

# Odběr vzorků krve a stabilita glukózy. Požadavky a realita pohledem účastníků programu EHK-SEKK.

B. Friedecký, K. Pelinková, J. Kratochvíla.

## Stabilita vzorků

Problém nestability koncentrace glukózy v krvi, způsobený glykolýzou, je notoricky známý, ale zatím stále nedůsledně řešený. Tabulka 1 ukazuje kvantifikaci této nestability v závislosti na třech základních typech odběrových nádobek a na dvou časech (1, 2, 3). Příslušných dat je v literatuře mnohem více, jsou velmi podobná tabelovaným a lze je najít i v aktuálních českých pracích (4, 5). Zřejmým závěrem, mnohokrát deklarovaným, je nezbytnost odběru vzorku krve do účinné antiglykolytické směsi a včasná separace plazmy od krevních elementů.

**Tabulka 1. Stabilita glukózy v krvi po odběru při pokojové teplotě**

Odběr	Úbytek po 4 hod. (%)	Úbytek po 24 hod. (%)
NaF – citrát	< 2	< 2
NaF - Kox*	9	10
Bez antiglykolytika	12	80

\*Štavelan draselný (oxalát draselný)

Řadu let standardně prováděný odběr do NaF (s přísadkou EDTA nebo oxalátu) nemá dostatečnou schopnost zajistit stabilitu bez separace vzorku (2). Základní podmínkou dostatečné stability je včasná (do 30 minut) separace plazmy, séra od elementů. Pokud ji nelze zajistit, je nutný odběr do NaF-citrátu.

Pak je zaručena stabilita glukózy při 4 °C minimálně 92 hodin a při pokojové teplotě asi 48 hodin (7, 8). Nebyly zjištěny signifikantní rozdíly koncentrací glukózy mezi plazmou při odběrech do NaF-citrátu (Terumo, Greiner) a včas separovaným sérem po odběru do gelových zkumavek Becton Dickinson SST II a RST.

V současné době je na trhu příliš mnoho variant odběru plazmy i séra k stanovení glukózy. Situace vyžaduje harmonizaci antiglykolytických stabili-

zátorů (směsi NaF+citrát), nebo dodržení rychle (do 30 minut) separace u odběrů bez přísadky antiglykolytik.

## Mezinárodní doporučení a konsekvence

Doporučení AACC 2011 (www.aacc.org) uvádí tři možnosti stabilizace glukózy v krvi: separaci do 30 minut, skladování v ledové vodní tříšti, odběr do směsi NaF-citrátu.

Výrobci dodávají na trh odběrové zkumavky všech uvedených typů (NaF- EDTA, NaF – oxalát, NaF – citrát, sérum bez gelu, sérum s gelem) bez ohledu na rozdílný efekt pro konečnou stabilitu glukózy. Úroveň harmonizace odběru vzorků je ve světě i u nás nízká a výsledky dotazníku to jen potvrzují. Experti ADA (American Diabetes Association) vyzvali již před pěti lety k řádné stabilizaci vzorků plazmy odběrem do směsi fluoridu sodného a citrátu, zatím však problém přetrvává (9). Laboratoř by měla být o problému glykolýzy a nestability vzorků krve dobře informovaná, aby provedla příslušná správná rozhodnutí u svých preanalytických pravidel.

Nestabilita glukózy v krvi při nedostatečné inhibici glykolýzy vede k stanovení falešně snížených hodnot a následně ke změně počtu osob s klasifikovaným diabetem. Četnost těchto změn není zanedbatelná a byla stanovena různými autory v rozmezí 5 až 7 % u diabetu mellitu a dokonce až 23 % u prediabetu (10, 11).

## Data účastníků

Dotazník vyplnilo 273 účastníků, za což jim děkujeme. 121 účastníků upřesnilo svoje odpovědi formou poznámky. V tabulce 2 jsou uvedeny dotazy a četnosti odpovědí na otázky dotazníku o odběru vzorků ke stanovení glukózy v rutinním cyklu SEKK AKS 2/18. Záměrem dotazníku bylo zmapovat nastavení preanalytických podmínek týkajících se stanovení glukózy v našich laboratořích. Zajímalo nás, zda laboratoř má či nemá dostupné pokyny pro uživatele služeb laboratoře, zda jsou v rutinní praxi dodržovány a jak je postupováno, pokud podmínky nejsou splněny. Záměr dotazníku byl edukační.

## Vyhodnocení odpovědí na otázky dotazníku z cyklu AKS2/18 a komentář autorů článku.

1. **Jaký biologický materiál vaše laboratoř doporučuje/předepisuje pro stanovení glukózy v krvi (v laboratorní příručce nebo na žádance o vyšetření)? (tabulka 2)**

Laboratoře by měly zpřesnit a zjednodušit pod-

**Tabulka 2**

Odpověď	Počet	
	absolutní	relativní
1. Krev bez přidavku inhibitorů glykolýzy	60	22 %
2. Krev s přidavkem inhibitoru glykolýzy obsahujícího NaF	129	48 %
3. Krev s přidavkem inhibitoru glykolýzy obsahujícího NaF a citrát sodný	43	16 %
4. Jiný materiál (prosíme popište formou poznámky)	38	14 %

**Tabulka 3**

Odpověď	Počet	
	absolutní	relativní
1. Krev bez přidavku inhibitorů glykolýzy	176	65 %
2. Krev s přidavkem inhibitoru glykolýzy obsahujícího NaF	60	22 %
3. Krev s přidavkem inhibitoru glykolýzy obsahujícího NaF a citrát sodný	19	7 %
4. Jiný materiál (prosíme popište formou poznámky)	16	6 %

mínky odběru tak, aby respektoval nezbytnost rychlé separace séra (plazmy) nebo provádět odběr do směsi NaF-citrátu, pokud není možné čas separace (30 minut) dodržet.

Laboratoře by měly vyžadovat pro odběr k vyšetření oGTT jen plnou krev, odebranou do NaF-citrátu.

**2. Jaký biologický materiál do vaší laboratoře pro stanovení glukózy v krvi v praxi nejčastěji dostáváte? (tabulka 3)**

K této otázce jsme zaznamenali velké množství upřesňujících poznámek. Pro oGTT posílají žadatelé výhradně krev se stabilizátorem, pro prvotní stanovení krev bez stabilizátoru, pro ověření hladiny a její monitorování pak většinou se stabilizátory. Běžně je do laboratoře dodáváno sérum, pro diagnostiku diabetu pak krev se stabilizátory. Jeden účastník z diabetologie pak uvádí, že je dodávána kapilární krev ve stabilizačním pufru. Pokud jsou požadována další vyšetření, žadatel posílá krev většinou bez stabilizátoru, pokud se jedná pouze o stanovení glukózy, pak zkumavku se stabilizátorem. Dvě laboratoře uvádějí, že nepracují s nestabilizovanou krví.

Opět platí, že stability lze dosáhnout buď odběrem do směsi NaF-citrátu, nebo rychlou separací do 30 minut. Stabilita odběru do směsi NaF - oxalátu nebo NaF -EDTA není dostatečná a neposkytuje spolehlivé hodnoty koncentrace glukózy. Kapilární krev je pro laboratorní stanovení naprosto nevhodná.

Z odpovědí je zřejmé, že reálná praxe se často výrazně rozchází s doporučením laboratoře.

Domníváme se, že pokud laboratoř doporučuje/předepisuje ve svých žádankách a laboratorní příručce a další dokumentaci dvě varianty, žadatel volí takovou, která je komfortnější a levnější, tedy odebere krev bez přidavku stabilizátoru. Z této zkumavky pak lze stanovit většinu dalších analytů a není potřeba pacientovi odebrat další zkumavku, ovšem cenou za tuto výhodu může být nespolehlivý výsledek stanovení glukózy.

**3. Jakou maximální dobu (od odběru krve do oddělení krevních elementů popř. do zpracování) připouštíte pro nestabilizovanou krev (bez přidavku inhibitorů glykolýzy)? (tabulka 4)**

Správný čas k separaci (30 minut) je uveden jen v 11 % odpovědí. Časy mezi 60 minutami a 4 hodinami, uváděné většinou respondenty, jsou akceptovatelné pouze pro odběry do NaF-citrátu. Poznámku účastníka, že stabilita pro nestabilizovanou krev je až do 8 hodin pak nelze akceptovat vůbec (viz tabulka 1). Některé laboratoře předepsanou dobu nemají, v dokumentaci mají uvedeno upozornění na pokles koncentrace glukózy a na výsledkovém listu je uveden čas odběru. To však nestabilitu vzorku neřeší. Jedna laboratoř uvádí ideální stav: nestabilizovanou krev nepřijímá vůbec. Jiný účastník uvádí, že se pokoušel nastavit přísnější dobu pro centrifugaci, ale žadatel začal posílat vzorky do jiné laboratoře, která tyto věci neřeší. Jedna laboratoř uvádí, že nemá čas na zpracování za podmínek „lege artis“. Tento argument je neúnosný!

Ideální podmínky představuje odběr v odborné místnosti, která je přilehlá ke klinické labora-

toři nebo s dostupnou centrifugou pro oddělení séra/plazmy od krevních elementů. Důležité je vhodné nastavení svozových tras. Oddělit sérum/plazmu od krevních elementů do 30 minut při odběru v ambulancích je nereálné, a stejně tak centrifugace v ambulancích. Pokud by laboratoř striktně vyžadovala pro stanovení glukózy zvláštní odběr do zkumavky s anti-glykolytickým činidlem, může to dopadnout tak, jak uvádí jeden účastník, žadatel posílá vzorky do jiné laboratoře. Bylo by asi řešením přenést určitou odpovědnost na ordinujícího, dostatečně informovaného lékaře. To lze provést jen společnou činností ČSKB a České diabetologické společnosti s jasnou formulací preanalytických podmínek pro diagnostiku diabetu a vyžadovat jejich dodržování pomocí akreditačních procesů. Uvádět přibližné odhady, jak asi by se promítl vliv nedodržení odběrových podmínek na výsledek měření nelze v žádném případě doporučit.

4. **Jakou maximální dobu (od odběru krve do oddělení krevních elementů popř. do zpracování) připouštíte pro stabilizovanou krev (s přidavkem inhibitorů glykolýzy)?** (tabulka 5)  
 Jen 2 % účastníků uvedla bezpečnou dobu separace do 30 minut.  
 82 % účastníků uvádí čas ≤ 4 hod, což lze akceptovat, jen pokud je krev stabilizovaná odběrem do směsi NaF-citrátu. Pokud je krev odebrána jinak, je čas vždy kritický.

Tabulka 4

Odpověď	Počet	
	absolutní	relativní
1. 30 minut	29	11 %
2. 60 minut	86	32 %
3. 2 hodiny	104	39 %
4. 4 hodiny	27	10 %
5. Jiný čas (prosíme uveďte formou poznámky)	20	8 %

Tabulka 5

Odpověď	Počet	
	absolutní	relativní
1. 30 minut	4	2 %
2. 60 minut	25	10 %
3. 2 hodiny	56	22 %
4. 4 hodiny	129	50 %
5. Jiný čas (prosíme uveďte formou poznámky)	46	18 %

Stabilitu jednoznačně řeší samostatné odběry pro stanovení glukózy realizované blízko laboratoře a stanovené přednostně.

5. **Jak ve vaší laboratoři postupujete v případě nedodržení doby stability uvedené v otázkách 3 a/nebo 4?** (tabulka 6)

Některé laboratoře automaticky připojí komentář při překročení laboratorní předepsané doby stability. Některé laboratoře vzorky, které mají delší dobu od odběru, vůbec nezpracují.

Někde je uveden komentář jen v případě výrazného překročení doby pro zpracování.

Některé laboratoře se snaží vždy dodržet předepsanou dobu, následuje telefonická konzultace s lékařem o překročení předepsané doby.

Nesprávný postup je provádět měření vždy a bez komentáře.

6. **Probíhá svoz vzorků pro stanovení glukózy v krvi do vaší laboratoře (z odběrových míst, z ambulancí, z jiných laboratoří apod.) za řízené teploty?** (tabulka 7)

65 % laboratoří vzorky sváží za řízené, sledované teploty. 21 % účastníků vzorky nesváží pravidelně.

7. **Pokud svoz vzorků probíhá za řízené teploty, jak je rozmezí teplot pro transport?** (tabulka 8)  
 Literární údaje o rozdílech v hodnotách řízené teploty jsou nejednoznačné, převažují ale názory, že nejsou pro stabilitu vzorků zásadní.

**Tabulka 6**

Odpověď	Počet	
	absolutní	relativní
1. Striktně vyžadujeme dodržení, v opačném případě stanovení neprovádíme a požadujeme nový odběr	31	12 %
2. Ve výjimečných případech provedeme stanovení, výsledek opatříme odpovídajícím komentářem	181	68 %
3. Připouštíme překročení doby o 1 hodinu	18	7 %
4. Připouštíme překročení doby o 2 hodiny	10	4 %
5. Máme jiná pravidla (prosíme uveďte formou poznámky)	25	9 %

**Tabulka 7**

Odpověď	Počet	
	absolutní	relativní
1. Vzorky pravidelně nesvážíme	56	21 %
2. Vzorky svážíme za neřízené teploty	11	4 %
3. Vzorky svážíme za řízené teploty, sledování teploty není v naší kompetenci (zajišťuje přepravce)	18	7 %
4. Vzorky svážíme za řízené teploty, sledování teploty je v kompetenci naší laboratoře	174	65 %
5. Máme jiná pravidla (prosíme uveďte formou poznámky)	10	4 %

**Tabulka 8**

Odpověď	Počet	
	absolutní	relativní
1. +2 až +8 °C	49	21 %
2. +15 až +25 °C	151	66 %
3. Jiné rozmezí (prosíme uveďte formou poznámky)	28	12 %

## Závěr

Byla zaznamenána velmi nízká četnost použití účinných inhibitorů glykolýzy (jen 29 % respondentů). Odběry do antiglykolytické směsi s NaF, ale bez přísady citrátu (s četností 22 %) stabilitu obsahu glukózy ve vzorcích zaručit nemohou. To je zjištěno a publikováno opakovaně po řadu let. Podle dat účastníků je tedy 65 % odběrů bez aplikace antiglykolytik. Požadavek na dobu separace od elementů, podle doporučení do 30 minut, je dodržován jen výjimečně (11 % odpovědí). Většina účastníků udává dobu 1 hodina a více (81 %). Prodloužení časového intervalu nad 30 minut je však možné pouze tehdy, je-li glykolýza ve vzorcích potlačena přídatkem účinného inhibitoru (nejlépe směs NaF+citrát). Jediným řešením je stabilizace odebraného vzorku pomocí NaF-citrátu, nebo rychlá (do 30 minut) separace plazmy/séra od elementů.

Neobejde se to samozřejmě bez organizačních změn v laboratořích.

## Literatura

1. Montagnana M, Lippi J.: Overcoming pre-analytical issues for diagnosing diabetes with fasting plasma glucose. *Ann Trans Med* 2017, 12, doi:1021037/atm.2017.05.19.
2. Juričič G, Bakliza A, Saracevic A, Kopcinovic LM, Dobrijevic S, a spol.: Glucose is stable during prolonged storage in un-centrifuged Greiner tubes with liquid citrate buffer, but not in serum and NaF/KOx tubes. *Clin Chem Lab Med* 2016, 54/3:411-418.
3. Fobker M.: Stability of glucose in plasma with different anticoagulants. *Clin Chem Lab Med* 2014, 52/7:1057-1060.

4. Friedecký B, Palička V, Kratochvíla J.: Diagnostika diabetu pomocí plasmatické glukózy. Nerozřešený problém laboratorní medicíny. *Klin Biochem Metab* 2017, 25/4:192-193.
5. Racek J, Fialová K, Rajdl D, Ženková J.: Stabilizace glukózy v krevní plazmě citrátem – pro a proti. *Klin Biochem Metab* 2018,26/1:41-42.
6. Kim HS.: Blood glucose measurement: Is serum equal to plasma? *Diabetes Metab J* 2016,40/5:365-366.
7. Kocijanevic M, Cargonja J, Delic-Knezevic A.: Evaluation of the BD Vacutainer® RST blood collection tube for routine chemistry analytes: clinical significance of differences and stability study. *Biochem Medica* 2014,24/3:368-375.
8. Winter T, Hannemann A, Suchsland J, Nauck M, Petersmann A.: Long-term stability of glucose: glycolysis inhibitor vs gel barrier tubes. *Clin Chem Lab Med* 2018 doi:10.1515/cclm-2017-0860.
9. Peake MJ, Bruns DE, Sacks DB, Horvath AR.: It's time for a better blood collection tube to improve the reliability of glucose results. *Diabetes care* 2013,36/1: e2.
10. Ridefelt P, Akerfeldt T, Helmersson-Karlqist J.: Increased plasma glucose levels after change of recommendation from NaF to citrate blood collection tubes. *Clin Biochem* 2014,47:625-628.
11. Szoke D, Valente C, Panteghini M.: Better blood collection tubes for plasma glucose ready for prime time? *Clin Chem Lab Med* 2013, 52/5: e87-e89.