

Glukóza

Analytická část

Petr Breinek

Požadavky na analytickou kvalitu měření

	FPG	HbA1c	Albumin v moči	Glukometry
Přesnost	CV<2,5%	CV<3,0%	CV<15,0%	Rozdíl od laboratorní metody: celková chyba=15%
Pravdivost (bias)	b <2,0%	b <3,0%		
Návaznost	metoda ID-GC/MS	metoda IFCC	kalibrátor CRM 470	
U _c	5,0-7,0%			

Glukóza

- Nástroj laboratorní diagnózy diabetu mellitu

Preanalytická fáze

Doporučení ČSKB, ČDS, 2005

- stanovení v plazmě žilní krve (EDTA + NaF)
- zpracování do 60 min po odběru
- odběr nalačno (min. 8h lačnění)

(přiměřená hydratace, v posledních 3 dnech vyloučit fyzickou aktivitu a kouření, stravování bez restrikce sacharidů-min. 150g denně)

- Oddělení plasmy od krevních elementů:
do 60min od odběru

- Přepočetni faktory

Je-li vzorek krve ředěn před analýzou:

$$\text{FPG} = 1,1 \times \text{B-Glukóza}$$

Je-li je vzorek krve měřen bez ředění:

$$\text{FPG} = 0,94 \times \text{B-Glukóza}$$

Metody stanovení

1. REFERENČNÍ metoda

ID-GC/MS

standardní přidání značené glukózy C¹⁴ (izotopová diluce) do analyzovaného vzorku, následné rozdělení plynovou chromatografií a stanovení glukózy hmotnostní spektrometrií

Certifikovaný referenční materiál (CRM)

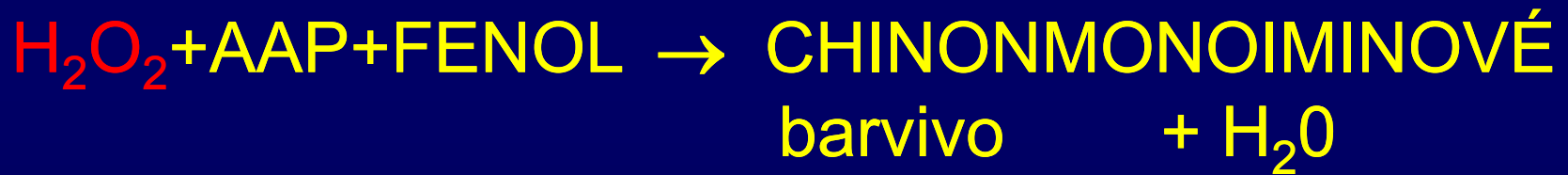
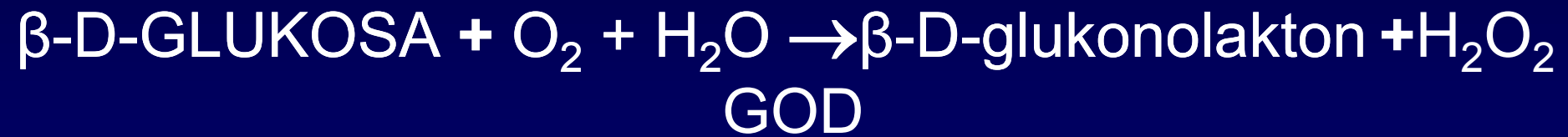
(SRM 909b NIST, SRM 917 NIST)

2. Doporučené rutinní metody (enzymové)

a) (GOD/ PAP)

glukózaoxidas
peroxidáza





PAP (oxidační kopulace)

b) (HK/ G6PD)

hexokináza

glukóza-6-fosfátdehydrogenáza





spektrofotometricky - vzrůst absorbance NADPH při 340 nm

c) (GDH)

glukózadehydrogenáza



spektrofotometricky -vzrůst absorbance NADH při 340nm

3. Elektrochemické metody

- Clarkova kyslíková elektroda
- Biosenzory s membránou se zakotvenou GOD
- Glukometry (POCT)

Kontinuální monitorování koncentrace glukózy

- Transkutánní senzory
- Mikrodialýza kůže
- **Neinvazivní** kožní a oční přístroje
- Senzory pro použití na odděleních intenzivní péče

Glykosurie, glukosurie = stanovení
glukózy v moči

- má jen orientační význam
- prakticky byla nahrazena
selfmonitoringem glykemií

Referenční rozmezí:

S,P-Glukóza	3,9-5,6 mmol/l
CSF-Glukóza	2,8-3,9 mmol/l
dU-Glukóza	0 -1,7 mmol/24h
P-Glukóza (oGTT) nalačno	3,9-5,6 mmol/l
P-Glukóza (oGTT) po 2h	3,9-7,8 mmol/l

DM - diagnóza

- Klinické symptomy
- P-Glu (náhodný odběr) $\geq 11,1$ mmol/l
- P-Glu (nalačno) $\geq 7,0$ mmol/l
- P-Glu (oGTT) po 2h $\geq 11,1$ mmol/l
- Opakované vyšetření
- Přesnost $< 2,5\%$
- Správnost (bias) $< 2,0\%$

Glukózový toleranční test (oGTT)

- Diagnóza diabetu
- Verifikace zvýšené hodnoty FPG

Glykovaný hemoglobin HbA1c

Petr Breinek

Názvosloví

HbA1c

β N-1-deoxyfruktosyl hemoglobin

DOF hemoglobin

stabilní adukt glukózy s N-terminální
aminoskupinou valinu β -řetězce
hemoglobinu

Glykovaný hemoglobin (HbA1c)

- Nástroj sledování stavu diabetu
- Velmi dobře koreluje:
 - ❖ S dlouhodobým stavem koncentrace glukózy v krvi
 - ❖ S riziky diabetických komplikací

Glykace proteinů

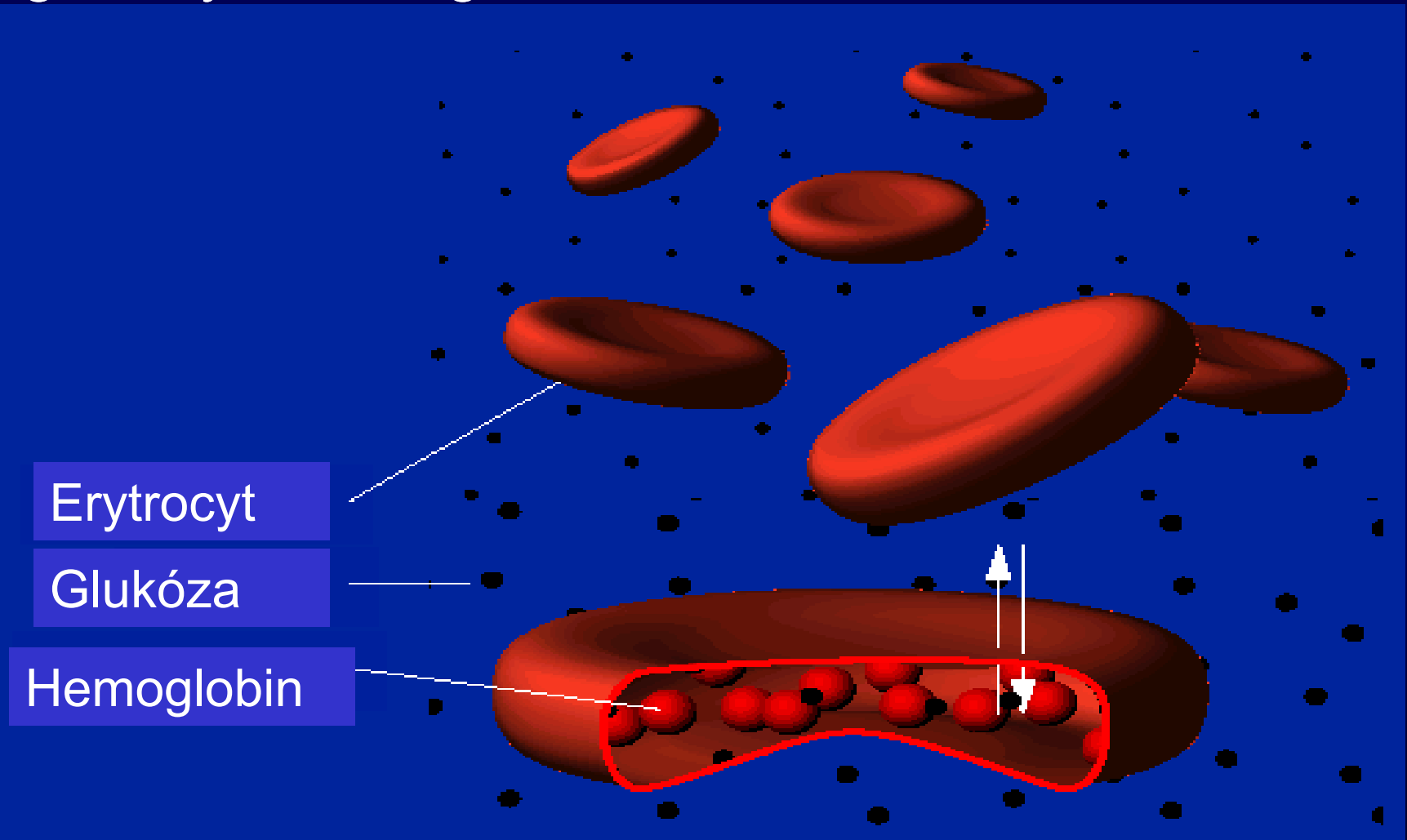
- chemická vazba sacharidů na N-koncové aminokyseliny proteinů (neenzymová reakce)
- in vivo- vznikají glykované (modifikované) proteiny se závažnými patobiochemickými důsledky
- in vitro- hnědnutí proteinů v přítomnosti sacharidů

Faktory ovlivňující neenzymovou glykaci proteinů

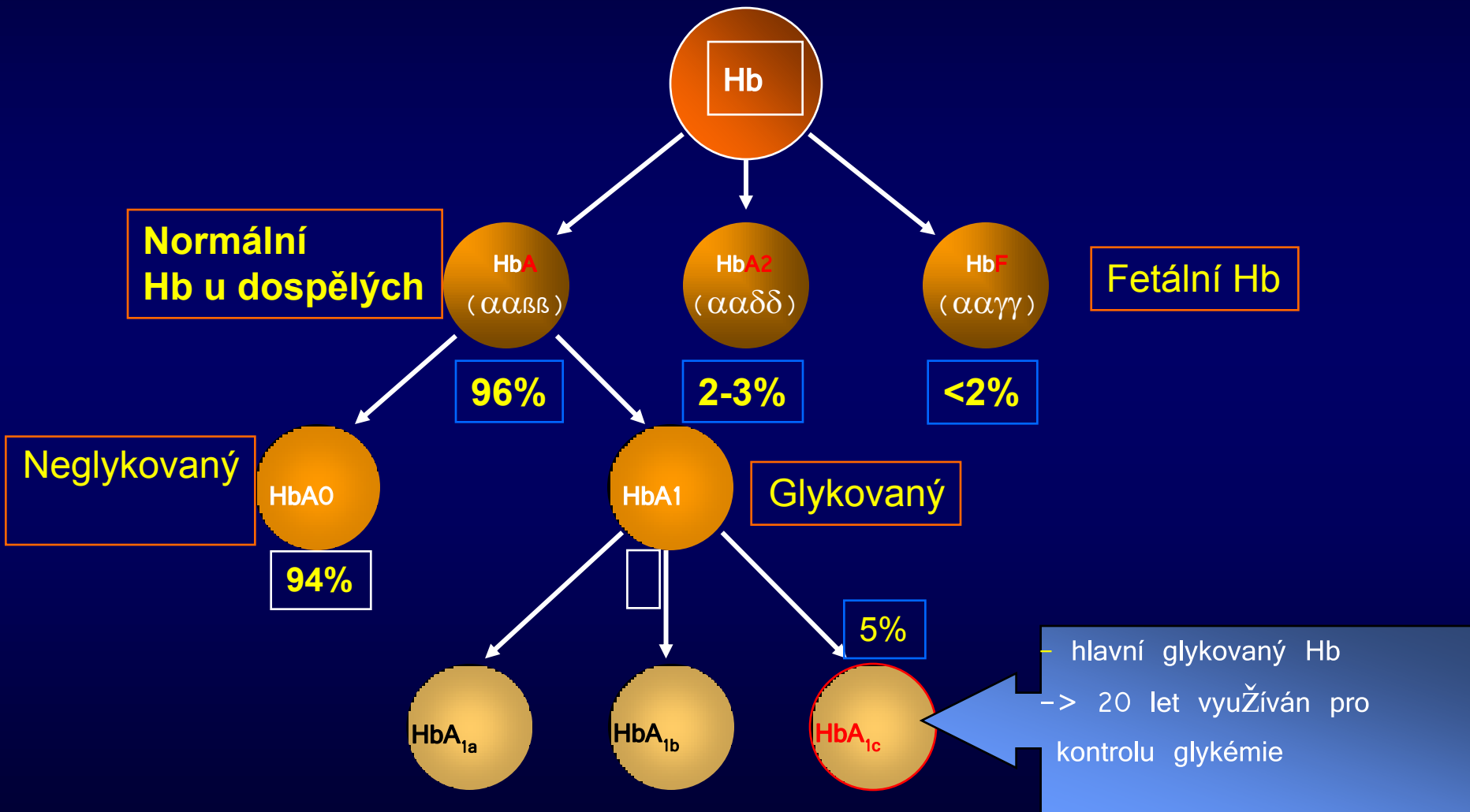
- koncentrace sacharidů a proteinů a jejich kolísání
(koncentrace proteinů v krvi relativně konstantní, rychlost glykace je úměrná koncentraci sacharidů)
- doba expozice
- biologický poločas daného proteinu
- teplota

Glykovaný hemoglobin

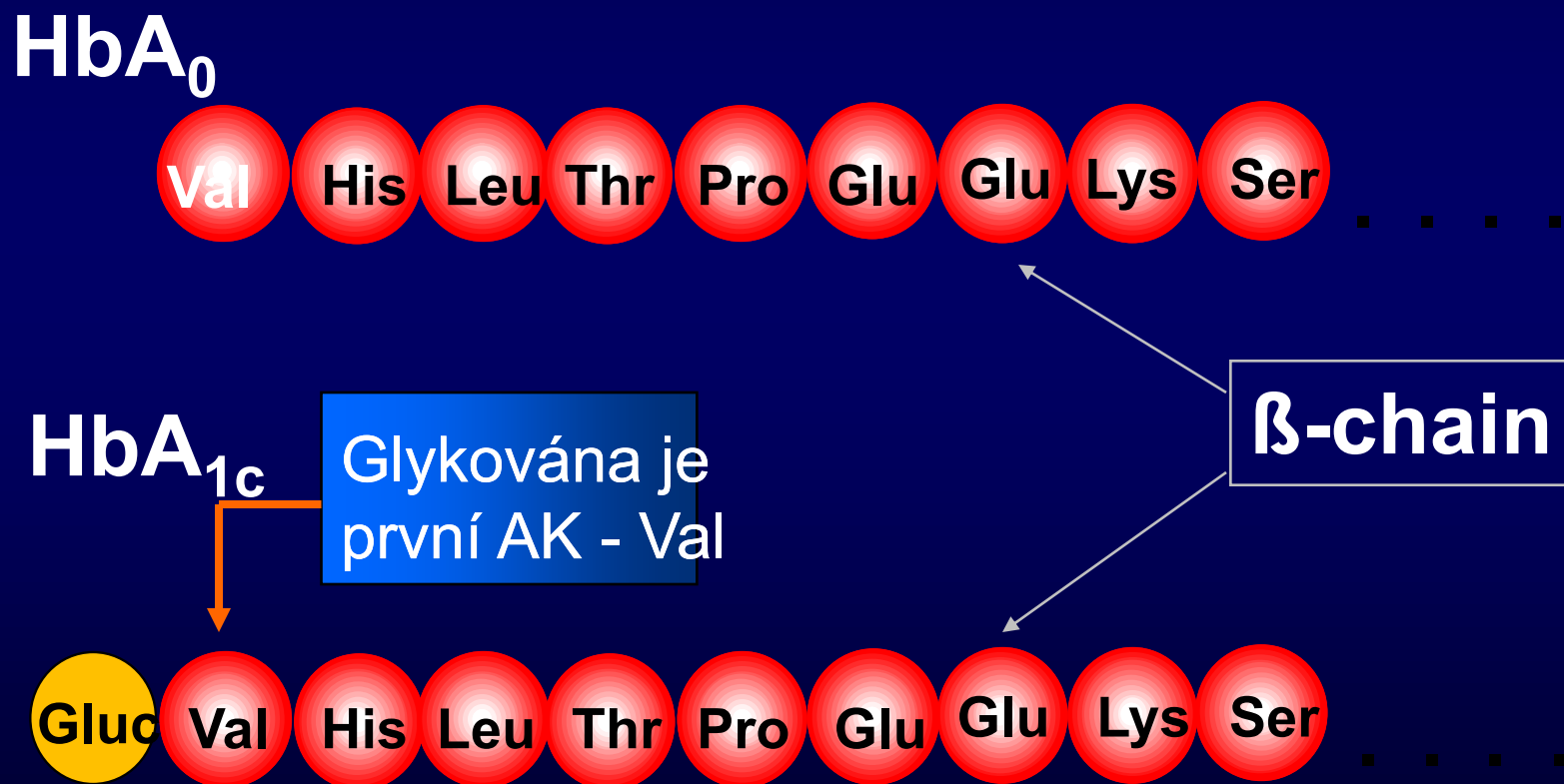
Vzniká glykací- neenzymovým navázáním
glukózy k hemoglobinu



Hemoglobiny



HbA_{1c} vzniká glykací na N-konci β -řetězce hemoglobinu



Jednotky měření (vyjadřování výsledků)

% (např. 4,5%)

mmol/mol (např. 45 mmolHbA1c/mol Hb)

Odběr a analyzovaný materiál

- Krev (B) - odběr do EDTA

Stabilita:	2d	(+20 až +25°C)
	1t	(+4 až +8°C)
	1r	(<-20°C lépe při -80°C)

Referenční meze

B-HbA1c

2,8-4,0 %

Kompenzace diabetu	IFCC,2004	do 2004
Výborná	< 4,5 %	< 6,5 %
Uspokojivá	4,5 - 6,0 %	6,5 - 7,5 %
Neuspokojivá	> 6,0 %	> 7,5%

Metody stanovení

1. Referenční metody IFCC, 2002

Izolace a **hemolýza** erytrocytů (+ odstranění labilních pre-HbA1c)

Enzymové **štěpení hemoglobinu** (endoproteináza Glu-C)

Analytické měření (**detekce glykovaných hexapeptidů**)

a) HPLC/ESI /MS

b) HPLC/CE

c) RM DCCT

(Diabetes Control and Complication Trial, USA, v programu **NGSP**=The National Glycohemoglobin Standardization Program)

CRM: IRMM 466
IRMM 467
(směs čistých HbA0 a HbA1c)

Přesnost měření a nejistota

Opakovatelnost $CV=1,05\%$

Reprodukovatelnost $CV=1,8\%$

Kombinovaná standardní nejistota primárních
kalibrátorů $0,63\%$

TMU (teoretická): 4%

2. Doporučené metody:

a) Chromatografické

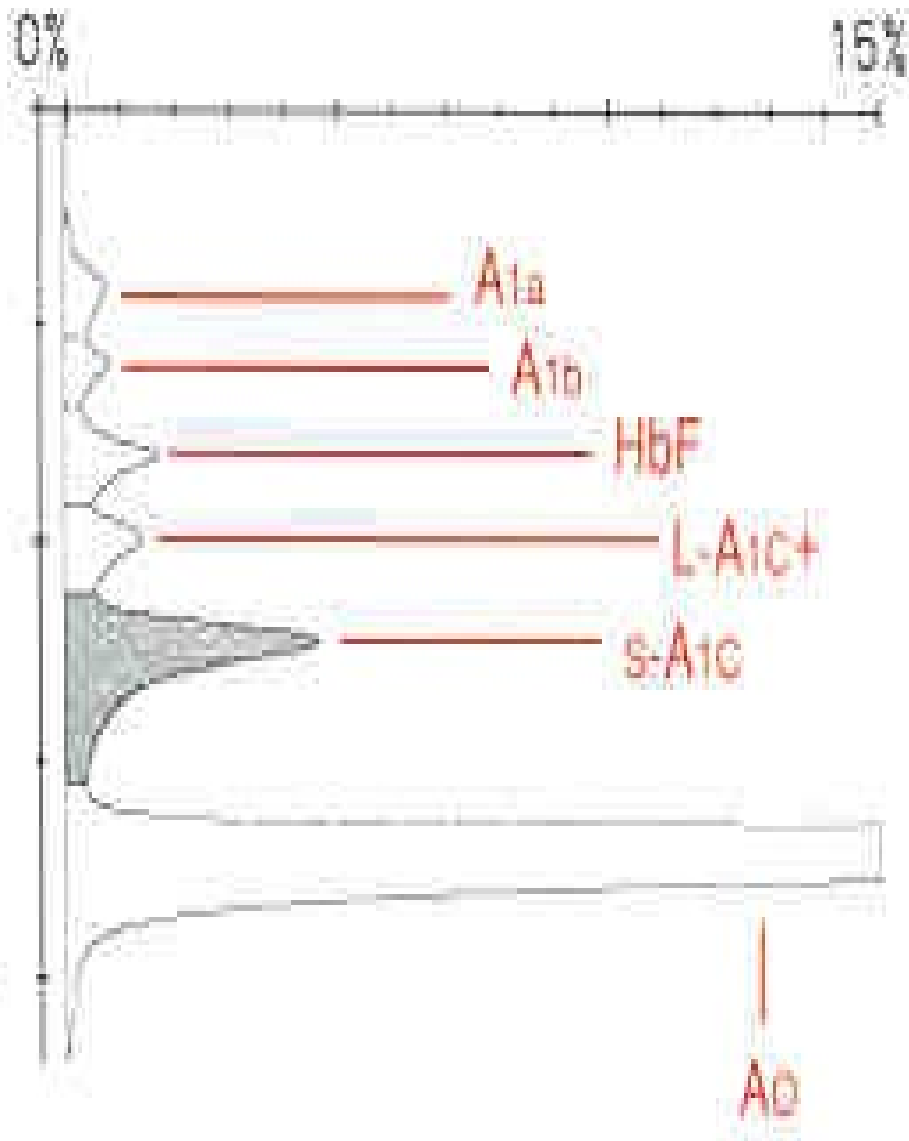
- ❖ HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)
- ❖ LC (nízkotlaká kapalinová chromatografie)

Afinitní chromatografie (aminofenylboronátová)

IEC (kapalinová chromatografie s výměnou iontů)

HPLC Tosoh



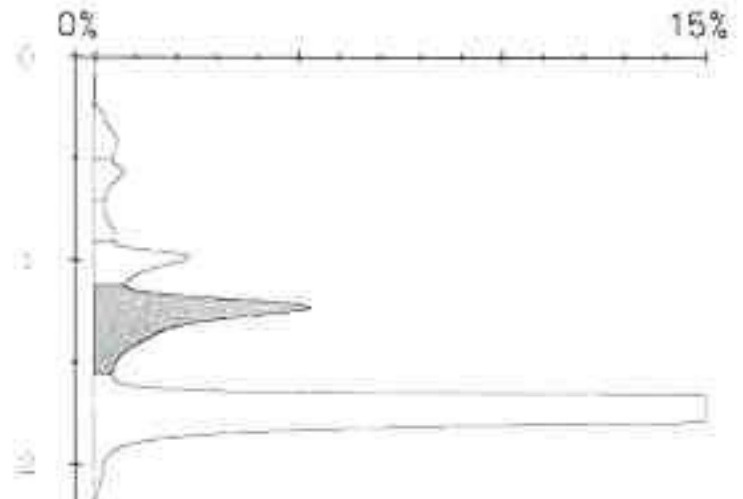


***** GLYCOHEMOGLOBIN REPORT *****

NO. 404 01D20 1998/04/04 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 2266.24
 SA1C 5.4 TOTAL A1 6.5



b) Elektroforetické

ELFO (elektroforéza)

IEF (izoelektrická fokusace)

CE a HPCE (kapilární elektroforéza)

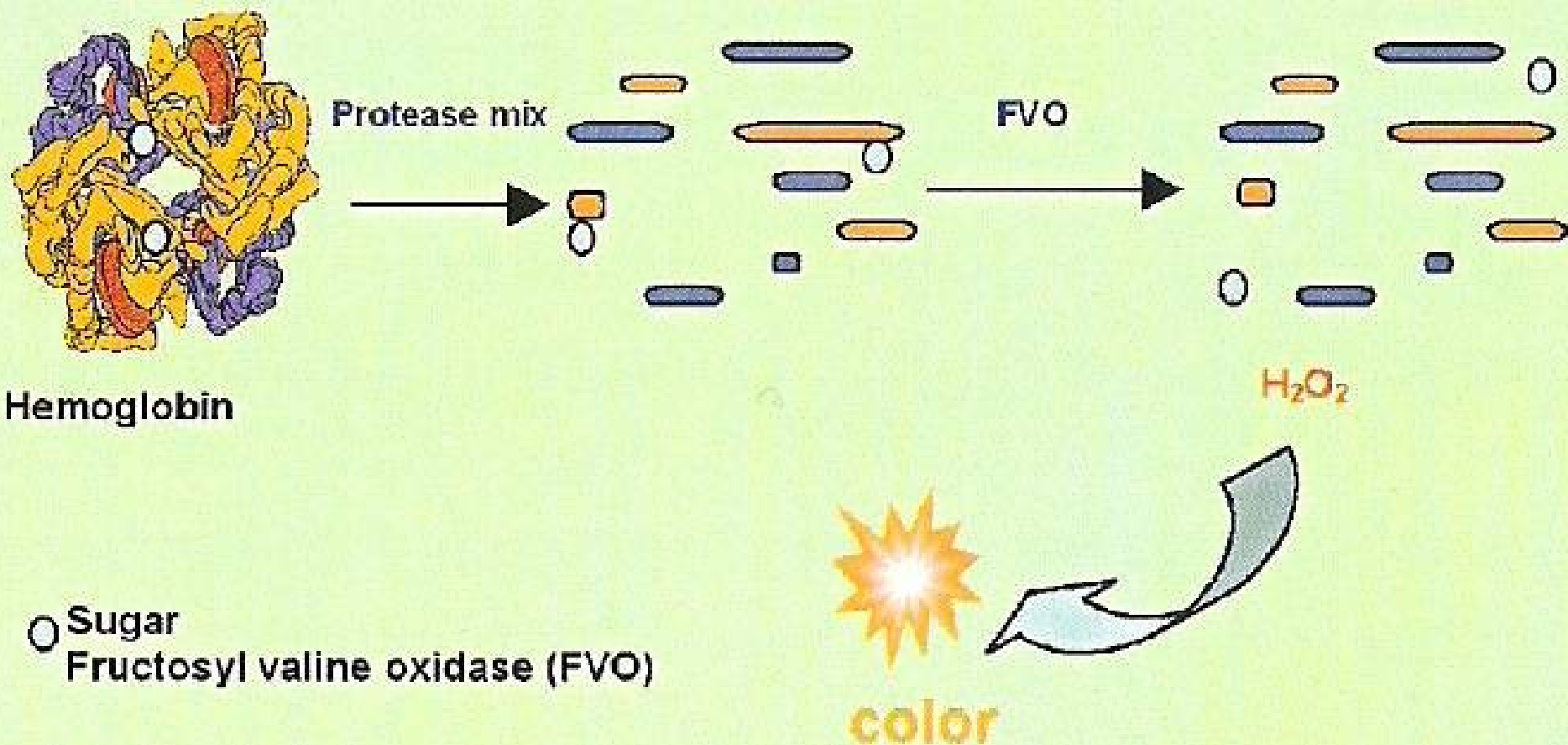
c) Imunoanalytické

IT (imunoturbidimetrie)

TINIA (Turbidimetric Inhibition Immunoassay)
(Imunoinhibiční turbidimetrie)

IN (imunonefelometrie)

Enzymové stanovení HbA1c



Albumin v moči - mikroalbuminurie

- průkaz časně detekce diabetické nefropatie
- diagnostický závěr učinit na podkladě tří opakovaných měření

- Materiál:
 - sbíraná moč za 24h
 - časovaný sběr (za 4h nebo přes noc)
 - náhodný vzorek (nejlépe druhá ranní moč)
- Skladování: 1 týden při +4°C
6 měsíců při -80°C

Vzorek	Fyziologická albuminurie	Mikroalbuminurie	Proteinurie
Sběr moči (24h)	< 30 mg/d	30- 299 mg/d	> 300 mg/d
Náhodný vzorek	< 2,8 mg/mmol kreatininu	2,8-22,8 mg/mmol kreatininu	>22,8 mg/mmol kreatininu
Časovaný vzorek	< 20 µg/min	20-199 µg/min	> 200 µg/min

C-peptid (connecting peptid)

- Nástroj sledování stavu diabetu
- Koncentrace v krvi je mírou endogenní sekrece inzulínu

(v inj. podaném inzulínu není C-peptid přítomen)

PROINZULIN

A- řetězce

B-řetězce

INZULIN

C-peptid

50-75%
vychytáváno játry

jen 5%
vychytáváno játry

V krvi je poměr inzulínu a C-peptidu 1:5

Referenční rozmezí:

S-C-peptid

0,78-1,89 µg/l

Ukazatelé autoimunity a dg.DM

- ICA (Islet Cell Antibodies, protilátky cytoplasmu T-lymfocytů)
- IAA (Insulin Autoantibodies, protilátky proti inzulinu)
- Anti-GAD 65A (Anti Glutamic Acid Decarboxylase, protilátky proti dekarboxyláze kyseliny glutamové)
- IA-2A, IA-2 β A (Insulinoma Associated Antigens)