

Stabilita glukózy ve vzorcích krve po odběru

Friedecký B., Springer D., Kratochvíla J.

Glykolýza ve vzorcích odebrané krve. Trochu historie.

Glykolýza snižuje významně koncentraci glukózy ve vzorcích odebraných krví. Inhibice glykolýzy pomocí fluoridu sodného (NaF), případně směsi NaF + EDTA, je nedostatečná, zejména v první hodině po odběru. Přesto se této neúčinné inhibice v laboratorních řadu let i nadále používá (1). Je paradoxní, že nedostatečná inhibice glykolýzy pomocí NaF byla popsána ovšem bez praktické odzvy v klinických laboratořích již v roce 1941 (2).

V roce 1988 byla vyvinuta a v USA patentována pro potřebu firmy Terumo zlepšená inhibice glykolýzy přidáním citrátu sodného a kyseliny citronové. Podstatou zlepšení je snížení pH v odběrové směsi na hodnotu 5,3-5,9. Enzymy závislé na pH, které způsobují glykolýzu ihned po odběru (hexokináza a fosfofruktokináza) jsou deaktivovány nízkým pH citrátu, zatímco fluoridy deaktivují jen enolázu (fosfopyruvát hydratáza), která je téměř na konci glykolytické metabolické cesty. Ani uvedení zkumavek Terumo se zdokonalenou inhibicí glykolýzy nemělo zprvu významný vliv na preanalytickou praxi rutinních laboratoří, ani na texty odborných doporučení pro diagnostiku diabetu. Zvýšenou pozornost vzbudil až článek Gambina z roku 2007 (3). Teprve pak se postupně začala potřebovat řádná inhibice glykolýzy prosazovat jak ve výrobě odběrových zkumavek, tak i v textech doporučení a v rutinní praxi klinických laboratoří.

Nádobky pro minimalizaci glykolýzy po odběru vzorků krve. Výsledky několika studií.

V roce 2009 byly publikovány články naléhavě zdůrazňující, že inhibice samotným NaF nebo údajným „zlatým standardem“ NaF/oxalát je nedostatečná (4, 5). Výrobci zareagovali na trend potřeby minimalizace glykolýzy a na trhu je několik odpovídajících odběrových nádobek. V současnosti dominují největším počtem testujících studií, pracujících někdy i s desetitisícovými až statisíčovými počty výsledků, tři následující odběrové systémy:

- Terumo Venosafe
- Sarstedt GlucoEXACT
- Greiner Glucomedics

Výsledky jednotlivých autorů se vždy přísně neshodují v kvantifikaci potlačení glykolýzy, nicméně ve všech případech potvrzují pozitivní efekt kombinace citrátové směsi s NaF. Uvedeme stručně data několika recentních studií z let 2012-2014.

Španělští autoři (6) použili Terumo Venosafe zkumavek. Nalezli sice nižší diference mezi použitím citrátových a necitrátových odběrových nádobek než ostatní níže uvedení autoři (největší počet změn v klinických klasifikacích našli u diagnóz gestačních diabetů), ale použití citrátových zkumavek doporučují.

Německý autor (7) testoval odběrové zkumavky Terumo Venosafe a Sarstedt GlucoEXACT ve srovnání se standardně používanými odběrovými zkumavkami s NaF a NaF+oxalát. Zkumavky Venosafe a GlucoEXACT poskytovaly po 2 hodinách stání při teplotě místnosti o 2,5 - 4,5 % vyšší výsledky, po 24 hodinách dokonce o 7 - 10 % vyšší.

Norští autoři (8) pozorovali u souboru asi 461 000 výsledků při použití Terumo Venosafe posuv mediánu z 6,03 mmol/l na 6,28 mmol/l. Dále byl v tomto souboru zjištěn počet výsledků vyšších než 7 mmol/l u NaF 48,1 %, u zkumavek s citrátem to bylo 55,4 %. Je tu tedy možnost významného ovlivnění diagnostické klasifikace.

Neméně výrazné efekty použití citrátového pufru (opět Terumo Venosafe) publikovali Italové (9). Autoři srovnávali výsledky stanovení s odběrem do BD NaF/oxalátových nádobek, dosud považovaných za zlatý standard. Sledovali stabilitu glukózy po dobu 165 ± 20 minut, tedy po dobu blízkou se praktickým podmínkám rutinní laboratoře. Úbytek glukózy při odběru do NaF bez citrátu byl v průměru 6,7 %. Následně se změnil počet výsledků pod diagnostický limit 5,6 mmol/l o 23 %. Změna u diagnostického limitu 7 mmol/l byla méně výrazná a činila 5 %.

Z roku 2014 jsou k dispozici již i studie testující citrátové zkumavky Greiner-Glucomedics (10). Dinesti a spol. srovnávají Greiner Glucomedics se sedmi dalšími odběrovými nádobkami Greiner. Zatímco u testovaného výrobku Greiner Glucomedics našli po 4 hodinách pokles o 1,5 %, u ostatních pak byl interval poklesu -8,5 až -18,5 %.

Normanová a spol. (11) pozorovali po zavedení zkumavek Greiner Glucomedics do praxe nárůst průměrných hodnot glukózy o 14 % (u více než 15 000 pacientů po dobu 6 let (3 roky NaF/oxalát, 3 roky Greiner NaF/citrát). Autoři tvrdí, že by bylo nutné ověřit, resp. změnit diagnostické rozhodovací limity.

Je možné konstatovat, že na našem trhu jsou k dispozici odběrové zkumavky tří výrobců (Greiner, Sarstedt, Terumo) poskytující možnost minimalizace glykolýzy ve vzorcích krve a srovnatelných vzájemně mezi sebou.

Doporučení pro diagnózu diabetu a odběr vzorků krve k měření koncentrace glukózy

Doporučení NACB (National Academy of Clinical Biochemistry) a ADA (American Diabetes Association) shodně požadují minimalizaci glykolýzy v odebraných vzorcích krve. Cesty k minimalizaci jsou podle doporučení tři:

- a) uskladnění odebraných vzorků do ledové tříště
- b) použití antiglykolytického přípravku, složeného z NaF a citrátové směsi
- c) oddělení plasmy od krevních elementů do 30 minut

Německé doporučení pro gestační diabetes (2014) explicitně doporučuje používat při odběru krve přísady fluoridu a citrátové směsi.

V Doporučení České společnosti klinické biochemie a České diabetologické společnosti ČLS JEP je uvedeno: *Vzorek žilní krve se odebírá do odběrové nádoby s obsahem inhibitoru glykolýzy. Obvyklou kombinací pro získání plazmy s dostatečnou stabilitou glukózy je směs fluoridu sodného a EDTA. K účinné inhibici glykolýzy je nutná koncentrace minimálně 2,5 mg fluoridu sodného na 1 ml krve. K bezpečné zábráně 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).*

Bylo by vhodné uvážit, zda by se v popisu odběru vzorku v tomto Doporučení neměla potřeba minimalizace glykolýzy výrazně zdůraznit. Zejména pak role odběrových nádobek s NaF a citrátovou směsí a také nezbytnost dodržení maximálně 30 minut mezi odběrem krve a separací plazmy od krevních elementů.

Urgentní potřebu vyřešení problému glykolýzy a stability glukózy v krvi potvrzuje i článek, uveřejněný v časopise Diabetes Care (12). Nezbytné je i zahájení výroby příslušných odběrových nádobek velkými producenty a jejich testování v klinických laboratořích.

K dosažení minimalizace negativních efektů glykolýzy na diagnostiku diabetu jsou k dispozici účinné nástroje. Jejich obecné používání narazí

na řadu organizačních a technických problémů, ale ty nepředstavují závažný důvod minimalizaci glykolýzy nedoporučit a neřešit.

Literatura

1. Gambino R.: Ann Clin Biochem 2013,50:3-5.DOI:10.1258/acb.2012.012135
2. Bueding E, Goldfarb W.: The effect of sodium fluoride and sodium iodoacetate on glycolysis in human blood. J Biol Chem 1941,14:539-544.
3. Gambino R.: Glucose a simple molecule is not simple to quantify. Clin Chem 2007,53:2040-2041.
4. Bruns DE, Knowler WC.: Stabilization of glucose in blood samples: Why it matters. Clin Chem. 2009; 55(5):850-852.
5. Gambino R, Piscitelli J, Ackattupathil TA, Theriault JL, Andrin RD, Sanfilippo ML, Etienne M.: Acidification of blood is superior to sodium fluoride alone as an inhibitor of glycolysis. Clin Chem 2009, 55(5):1019-1021.
6. Del Pino GI, Constanso I, Vázquez ML, Safort B, Vázquez R.: Citric/citrate buffer: an effective antiglycolytic agent. Clin Chem Lab Med 2013. DOI 10.1515/cclm-2012-0735.
7. Fobker M.: Stability of glucose in plasma with different anticoagulants. Clin Chem Lab Med 2014 ;52:1057-60.DOI 101515/cclm-2013-1049.
8. Ridefelt P, Aherfelt T, Helnersson-Karlquist J.: Increased plasma glucose levels after change of recommendation from NaF to citrate blood collection tubes. Clin Biochem 2014,47:625-628.
9. Szoek D, Valente C, Panteghini M.: Better blood collection tubes for plasma glucose ready for prime time? Clin Chem Lab Med 2014,54:e87-e89.DOI 101515/cclm-2013-1006.
10. Dimeski G, Yow KS, Brown NN.: What is the most suitable blood collection tube for glucose estimation? Ann Clin Biochem 2014. DOI:10.1177/0004563214544708.
11. Norman M, Jones I. The shift from fluoride/oxalate to acid citrate/fluoride blood collection tubes for glucose testing. The impact upon patient results. Clin Biochem 2014,47:683-685.
12. Peake MJ, Bruns DE, Sacks DB, Horvath AR.: It's time for a better blood collection tubes to improve the reliability of glucose results. Diabetes Care 2013,36.DOI:10.2337/dc12-1312.