nejméně 3 dny před testem by pacient neměl měnit svoji obvyklou fyzickou aktivitu.
- 4) Stanovení glykémie nalačno znamená stanovení po 10-14 hodinách lačnění (dovoleno je pít pouze čistou vodu).
- 5) Doba mezi odběrem krve a vypitím roztoku nesmí přesáhnout 5 minut.

OGTT nikdy neprovádíme při akutním onemocnění, psychickém stresu nebo při léčbě diabetogenními léky (Perušičová et al. 1996). Prediabetes je diagnostikován,

pokud hladina glukózy (nalačno) je v rozmezí 6,1-6,9 mmol/l a po 2 hodinách 7,8 – 11,0 mmol/l. Diabetes mellitus je diagnostikován, pokud je hladina glukózy (nalačno) vyšší než 6,9 mmol/l a po 2 hodinách vyšší než 11,1 mmol/l (Philips et al. 2012). Toto vyšetření se provádí tehdy, pokud není diagnóza jednoznačně potvrzena při hodnotách plazmatické glykémie nalačno vyšších než 7 mmol/l. Sem patří stavy se zvýšenou (hraniční) glykemií nalačno (5,6 – 6,9 mmol/l) nebo situace, kdy bylo vysloveno podezření na poruchu glukózové tolerance z předcházejících vyšetření nebo pokud se jedná o jedince se zvýšeným rizikem vzniku diabetu (Rybka 2007).

Glykovaný hemoglobin

je stanovení, které se využívá hlavně k posouzení dlouhodobé kompenzace diabetika, ale i k případné diagnostice DM. Lze jím prokázat výskyt déle trvajících hyperglykemií a tím posoudit riziko rozvoje komplikací diabetu. Glykovaný hemoglobin vzniká navázáním glukózy na červené krevní barvivo hemoglobin, čím vyšší je hladina glukózy v krvi, tím víc se jí váže na molekulu hemoglobinu a hodnoty glykovaného hemoglobinu stoupají. Vytvořená vazba glukózy na hemoglobin je ireverzibilní a trvá po celou dobu života erytrocytů. Životnost erytrocytů je zhruba 120 dní, proto hodnota glykovaného hemoglobinu znázorňuje hladiny glukózy v krvi za posledních 6-8 týdnů (Jirkovská et al. 2003).

3.2 Metody sledování diabetu

3.2.2 Glykémie

Základním biochemickým vyšetřením je stanovení hladiny glukózy v krvi. Toto vyšetření ukazuje na aktuální stav glukózové homeostázy. Stanovení glykémie má význam především pro prevenci, diagnostiku a dlouhodobé sledování pacientů s diabetem. Glykémii lze vyšetřit z kapilární nebo venózní krve, vlastní stanovení se provádí v plné krvi, séru nebo plazmě. Pro správnou interpretaci výsledků je důležité, že referenční hodnoty se liší podle typu analyzovaného materiálu (Ferenčík

et al. 2000). Hladiny glykemií v plazmě (séru) jsou obvykle o 10-15 % vyšší než glykémie v plné krvi (Rybka 2006), je to dáno rozdílnou koncentrací vody v obou materiálech. Glykémii můžeme vyšetřovat buď: nalačno – odběr se provádí nejméně po 8 hodinovém lačnění, nebo postprandiální – náhodný odběr se provádí kdykoliv během dne nezávisle na příjmu potravy (Ferenčík et al. 2000).

3.2.3 Aktuální glykémie

Stanovení aktuální hladiny glukózy v krvi slouží pro prevenci, diagnostiku a dlouhodobé sledování pacientů s diabetem a její hodnota podává základní informaci o sacharidovém metabolismu. Její stanovení slouží nejen k určení diagnózy DM, ale i k vyhledávání osob se zvýšeným rizikem DM. Stanovuje se v žilní krvi, často se provádí odběr i pro stanovení jiných analytů. Krev se odebírá minimálně po 8 hodinovém lačnění (přes noc), pacient se musí vyvarovat kouření a zvýšené fyzické námaze. Odběr se provádí v klidové poloze vsedě (Masopust 1998; Zima 2007).

3.2.4 Glykemický profil

Hladina glykémie se v průběhu dne může značně měnit, proto je důležité znát její hodnoty během celého dne a noci. K tomuto účelu se zavedlo vyšetření glykemického profilu, kdy se vyšetřuje hladina krevního cukru několikrát v průběhu dne a noci, obvykle před jídlem nebo 1 hodinu po něm. Vyšetření glykemického profilu má význam pro určení terapie (např. pro výběr vhodného typu inzulínu a určení jeho dávky). Vyšetření se obvykle provádí z kapilární krve odebrané do eppendorfských zkumavek dodávaných do laboratoře nebo si glykemický profil může měřit sám pacient pomocí glukometru (selfmonitoring glykemií). Frekvence kontrol glykemií závisí na stavu kompenzace diabetu a určuje ji ošetřující lékař (Zima 2007).

Podle počtu vzorků můžeme glykemický profil rozdělit na:

- a) **malý glykemický profil** – stanoví se hodnota 3 – 4 glykemií během dne a to buď před snídaní, obědem, večeří, nebo 2 hodiny po jídlech, doplněné glykemií před spaním
- b) **velký glykemický profil** – stanoví se hodnota 6 – 8 glykemií, vždy před snídaní a 2 hodiny po snídani, obědě, večeři, doplněných glykemií před spaním a nejlépe 2 hodiny po půlnoci (Perušičová et al. 1996).

3.2.5 Glykovaný hemoglobin

Toto stanovení se využívá hlavně k posouzení dlouhodobé kompenzace diabetika, ale i k případné diagnostice DM. Lze jím prokázat výskyt déle trvajících hyperglykemií a tím posoudit riziko rozvoje komplikací diabetu. Glykovaný hemoglobin vzniká navázáním glukózy na červené krevní barvivo hemoglobin, čím vyšší je hladina glukózy v krvi, tím víc se jí váže na molekulu hemoglobinu a hodnoty glykovaného hemoglobinu stoupají. Vytvořená vazba glukózy na hemoglobin je ireverzibilní a trvá po celou dobu života erytrocytů. Životnost erytrocytů je zhruba 120 dní, proto hodnota glykovaného hemoglobinu znázorňuje hladiny glukózy v krvi za posledních 6-8 týdnů (Jirkovská et al. 2003).

3.3 Další metody pro sledování komplikací diabetu

3.3.2 Glykosurie

Toto vyšetření zjišťuje přítomnost cukru v moči. Za fyziologických podmínek je všechna glukóza, která se přefiltruje do primární moči, vstřebávána buňkami proximálního tubulu zpět do krevního oběhu. U zdravého jedince se tedy cukr v moči nevyskytuje. Glukóza se v moči objevuje teprve tehdy, kdy její koncentrace v krevní plazmě překročí hodnotu 10 mmol/l. Tato hodnota představuje ledvinový práh pro glukózu. U některých stavů dochází ke snížení ledvinového prahu a glukóza se v moči objevuje i při fyziologických hodnotách glykémie (těhotenství, renální diabetes), jindy

je renální práh pro glukózu zvýšen a glukóza přestupuje do moči při hodnotách glykémie daleko vyšších než 10 mmol/l (starší diabetici s glomerulosklerózou). Vzhledem k tomu, že cukr v moči nemusí odpovídat současné hladině cukru v krvi, nepatří vyšetření glykosurie mezi základní nástroje diagnostiky diabetu ani sledování stavu pacienta s tímto onemocněním (Racek et al. 2006). Stanovení ketolátek v moči a krvi má význam pro diagnózu diabetické ketoacidózy. Ketolátky by měly být stanovovány u pacientů s hladinou glykémie nad 16,7 mmol/l a také při výskytu klinických symptomů diabetické ketoacidózy (DM lab.diagnostika ČSKB 2012).

3.3.3 Mikroalbuminurie

Kvantitativní stanovení vylučování albuminu močí je základní metoda informující o rozvíjející se diabetické nefropatii. Zvýšená koncentrace albuminu v moči předpovídá stav nefropatie, ale tyto nízké koncentrace nejsou běžnými testy na proteinurii (testovací proužky nebo jiné kvalitativní metody) prokazatelné. Stanovují se metodami imunochemickými. Zvýšené vylučování albuminu se označuje jako mikroalbuminurie a zahrnuje hodnoty 30-300 mg/den albuminu vyloučeného močí (Zima 2007). Mikroalbuminurie se často vyjadřuje v množství albuminu vyloučeném močí za časovou jednotku. Doporučuje se sběr přes noc, kdy je nemocný v tělesném klidu. Délka sběrného období je alespoň 6 hodin a udává se s přesností na minuty. Fyziologická albuminurie je < 20 mikrogramů/min (Racek et al. 2006).

3.3.4 Inzulin a C- peptid

Stanovení C- peptidu se provádí při rozhodování o vhodnosti volby terapie inzulinem u DM 2. typu, tj. při podezření na selhání sekrece inzulinu. Vyšetření inzulinu má význam při podezření na inzulinovou rezistenci u syndromu polycystických ovárií (DM lab.diagnostika ČSKB 2012)

3.3.5 Stanovení autoprotilátek

Diabetes mellitus 1. typu je považován za autoimunitní onemocnění, v séru lze tedy prokázat řadu autoprotilátek, které lze detekovat v časných stádiích, jejich nepřítomnost ale DM 1. typu nevylučuje. U 5-30 % nemocných, u kterých byl původně diagnostikován DM 2. typu, jsou přítomny autoprotilátky proti ostrůvkovým buňkám glutamátdekarboxylázy. Tito nemocní nereagují na léčbu perorálními antidiabetiky. Kvantitativním vyhodnocením charakteristických protilátek umožňuje vedle typických diabetiků 1. typu odhalit diabetes známý jako latentní autoimunitní diabetes dospělých (LADA), (Krejsek et al. 2004, Racek et al. 2006).

3.4 Selfmonitoring

Hladinu glukózy v krvi lze zjistit i z kapilární krve měřením pomocí glukometrů. Jsou to přístroje sloužící k rychlému ale pouze orientačnímu měření glykémie. Tento přístroj za pomoci testovacího proužku změří aktuální hladinu cukru v krvi. K získání výsledku stačí malá kapka krve a hodnota glykémie se za několik sekund objeví na displeji přístroje. Vyšetření si může pacient provádět sám v domácím prostředí, mluvíme o tzv. selfmonitoringu. Na základě naměřené hodnoty glykémie si pacienti mohou upravit dietu, pohybovou aktivitu nebo dávku inzulínu a tak správnou kompenzací diabetu předcházet pozdějším komplikacím (Kapounová 2007). Glukometr pracuje na principu vyhodnocování elektrochemického nebo fotometrického signálu. V současné době jsou nejvíce používány glukometry elektrochemické s detekcí specifickými enzymovými metodami (Zima 2007).

3.5 Přístroje a senzory pro (kontinuální) měření hladiny glukózy

Tyto přístroje umožňují průběžnou kontrolu hladiny glukózy v organismu v průběhu dne. Na rozdíl od glukometrů, které určují hodnotu glykémie z kapilární krve, tyto přístroje stanovují koncentraci glukózy v podkožní tkáni, ve které je senzor

zabudován. Systém zaznamenává koncentraci glukózy každých 5 minut (Zima 2007). Kvůli rychlé dostupnosti výsledků je někdy výhodné provádět určitá základní vyšetření na místě – tzv. **POCT** (point of care testing). Tato vyšetření jsou prováděna pomocí přístrojů přímo u nemocného – na operačním sále, jednotce intenzivní péče, při výjezdu záchranné služby (Klener et al. 2006). Systémy POCT jsou součástí laboratorní diagnostiky a za kvalitu provozu odpovídá klinická laboratoř. Ta také zodpovídá za zaškolení personálu a za nastavení kontroly kvality jednotlivých přístrojů (glukometrů) a její dodržování (Schneiderka et al. 2010).

3.6 Stabilita glukózy

Zásadní klinický význam stanovení glukózy kontrastuje s řadou nedostatků tohoto stanovení. Během posledních let došlo v klinických laboratořích k velkému pokroku stanovení glukózy v krvi. S použitím enzymatických metod, moderních analyzátorů a elektroniky dosahují laboratoře nepřesnost pouze (CV) 1 až 2 %. Ale bohužel nejsou vyřešeny otázky týkající se preanalytiky a stability glukózy ve vzorku. Snížení glukózy ve vzorcích bylo předmětem různých studií. Jako hlavní stabilizační činidlo se dnes používá NaF-EDTA. Snížení glukózy ve vzorcích představuje větší zdroj chyb než analytická chyba v laboratoři, může se jednat o 5–10 % po jedné nebo více hodin po odběru vzorku. Přesvědčení, že použití NaF vyřešilo tento problém, je mylné (Brunds 2009), protože obvyklý a doporučený odběr vzorku do NaF-EDTA není schopen zajistit stabilitu glukózy ve vzorku první dvě hodiny. Zejména v první hodině po náběru je stabilita (a jí odpovídající pokles) glukózy v podstatě stejná jako u vzorku bez NaF. Po více než jedné hodině po odběru klesá koncentrace glukózy o cca 5-7 %. Stabilitu glukózy lze dosáhnout okamžitým ponořením zkumavky s odebraným vzorkem do ledové tříště. Tento postup se používá při klinických studiích, je doporučován experty, ale není možné ho uplatnit v rutinní praxi. Již v létech 1986 a 1988 byl publikován velmi účinný způsob dokonalého zablokování glykolýzy. Byl vyvinut japonskými odborníky pro firmu Terumo. Princip spočívá v odběru vzorku do pevné granulované směsi kyseliny citronové, citrátu trojsodného, Na₂EDTA a NaF v poměru 3,4 : 1,6 : 4,8 : 0,2.

Pro 1 ml krve je potřeba 10 mg této směsi. Inhibice glykolýzy je natolik účinná, že pokles glukózy je redukován na 0,3 % po dvou hodinách.

Vyšší stabilitu vykazuje glukóza v séru, pokud je k odběru použito gelových zkumavek, které oddělí krvinky od krevního séra. Musí však dojít k oddělení séra od krevních elementů do 30 minut od odběru, což je v praxi velký technicko-organizační problém. Autoři studie tvrdí a experimentálně dokazují, že mezi sérem a plazmou je za podmínek stability rozdíl pouhých 0,9 % ve prospěch plazmy (Gambino et al. 2009).

Glukóza v krvi odebraná do NaF je nestabilní, výsledky rutinních analýz takových vzorků nejsou z toho důvodu v dostatečné míře interpretovatelné podle výsledků velkých klinických studií, na jejichž bázi byly stanoveny rozhodovací diagnostické limity. Je nezbytné zajistit stabilitu glukózy v rutinních vzorcích obecně a rutinně ve všech laboratořích a poté znovu ustanovit tyto limity. Nestabilita glukózy vede k nejasnostem ve výsledcích dat a k možným chybným diagnostickým klasifikacím (Bruns, Knowler 2009).

3.7 Laboratorní metody stanovení glukózy

Existuje poměrně široká paleta metod pro stanovení krevního cukru. Poté, co byly oxidoredukční metody opuštěny jako zdouhavé a nepřesné a barevné reakce jako nevhodné z toxikologického hlediska, zůstávají metodou první volby metody enzymové a elektrochemické (Kotyza et al. 2005). Nelze zapomínat na glukometry, ale výsledky z nich jsou pouze orientační, přesnějších hodnot se docílí měřením glykémie v laboratoři. (Lebl, Průhová et al. 2004).

3.7.2 Redukční metody

Redukční metody patří mezi nejstarší způsoby stanovení glukózy. Tyto metody jsou založeny na využití redukčních vlastností tzv. reduktonů, to jsou organické látky obsahující ve své molekule endiolovou skupinu, která způsobuje jejich silné redukční

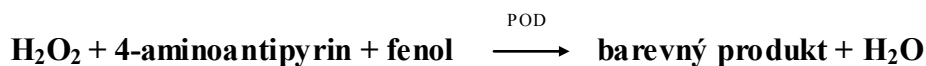
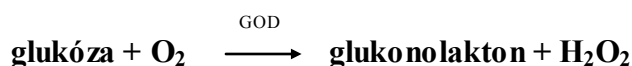
vlastnosti. Reduktory vznikají z monosacharidů varem v silně alkalickém prostředí, kde reagují s ionty Cu^{2+} nebo Fe^{3+} , případně s kyselinou pikrovou za tvorby Cu^+ , Fe^{2+} nebo kyseliny pikraminové. Pravděpodobně nejstarší a nejdéle používanou byla metoda dle Hagedorna a Jensena, jež se zakládala na redukci známého množství $\text{K}_3/\text{Fe}(\text{CN})_6/$. Množství zredukovaného Fe^{2+} se stanovuje nepřímou titrací jodometricky. Redukční metody se ukázaly jako zdlouhavé a nespecifické, a proto se v současnosti již nepoužívají (Prokeš et al. 1998).

3.7.3 Kondenzační metody

Kondenzační metody jsou ve srovnání s metodami redukčními mnohem specifičtější. Jsou založeny na schopnostech glukózy tvořit barevné komplexy s některými činidly. V prvním kroku se glukóza přeměňuje působením koncentrovaných kyselin (H_2SO_4 nebo CH_3COOH) na hydroxymethylfural. Ten se ve druhém kroku kondenzuje s vhodným fenolem (resorcin, naftol) nebo aromatickým primárním aminem (o-toluidin) za vzniku barevného produktu, vhodného pro fotometrické stanovení. Tento princip byl v minulosti rutinně používán před zavedením enzymových metod (Prokeš et al. 1998).

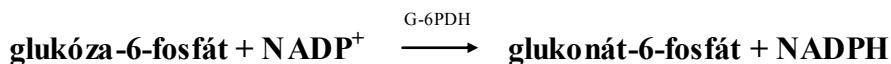
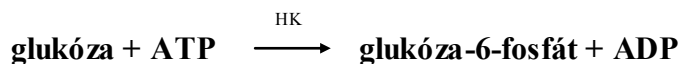
3.7.4 Enzymová metoda s glukózooxidázou

Rozšířená a v praxi často používaná metoda pro kvantitativní stanovení glukózy. Glukóza přítomná v analyzovaném vzorku je oxidována kyslíkem za katalytického působení enzymu glukózooxidázy (GOD) na glukonolakton a peroxid vodíku. Uvolněný peroxid vodíku je stanoven barevnou reakcí s fenolem a 4-aminoantipyrinem za přítomnosti enzymu peroxidázy (POD). Vzniká barevný produkt, který stanovujeme spektrofotometricky. Intenzita zbarvení vzniklého produktu je přímo úměrná koncentraci glukózy v analyzovaném vzorku (Kotyza et al. 2007).



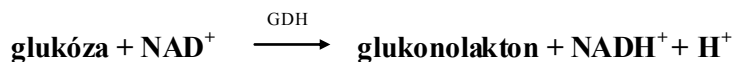
3.7.5 Enzymová metoda s hexokinázou

Glukóza přítomná v analyzovaném vzorku v přítomnosti adenosintrifosfátu (ATP) a hořečnatých iontů za katalytického působení hexokinázy (HK) je fosforylována na glukózo-6-fosfát a adenosindifosfát (ADP). Glukózo-6-fosfát se v přítomnosti NADP^+ oxiduje na glukonát-6-fosfát, současně dochází k redukci NADP^+ na NADPH pomocí enzymu glukózo-6-fosfátdehydrogenázy (G-6-PDH). Sleduje se nárůst absorpance NADPH při 340 nm, která je přímo úměrná koncentraci glukózy v analyzovaném vzorku (Kotyza et al. 2007, Yee et al. 1972).



3.7.6 Enzymová metoda s glukózodehydrogenázou

Je to obdoba metody glukózooxidázové, za použití enzymu glukózodehydrogenázy (GDH). Tato metoda v našich klinických laboratořích z ekonomických důvodů není příliš využívána. (Dastych et al. 2008).



3.7.7 Metody elektrochemické

Tyto metody jsou založeny na enzymatické reakci a její amperometrické detekci. Používá se Clarkova kyslíková elektroda, která má na svém povrchu membránu s imobilizovanou glukózooxidázou. Tento enzym katalyzuje oxidaci glukózy vzdušným kyslíkem a vzniká glukonolakton a peroxid vodíku. Při této reakci se měří úbytek kyslíku spotřebovaného při reakci Clarkovou kyslíkovou elektrodou. Úbytek kyslíku se projeví poklesem elektrického proudu, který je přímo úměrný koncentraci glukózy ve vzorku (Doležalová et al. 1995). Na elektrochemickém principu jsou založeny i glukometry, které slouží k rychlému měření glykémie v domácím prostředí. Do glukometru se vkládají testovací proužky, které mají na svém povrchu imobilizovaný enzym glukózooxidázu. Po nanesení kapky krve na testovací proužek dochází k enzymatické reakci, při které vzniká glukonolakton a peroxid vodíku. Uvolněný peroxid vodíku je elektrochemicky redukován na vodu a vzniklý elektrický proud je úměrný koncentraci glukózy ve vzorku (Dohnal, Štern 2008).

3.7.8 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně – chemická metoda pro určování hmotnosti atomů a molekul po jejich převedení na ionty. Využívá ke kvantitativnímu stanovení látek rozdílného chování jejich ionizovaných molekul v elektrickém a magnetickém poli. Molekuly se ionizují proudem rychle letících elektronů. Vzniklé ionty procházejí elektrickým proudem, kde se urychlují podle velikosti náboje a kolmo působícím magnetickým polem se vychylují ze své dráhy podle velikosti hmotnosti a dopadají na detektor. Ten pak následně poskytuje signál, který je úměrný počtu dopadajících iontů. Výsledkem je hmotnostní spektrum, které graficky znázorňuje závislost četnosti iontů na jejich hmotnosti a náboji (Doležalová et al. 1995). Hmotnostní spektrometrie s izotopovým zředováním je metoda přístrojově náročná, ekonomicky nevýhodná, doba analýzy je delší, ale chyba metody pouze 0,1 %. V klinických laboratořích se z

ekonomických důvodů a kvůli dlouhé době analýzy neprovádí. Používá se ke stanovení hodnot glukózy v referenčních materiálech (Štern et al. 2005).

4. Hypotéza a cíl práce

4.1 Hypotéza

Hypotéza předpokládá snížení hladiny glukózy u těch vzorků, kdy krev byla odebrána do zkumavek bez přídavku antiglykolitického činidla tak, jak se udává v odborné literatuře a potvrzuje tak vliv stabilizačních činidel na koncentraci glukózy v závislosti na čase. Zároveň předpokládá vyšší stabilitu glukózy u vzorků odebraných do zkumavek se separačním gelem.

4.2 Cíl práce

Cílem mé práce bylo stanovení koncentrace glukózy v krvi (séru) a plazmě a posouzení rozdílnosti její stability v různých odběrových systémech u náhodné skupiny 50 osob. Měření jsem provedla ve třech typech zkumavek, jeden typ obsahoval separační gel, který během centrifugace oddělil sérum od krevních elementů, druhý typ zkumavek byl bez gelu a bez stabilizačního činidla a třetí typ zkumavek obsahoval stabilizační činidlo (inhibitor glykolýzy) NaF. Původním záměrem bylo stanovení koncentrace glukózy pouze ve dvou typech zkumavek: ve zkumavce se stabilizátorem NaF a ve zkumavce se separačním gelem, (tento typ zkumavek je v ordinacích lékařů používán nejčastěji), ale pak jsem ještě použila třetí typ zkumavky - bez stabilizátoru a bez separačního gelu pro ještě názornější představu (ne)stability glukózy v dalším typu odběrového systému. Měření jsem provedla ve třech časových intervalech: po 1, 6 a 24 hodinách po odběru pomocí nejmodernější laboratorní techniky a následně vyhodnotila a porovнала data naměřených hodnot v rozdílných souborech vzorků.

5. Metodika

Vzorky, které byly použity pro tuto práci, byly odebrány v odběrové místnosti společnosti Synlab s.r.o. České Budějovice a ihned dopraveny do laboratoře k samotnému zpracování. Krev byla odebrána 50 pacientům, každému po 3 zkumavkách, jedna zkumavka s inhibítozem glykolýzy, druhá bez separačního gelu a inhibítozem glykolýzy a třetí bez inhibítozem glykolýzy ale se separačním gelem. U všech vzorků byla měřena hladina glukózy 1 hodinu po odběru, 6 hodin po odběru a 24 hodin po odběru.

5.1 Preanalytická část

Obsahuje soubor všech činností a postupů, kterými projde vzorek od okamžiku požadavku vyšetření do okamžiku vložení vzorku do analytického systému (Dastyh et al. 2008).

5.1.2 Preanalytická fáze (mimolaboratorní)

Preanalytickou fází můžeme rozdělit na část mimolaboratorní a laboratorní. Mimolaboratorní fáze obsahuje všechny postupy mimo laboratoř, lze do ní zařadit i přípravu pacienta k odběru, vlastní odběr, identifikaci odebraného materiálu, jeho uchování a transport do laboratoře (Racek et al. 2006).

Preanalytická fáze může významným způsobem ovlivnit výsledek laboratorního vyšetření. Podle studií až 60 % chyb při laboratorním vyšetření vzniká právě v této fázi. Zdaleka nejvíce chyb vzniká mimo laboratoř, na odděleních a v ordinacích lékařů. Nedostatky a chyby v této části mohou být velmi nebezpečné a mohou vést k chybným výsledkům nebo jejich nesprávné interpretaci. Ve svých důsledcích mohou vést k opakovaným vyšetřením a v některých případech dokonce až k poškození pacienta (Čermáková, Štěpánová 2003).

Nejúčinnější způsob, jak se vyhnout chybám, je mít zavedený kompletní systém řízení kvality dle ISO 15189 (Laix et al. 2012). Vlivy, které mohou ovlivnit výsledek vyšetření, jsou různé – pohlaví, věk, váha, složení stravy, léky, choroby, fyzický a psychický stres, psychotropní látky (káva, drogy, alkohol).

5.1.3 Příprava pacienta před odběrem

Poučení pacienta před odběrem hraje důležitou roli v celém procesu laboratorního vyšetření. Je důležité, aby byl pacient poučen o opatřeních, které má před odběrem dodržet. (Rozsypalová, Haladová, Šafránková 2002). Nejčastější chyby před odběrem: pacient nebyl na lačno, odběr byl proveden po zvýšené tělesné námaze, pacient před odběrem dlouho nepil a výsledky mohou být ovlivněny dehydratací, pacient nevynechal před odběrem léky (Šamánková et al. 2006).

5.1.4 Preanalytická fáze (laboratorní)

Tato fáze začíná příjmem biologického materiálu do laboratoře a končí vložení vzorku do příslušného analyzátoru. Při příjmu do laboratoře se provede přezkoumání vzorku (ověření shodnosti a úplnosti identifikačních údajů pacienta, správnost odběru), zápis do LIS (Laboratorní Informační Systém) a označení vzorků čárovým identifikačním kódem. Po příjmu a identifikaci materiálu se provede centrifugace (2500 otáček po dobu 10 minut). Poté se připraví sekundární analytické vzorky – alikvoty, označí se také čárovým kódem a vloží se do příslušného analyzátoru (Dastyh et.al. 2008).

5.2 Analytická fáze

Tato fáze začíná vložení vzorku do analyzátoru. Každá laboratoř má své vlastní standardní operační postupy (SOP). Obsahují návod, jak postupovat při přípravě

diagnostických reagensů, zhotovení kalibrací, provedení kontrol a vlastní měření vzorků.

5.2.2 Kontrola kvality

Kontrola kvality v oblasti laboratorní medicíny se vztahuje na všechny postupy běžně používané v laboratořích. Cílem je zjistit případné chyby a opravit je dříve, než jsou vydány výsledky. Zejména vnitřní kontrola kvality (IHK) a externí hodnocení kvality (EHK) jsou programy, které slouží k hodnocení a zlepšování kvality v laboratorní medicíně. Pokud kontrolní vzorky nedávají očekávané (shodné) výsledky v určitém referenčním rozmezí, musí laboratoř zjistit příčinu a neodkladně ji odstranit (Nichols et al. 2011).

5.2.3 Validace

Základním aspektem validace je, že metoda splňuje potřeby uživatelů laboratorních služeb (klinický aspekt). U metod s CE značkou to dokládá výrobce. Dalším aspektem je validace vlastního analytického postupu (základní znaky analytické metody). Hlavním cílem validace je hodnocení analytických a výkonnostních znaků metod a průkaz, že bylo dosaženo požadované úrovně těchto znaků. V laboratorní medicíně to znamená, že výsledky měření jsou efektivním nástrojem diagnostiky, terapie a prevence. Validace metod je v klinických laboratořích vyžadována normami Systému řízení kvality (ISO 17025, ISO 15189).

Validace potvrzuje, že měřicí postup (měřicí systém) je schopen plnit požadavky na ně kladené. Jinak řečeno, že úroveň měření je dostatečná, postupy měření korektní a s řádně provedenou kalibrací (Friedecký 2004).

5.2.4 Verifikace

Účelem laboratorní verifikace metod je potvrzení, že získané hodnoty analytických a výkonnostních znaků jsou ve shodě s hodnotami deklarovanými výrobcem a že jich lze v konkrétní laboratoři docílit za běžných podmínek rutinní činnosti. Předmětem verifikace je schopnost realizovat měřicí proces v konkrétní laboratoři v daném čase a prostoru. Rozhodujícím výstupem verifikace by měla být seriózně stanovená hodnota nejistoty měření (Friedecký 2004).

5.2.5 Aritmetický průměr

Aritmetický průměr AM se vypočítá jako podíl součtu všech naměřených hodnot k počtu měření.

5.2.6 Směrodatná odchylka

Vypovídá o tom, jak moc se od sebe navzájem liší výsledky v souboru zkoumaných čísel. Je-li malá, jsou si soubory většinou navzájem podobné. Naopak velká směrodatná odchylka signalizuje velkou vzájemnou odlišnost. Směrodatná odchylka je nejužívanější míra variability.

5.2.7 Dosažená hladina významnosti

Dosažená hladina významnosti (p) – pravděpodobnost obdržení dat odporujících nulové hypotéze (za předpokladu, že je nulová hypotéza pravdivá), pak platí: je-li hodnota (p) menší než 5 %, je výsledek statisticky významný a je-li hodnota (p) menší než 1 % mluvíme o vysoké statistické významnosti.

Obvyklá praxe pokládá statisticky významný výsledek za skutečný efekt a v důsledku toho za klinicky důležitý. To však nemusí být oprávněné, protože někdy může být rozdíl statisticky významný, ale klinicky nevýznamný!

5.2.8 Rozptyl

Vyjádřuje velikost rozptýlení hodnot kolem její střední hodnoty.

5.3 Postanalytická fáze

Sem patří systém komunikace mezi lékařem indikujícím vyšetření a laboratoří. Patří sem doprava výsledků v tištěné podobě zpět do ordinace lékaře, současně probíhá i elektronický přenos výsledků, konzultace a telefonické hlášení patologických hodnot.

5.4 Stanovení glukózy – provedení testu

Odběr vzorku krve na stanovení glykémie se provádí nejméně po 8 hodinovém lačnění. Před odběrem je nutno vyloučit jakoukoliv fyzickou námahu a kouření. Pacient má být 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. Krev je nutné po odběru promíchat opakovaným převrácením zkumavky. Plazma má být oddělena od krevních elementů do 60 minut (Janssen, Delanghe 2010).

5.4.2 Princip testu

Jedná se o in vitro test pro kvantitativní stanovení glukózy v lidském séru, plazmě, moči a mozkomíšním moku (CSF) na systémech Cobas Integra.

Glukóza přítomná v analyzovaném vzorku je fosforylována hexokinázou (HK) za přítomnosti adenosintrifosfátu (ATP) a hořčnatých iontů. Vzniká glukózo-6-fosfát a adenosindifosfát (ADP). V následné reakci se glukózo-6-fosfát v přítomnosti NADP⁺ oxiduje na glukonát-6-fosfát, současně dochází k redukci NADP⁺ na NADPH za katalytického působení enzymu glukózo-6-fosfátdehydrogenázy (G-6-PDH). Sleduje se nárůst absorbance NADPH při 340 nm, která je přímo úměrná koncentraci glukózy v analyzovaném vzorku.

5.4.3 Analyzátor Cobas Integra 800

Vlastní měření vzorků bylo provedeno na biochemickém analyzátoru Cobas Integra 800 (obr. č. P1) od společnosti Roche Diagnostics. Jedná se o plně automatický biochemický analyzátor s uzavřeným systémem, který provádí všechny požadavky na testy automaticky a je opatřen měřicími moduly pro absorpční spektrofotometrii, fluorescenční polarizaci, turbidimetrii a potenciometrické měření iontově selektivními elektrodami (ISE). Přístroj využívá 72 různých metod na palubě s více než 150 aplikacemi a výkonem až 855 testů za hodinu. Analyzátor se skládá z vlastního přístroje a datové stanice složené z PC, LCD monitoru, klávesnice, ovladače (myši), tiskárny a software. Bližší informace jsou dostupné na webové adrese: www.roche-diagnostics.cz.

5.4.4 Postup měření na analyzátoru Cobas Integra 800

Prvním krokem je zadání údajů o vzorku a volba typu testu do laboratorního informačního systému (LIS). Primární zkumavka s čárovým kódem se přiloží k laserové čtečce a tím dojde k načtení všech požadavků zapsaných v LIS, současně systém vygeneruje a vytiskne sekundární štítek s čárovým kódem. Tyto štítky se nalepí na sekundární zkumavky a napipetuje se potřebné množství séra či plazmy, tak se vytvoří sekundární vzorky (aliquoty).

Alikvoty umístíme do speciálních stojánek, ty se umístí na plošinu určenou pro stojánku se vzorky, stisknutím tlačítka START se zahájí vlastní analýza. Na vstupu stojánku do pracovní části analyzátoru dochází k načtení identifikačního čárového kódu a k přenosu informace o požadovaných analýzách z LIS. Další zpracování a doprava vzorku je zajištěna robotizovanými prvky uvnitř analyzátoru. Výsledek analýzy je opět automaticky přenesen do LIS a vytisknut v podobě laboratorního výsledku.

5.4.5 Reagencie analyzátoru Cobas Integra 800

Reagencie (obr. č. P2) jsou připraveny přímo k použití, skladují se při 2-8 °C, po otevření jsou stabilní po dobu 8 týdnů.

Reagencie R1 obsahuje: MES pufr (pH 6), ATP, Mg^{2+} , NADP a konzervační prostředek.

Reagencie R2 obsahuje: Mg^{2+} , HEPES pufr (pH 8), HK (kvasinky), G6PHD (mikrob.), konzervační prostředek.

5.4.6 Kalibrace analyzátoru Cobas Integra 800

Pro analýzu byl použit *kalibrátor Calibrator for automated systems* dodávaný firmou Roche Diagnostics. Jedná se o lyofilizovaný kalibrační materiál připravený na bázi lidského séra se známou koncentrací glukózy pro daný princip reakce. Kalibrátor je navázán na referenční metodu ID-MS. Kalibrace je lineární, dvoubodová (prvním bodem je destilovaná voda, druhým bodem je kalibrátor o přesně dané koncentraci).

5.4.7 Kontrola kvality analyzátoru Cobas Integra 800

Ke kontrole kvality byly použity kontrolní materiály *Precinorm U* a *Precipath U* o přesně dané koncentraci. Opět jde o lyofilizovaná séra připravená na bázi lidského séra,

keré je nutné před použitím rozpustit stejně jako kalibrační materiál. *Precinorm U* má normální hodnotu glukózy a *Precipath U* má patologickou hodnotu.

Kontrolní materiál se skladuje v lednici při 2-8 °C, kde je stabilní do doby expirace vyznačené na lahvičce. Po rozpuštění v deionizované vodě je stabilní 2 dny při 2-8 °C nebo 4 týdny při -20 °C.

5.4.8 Referenční meze

Dospělí: 3,6–5,9 mmol/l

5.4.9 Metrologické parametry

Rozsah měření: 0,24-40 mmol/l

Mez detekce: 0,24 mmol/l

Výtěžnost: ±10 %

Interference:

- a) hemolýza – bezvýznamná do hodnoty hemoglobinu 774 µmol/l
- b) ikterus – bez významných interferencí do hodnoty bilirubinu 1026 µmol/l,
- c) lipémie – bez významných interferencí do hodnoty L indexu 1900 µmol/l.

6. Výsledky měření

6.1 Závislost stability glukózy na čase a typu použité "zkumavky"

V tabulkách 1 a 2 uvádím naměřené hodnoty glukózy ze tří typů „zkumavek“ u 50 náhodně vybraných osob.

Tabulka 1: Naměřené hodnoty 1 hodinu a 6 hodin po odběru

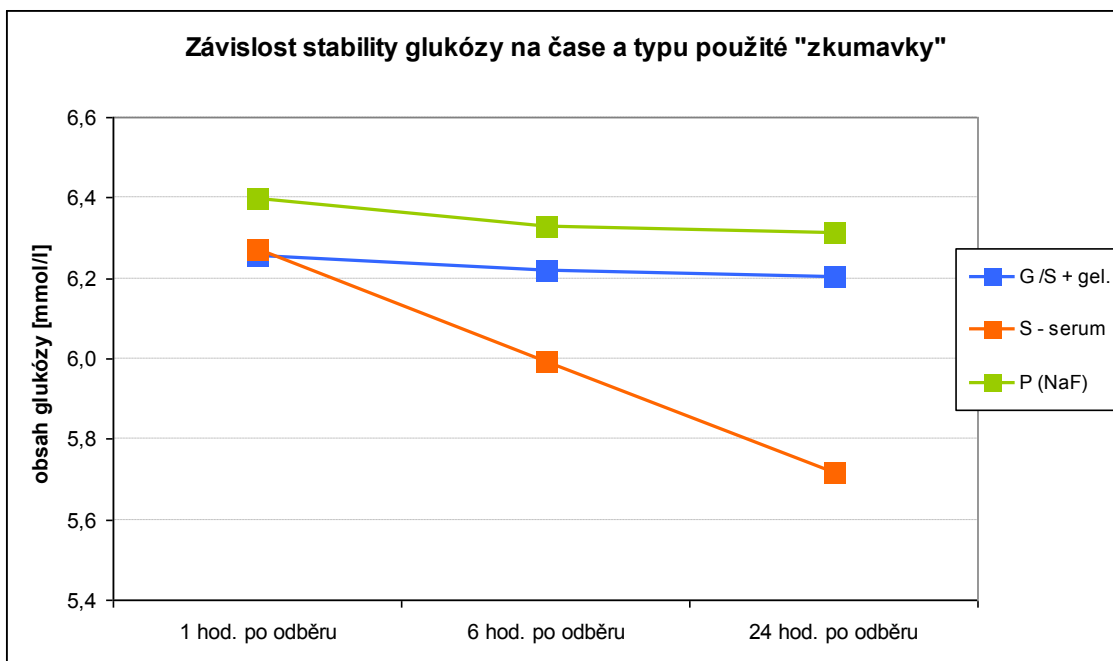
Vzorek	1 hod po odběru				6 hod po odběru			
	G/S +gel.	S - sérum	P (NaF)	Jednotky	G/S+gel.	S - sérum	P (NaF)	Jednotky
1.	5,7	5,5	5,8	mmol/l	5,8	5,4	5,9	mmol/l
2.	5,6	5,8	5,7	mmol/l	5,6	5,3	5,7	mmol/l
3.	5,3	5,2	5,5	mmol/l	5,3	5,0	5,3	mmol/l
4.	4,6	4,6	4,9	mmol/l	4,5	4,4	4,8	mmol/l
5.	5,2	5,2	5,3	mmol/l	5,2	5,0	5,2	mmol/l
6.	5,6	5,6	5,9	mmol/l	5,6	5,4	5,9	mmol/l
7.	7,4	7,6	7,6	mmol/l	7,4	7,4	7,7	mmol/l
8.	5,3	5,2	5,4	mmol/l	5,3	5,2	5,3	mmol/l
9.	5,2	5,1	5,3	mmol/l	5,2	5,0	5,1	mmol/l
10.	7,6	7,6	7,7	mmol/l	7,6	7,4	7,6	mmol/l
11.	5,9	5,8	6,0	mmol/l	5,9	5,6	5,9	mmol/l
12.	6,0	5,9	6,0	mmol/l	5,9	5,3	6,0	mmol/l
13.	4,9	4,9	5,0	mmol/l	4,9	4,5	5,0	mmol/l
14.	6,0	5,9	6,4	mmol/l	6,0	5,5	6,3	mmol/l
15.	5,3	5,5	5,4	mmol/l	5,3	5,1	5,3	mmol/l
16.	5,1	5,0	5,1	mmol/l	5,0	4,9	5,1	mmol/l
17.	6,0	6,0	6,1	mmol/l	6,0	5,8	6,0	mmol/l
18.	13,4	13,4	13,5	mmol/l	13,3	13,2	13,4	mmol/l
19.	6,0	6,3	6,3	mmol/l	6,0	6,0	6,3	mmol/l
20.	5,5	5,5	5,9	mmol/l	5,5	5,2	5,7	mmol/l
21.	5,9	6,1	5,8	mmol/l	5,9	5,6	5,8	mmol/l
22.	7,0	6,8	7,0	mmol/l	6,9	6,4	6,9	mmol/l
23.	5,2	5,2	5,2	mmol/l	5,2	4,9	5,2	mmol/l
24.	5,7	5,7	5,7	mmol/l	5,7	5,5	5,7	mmol/l
25.	4,9	4,9	5,0	mmol/l	4,9	4,6	4,9	mmol/l
26.	9,4	9,3	9,5	mmol/l	9,6	8,8	9,4	mmol/l
27.	13,0	12,9	13,2	mmol/l	13,0	12,3	13,0	mmol/l
28.	6,1	6,1	6,2	mmol/l	6,1	5,9	6,2	mmol/l
29.	7,2	7,2	7,5	mmol/l	7,1	7,0	7,4	mmol/l
30.	16,0	16,0	16,0	mmol/l	16,1	15,3	16,0	mmol/l
31.	5,8	5,6	5,8	mmol/l	5,7	5,4	5,9	mmol/l
32.	5,0	5,0	5,2	mmol/l	4,9	4,7	5,1	mmol/l
33.	4,7	4,8	4,8	mmol/l	4,8	4,5	4,8	mmol/l
34.	5,5	5,5	5,6	mmol/l	5,5	5,3	5,6	mmol/l

Vzorek	1 hod po odběru				6 hod po odběru			
	G/S +gel.	S - sérum	P (NaF)	Jednotky	G/S+gel.	S - sérum	P (NaF)	Jednotky
35.	5,2	5,2	5,4	mmol/l	5,1	5,1	5,2	mmol/l
36.	5,7	5,7	5,7	mmol/l	5,6	5,6	5,8	mmol/l
37.	4,8	4,8	5,1	mmol/l	4,7	4,6	5,0	mmol/l
38.	5,1	5,1	5,4	mmol/l	5,0	4,8	5,2	mmol/l
39.	5,2	5,4	5,4	mmol/l	5,1	4,9	5,2	mmol/l
40.	5,1	5,1	5,3	mmol/l	5,0	5,0	5,2	mmol/l
41.	5,5	5,7	5,8	mmol/l	5,5	5,4	5,6	mmol/l
42.	4,2	4,3	4,4	mmol/l	4,1	4,0	4,4	mmol/l
43.	5,2	5,4	5,5	mmol/l	5,1	5,2	5,4	mmol/l
44.	7,0	7,2	7,2	mmol/l	6,9	7,0	7,2	mmol/l
45.	5,4	5,6	5,6	mmol/l	5,3	5,0	5,5	mmol/l
46.	6,2	6,3	6,3	mmol/l	6,1	6,0	6,3	mmol/l
47.	5,8	6,0	6,1	mmol/l	5,7	5,7	6,0	mmol/l
48.	6,3	6,1	6,1	mmol/l	6,2	6,0	6,1	mmol/l
49.	5,9	6,0	5,9	mmol/l	5,8	5,6	5,9	mmol/l
50.	7,2	7,0	7,3	mmol/l	7,1	6,8	7,1	mmol/l
Průměr	6,3	6,3	6,4	mmol/l	6,2	6,0	6,3	mmol/l
				Rozdíl	-0,04	-0,28	-0,07	mmol/l
				Rozdíl %	-0,6 %	-4,5 %	-1,0 %	

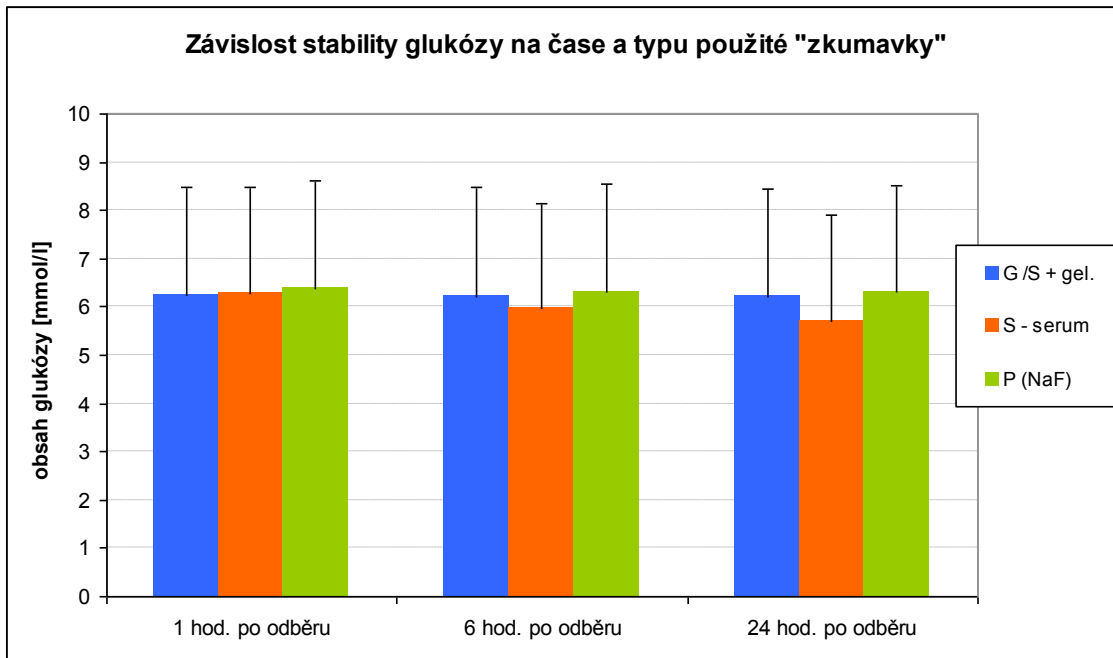
Tabulka 2: Naměřené hodnoty 1 hodinu a 24 hodin po odběru

Vzorek	1 hod po odběru				24 hod po odběru			
	G/S +gel.	S - sérum	P (NaF)	Jednotky	G/S+gel.	S - sérum	P (NaF)	Jednotky
1.	5,7	5,5	5,8	mmol/l	5,7	5,1	5,8	mmol/l
2.	5,6	5,8	5,7	mmol/l	5,6	5,3	5,7	mmol/l
3.	5,3	5,2	5,5	mmol/l	5,3	4,6	5,3	mmol/l
4.	4,6	4,6	4,9	mmol/l	4,5	4,0	4,8	mmol/l
5.	5,2	5,2	5,3	mmol/l	5,2	4,6	5,2	mmol/l
6.	5,6	5,6	5,9	mmol/l	5,6	4,8	5,8	mmol/l
7.	7,4	7,6	7,6	mmol/l	7,4	7,1	7,6	mmol/l
8.	5,3	5,2	5,4	mmol/l	5,3	4,7	5,3	mmol/l
9.	5,2	5,1	5,3	mmol/l	5,2	4,8	5,1	mmol/l
10.	7,6	7,6	7,7	mmol/l	7,6	7,1	7,5	mmol/l
11.	5,9	5,8	6,0	mmol/l	5,8	5,3	5,8	mmol/l
12.	6,0	5,9	6,0	mmol/l	6,0	5,1	5,9	mmol/l
13.	4,9	4,9	5,0	mmol/l	4,9	4,1	5,0	mmol/l
14.	6,0	5,9	6,4	mmol/l	6,1	5,5	6,0	mmol/l
15.	5,3	5,5	5,4	mmol/l	5,3	4,9	5,3	mmol/l
16.	5,1	5,0	5,1	mmol/l	5,1	4,3	5,1	mmol/l
17.	6,0	6,0	6,1	mmol/l	6,0	5,4	6,0	mmol/l
18.	13,4	13,4	13,5	mmol/l	13,2	13,0	13,4	mmol/l

Vzorek	1 hod po odběru				24 hod po odběru			
	G/S +gel.	S - sérum	P (NaF)	Jednotky	G/S+gel.	S - sérum	P (NaF)	Jednotky
19.	6,0	6,3	6,3	mmol/l	6,0	5,4	6,0	mmol/l
20.	5,5	5,5	5,9	mmol/l	5,5	5,0	5,9	mmol/l
21.	5,9	6,1	5,8	mmol/l	5,8	5,4	5,8	mmol/l
22.	7,0	6,8	7,0	mmol/l	6,9	5,9	6,9	mmol/l
23.	5,2	5,2	5,2	mmol/l	5,2	4,8	5,2	mmol/l
24.	5,7	5,7	5,7	mmol/l	5,7	4,9	5,8	mmol/l
25.	4,9	4,9	5,0	mmol/l	4,9	4,4	5,0	mmol/l
26.	9,4	9,3	9,5	mmol/l	9,4	8,6	9,4	mmol/l
27.	13,0	12,9	13,2	mmol/l	13,0	12,0	13,1	mmol/l
28.	6,1	6,1	6,2	mmol/l	6,1	5,5	6,2	mmol/l
29.	7,2	7,2	7,5	mmol/l	7,2	6,7	7,4	mmol/l
30.	16,0	16,0	16,0	mmol/l	16,0	15,4	16,0	mmol/l
31.	5,8	5,6	5,8	mmol/l	5,8	5,0	5,9	mmol/l
32.	5,0	5,0	5,2	mmol/l	5,0	4,3	5,0	mmol/l
33.	4,7	4,8	4,8	mmol/l	4,6	4,4	4,8	mmol/l
34.	5,5	5,5	5,6	mmol/l	5,3	5,4	5,6	mmol/l
35.	5,2	5,2	5,4	mmol/l	5,1	4,9	5,2	mmol/l
36.	5,7	5,7	5,7	mmol/l	5,6	5,5	5,8	mmol/l
37.	4,8	4,8	5,1	mmol/l	4,6	4,5	5,0	mmol/l
38.	5,1	5,1	5,4	mmol/l	5,0	4,2	5,2	mmol/l
39.	5,2	5,4	5,4	mmol/l	5,0	4,5	5,2	mmol/l
40.	5,1	5,1	5,3	mmol/l	5,1	4,8	5,1	mmol/l
41.	5,5	5,7	5,8	mmol/l	5,4	5,0	5,7	mmol/l
42.	4,2	4,3	4,4	mmol/l	4,0	3,9	4,3	mmol/l
43.	5,2	5,4	5,5	mmol/l	5,2	5,0	5,4	mmol/l
44.	7,0	7,2	7,2	mmol/l	6,8	6,7	7,1	mmol/l
45.	5,4	5,6	5,6	mmol/l	5,5	4,9	5,5	mmol/l
46.	6,2	6,3	6,3	mmol/l	6,0	6,0	6,3	mmol/l
47.	5,8	6,0	6,1	mmol/l	5,7	5,5	6,0	mmol/l
48.	6,3	6,1	6,1	mmol/l	6,1	5,8	6,1	mmol/l
49.	5,9	6,0	5,9	mmol/l	5,8	5,4	6,0	mmol/l
50.	7,2	7,0	7,3	mmol/l	7,1	6,5	7,2	mmol/l
Průměr	6,3	6,3	6,4	mmol/l	6,2	5,7	6,3	mmol/l
				Rozdíl	-0,02	-0,27	-0,02	mmol/l
				Rozdíl %	-0,8 %	-8,8 %	-1,3 %	



Obr. č. 3: Graf výsledků měření



Obr. č. 4: Graf výsledků měření

6.2 Statistické hodnocení

Hladina glukózy měřená 1 hodinu po odběru byla ve všech třech typech zkumavek téměř shodná, podstatnější rozdíly byly naměřeny u vzorků změřených 6 a 24 hodin po odběru (tabulka 3).

Tabulka 3:

Typ použité zkumavky	Vzorek	Čas (hodiny od odběru) rozdíl (%)	
		6 hod	24 hod
Zkumavka s gelem	sérum (S/G)	-0,6	-0,8
Zkumavka bez gelu	sérum (S)	-4,5	-8,8
Zkumavka s NaF	plazma (P/NaF)	-1,0	-1,3

Nejprve bylo otestováno, zda data mají normální rozdělení. Na základě výsledku testu Shapiro-Wilk (tabulka 4) je zřejmé, že data nemají normální rozdělení.

Tabulka 4: Test normality

Typ zkumavky měřené v čase	Shapiro - Wilk		
	Statistika	Stupně volnosti	Signifikance
G /S + gel. 1h	0,602	50	<0,1 %
S - serum 1h	0,604	50	<0,1 %
P (NaF) 1h	0,597	50	<0,1 %
G /S + gel. 6h	0,603	50	<0,1 %
S - serum 6h	0,610	50	<0,1 %
P (NaF) 6h	0,602	50	<0,1 %
G /S + gel. 24h	0,607	50	<0,1 %
S - serum 24h	0,608	50	<0,1 %
P (NaF) 24h	0,595	50	<0,1 %

Hodnoty dat nemají normální rozdělení, proto k dalšímu porovnání musíme použít neparametrické testy.

6.3 Statistické rozdíly a statistická významnost naměřených dat

Porovnání měření ve třech časových intervalech pomocí testu Friedmanova ANOVA (tj. neparametrické porovnání opakovaných měření) v čase 1, 6 a 24 hodin (tabulka 5).

Tabulka 5: Friedmanova ANOVA

Friedmanova ANOVA	1 hodina	6 hodin	24 hodin
Počet měření	50	50	50
Chi - kvadrát test	44,0	78,2	85,3
Stupně volnosti	2	2	2
Signifikance	<0,1 %	<0,1 %	<0,1 %

Ve všech třech časech je rozdíl mezi třemi měřeními statisticky významný.

Abychom odhalili, která měření jsou nejvíce odlišná, provedli jsme Wilcoxonův neparametrický test pro dvě skupiny (tabulka 6).

Tabulka 6: Wilcoxonův test

Wilcoxonův test	S - sérum 1 x G/S + gel. 1 hod	P (NaF) 6 x G/S + gel. 6 hod	P (NaF) 24 x G/S + gel. 24 hod
Z	-1,100	-4,438	-4,538
Signifikance	27,1 %	<0,1 %	<0,1 %

Z výsledků testů vyplývá, že v čase 1 hodina se měření G/S +gel a S - sérum neliší. Statisticky odlišné od ostatních dvou měření jsou tedy pouze hodnoty P (NaF).

Po 6 i 24 hodinách jsou ale dvě podobná měření statisticky odlišná, takže v závislosti na čase se liší všechna tři měření.

7. Diskuze

Hlavním cílem mé práce bylo posoudit rozdílnost stability glukózy ve dvou odběrových systémech: ve zkumavkách se stabilizátorem glukózy NaF a ve zkumavkách bez stabilizátoru - zde jsem použila dva typy zkumavek: zkumavku se separačním gelem, který po centrifugaci oddělí sérum od krevních elementů a zkumavku bez separačního gelu.

Měření jsem provedla ve třech časových intervalech: po 1 hodině, 6 a 24 hodinách po odběru. Za 1 hodinu po odběru je koncentrace glukózy jednotlivých vzorků ve všech třech typech použitých zkumavek téměř shodná. Pokles stability glukózy a tím také snížení její hladiny je patrný u vzorků měřených za 6 a 24 hodin po odběru. U vzorků, které byly odebrány do zkumavek se separačním gelem a měřeny 6 hodin po odběru je pokles stability glukózy 0,6 %, u vzorků odebraných do zkumavek se stabilizátorem 1,0 %. Nejvyšší pokles stability je vidíme u vzorků odebraných do zkumavek bez stabilizátoru a separačního gelu: 4,5 %. Výsledky měření 24 hodin po odběru ukázaly snížení hladiny glukózy ve vzorcích odebraných do zkumavek se separačním gelem 0,8 %, ve vzorcích odebraných do zkumavek se stabilizátorem 1,3 % a nejvyšší pokles stability byl u vzorků odebraných do zkumavek bez stabilizátoru a separačního gelu: 8,8 %. Měření glykemie 24 hodin po odběru se běžně v laboratořích neprovádí, tento časový interval jsem použila pro názornou ukázkou nestability glukózy, pokud by odběr vzorku byl proveden do zkumavky bez separačního gelu a stabilizátoru nebo pokud u vzorku nebyla včas provedena centrifugace.

8. Závěr

Krev na vyšetření glykémie by měla být odebrána do zkumavky se stabilizátorem NaF a ihned zpracována v laboratoři. Pokud má pacient kromě glukózy požadovaná i jiná vyšetření, odběr vzorku by měl být provedený do zkumavky se separačním gelem, který po centrifugaci oddělí sérum od krevních elementů. Centrifugace by měla být proběhnout do 30 minut od odběru vzorku. Ovšem v praxi je toto velký technicko-organizační problém.

Proto by ošetřující lékař měl brát v úvahu pokles stability glukózy a tím i možné snížení hodnoty naměřené glykémie o 5 až 10 % v závislosti na typu použitého odběrového systému a intervalu mezi odběrem a zpracováním vzorku.

Seznam použité literatury

ABDUL-GHANI, M., et al. *Two-step approach for the prediction of future type 2 diabetes risk*. *Diabetes Care*, 2011, vol. 34, no. 9, p. 2108–12.

BARTOŠ, V., et al. *Preanalytická fáze*. 1st ed. Praha: ČLS JEP SEKK, 2005. ISBN 80-239-5198-X.

BRUNS, D., KNOWLER, W. *Stabilization of glukose in blood samples: why it matters*. *Clin Chem.*, 2009, vol. 55/5, p. 850–2.

ČERMÁKOVÁ, M., ŠTĚPÁNOVÁ, I. *Klinická biochemie 1. díl*. 1st ed. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 2003. ISBN 978-80-210-4572-9.

DASTYCH, M., BREINEK, P., et al. *Klinická biochemie*. 1st ed. Brno: Masarykova univerzita, 2008. ISBN 978-80-210-4572-9.

DOHNAL, L., ŠTERN, P. *Stanovení glukózy glukometrem – mýty a skutečnost*. *Informační bulletin FONS*, 2008, no. 3, p. 36–38. ISSN 1211-7137.

DOLEŽALOVÁ, V., et al. *Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii*. 4th ed. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995. ISBN 80-7013-198-5.

FERENČÍK, M., et al. *Biochémiá*. 1st ed. Bratislava: Slovak Academic Press, 2000. ISBN 80-88908-58-2.

GAMBINO, R., BRUNS, D. *Stabilization of glucose in blood samples: out with the old, in with the new*. *Adv. Clin. Chem.*, 2009, vol. 55, no. 5, p. 1019–21.

CHLUP, R., et al. *Úvod do diagnostiky a léčby diabetu*. 1st ed. Olomouc: Univerzita Palackého, 2000. ISBN 80-244-0091-X.

JANSEN, K., DELANGHE, J. *Importance of the pre-analytical phase in blood glukose analysis*. *Acta Clinica Belgica*, 2010, vol. 65, no. 5, p. 311–318.

JIRKOVSKÁ, A., et al. *Jak (si) léčit a kontrolovat diabetes: Manuál pro edukaci diabetiků*. Praha: Svaz diabetiků ČR, 2003. ISBN 80-902126-6-2.

KAPOUNOVÁ, G. *Ošetrovatelství v intenzivní péči*. 1st ed. Praha: Grada, 2007. ISBN 978-80-247-1830-9.

KLENER, P., et al. *Vnitřní lékařství*. 3rd ed. Praha: Galen, 2006. ISBN 80-7262-430-X.

KOTYZA, J., et al. *Úvod do klinické biochemie a enzymologie pro studující lékařství*. 1st ed. Praha: Karolinum, 2007. ISBN 978-80-246-1350-5.

- KREJSEK, J., KOPECKÝ, O. *Klinická imunologie*. 1st ed. Pardubice: Nukleus, 2004. ISBN 80-86225-50-X.
- LAI, Y., et al. *Analysis of factor influencing the generation of unqualified clinical samples and measures to prevent this generation*. *Ann Lab Med*, 2012, no. 32, p. 216–219.
- LEBL, J., PRŮHOVÁ, Š., et al. *Abeceda diabetu*. 2nd ed. Praha: Maxdorf, 2004. ISBN 80-7345-022-4.
- MASOPUST, J. *Klinická biochemie. Požadování a hodnocení biochemických vyšetření část I*. 1st ed. Praha: Karolinum, 1998. ISBN 80-7184-648-1.
- MUSIL, J. *Molekulové základy klinické biochemie*. 1st ed. Praha, 1994. ISBN 80-7169-056-2.
- NICHOLS, J. *Laboratory quality kontrol based on risk management*. *Ann Saudi Med.*, 2011, vol. 31, no. 3, p. 223–8.
- NOVÁK, F. *Úvod do klinické biochemie*. 1st ed. Praha: Karolinum, 2002. ISBN 80-246-0366-7.
- OLOKOBA, A., et al. *Type 2 diabetes mellitus a review of current trends, in Free PMC Article*. *Oman Med J.*, 2012, vol. 27, no. 4, p. 269–73.
- PERUŠIČOVÁ, J., et al. *Diabetes mellitus 2. typu*. 1st ed. Praha: Galen, 1996.
- PHILIPS, P. *Oral glucose tolerance*. *Aust Fam Physician.*, 2012, vol. 41, no. 6, p. 391-3.
- PROKEŠ, J., et al. *Chemické principy metod klinické biochemie*. 1st ed. Praha: Karolinum, 1998. ISBN 80-7184-449-7.
- RACEK, J. *Klinická biochemie*. 2nd ed. Praha: Galén, 2006. ISBN 80-7262-324-9.
- ROZSYPALOVÁ, M., HALADOVÁ, E., ŠAFRÁNKOVÁ, A. *Ošetrovatelství II*. 1st ed. Praha: Informatorium, 2002. ISBN 80-86073-97-1.
- RYBKA, J., et al. *Diabetologie pro sestry*. 1st ed. Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-1612-7.
- SACKS, D., et al. *Position statement executive summary: guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. National Academy of Clinical Biochemistry*. *Diabetes Care.*, 2011, vol. 34, no. 6, p. 1419–2011.

SCHNEIDERKA, P., et al. *Problematika řízené POC glukometrie a zkušenosti se sítěmi glukometrů ve dvou fakultních nemocnicích Část I. – Přehled a výchozí stav*. *Klinická biochemie a metabolismus*, 2010, vol. 18, no. 39, p. 149–160.

SVAČINA, Š. *Metabolický syndrom*. 1st ed. Praha: Triton, 2001. ISBN 80-7254-178-1.

SVAČINA, Š., KLÁRA, O. *Syndrom inzulinové rezistence*. Praha: Triton, 2003. ISBN 80-7254-353-9.

ŠAMÁNKOVÁ, M., et al. *Základy ošetrovatelství*. 1st ed. Praha: Karolinum, 2006. ISBN 80-246-1091-4.

ŠTERN, P., et al. *Obecná a klinická biochemie pro bakalářské obory studia*. 1st ed. Praha: Karolinum, 2005. ISBN 80-246-1025-6.

TROJAN, S., SCHREIBER, M. *Atlas biologie člověka*. 2nd ed. Praha: Scientia, 2007. ISBN 987-80-86960-11-1.

YEE, H. *Automated hexokinase procedure for assaying glucose in urine, serum, or plasma*. *Adv. Clin. Chem.*, 1972, vol. 18, no. 11, p. 1416–9.

ZIMA, T., et al. *Laboratorní diagnostika*. 2nd ed. Praha: Galén, 2007. ISBN 978-80-7262-372-3.

Klíčová slova

Glukóza

Diabetes mellitus

Stabilita glukózy

Stabilizátor NaF

Odběrový systém

Separční gel

Použitá zkumavka

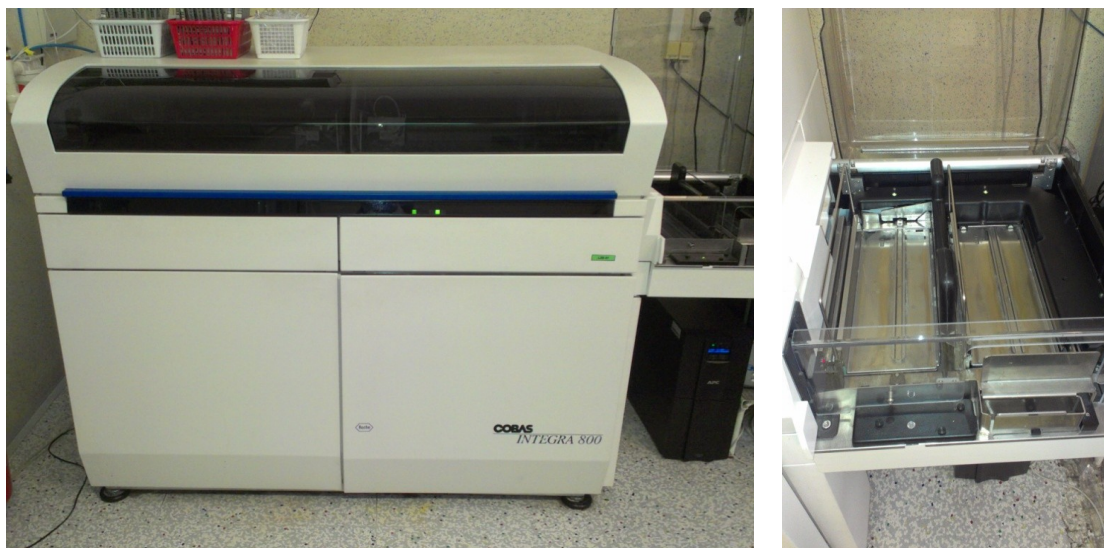
Časový interval

Preanalytická fáze

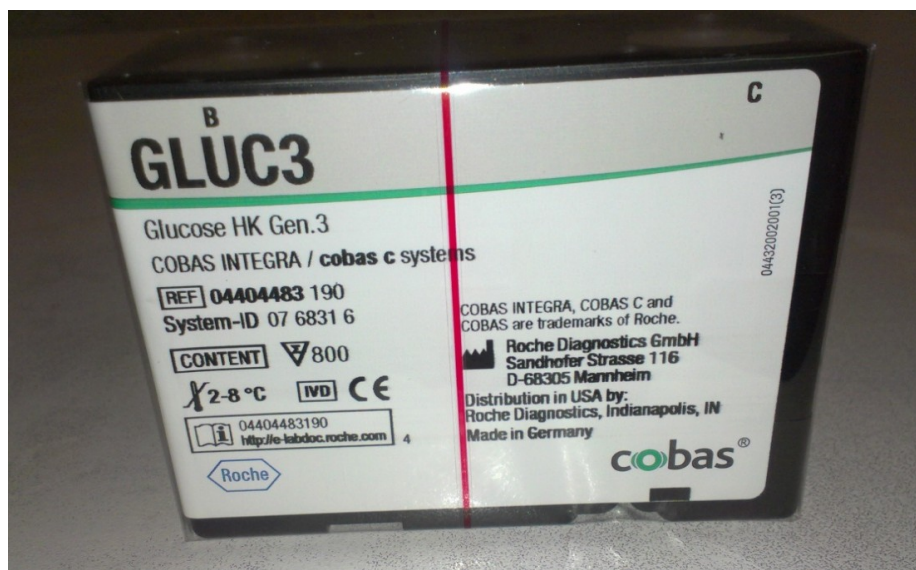
Enzymové metody

Měření vzorku

Přílohy



Obr. č. P1: Analyzátor Cobas Integra 800



Obr. č. P2: Reagencie na stanovení glukózy



Obr. č. P3: Typy použitých zkumavek.

Typy použitých zkumavek:

žlutý uzávěr - zkumavka s gelem,

šedý uzávěr - zkumavka se stabilizátorem NaF,

červený uzávěr - zkumavka bez gelu a bez stabilizátoru NaF.