

Laboratorní diagnostika diabetu mellitu

Ondřej Wiewiorka

2019

Diabetes Care

WWW.DIABETES.ORG/DIABETES-CARE

JANUARY 2019


 1

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION

STANDARDS OF MEDICAL CARE IN DIABETES—2019



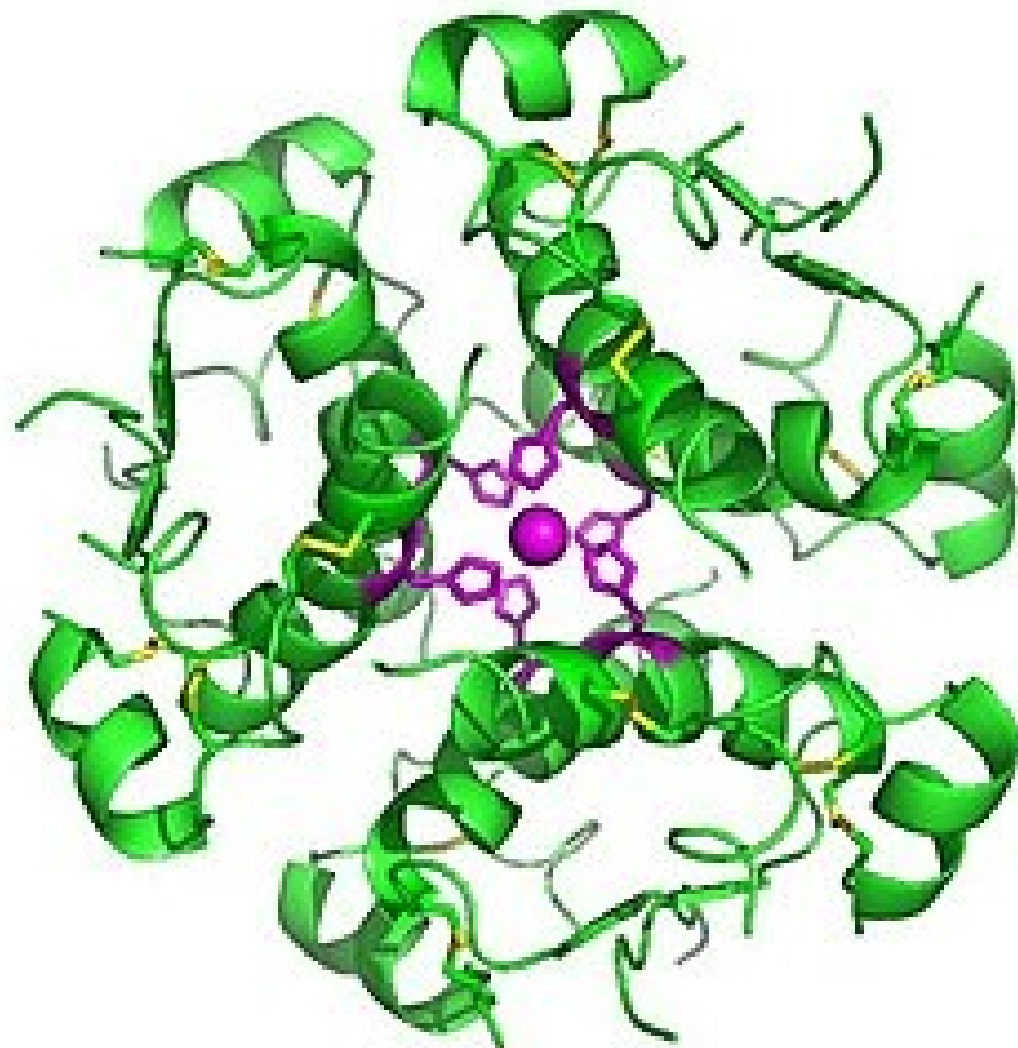
ISSN 0898-5921

Standards of Medical Care in Diabetes—2019

- | | | | |
|-----|--|------|--|
| S1 | Introduction | S90 | 9. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment Pharmacologic Therapy for Type 1 Diabetes Surgical Treatment for Type 1 Diabetes Pharmacologic Therapy for Type 2 Diabetes |
| S3 | Professional Practice Committee | | |
| S4 | Summary of Revisions: <i>Standards of Medical Care in Diabetes—2019</i> | | |
| S7 | 1. Improving Care and Promoting Health in Populations Diabetes and Population Health Tailoring Treatment for Social Context | S103 | 10. Cardiovascular Disease and Risk Management Hypertension/Blood Pressure Control Lipid Management Antiplatelet Agents Cardiovascular Disease |
| S13 | 2. Classification and Diagnosis of Diabetes Classification Diagnostic Tests for Diabetes A1C Type 1 Diabetes Prediabetes and Type 2 Diabetes Gestational Diabetes Mellitus Cystic Fibrosis–Related Diabetes Posttransplantation Diabetes Mellitus Monogenic Diabetes Syndromes | S124 | 11. Microvascular Complications and Foot Care Chronic Kidney Disease Diabetic Retinopathy Neuropathy Foot Care |
| S29 | 3. Prevention or Delay of Type 2 Diabetes Lifestyle Interventions Pharmacologic Interventions Prevention of Cardiovascular Disease Diabetes Self-management Education and Support | S139 | 12. Older Adults Neurocognitive Function Hypoglycemia Treatment Goals Lifestyle Management Pharmacologic Therapy Treatment in Skilled Nursing Facilities and Nursing Homes End-of-Life Care |
| S34 | 4. Comprehensive Medical Evaluation and Assessment of Comorbidities Patient-Centered Collaborative Care Comprehensive Medical Evaluation Assessment of Comorbidities | S148 | 13. Children and Adolescents Type 1 Diabetes Type 2 Diabetes Transition From Pediatric to Adult Care |
| S46 | 5. Lifestyle Management Diabetes Self-management Education and Support Nutrition Therapy Physical Activity Smoking Cessation: Tobacco and e-Cigarettes Psychosocial Issues | S165 | 14. Management of Diabetes in Pregnancy Diabetes in Pregnancy Preconception Counseling Glycemic Targets in Pregnancy Management of Gestational Diabetes Mellitus Management of Preexisting Type 1 Diabetes and Type 2 Diabetes in Pregnancy Pregnancy and Drug Considerations Postpartum Care |
| S61 | 6. Glycemic Targets Assessment of Glycemic Control A1C Goals Hypoglycemia Intercurrent Illness | S173 | 15. Diabetes Care in the Hospital Hospital Care Delivery Standards Glycemic Targets in Hospitalized Patients Bedside Blood Glucose Monitoring Antihyperglycemic Agents in Hospitalized Patients Hypoglycemia Medical Nutrition Therapy in the Hospital Self-management in the Hospital Standards for Special Situations Transition From the Acute Care Setting Preventing Admissions and Readmissions |
| S71 | 7. Diabetes Technology Insulin Delivery Self-monitoring of Blood Glucose Continuous Glucose Monitors Automated Insulin Delivery | S182 | 16. Diabetes Advocacy Advocacy Statements |
| S81 | 8. Obesity Management for the Treatment of Type 2 Diabetes Assessment Diet, Physical Activity, and Behavioral Therapy Pharmacotherapy Medical Devices for Weight Loss Metabolic Surgery | S184 | Disclosures |
| | | S187 | Index |

Diabetes mellitus (DM)

- Heterogenní onemocnění, jehož hlavním znakem je nedostačující regulace glykémie
 1. Diabetes mellitus I. typu (imunitně podmíněný; idiopatický)
 2. Diabetes mellitus II. typu
 3. Gestační diabetes mellitus
 4. Ostatní specifické typy diabetu



Inzulín

American Diabetes Association, 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: *Standards of Medical Care in Diabetes—2019*, Diabetes Care. 42 (2019) S13–S28. doi:10.2337/dc19-S002.

Created by Isaac Yonemoto created with [en:pymol](#), [en:inkscape](#), and [en:gimp](#) from NMR structure 1ai0 in the [en:pdb](#). Ref: Chang, X., Jorgensen, A.M., Bardrum, P., Led, J.J.

Diagnóza diabetu

Glukóza

- Na lačno (alespoň 8 hodin bez příjmu potravy)
≥ 7,0 mmol/l
- Náhodný odběr nebo OGTT (75g glukózy ve vodě, odběr po 2 hodinách)
≥ 11,1 mmol/l

HbA1c

≥ 48 mmol/mol

Dle současného doporučení

Klin. Biochem. Metab., 24 (45), 2016, No. 1, p. 39–50.

- O diagnóze lze rozhodnout pouze na základě opakovaného odběru!

Dle ADA (2019)

- O diagnóze lze rozhodnout z jednoho odběru, pokud je hyperglykémie nezaměnitelná (unequivocal)

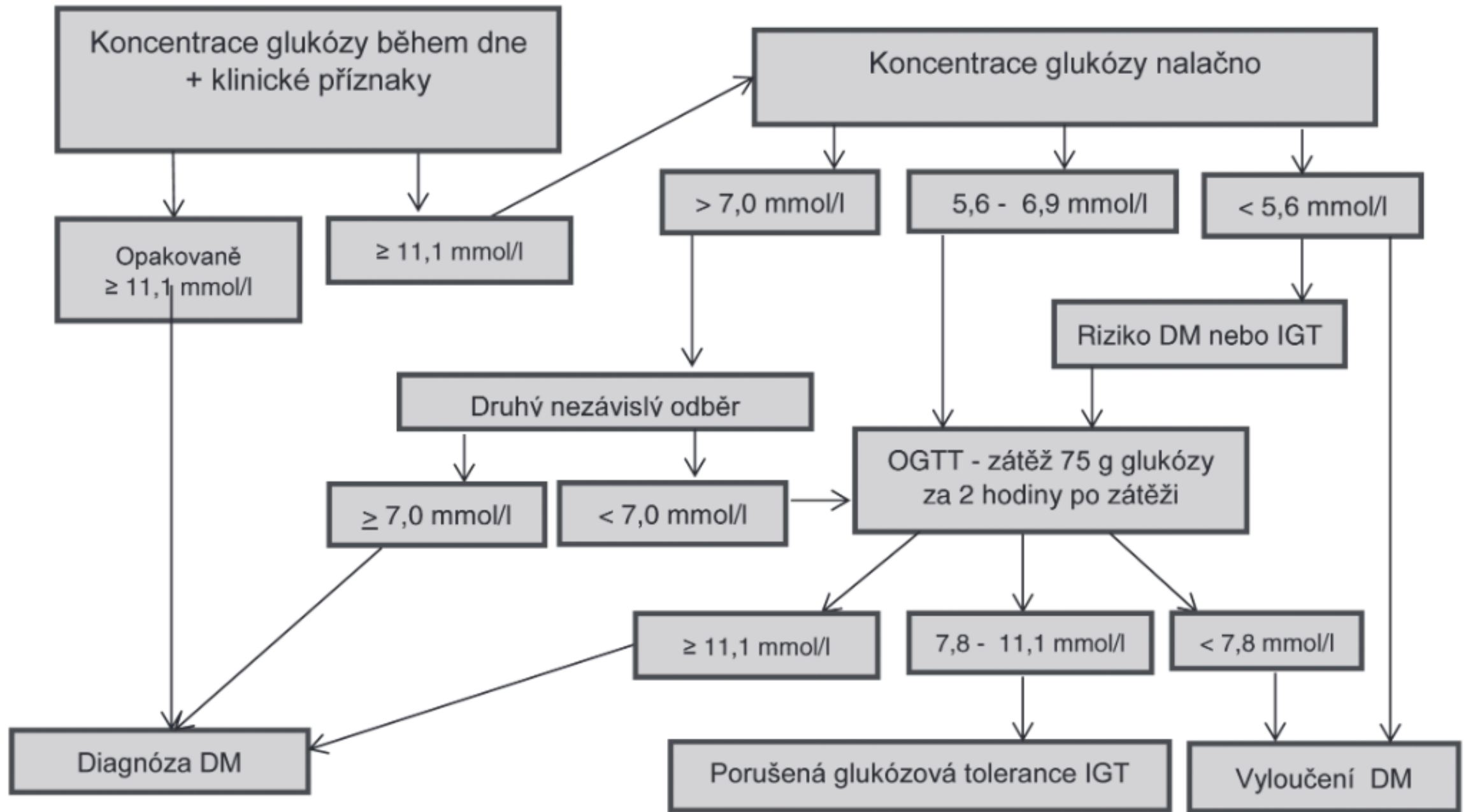
Prediabetes

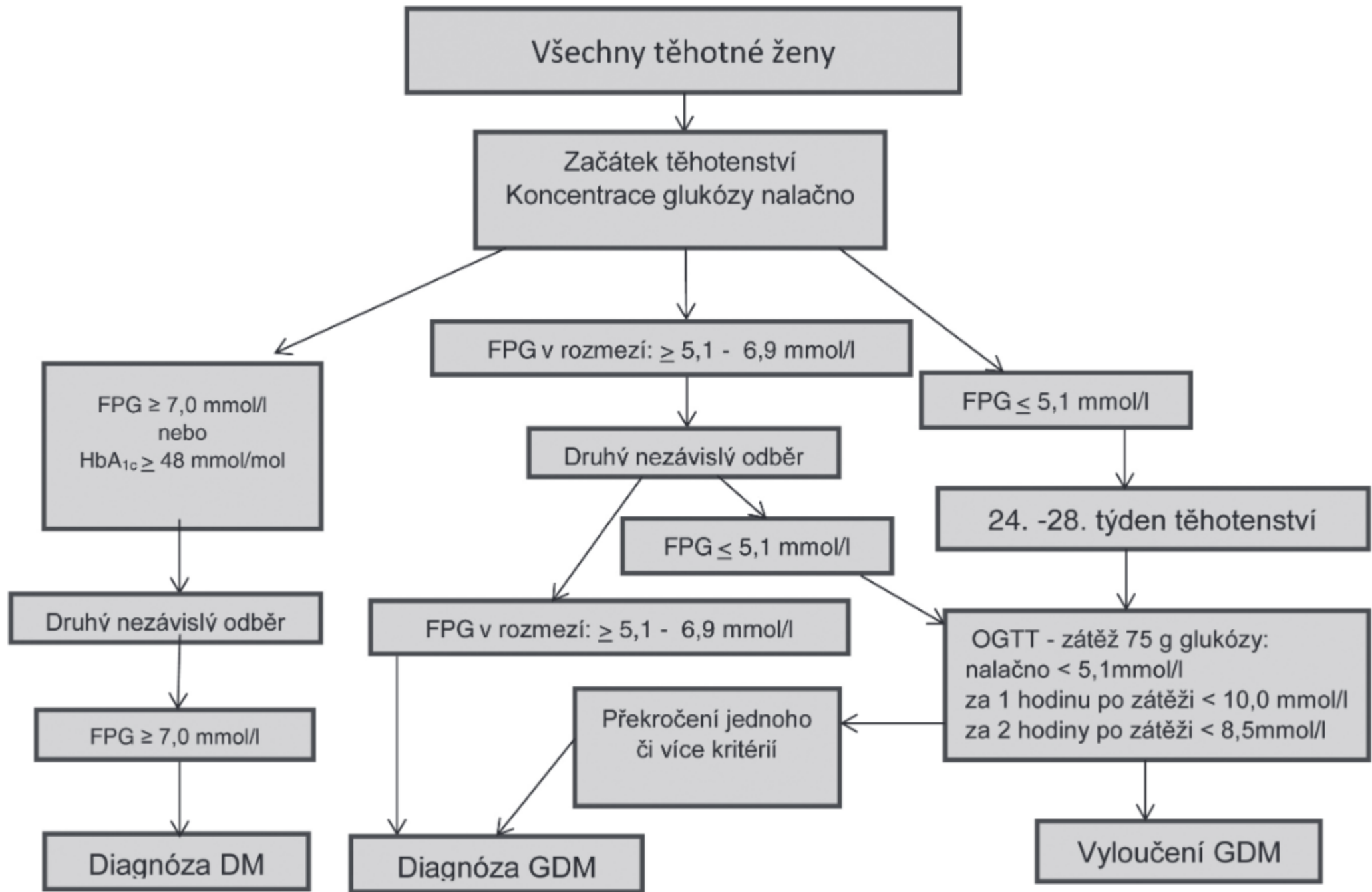
Termín používaný u osob se zvýšenou glykemií, ale ne tolik, aby překročili kritéria pro diagnózu diabetu

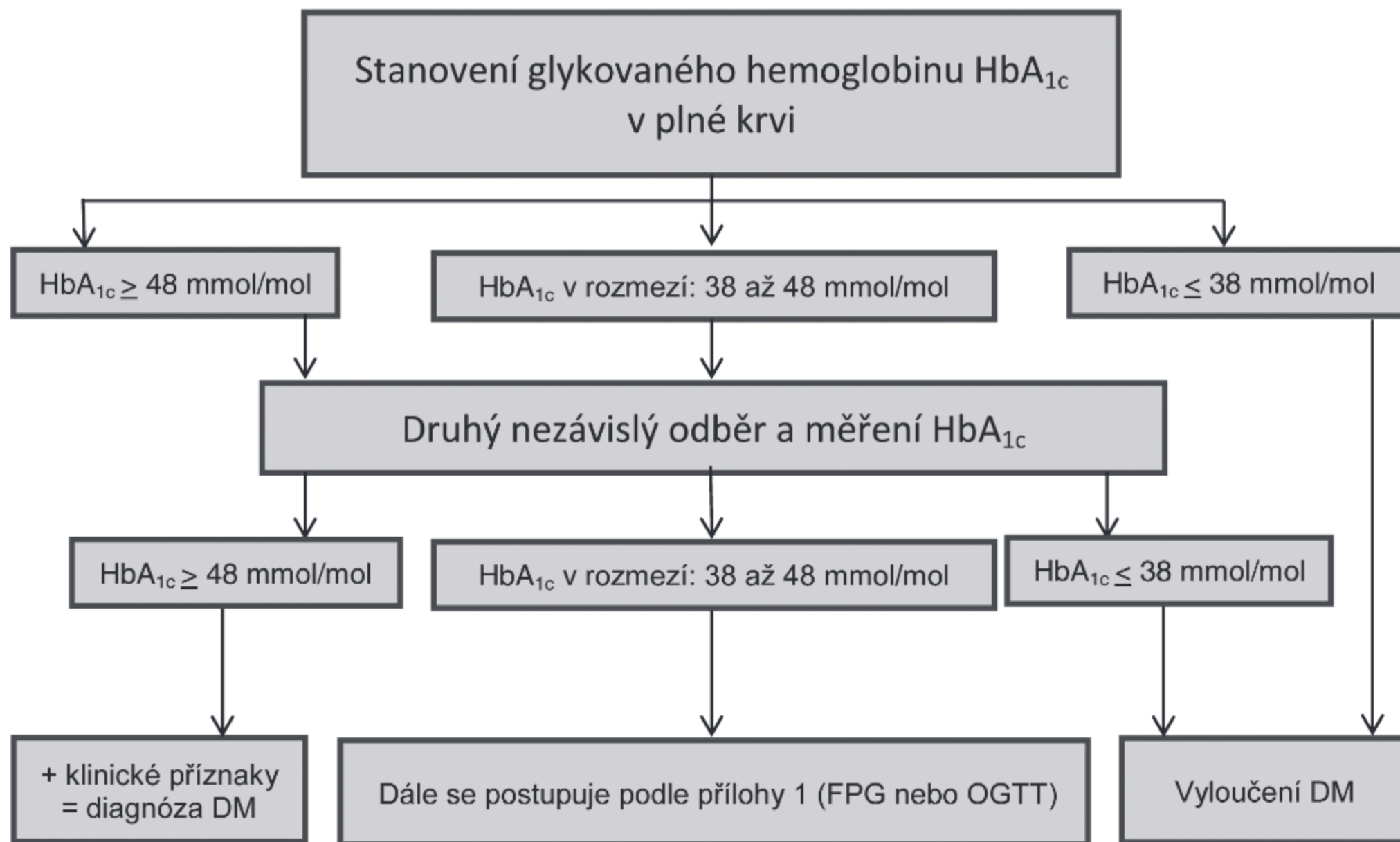
-> riziková populace pro diabetes 2. typu (≥ 45 let; BMI ≥ 25 kg/m²)
u obézních adolescentů (BMI ≥ 85 percentilu)

- HbA1c (39-47 mmol/mol)

-> riziko rozvoje kardiovaskulárních







Laboratorní diagnostika

- Glykémie
- HbA1c
- Glykovaný albumin

Stanovení glykémie

- Referenční metoda: ID-GC/MS (izotopová diluce a stanovení GC s MS)
- Certifikovaný referenční materiál: SRM 909 NIST, NIST/SRM 917, NIST/SRM 965 (USA)
- Alespoň 2x ročně účast v EHK

Sérum, plazma

| | | |
|--------------------|------------------|----------------|
| Dospělí | 4.11-5.89 mmol/L | (74-106 mg/dL) |
| 60-90 let | 4.56-6.38 mmol/L | (82-115 mg/dL) |
| > 90 let | 4.16-6.72 mmol/L | (75-121 mg/dL) |
| Děti | 3.33-5.55 mmol/L | (60-100 mg/dL) |
| Novoroz. (1 den) | 2.22-3.33 mmol/L | (40-60 mg/dL) |
| Novoroz. (> 1 den) | 2.78-4.44 mmol/L | (50-80 mg/dL) |

Moč

| | | |
|-------------|------------------|----------------|
| 24h. moč | < 2.78 mmol/24 h | (< 0.5 g/24 h) |
| Náhodná moč | 0.06-0.83 mmol/L | (1-15 mg/dL) |

CSF

| | | |
|---------|------------------|---------------|
| Děti | 3.33-4.44 mmol/L | (60-80 mg/dL) |
| Dospělí | 2.22-3.89 mmol/L | (40-70 mg/dL) |

Tietz NW, ed. Clinical Guide to Laboratory Tests, 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Co 2006;444-451.

Stanovení glykémie

| | |
|-------------------------------|--------------------------|
| Mezilehlá preciznost | CV < 2,5 % |
| Pravdivost (Bias) | B < 2,0 % |
| Celková chyba | TE < 3,1 % |
| Metrologická návaznost | referenční metoda |

□ Doporučení ČDS a ČSKB; vydáno v únoru 2012, aktuální korekce 18.2.2015

| | | | |
|---|------------|---|------------|
| Intraindividuální biologická variabilita | 4,9 | Preciznost odvozená z biologických variabilit | 2,5 |
| Interindividuální biologická variabilita | 6,9 | Pravdivost odvozená z biologických variabilit | 2,2 |
| Celková biologická variabilita | 8,9 | Celková chyba odvozená z biologických variabilit | 6,9 |

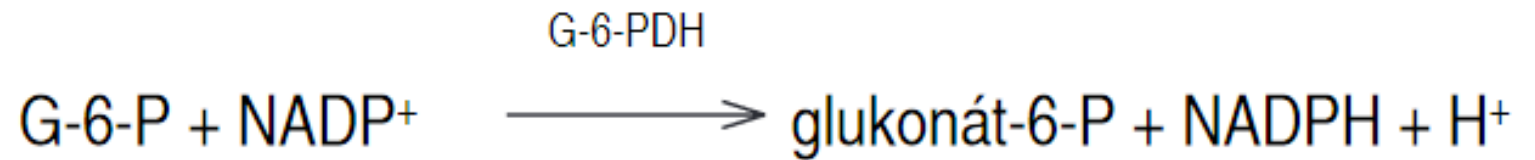
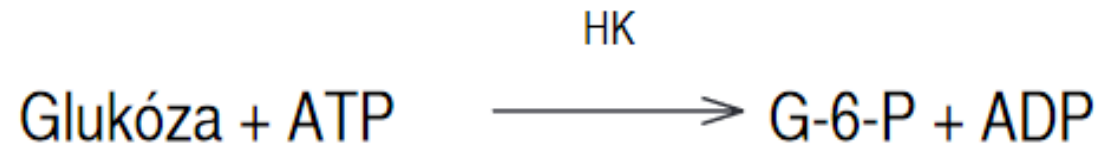
□ www.westgard.cz

Stanovení glykémie

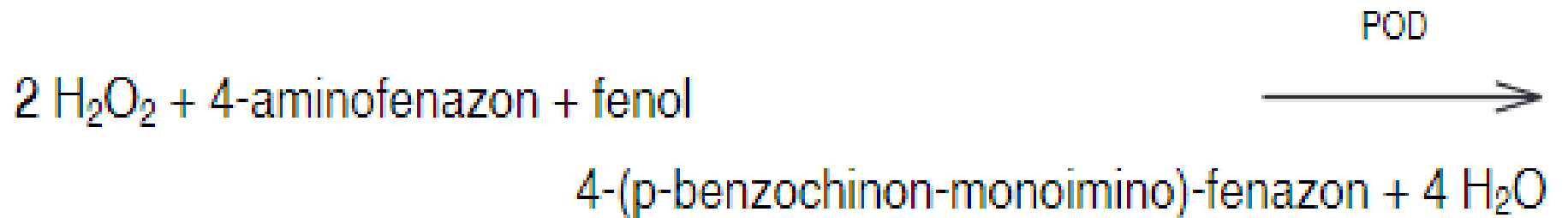
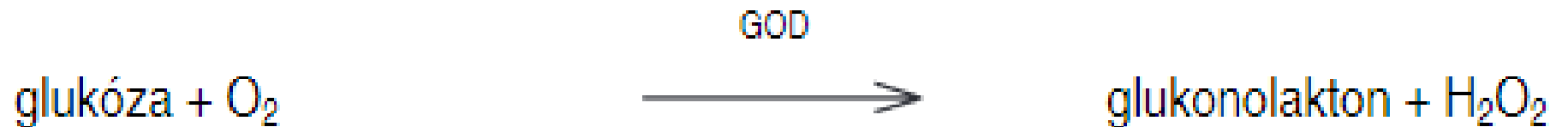
- Analyzovaný materiál:
- B, S, P, U, CSF, výpotek
- Preanalytické požadavky:
- pro diagnostiku diabetu mellitu je nevhodný odběr krve bez antiglykolitických přísad; ČSKB a Česká diabetol. společnost (2005) doporučují:
- odběr krve nalačno (min. 8h lačnění)
- stanovení v plazmě žilní krve (EDTA + NaF); (EDTA + NaF + citrát sodný)
- oddělení plazmy od krevních elementů ideálně do 60 min po odběru
- při sběru moče uchovávat moč do doby analýzy při 4-8°C, je třeba zabránit bakteriální kontaminaci

Stanovení glykémie – plazma/sérum/moč/CSF

- Hexokinázová metoda



- Glukózaoxidázová metoda



Glukóza v moči

- glykosurie: stanovení ztráty glukózy močí
 - pro diagnostiku DM není stanovení doporučeno
 - má jen orientační význam
 - prakticky byla nahrazena selfmonitoringem glykemií
-
- Spektrofotometricky nebo orientačně suchou chemií (glukózaoxidázová reakce)

Stanovení glykémie

- Elektrochemické metody
 - Clarkova kyslíková elektroda
 - Biosenzory s membránou s GOx

□ glukometry



lanceta



□ automatický stolní analyzátor ke stanovení glukózy a laktátu (Biosen)

Glykémie elektrochemicky

- Princip: přímé elektrochemické stanovení glukózaoxidázou
- 1. glukóza + O₂ \longrightarrow glukonolakton + H₂O₂
(glukózaoxidáza)
- 2. elektrochemická redukce H₂O₂ na H₂O
- 3. vzniklý elektrický proud nebo náboj je úměrný koncentraci glukózy (amperometrické nebo coulometrické stanovení)
- H₂O₂ \longrightarrow 2H⁺ + O₂ + 2e⁻ reakce na anodě
- 2e⁻ + 2H⁺ + ½ O₂ \longrightarrow H₂O reakce na katodě

Glykémie elektrochemicky

- Princip: přímé elektrochemické stanovení glukózadehydrogenázou
- 1. glukóza + NAD^+ \longrightarrow glukonolakton + e + NADH
(glukózadehydrogenáza)
- 2. glukóza + e-akceptor \longrightarrow glukonolakton + redukovaný e-ac
(FAD dependentní GLU dehydrogenáza)
- Jako transducery elektronů slouží např. hexokyanoželezitan

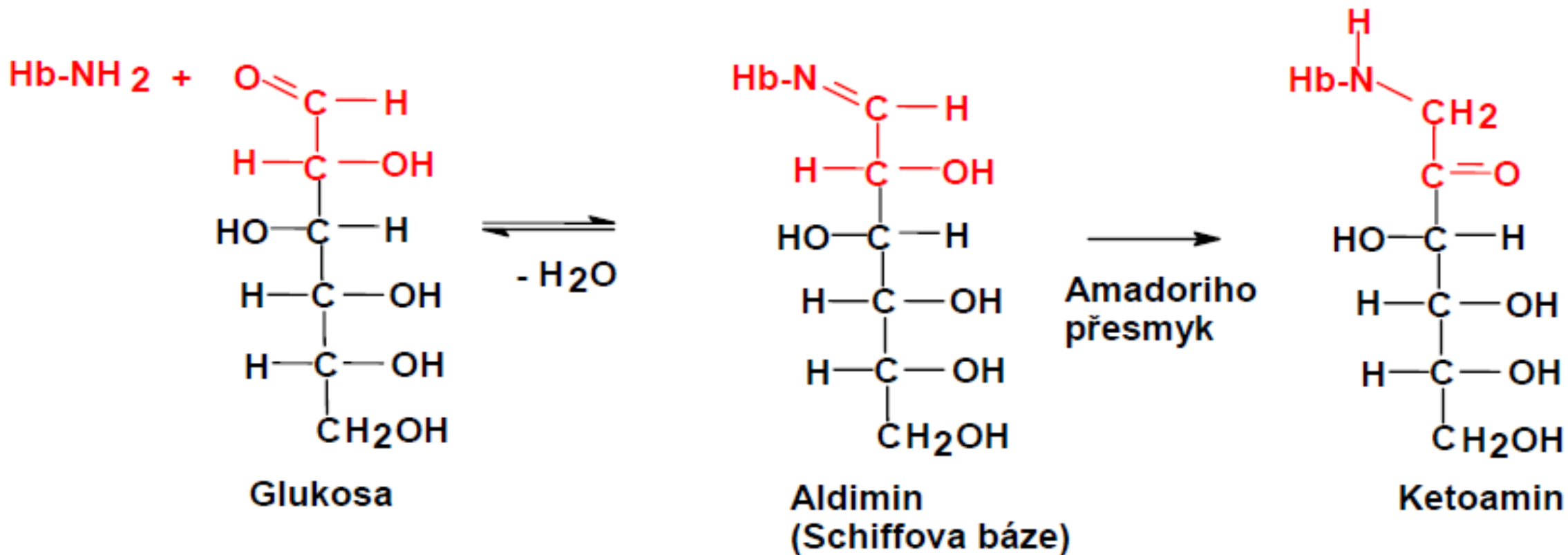
- Glukometry nemocniční
 - AccuChek Inform, Hemocue, Stat Strip
- Umožňují přenos dat do LIS, monitoring kontroly kvality, do jisté míry vzdálenou správu

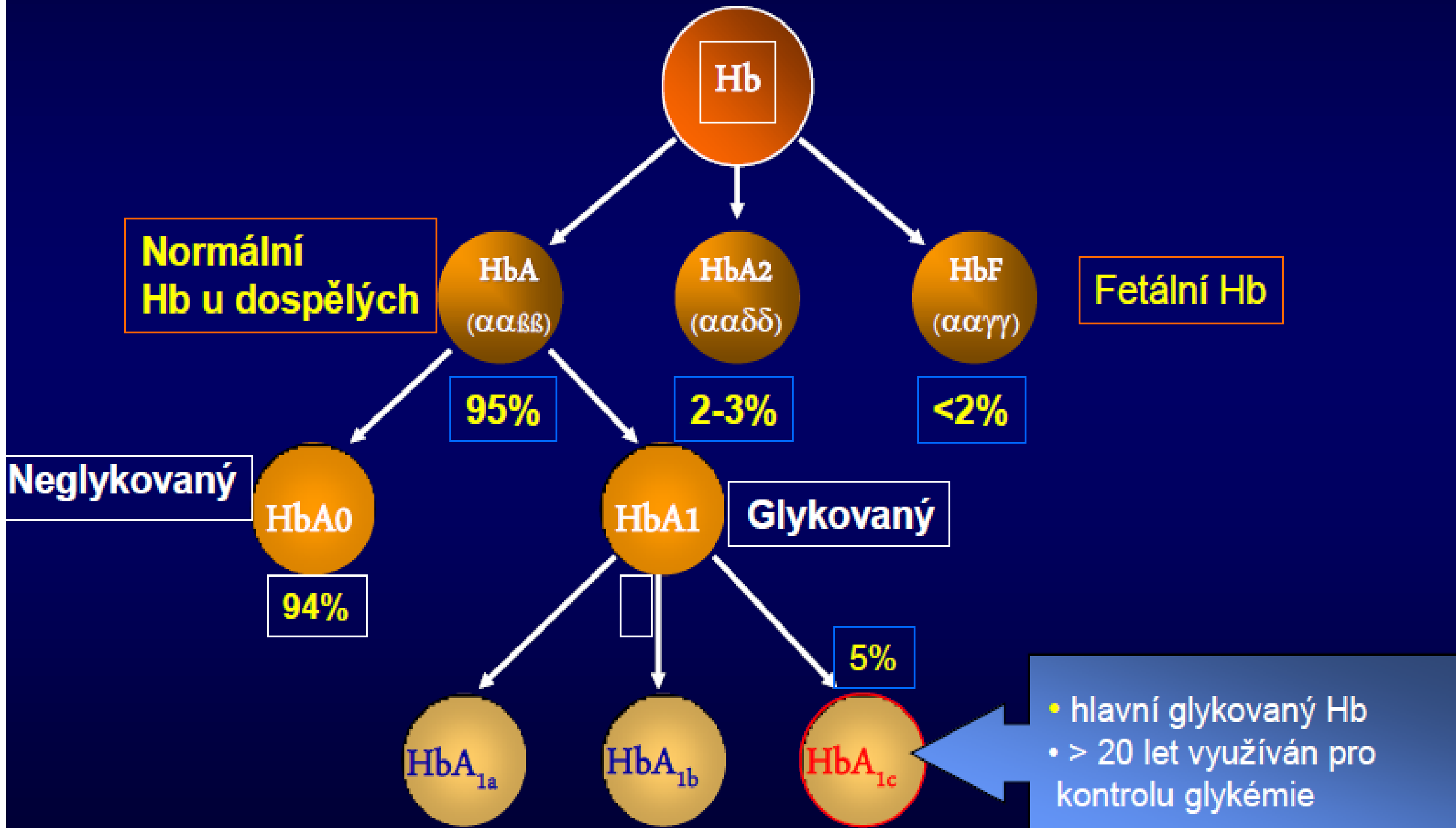


- Glukometry:
- jsou určeny k selfmonitoringu pacientů s DM, dále pro ambulantní měření koncentrace glukózy
- použití glukometrů k dg. DM se nedoporučuje
- proti referenční metodě nesmí chyba měření překročit:
 - $\pm 0,83$ mmol/l pro koncentrace $< 5,6$ mmol/l
 - $\pm 15\%$ pro koncentrace $\geq 5,6$ mmol/l
- kontroly osobních glukometrů srovnáním s měřením v laboratoři se doporučuje provádět v pravidelných časových intervalech minimálně jednou ročně

Glykovaný hemoglobin

- Vazba na N-terminální valin betařetězce hemoglobinu





Glykovaný hemoglobin

- rutinní a efektivní nástroj sledování průběhu DM (diabetu)
- HbA_{1c} ukazatel dlouhodobé průměrné koncentrace glukózy v krvi (období cca 6-8 týdnů nazpět) umožňuje posoudit dlouhodobou kompenzaci diabetu
- diagnostické kritérium DM
- kontrola terapie
- včasné odhalení hrozících komplikací
- hodnocení vyšetření:

| <i>HbA_{1c}</i> <i>[mmol/mol]</i> | <i>Interpretace</i> |
|--|----------------------------|
| < 38 | diabetes nepřítomen |
| 38 až 48 | hraniční hodnoty |
| > 48 | diagnóza diabetu |

HbA1c vs. glykémie

- není třeba konzervovat krev (větší stabilita)
- menší intraindividuální variabilita ($CV < 2\%$)
- HbA1c není ovlivněn krátkodobou glykemií
- nemocný nemusí být lačný
- využití pro diagnostiku i kontrolu léčby

Jednotky HbA1c

- od 1.1. 2012: mmol/mol dle IFCC
- V USA % (NGSP/DCCT) používají se paralelně, přepočít jednotek dle vzorce

$$\text{výsledek}_{\text{NGSP}} = (0,09148 \times \text{výsledek}_{\text{IFCC}}) + 2,152$$

| <i>HbA_{1c}</i> <i>[mmol/mol]</i> | <i>Interpretace</i> |
|--|---|
| 20 až 42 | Referenční interval (dospělí, negravidní). |
| 43 až 53 | Kompenzovaný diabetes (dospělí, negravidní). |
| > 53 | Dekompenzovaný diabetes. Signál k změně terapie a režimu. |

- Preanalytické požadavky:
- Analyzovaný materiál: B – odběr do EDTA
- stabilita: 2d (+20 až +25°C); 1 týden (+4 až +8°C); 1rok (<-20°C lépe při -80°C)
- Poznámky:
- snížená hodnota doby života erytrocytů
- hemoglobinopatie, karbamylace (uremiční pacienti) – ovlivnění koncentrace HbA1c v rutinních metodách

Požadavky na analytickou kvalitu

| | |
|-------------------------------|------------------------------------|
| Mezilehlá preciznost | CV < 1,0 % |
| Pravdivost (Bias) | B < 1,5 % |
| Celková chyba | TE < 6,9 % |
| Metrologická návaznost | referenční metoda LC-ESI/MS |

□ Doporučení ČDS a ČSKB; vydáno v únoru 2012, aktuální korekce 18.2.2015

| | | | |
|---|------------|---|------------|
| Intraindividuální biologická variabilita | 1,9 | Preciznost odvozená z biologických variabilit | 1,0 |
| Interindividuální biologická variabilita | 5,7 | Pravdivost odvozená z biologických variabilit | 1,5 |
| Celková biologická variabilita | | Celková chyba odvozená z biologických variabilit | 3,1 |

□ www.westgard.cz

HbA1c – metody stanovení

- Referenční metody (2001):

- 1) izolace a hemolýza erytrocytů (+ odstranění labilních pre-HbA1c)

- 2) enzymové štěpení hemoglobinu (endoproteináza Glu-C)

- 3) analytické měření (detekce glykovaných hexapeptidů) pomocí

- a) HPLC/ESI-MS:

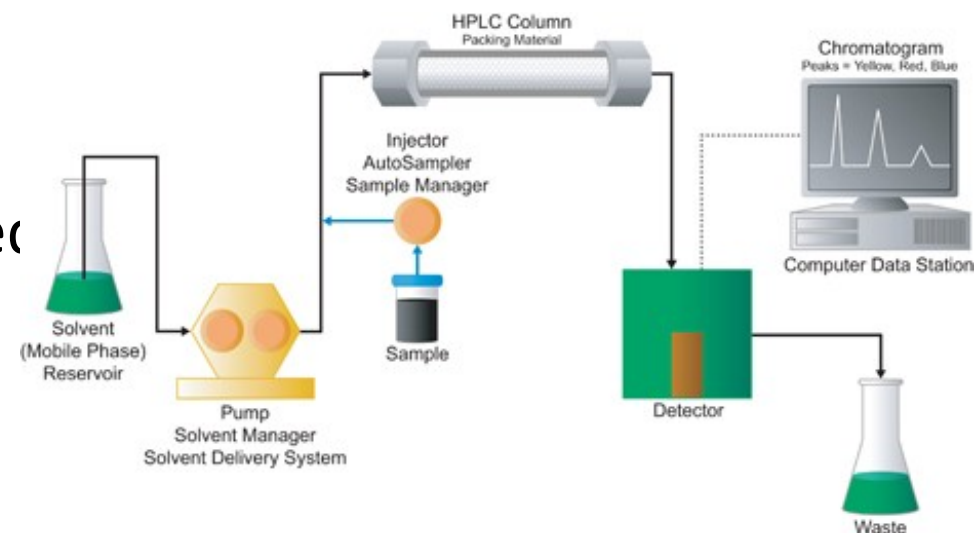
- Glykovaný hemoglobin (HbA1c) je ze směsi peptidů separován, detekován, identifikován hmotnostní spektrometrií a kvantifikován na podkladě rozdílných hodnot m/z . Z poměru hodnot m/z analyzovaných vzorků a kalibrátorů se vypočítá hodnota HbA1c.

- b) HPLC/CE/UV:

- První separace se provede pomocí HPLC, jednotlivé frakce se sbírají, následuje další separace této směsi pomocí CE. Glykovaný a neglykovaný hexapeptid jsou odděleny na základě různých elektromigračních časů a kvantifikovány UV detektorem.

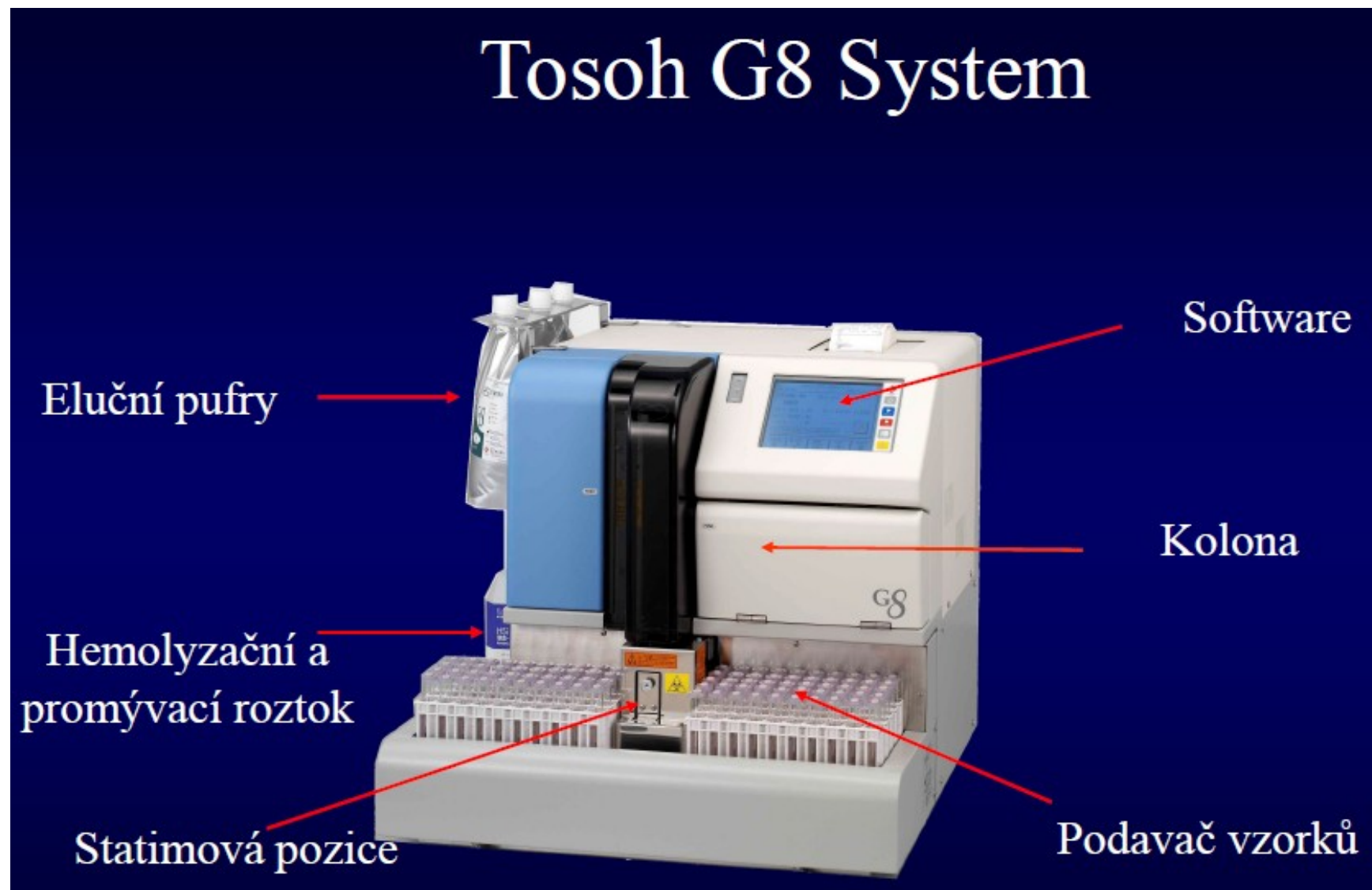
HbA1c – rutinní metody stanovení

- Kapalinová chromatografie s výměnou iontů (IEC)
- separace hemoglobinů a jeho složek na slabě kyselých ionexech
- jednotlivé frakce hemoglobinu jsou rozděleny podle jejich různých fyzikálně-chemických vlastností (velikost náboje) v měnícím se prostředí (změna koncentrace iontů, změna pH)
- frakce se po rozdělení detekují v mobilní fázi detektorem, který měří absorbance při 415 nm
- koncentrace HbA1c se zjistí z velikosti plochy příslušného píku na chromatogramu podle kalibrační křivky pomocí softwaru chromatografu
- HPLC (Vysokoúčinná kapalinová chromatografie)



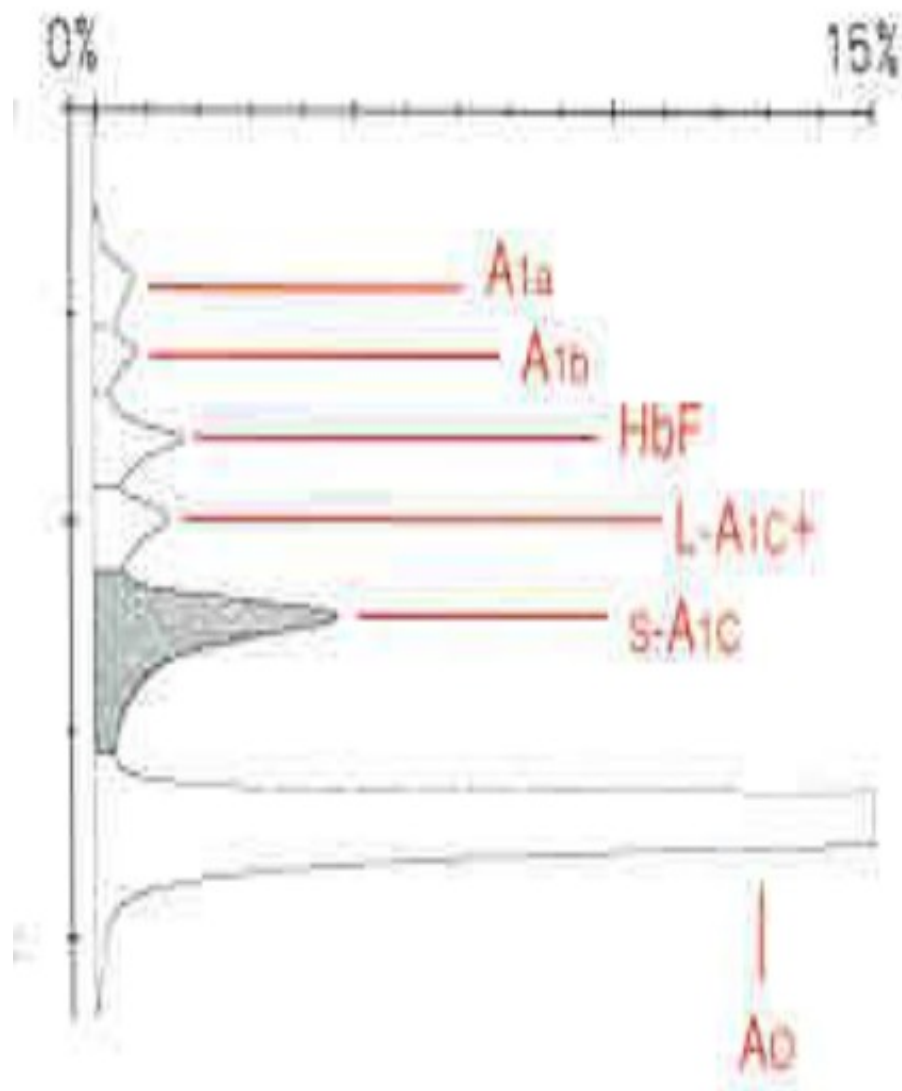
HbA1c – rutinní metody stanovení

▣ HPLC



HbA1c – rutinní metody stanovení

□ HPLC

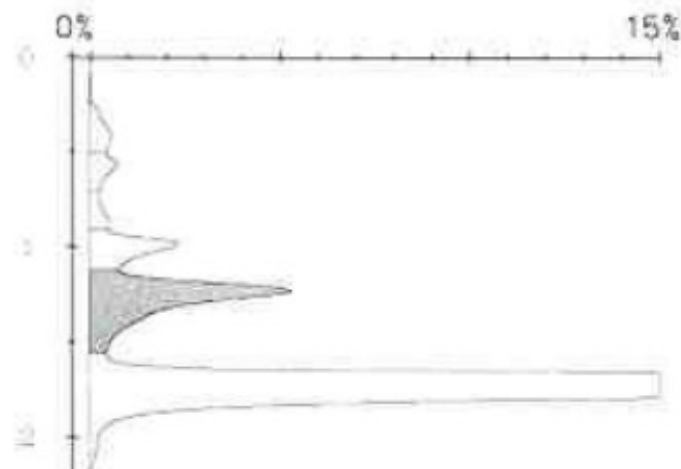


***** GLYCOHEMOGLOBIN REPORT *****

NO. 404 01020 1996/04/04 15:43
SAMPLE ID 03 - 10
CALIB Y = 1.0911X + 0.0765

| NAME | % | TIME | AREA |
|-------|------|------|---------|
| A1A | 0.6 | 0.43 | 13.70 |
| A1B | 0.5 | 0.57 | 12.19 |
| F | 0.4 | 0.89 | 9.21 |
| LA1C+ | 1.6 | 0.99 | 36.68 |
| SA1C | 5.4 | 1.23 | 109.65 |
| A0 | 92.0 | 1.69 | 2084.81 |

TOTAL AREA 2256.24
SA1C 5.4 TOTAL A1 6.5



HbA1c – rutinní metody stanovení

□ HPLC



Biorad - Variant



Biorad – D10

HbA1c – rutinní metody stanovení

HA-8180V ADAMS™ A1c



Premier Hb 9210



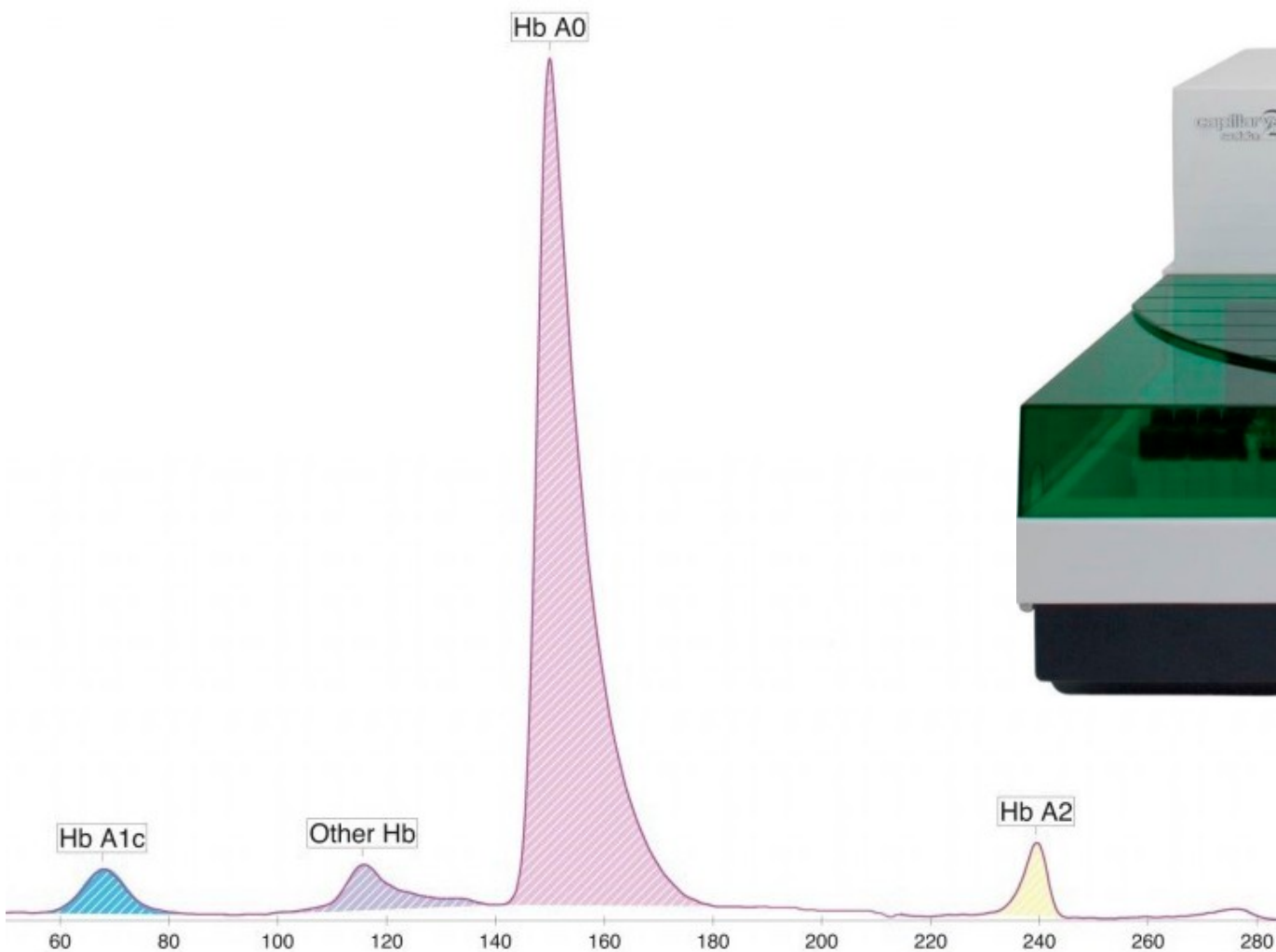
HbA1c – rutinní metody stanovení

2. Doporučené rutinní metody - elektroforetické:

- elektroforéza v agarózovém gelu (ELFO)
- kapilární elektroforéza (HPCE)
- izoelektrická fokusace (IEF)

HbA1c – rutinní metody stanovení

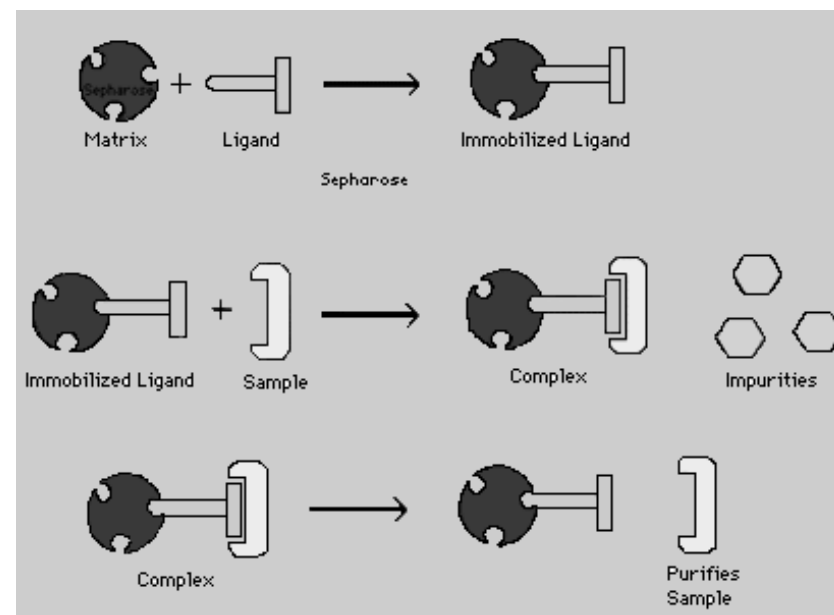
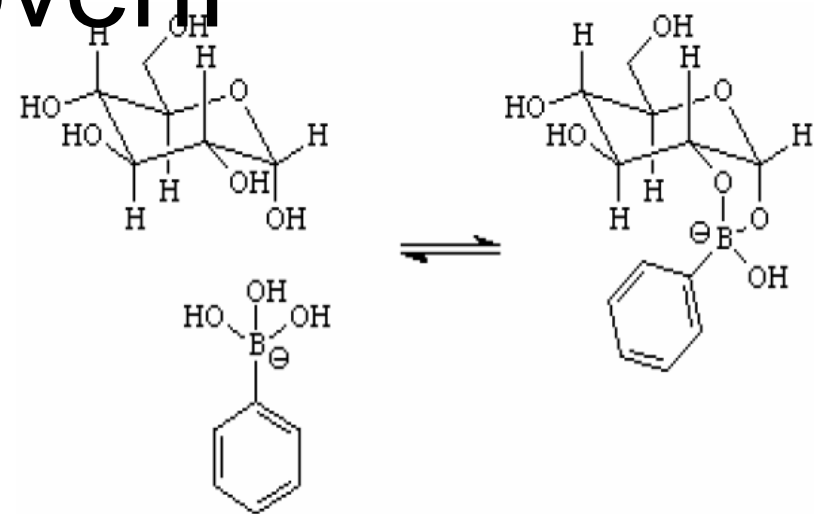
□ CE



Sebia - CapillaryS

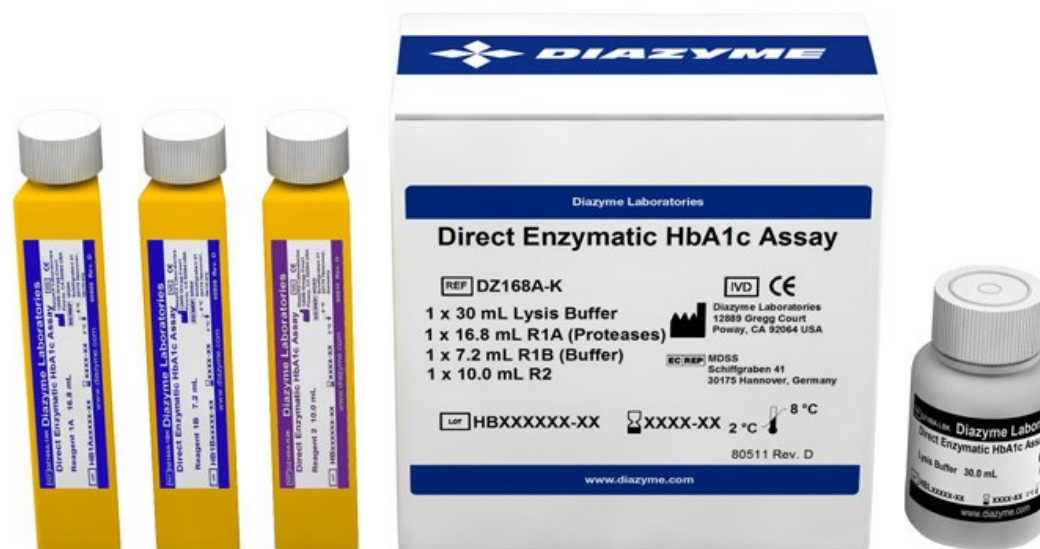
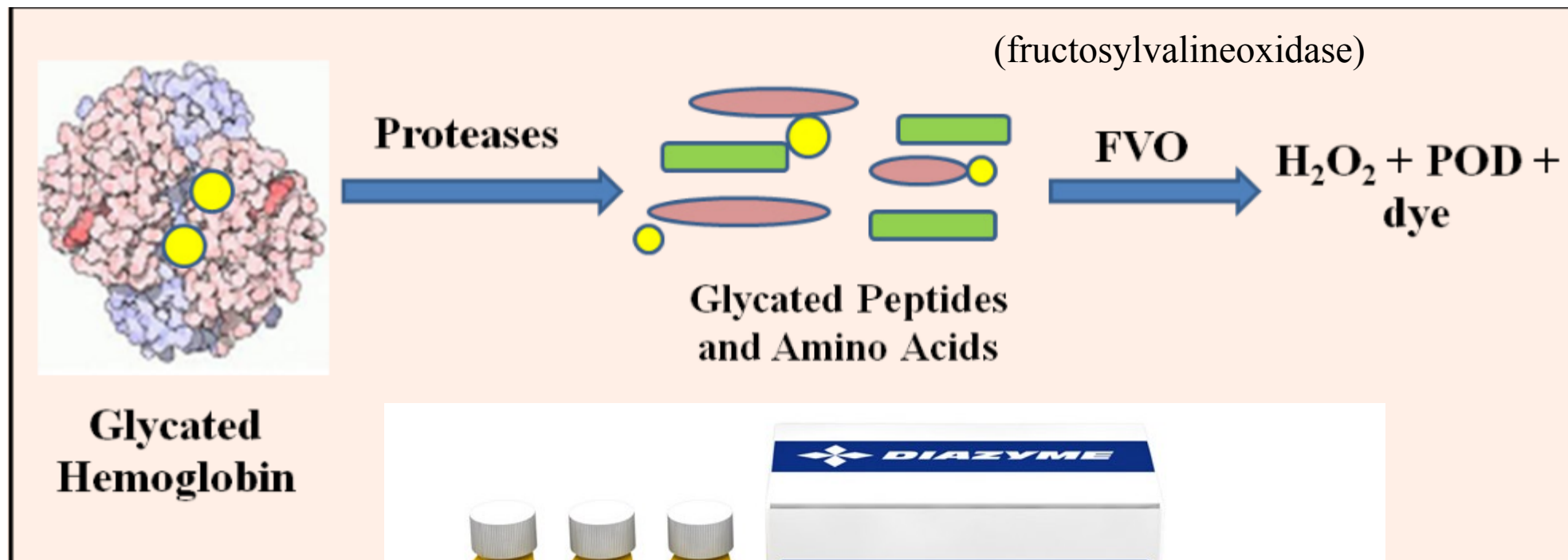
HbA1c – rutinní metody stanovení

- Chromatografické:
- Afinitní chromatografie (aminofenylboronátová):
- založena na interakci glykovaného hemoglobinu s imobilizovaným boronátovým aniontem
- po eluci neglykovaných frakcí hemoglobinu, dojde k uvolnění vazby a po eluci se stanoví hemoglobinové frakce detektorem, který měří absorbance při 415 nm
- koncentrace HbA1c se zjistí z velikosti plochy příslušného píku na chromatogramu



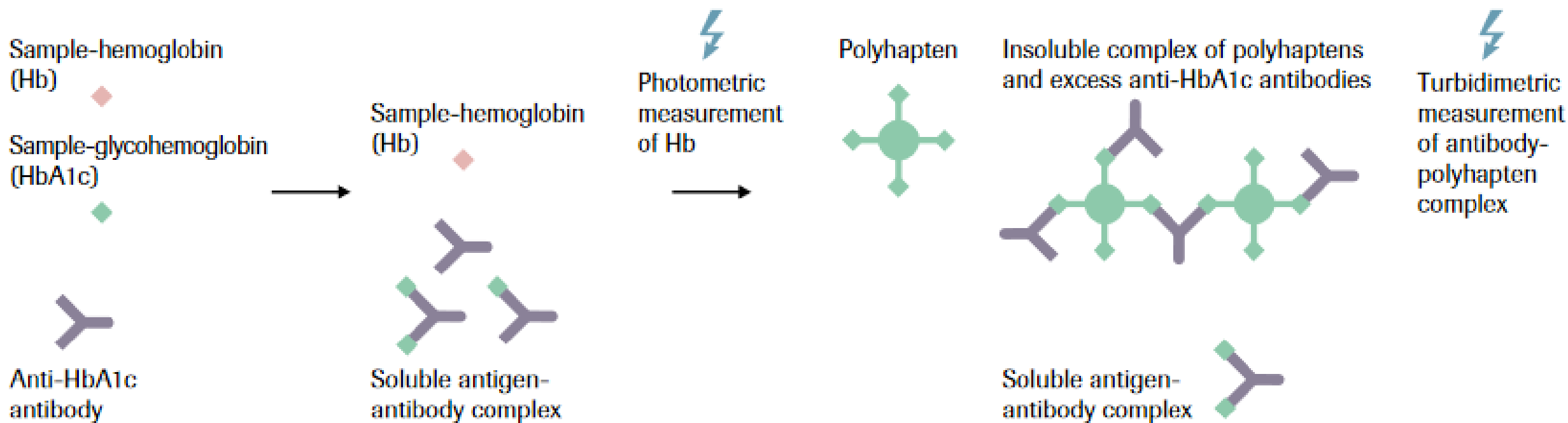
HbA1c – rutinní metody stanovení

Direct enzymatic HbA1c method



HbA1c – rutinní metody stanovení

Test principle: competitive turbidimetric inhibition immunoassay (TINIA) for hemolyzed whole blood



HbA1c – POCT

□ **Boronátová afinitní chromatografie/
fotometrie**



Infopia Clover

U nás v současnosti nejčtenější

HbA1c – POCT

□ **Boronátová afinitní chromatografie/
fotometrie**

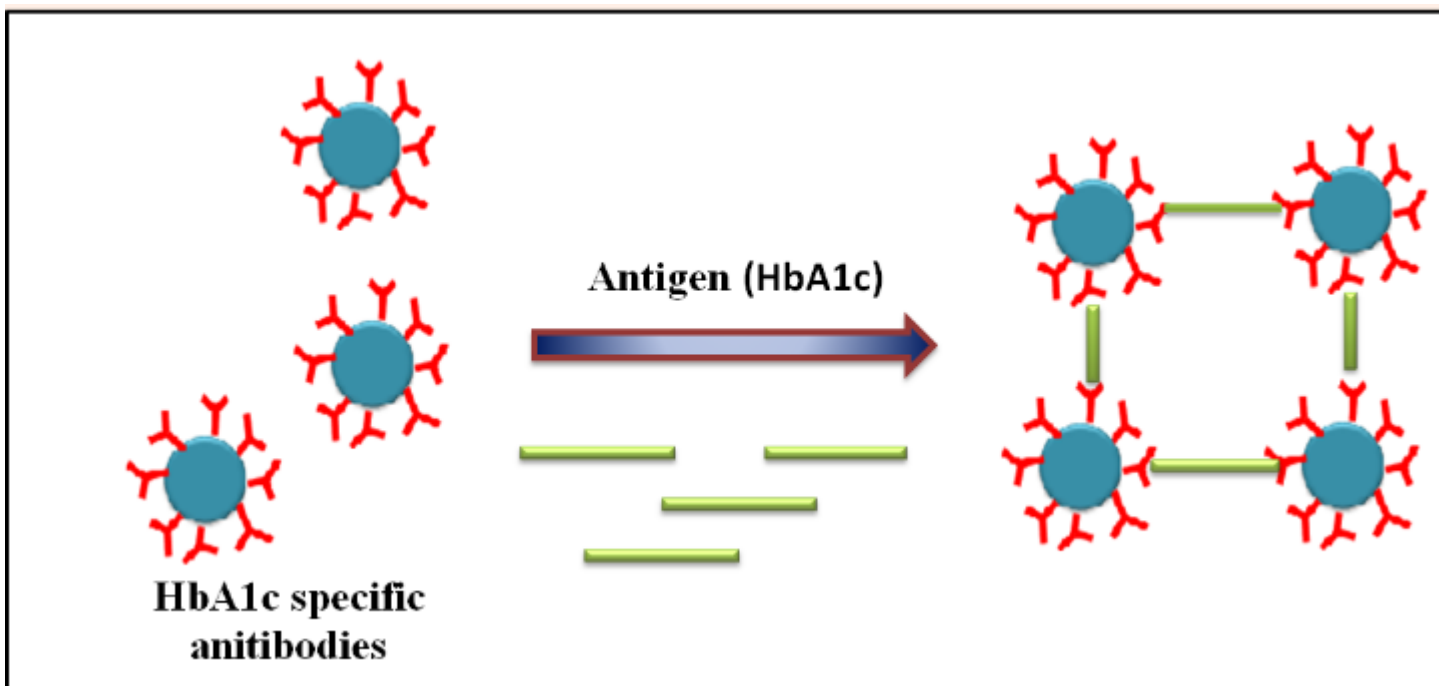


Alere (Abbott) - Afinion

FDA schválila používání pro diagnózu diabetu mellitu 2. typu

HbA1c – POCT

Imunochemický (aglutinace)



Latex enhanced immunoassay method



Siemens - DCA Vantage

Pozitivní hodnocení v rámci NGSP

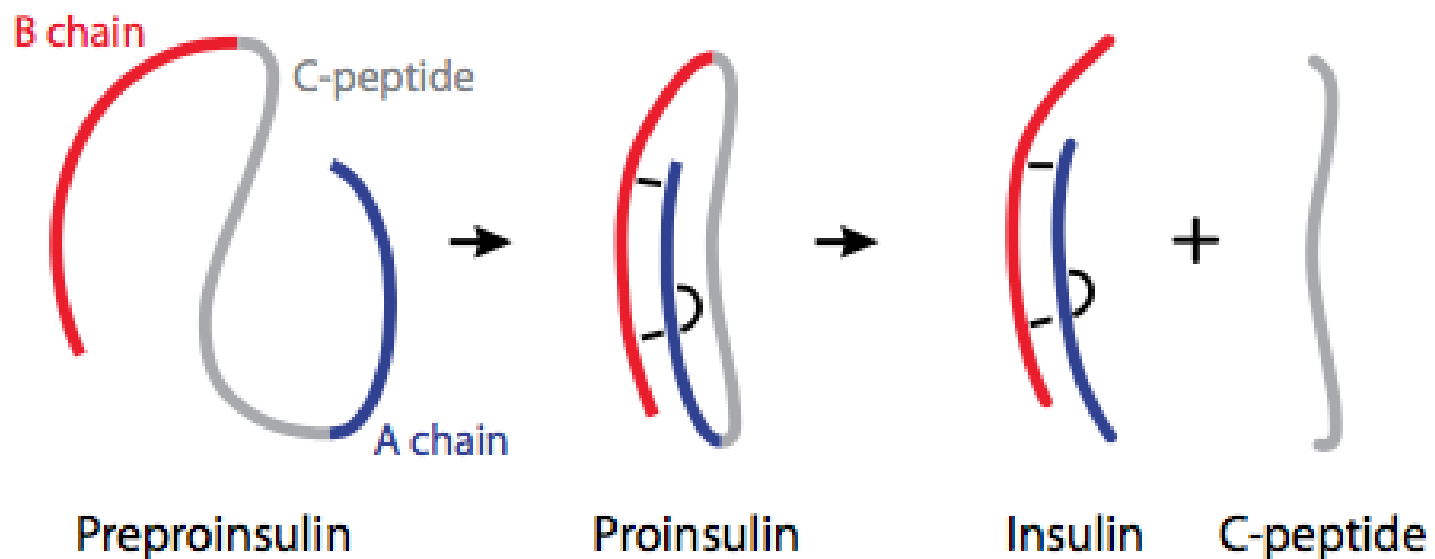
HbA1c - nevýhody

- doba života erytrocytů (120 ± 10 d) !
- přítomnost vzácnějších typů hemoglobinu (1165 variant Hb, např. HbS, HbC, HbE, HbD)
- hemolýza, ikterus
- těžké krvácení
- věk, rasa, terapie,...

C-peptid a inzulin

Stanovení C-peptidu a inzulinu není zakotveno v žádném doporučení pro diagnostiku diabetu a nemá význam při rutinním sledování pacientů s DM.

Stanovení C-peptidu se provádí při rozhodování o vhodnosti volby terapie inzulinem u diabetu 2. typu, tj. při podezření na selhání sekrece inzulinu. Vyšetření inzulinu má význam při podezření na inzulinovou rezistenci u syndromu polycystických ovárií a při diagnostice inzulinomu.



C-peptid a inzulin

- Standardizace probíhá
- Používají se imunoanalytické metody
- C-peptid – standard WHO IRR 84/510

Autoprotilátky

- Nejsou doporučovány k diagnóze diabetu
- Jsou vhodné při podezření na kontrolu původu DM (LADA)
- Kombinované vyšetření 3 autoprotilátek – anti IAA, anti-GAD a anti IA-2

Glykovaný albumin

- V doporučeních není zmiňován
- Lze použít při snížení životnosti erytrocytů (nedostatek Fe, B12; hemolytická anémie, gestační diabetes...)
- Glykace na ϵ -aminoskupinách lyzinu (12 vazebných míst)

Enzymatická metoda zakončená Trinderovou reakcí + stanovení celkového albuminu bromkresolovým purpurem

-> přepočítání na % podíl

Lucica GA-L (Asahi Kasei Pharma) ; quantILab IL (Werfen);

Ref. Metoda: ID-LC-MS/MS

Referenční materiál: JCC RM611

| Method | CV (%)* | reference interval (% GA) |
|-----------------------|-------------|---------------------------|
| Lucica | < 1.0 - 1.7 | 11.9 - 15.8 |
| Lucica | 1.7 | |
| Lucica | 1.2 - 1.6 | |
| IL Werfen (quantILab) | 1.0 - 3.1 | ≤ 14.5 (9.0 - 16.0) |
| Diazyme | 1.2 - 2.3 | 10.5 - 17.5 |

Albumin v moči

- Včasná detekce predikuje diabetickou nefropatii
 - Mikroalbuminurie
- Doporučené vyšetření 1x ročně u diabetiků

Děkuji za pozornost