Stanovení glukózy glukometrem - mýty a skutečnost

L. Dohnal, P. Štern

MOTTO

Staré přísloví říká: „Tak dlouho se chodí se džbánem pro vodu, až se ucho utrhne“. To přísloví můžeme parafrázovat: Tak dlouho se zjednodušuje, aniž by se přísně kontrolovalo, zda podmínky pro zjednodušení jsou dobře splněny, až se v tom už nemůžeme vyznat. Už nevíme, co, proč a za jakých předpokladů bylo zjednodušeno (zanedbáno, aproximováno).

ÚVOD

Řadu let existují potíže při srovnávání výsledků glukózy stanovené glukometry a laboratorními postupy. Rovněž existují problémy se vzájemným srovnáváním výsledků získaných různými typy glukometrů. S postupujícími technickými inovacemi a přibývajícím počtem druhů těchto přístrojů na trhu se situace spíše komplikuje. Tento článek se snaží poukázat alespoň na některé příčiny potíží. V závěru pak se věnuje některým mýtům, které se v souvislosti s měřením glukometry tradují.

AKTIVITA A AKTIVITNÍ KOEFICIENT

Fysikální chemie učí, že aktivita chemické sloučeniny (iontu) je projevem chemického působení této sloučeniny nebo iontu. Aktivita určuje průběh chemických a fyzikálně-chemických dějů. Aktivitu můžeme nahradit koncentrací pouze za splnění jistých předpokladů. Pokud tyto předpoklady nejsou splněny, můžeme se dopustit závažné chyby. **Aktivita** látky ve vodném roztoku je úměrná koncentraci této látky v roztoku, přičemž konstantou úměrnosti je **aktivitní koeficient**. Aktivitní koeficienty můžeme alespoň přibližně zjišťovat pomocí tabulek, výpočtem nebo experimentálně. Pro ilustraci uveďme, že u chloridu sodného je aktivitní koeficient při koncentraci 0,001 mol/kg roven 0,966 a při koncentraci 0,01 mol/kg roven 0,904 - rozdíl činí více než 6%.

KONCENTRACE - MOLARITA, MOLALITA, HMOTNOSTNÍ ZLOMEK

Koncentraci můžeme vyjádřit **molalitou**, to jest počtem molů látky rozpuštěné v 1 kg rozpouštědla, **molaritou**, tedy počtem molů látky rozpuštěné v 1 litru roztoku nebo **molárním zlomkem**, tj. počtem molů rozpuštěné látky děleným celkovým počtem molů rozpuštěné látky a rozpouštědla. Nejčastěji používaná je molární koncentrace. Pro glukózu v krvi udává jmnožství glukózy v milimolech v jednom litru krve. Molarita je na rozdíl od molality a molárního zlomku závislá na tlaku a teplotě. Na těchto dvou veličinách je totiž závislý objem. Ve fyzikální chemii je zvykem raději než molaritou vyjadřovat koncentraci způsobem hmotnostním, nejčastěji molalitou. Proto literární údaje a hodnoty, které se týkají aktivit a aktivitních koeficientů, se vyjadřují obvykle molalitou. V této souvislosti je zajímavé, že ve farmacii se typicky množství kapalin udává jejich hmotností, nikoliv objemem, jak je tomu zvykem v klinické biochemii.

V nekonečně zředěném vodném roztoku (představa analogická pojmu ideálního plynu) pak platí s dostatečnou spolehlivostí, že 1 litr roztoku při laboratorní teplotě a atmosférickém tlaku má hmotnost 1 kg a současně obsahuje 1 kg rozpouštědla. Je-li roztok dostatečně zředěný, abychom jej mohli považovat za nekonečně zředěný, je rozdíl mezi molalitou a molaritou zanedbatelný. Navíc v takovém případě můžeme většinou zanedbat rozdíl mezi aktivitou a koncentrací. Aproximaci molalita = molarita a aktivita = koncentrace často v praxi používáme automaticky, aniž bychom si uvědomovali její značně omezenou platnost.

PRINCIP STANOVENÍ GLUKOMETREM

Dnešní glukometry jsou převážně určeny pro laické stanovení glukózy v krvi, někdy i v plazmě nebo v séru. Tyto přístroje pracují na principu přímého elektrochemického stanovení. Enzym glukóza-oxidasa katalyzuje oxidaci glukózy kyslíkem a vzniká kyselina glukonová a peroxid vodíku. Peroxid vodíku je elektrochemicky redukován na vodu a vzniklý elektrický proud nebo prošlý elektrický náboj je úměrný koncentraci glukózy. Elektrodový systém je v bezprostředním kontaktu se vzorkem, který se před vlastním měřením neředí ani jinak neupravuje. Při stanovení se glukóza spotřebovává a současně se spotřebovává i kyslík ve vzorku rozpuštěný. Měřenou veličinou bývá nejčastěji elektrický proud. V takovém případě se jedná o **amperometrické stanovení**. Výsledek je málo citlivý ke změně objemu vzorku, ale může být ovlivněný změnou ve složení krve.

Ojediněle je měřenou veličinou elektrický náboj. Pak jde o **stanovení coulometrické**. Přímé coulometrické stanovení se provádí do úplného spotřebování analytu. Výsledek je ze své podstaty málo citlivý ke změnám ve složení krve, pokud nepřihlížíme k mož-

ným interferencím (např. léčiv). Na druhé straně je (v protikladu k ampérometrickému stanovení) velmi citlivý na odchylky v objemu vzorku.

LABORATORNÍ METODY STANOVENÍ GLUKÓZY VS. STANOVENÍ GLUKOMETREM

V laboratorních podmínkách se používají ke stanovení glukózy až na výjimky nepřímé metody. Mají společné to, že k relativně malému množství vzorku (krve, plazmy, séra) se postupně přidají dostatečně zředěné roztoky činidel. Výsledná reakční směs určená k vlastnímu fotometrickému nebo elektrochemickému měření má hustotu (měrnou hmotnost) velmi blízkou hustotě vody (1 kg/l). V takové reakční směsi je objemový poměr vzorek/činidlo typicky 1/30 až 1/50. Lze tedy zanedbat jak rozdíl mezi aktivitou a koncentrací tak mezi molalitou a molaritou. V případě přímých měření glukometrem si takovéto zjednodušení nemůžeme dovolit. „Výslednou reakční směsí" je totiž neředěná krev, plazma nebo sérum. Za těchto podmínek je analytická odezva úměrná aktivitě (tj. součinu aktivitního koeficientu a molality) a nikoliv koncentraci.

V tab. 1 je uveden typický obsah vody v krvi, plazmě, séru, moči a nekonečně (dostatečně) zředěném vodném roztoku (2,3,4). Obsah vody v krvi je vypočtený na základě typického obsahu vody v krvinkách (0,71 kg/l) a typického hematokritu (0,43). Krev, plazma ani sérum nepatří mezi dostatečně zředěné roztoky. Nelze u nich položit rovnítko mezi molalitu a molaritu, protože v 1 litru roztoku není stejné množství látky jako v 1 kilogramu rozpouštědla.

Obsah vody ve vzorku je pro možnost použití aproximace důležitý.

Tab. 1 Typický obsah vody (hmotnost vody v jednotce objemu tekutiny) a hustota = měrná hmotnost (hmotnost jednotky objemu roztoku) některých tělních tekutin a DZVR (dostatečně zředěného vodného roztoku)

tekutina	krev	plazma	sérum	moč	DZVR
obsah vody (kg/l)	0,84	0,93	0,93	0,98	0,99
hustota (kg/l)	1,057	1,027	1,026	1,015	1,01

V tab. 2 je pro ilustraci uvedena závislost obsahu vody v krvi na hematokritu. Vidíme, že ve fyziologických mezích hematokritu se obsah vody v krvi mění jen málo, samozřejmě za předpokladu, že složení plazmy se nemění.

Tab. 2 Závislost obsahu vody v krvi (hmotnost vody v jednotce objemu tekutiny) na hematokritu při stejné koncentraci proteinů a ostatních látek

hematokrit	0,35	0,45	0,55
obsah vody (kg/l)	0,85	0,81	0,81

Poněvadž za normálních okolností glukóza prochází volně z cytoplazmy krevních elementů do krevní plazmy a naopak (2), je v krvi její aktivita v intracelulárním i extracelulárním prostoru stejná. Konvenčními metodami nacházíme v celé krvi významně nižší koncentrace než v plazmě. Příčinou rozdílu je různý obsah vody v krvinkách a v plazmě. Koncentrace glukózy v krvi je tedy odlišná od koncentrace v plazmě, avšak přímo měřená aktivita (molální koncentrace) v krvi je totožná s přímo měřenou aktivitou v plazmě. Pokud tomu tak někdy není, jedná se o artefakt způsobený malou robustností metody. Např. vzorek při měření není dostatečně homogenní a / nebo neproniká dostatečně rychle k měřícímu čidlu. V takových případech se naměřená koncentrace v krvi může stát závislou např. na hematokritu. Tato skutečnost bývá reflektována v dokumentaci výrobců uvedením rozsahu hematokritu, v němž je funkce systému garantována.

Analogické problémy vznikly v minulosti při stanovení sodných a draselných iontů. Měření iontově selektivními elektrodami po naředění (stanovení koncentrace) je vytlačováno přímým měřením bez ředění (stanovení aktivity). V tomto případě je situace komplikovanější, poněvadž aktivita iontů v plazmě je jiná než v krvinkách (na rozdíl od glukózy). Vzniklé problémy s referenčními mezemi se často řešily „přepočítáváním" naměřených aktivit na „koncentrace" místo principiálně správnějšího určení nových referenčních mezí.

KALIBRACE GLUKOMETRU

Výrobci obvykle neuvádějí jakým postupem je glukometr kalibrován. Nesprávně označují často jako kalibraci nastavení glukometru v závislosti na šarži měřících proužků (ručně nebo pomocí čipu). Někdy je za kalibraci vydávána kontrola funkce glukometru pomocí jednoho neb více kontrolních roztoků.

Pracovní skupina IFCC v r. 2001 doporučila, aby glukometry bez ohledu na typ vzorku a použitou technologii udávaly koncentraci glukózy v plazmě (4). Splnění této podmínky nevyřeší všechny nastíněné problémy, např. problém koncentrace vs. aktivita. Přesto je žádoucí, aby byl tento jednotící princip bez výjimky dodržován a způsob kalibrace byl výrobci glukometrů podrobně popsán v dokumentaci pro případnou kontrolu. Pak budou výsledky glukometru a laboratorních analýz lépe srovnatelné. Samozřejmě pouze při dodržení ostatních nezbytných podmínek. Mezi ně patří dobrá opakovatelnost i reprodukovatelnost, zanedbatelný bias - dobrá návaznost a dobrá robustnost měření glukometrem vůči změnám hematokritu, objemu vzorku aj.

MÝTUS KAPILÁRNÍ KRVE

Oblíbený mýtus šířený výrobci a dodavateli glukometrů je, že měření v kapilární krvi je něco jiného než měření v žilní krvi. Za běžných okolností, které se při používání osobních glukometrů předpokládají, nejsou ve složení kapilární a žilní krve významné rozdíly. Něco jiného jsou mimořádné stavy organismu jako např. vyčerpání po velké fyzické zátěži, zranění většího rozsahu, metabolická krize aj. V takových případech mohou být rozdíly ve složení kapilární a žilní krve značné. Uvedený mýtus může mít racionální původ v obavě z nedostatečné koncentrace kyslíku v krvi. Při měření glukózy se kromě glukózy spotřebovává též kyslík. Samozřejmým požadavkem by mělo být, aby měření bylo dostatečně robustní vůči koncentraci kyslíku, která v kapilární krvi může značně kolísat. Z toho vyplývá, že glukometry nedostatečně robustní vůči koncentraci kyslíku jsou pro stanovení glukózy nevhodné.

MÝTUS ROZSAHU MĚŘENÍ

Dalším z mýtů (nebo je to už klamavá reklama?) bývá inzerce neoprávněně širokého rozsahu měření glukometrem. Nedávno jsem zaznamenal dokonce případ, kdy výrobce uvedl rozsah měření od 0,6 (!) do 33,3 mmol/l. V technické dokumentaci k tomuto systému bylo z grafů týkajících se ověřování správnosti jednoznačně zřejmé, že v použitých vzorcích byla koncentrace glukózy 1,6 mmol/l až 30 mmol/l. Při laboratorní zkoušce byla přijatelná horní mez měřícího rozsahu kolem 29 mmol/l. Také měření extrémně nízkých glykémií u novorozenců pomocí glukometrů je vysoce rizikové a nelze ho doporučit.

MÝTUS MALÉHO OBJEMU VZORKU

Výrobci a distributoři se předhánějí, kdo uvede menší objem krve a kratší čas potřebný k měření. V dokumentaci ke glukometrům jsou tyto údaje běžně uváděny. Doba měření bývá desítky až jednotky sekund, objem vzorku desítky až jednotky mikrolitrů. Začínají se objevovat přístroje, u nichž je postačující objem vzorku udáván již v desetinách mikrolitru. Výrobci a dodavatelé se z konkurenčních důvodů snaží vyvolávat dojem, že čím jsou tyto parametry menší, tím lépe. To platilo snad v dobách, kdy typická doba měření byla 60 s a objem vzorku 100 µl a více. V současnosti je opak pravdou. Zkracování doby odezvy a zmenšování objemu vzorku zhoršuje robustnost měření. Při vlastní analýze by mohlo dojít k nedostatku kyslíku při vyšších koncentracích glukózy. Kapka krve má objem asi 30 µl, takže menší objemy než 20 µl mají pouze reklamní význam a pro praxi jsou irelevantní. V preanalytické fázi při odběru vzorku dochází při nedostatečně hlubokém vpichu („bezbolestný odběr“) k výronu nepatrné kapičky krve výrazně kontaminované tkáňovým mokem. Obecně při velmi malých objemech a velmi krátkých časech dochází ke zhoršení přesnosti (5).

ZÁVĚR

Je třeba rozlišovat mezi aktivitou a koncentrací, mezi molaritou a molalitou. Odezva glukometrů je úměrná aktivitě. Navzdory mýtům se glukometry měří jak v kapilární, tak i venosní krvi, pouze referenční meze se mohou poněkud lišit. Extrémní rozsahy měření (0,6 až 33,3 mmol/l), objemy vzorku (1 µl) a doby měření (10 s) nejsou důvěryhodné a jejich marketingová „chvála“ je zavádějící.

Věci nejsou takové, jakými se zdají být. Nemůžeme-li to změnit, alespoň si toho buďme vědomi.

LITERATURA

1. Fogh-Andersen, N., Wimberley, P., D., Thode, J., Siggard-Andersen, O.: Direct reading glucose electrodes detect the molality of glucose in plazma and whole blood. Clin. Chim. Acta, vol.189, 33-38 (1990)
2. Wiener, K.: Whole blood glucose, what are we actually measuring? Ann. Clin. Biochem., vol. 32, 1-8 (1995)
3. Burtis, C., A., Ashwood, E., R., Bruns, D., E. (Eds.): Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 4. vydání, 2412 stran, Elsevier Saunders, St Louis, Missouri, USA 2006
4. Burnett, R., W., D'Orazio, P., Fogh-Andersen, N., Kuwa, K., Kulpmann, W., R., Larsson, L. et al.: IFCC recommendation on reporting results for blood glucose. Clin. Chim. Acta, vol. 307, 205-209 (2001)
5. Arens, S., Moons, V., Meuleman, P., Struyf, F., Zaman, Z.: Evaluation of Glucocard Memory 2 and Accutrend Sensor Blood Glucose Meters. Clin. Chem. Lab. Med., vol. 36, 47-52 (1998)