

Inventarisatie van de (pre)analytische aspecten van de glucosebepaling in Nederlandse laboratoria: tijd voor uniformiteit

S.A.A. van den BERG, M. H. M. THELEN en K.J.M. BOONEN

Juiste en onderling vergelijkbare resultaten van de bloedglucoseconcentratie vereisen goed gecontroleerde pre-analytische condities. Zo zal bij een te lange tijd tussen bloedafname en analyse de glucoseconcentratie in vitro dalen als gevolg van voortdurende glycolyse. Om dit te voorkomen worden buizen gebruikt met glycolyseremmers. De meest gebruikte remmer (natriumfluoride) is echter pas na enkele uren werkzaam. Om in vitro glycolyse zo veel mogelijk te beperken bieden richtlijnen drie alternatieven waarbij ofwel: bloed onmiddellijk na afname wordt gekoeld, ofwel directe scheiding van cellen en plasma plaats vindt, ofwel een snel werkende glycolyse remmer wordt gebruikt. Om meer inzicht te krijgen in de toepassing van deze methoden is een enquête verspreid onder hoofden van klinisch chemische laboratoria in Nederland. Er blijken grote verschillen te bestaan tussen laboratoria met betrekking tot de pre-analyse, waarbij opvallend is dat veel laboratoria geen maatregelen treffen om direct de glycolyse te remmen.

Het aantal Nederlanders met diabetes mellitus is tussen 2000 en 2011 met ruim de helft gestegen. Uit de laatste getallen van het Nationaal Kompas Volksgezondheid blijkt dat ons land meer dan 830.000 diabeten kent, en dat bij tenminste 200.000 diabeten de diagnose nog niet is gesteld.

De diagnose diabetes wordt in Nederland gesteld op basis van (herhaalde) nuchter glucosemetingen, al dan niet aangevuld met een orale glucosetolerantie test (OGTT). Richtlijnen maken daarbij gebruik van harde afkapwaarden. Zo houdt de NHG richtlijn 'Diabetes mellitus type 2' aan dat de diagnose diabetes mellitus mag worden gesteld bij 1) 2 nuchtere plasmaglucozewaarden $\geq 7,0$ mmol/l op 2 verschillende dagen of 2) een nuchtere glucozewaarde $\geq 7,0$ mmol/l of willekeurige plasmaglucozewaarde $\geq 11,1$ mmol/l in combinatie met klachten passend bij hyperglykemie.

Om een diagnose te stellen is het dus van belang dat de laboratorium bepaling van glucose wordt uitgevoerd in geschikt materiaal, dat op de juiste manier behandeld is. De meest bekende pre-analytische variabele waarmee rekening moet worden gehouden is het voortduren van de glycolyse na bloedafname.

Het is bekend dat indien er geen maatregelen worden

getroffen om de in vitro afbraak van glucose te stoppen, de plasma glucoseconcentratie snel zal dalen en dus vals verlaagd wordt gerapporteerd. De daling kan oplopen tot 0,6 mmol/l per uur, en is onder andere afhankelijk van het gekozen buistype, tijd en de combinatie daarvan (1), temperatuur (2, 3) en het aantal leukocyten (4, 5). Een recente gemeenschappelijke richtlijn van National Academy of Clinical Biochemistry (NACB), de American Association for Clinical Chemistry (AACC) samen met de American Diabetes Association (ADA) heeft, om een juiste rapportage van de glucoseconcentratie/waarden spiegel te borgen, naast het direct centrifugeren van het materiaal, een tweetal mogelijke pre-analyse protocollen vastgesteld als gelijkwaardig (6). Door gelijktijdige publicatie in internationaal goed gelezen tijdschriften voor diabetes en klinische chemie (6, 7) hebben de opstellers geprobeerd hun aanbevelingen bij een zo breed mogelijke doelgroep te laten doordringen.

De eerste mogelijkheid betreft het plaatsen van de afname buis in een water/ijsmengsel, direct na afname van het materiaal. Het plasma wordt daarna binnen 30 minuten gescheiden van de cellen. Als dit niet mogelijk is, dan kan een glycolyse remmer worden toegevoegd (6). De meest bekende remmer is de enolase remmer natrium fluoride (NaF). Echter, NaF is pas optimaal werkzaam na enkele uren. Dit betekent dat indien geen directe remmer wordt toegevoegd, de glucoseconcentratie gedurende de eerste uren zal dalen (1).

Afname materiaal waarin andere glycolyse remmers zijn toegevoegd dan NaF zijn (nog) geen algemeen gebruik. Daarnaast is er geen direct overzicht van de gebruikte protocollen met betrekking tot de glucosebepaling in de diverse laboratoria in Nederland. Om hier inzicht in te krijgen hebben wij een enquête gestuurd naar de hoofden van een groot aantal klinisch chemische laboratoria in Nederland.

Resultaten

Afnamemateriaal

De meeste deelnemende laboratoria (n=25) maken gebruik van BD als leverancier van afname materiaal voor glucosebepalingen (n=24, figuur 1A). Slechts 1 laboratorium in onze inventarisatie maakt gebruik van materiaal van Greiner. Daarbij worden vooral de heparine buis (n=8) en NaF-oxalaat/NaF-EDTA buis gebruikt (n=22, figuur 1B). Geen van de laboratoria

Amphia ziekenhuis, Breda

E-mail: svandenbergh@amphia.nl

in onze steekproef gebruikt Sarsted of Terumo materiaal. Soms worden zowel heparine als NaF-oxalaat/NaF-EDTA buizen gebruikt, waarbij de keuze per afname ingegeven wordt door de aanwezigheid van een externe afname post. Hierbij geldt dat bloed dat op een externe locatie in NaF buizen wordt afgenomen.

Turn-around-time en pre-analyse

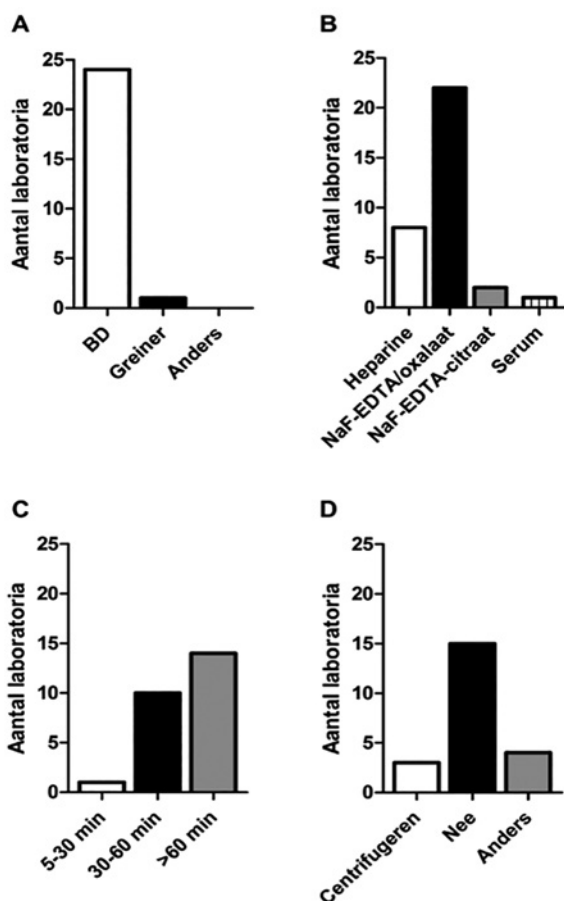
Slechts 1 laboratorium had een turn-around-time (TAT) korter dan 30 minuten. Dit laboratorium gebruikte heparine buizen (figuur 1C).

Bij een middellange turn-around-time (TAT) (tussen 30 en 60 minuten, n=10), wordt vaak geen gebruik gemaakt van directe glycolyse inhibitie (figuur 1D). Geen van de 10 laboratoria met een TAT tussen 30 en 60 minuten maakt gebruik van ijs, in 1 laboratorium wordt de buis direct na afname gecentrifugeerd, in 1 laboratorium worden wel de heparine maar niet NaF buizen direct afgedraaid. Daarnaast wordt in 1 laboratorium gebruik gemaakt van directe glycolyse inhibitie door aanzuring (citraat). In 8 laboratoria wordt niet routinematig glycolyse inhibitie toegepast. Echter, in een aantal laboratoria is mogelijk sprake van direct centrifugeren, maar wordt onderscheid gemaakt

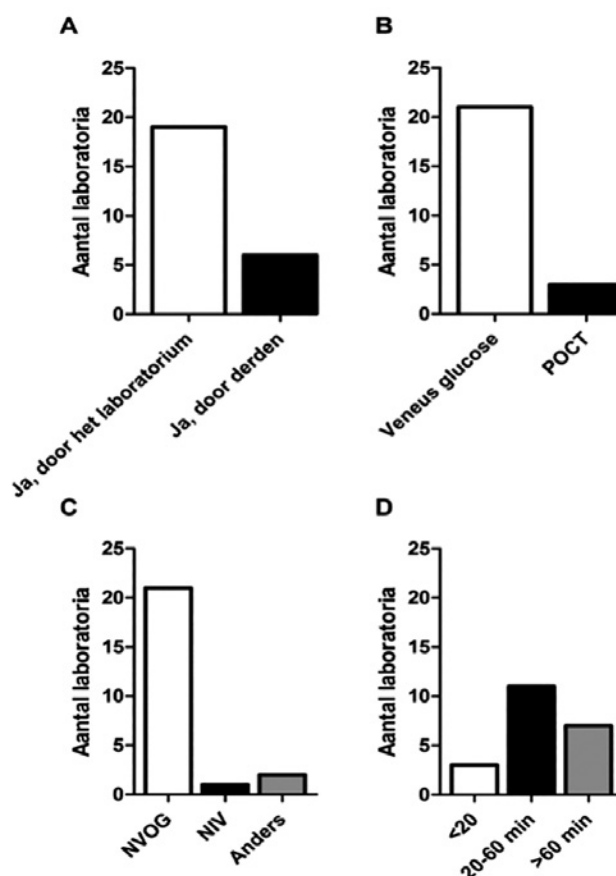
tussen materiaal dat afkomstig is van een buitenpost (wel afgedraaid) en materiaal dat in huis wordt afgenomen (niet afgedraaid). Van deze laboratoria is dus niet duidelijk of er sprake is van een lange TAT zonder maatregelen om glycolyse te inhiberen.

Bovenstaande betekent dat in de meerderheid van de laboratoria waarbij de TAT tussen de 30 en 60 minuten varieert, geen andere maatregelen worden getroffen om in vitro glycolyse tegen te gaan anders dan het toevoegen van de langzame enolase remmer NaF.

De routine TAT in de deelnemende laboratoria is vaak langer dan een uur (n=14). Geen van de laboratoria maakt gebruik van ijs om het afgenomen materiaal te koelen na de afname. Slechts 1 laboratorium maakt gebruik van afnamemateriaal waarin een directe glycolyse remmer aanwezig is (citraat). Daarnaast wordt in 2 laboratoria een protocol aangehouden waarbij het afgenomen materiaal direct na afname wordt gecentrifugeerd (figuur 1D), 1 laboratorium houdt een maximale tijd tot centrifugeren aan van 30 minuten en 1 laboratorium houdt een maximum tijd tot centrifugeren aan van 5 uur. Hierbij dient wederom opgemerkt te worden dat er in een aantal laboratoria mogelijk wel sprake is van centrifugeren, maar dat er onderscheid



Figuur 1. Uitkomsten van de enquête per vraag. A) Van welke leverancier betrekt u buizen voor glucosebepalingen binnen uw centrum? B) Welk anticoagulans wordt gebruikt voor glucosebepalingen? C) Met betrekking tot de bepaling van veneus glucose, wat is de geschatte niet-CITO tijd tot analyse? D) Stelt u nog voorwaarden aan de pre-analyse voor glucosebepalingen, anders dan buistype en/of turn-around-time? Resultaat in absolute aantallen.



Figuur 2. Uitkomsten van de enquête per vraag. A) Worden OGTT uitgevoerd in uw centrum, en indien ja; worden deze uitgevoerd door het laboratorium? B) Wordt de OGTT uitgevoerd op basis van veneuze glucosebepalingen of point-of-care analyse? C) Welke richtlijn wordt aangehouden voor de diagnostiek van zwangerschapsdiabetes? D) Met betrekking tot de bepaling van glucose tijdens een OGTT, wat is de geschatte gemiddelde tijd van afname tot analyse? Resultaten in absolute aantallen.

wordt gemaakt tussen materiaal dat afkomstig is van een buitenpost en materiaal dat in huis wordt afgenomen. In 7 van de 14 laboratoria met een TAT langer dan 60 minuten wordt zeker geen van de aanbevolen maatregelen getroffen om direct in vitro glycolyse tegen te gaan.

Glucosetolerantie testen

In alle deelnemende centra worden OGTT uitgevoerd, al dan niet door derden (zelf, n=19; derden, n=6, figuur 2A). In de meeste centra wordt de OGTT uitgevoerd op basis van glucose bepaald in veneus bloed (n=21), terwijl 3 laboratoria kiezen voor een point of care (POC) oplossing (figuur 2B), van 1 laboratorium werd geen informatie ontvangen. Beslissingscriteria zijn in de overgrote meerderheid van de centra gebaseerd op de NVOG richtlijn 'Diabetes mellitus en zwangerschap – 2010' (n=21, figuur 2C). Opvallend is dat in 6 laboratoria een kortere TAT wordt opgegeven indien een glucoseconcentratie wordt gemeten in de context van een OGTT dan wanneer deze wordt bepaald in de context van een andere (poli)klinische afname (figuur 2D). Daarnaast geeft 1 laboratorium aan dat materiaal afgenomen wordt in NaF buizen indien het een OGTT betreft, maar in heparine indien dit niet het geval is.

Discussie

Uit voorgaande resultaten blijkt dat er tussen Nederlandse laboratoria veel overeenkomsten zijn, voornamelijk in de keuze van buistype en leverancier. Echter, er is grote variatie in andere (pre)analytische aspecten rondom de glucosebepaling. Grote verschillen worden gevonden in de TAT en de manier waarop bij een lange TAT geborgd wordt dat de glucoseconcentratie stabiel blijft.

De keuze van leverancier voor buizen voor de glucosebepaling is opvallend, aangezien BD geen buis in het assortiment heeft waaraan een snel werkende glycolyse remmer is toegevoegd.

De meeste laboratoria gebruiken de glycolyse remmer NaF als agens om in vitro glycolyse te inhiberen. Hoewel NaF uitstekend werkt om de lange termijn stabiliteit van de glucoseconcentratie te borgen, heeft het geen effect op de initiële daling (1). Het wordt dan ook aangeraden daarnaast een glycolyse remmer te gebruiken die direct de glycolyse remt, zoals citraat (6).

Greiner heeft recent een dergelijke buis in het assortiment opgenomen (eind 2013), de Glucomedics buis. Er moet wel rekening mee worden gehouden dat deze buis een vloeibaar additief bevat, waardoor het cruciaal is dat de verhouding tussen het additief en bloed correct is. Het is bekend dat de vulling van dergelijke buizen aan variatie onderhevig is en dat ongeveer 1% van het totaal aantal buizen onvoldoende of juist te veel gevuld is (8, 9). Belangrijk om te realiseren is dat bij een vulniveau van 95% de gerapporteerde glucoseconcentratie 0,6 mmol/l en bij een vulniveau van 90% 1,3 mmol/l afwijkt bij een werkelijke concentratie van 11 mmol/l. Dit wordt veroorzaakt door de veranderde mengverhouding en dus incorrecte post-hoc correctie. Omdat de mate van verdunning erg afhankelijk is van de volledigheid van vulling bij afname, terwijl de

absolute waarde van de glucoseconcentratie in de context van diabetes een cruciale rol speelt, vraagt een dergelijke buis een dusdanig zorgvuldige werkwijze met betrekking tot de volledigheid van vulling, dat deze in ieder geval als niet praktisch beschouwd kan worden. Op dit moment heeft alleen Terumo een 'droge' citraat buis in het assortiment (Glycaemia - VF-052SFC), wat een uitkomst biedt om de glycolyse direct te remmen zonder het afgenomen bloed te verdunnen. Op dit moment wordt deze buis nog niet gebruikt in de onder-vraagde laboratoria.

Gegeven de lange TAT in een groot deel van de laboratoria, gekoppeld aan het feit dat er geen directe glycolyse inhibitie wordt toegepast, is het mogelijk dat vaak glucoseconcentraties te laag worden gerapporteerd. Dit betekent dat bij een geringe verhoging van de nuchtere waarde (gestoord nuchtere glucose) of een licht verstoorde glucosetolerantie een onterecht normale uitslag kan worden gevonden. Beide kunnen echter, indien onbehandeld, resulteren in de ontwikkeling van diabetes en/of cardiovasculaire aandoeningen (10, 11). Opvallend is ook het feit dat een aantal laboratoria (16%) een ander, vaak strikter, pre-analytische protocol aanhoudt indien de glucosebepaling wordt uitgevoerd in het kader van een OGTT. Het gaat daarbij voornamelijk om een kortere TAT en het gebruik van NaF buizen in plaats van heparine buizen.

In drie laboratoria wordt POC analyse uitgevoerd in het kader van de OGTT. Hoewel de totale TAT bij POC uiteraard vele malen sneller is dan bij een veneus gebaseerd protocol, staat de toepasbaarheid van POC testen in de context van het stellen van de diagnose diabetes nog steeds ter discussie. Hierbij splitst de discussie zich voornamelijk toe op de grote imprecisie in de glucosemeting bij POC analyzers. Binnen deze discussie zijn voor en tegenstanders te vinden voor het gebruik van POC apparatuur (12-14).

Het is echter belangrijker om te realiseren dat er grote verschillen in de dynamiek van glucoseveranderingen in het veneuze en interstitiële compartiment bestaan. De glucoseconcentratie in het interstitiële compartiment is namelijk significant hoger dan dat in het veneuze compartiment na glucosebelasting (15, 16). Dit kan resulteren in een foutief positieve diagnose wanneer de patiënt een veneus glucose rond het afkappunt heeft. Naar onze mening is er dan ook geen plaats voor POC analyse tijdens de OGTT.

Conclusie

Hoewel er vele overeenkomsten zijn in de leverancier van de buizen en het gekozen buistype, is er grote variatie in de pre-analyse van glucose tussen laboratoria. De verschillen betreffen voornamelijk de turn-around-time en de maatregelen die worden getroffen om glycolyse te remmen in de cruciale eerste uren na afname. Opvallend is dat de aanbevolen methoden om een juiste glucosemeting te borgen niet altijd opgevolgd worden en dat er in een aantal laboratoria separate protocollen worden aangehouden voor afnamen in het kader van diagnostiek (OGTT) en monitoring, waarbij niet alleen tijd en buistype variëren maar ook de meetmethode. Dit resulteert er in dat laboratoria vaak

gebruik maken van een protocol dat mogelijk resulteert in vals lage glucosewaarden en dus een verkeerde diabetesdiagnose.

In onze ogen vragen de uitkomsten van de inventarisatie om nadere studie. In een prospectieve studie (CCMO studie NL46462.015.13, optimalisatie van de (pre)analyse van zwangerschapsdiabetes), willen we twee vragen beantwoorden. Ten eerste willen we onderzoeken in welke mate de in Nederland gebruikelijke (en in theorie onvoldoende) glycolyse inhibitie tot verschillende uitkomsten leidt ten opzichte van de in de richtlijn aanbevolen werkwijzen. Daarnaast wordt zo duidelijk of de in de richtlijn aanbevolen werkwijzen inderdaad onderling gelijkwaardig zijn. De uitkomsten van die analyse zullen door ons en andere laboratoria gebruikt kunnen worden in de prospectieve risico-analyse van de GTT en random glucosemeting ten behoeve van diabetesdiagnostiek en andere toepassingen van glucoseconcentratie. Zo lang wij of anderen niet hebben kunnen aantonen dat het volgen van de aanbevelingen van AACC en ADA uit 2011 met betrekking tot de pre-analyse van de glucosebepaling niet nodig is, bevelen we alle laboratoria aan om bij de pre-analyse van glucose een keuze te maken tussen één van de in de aanbevelingen genoemde opties.

Literatuur

1. Chan AY, Swaminathan R, Cockram CS. Effectiveness of sodium fluoride as a preservative of glucose in blood. *Clin Chem.* 1989; 35: 315-317.
2. Beitland S, Opdahl H, Aspelin T, Torjesen PA, Lyberg T. Reduction of glucose and insulin concentrations during in vitro incubation of human whole blood at different temperatures. *Journal of Diabetes Research and Clinical Metabolism* 2013 2: 11
3. Meites S, Bohman N. In vitro stabilization of blood glucose with water. *Clin Chem.* 1963; 102: 594-599.
4. Ybarra J, Isern J. Leukocytosis-induced artifactual hypoglycemia. *Endocrine J.* 2003; 50: 481-482.
5. Weismann M, Kein B. Evaluation of glucose determinations in untreated serum samples. *Clin Chem.* 1958; 4: 420-422.
6. Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, Bruns DE, Horvath AR, Kirkman MS, et al. Position statement executive summary: guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2011; 34: 1419-1423.
7. Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, Bruns DE, Horvath AR, Kirkman MS, et al. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of Diabetes Mellitus. *Clin Chem.* 2011; 57: e1-e47.
8. Romero A, Munoz M, Ramos JR, Campos A, Ramirez G. Identification of preanalytical mistakes in the stat section of the clinical laboratory. *Clin Chem Lab Med.* 2005; 43: 974-975.
9. Salvagno GL, Lippi G, Bassi A, Poli G, Guidi GC. Prevalence and type of pre-analytical problems for inpatients samples in coagulation laboratory. *J Eval Clin Pract.* 2008; 14: 351-353.
10. de Vegt F, Dekker JM, Jager A, Hienkens E, Kostense PJ, Stehouwer CD, et al. Relation of impaired fasting and post-load glucose with incident type 2 diabetes in a Dutch population: The Hoorn Study. *JAMA.* 2001; 285: 2109-2113.
11. Janssen PG, Gorter KJ, Stolk RP, Akarsubasi M, Rutten GE. Three years follow-up of screen-detected diabetic and non-diabetic subjects: who is better off? The ADDITION Netherlands study. *BMC Fam Pract.* 2008; 9: 67.
12. Cengiz E, Tamborlane WV. A tale of two compartments: interstitial versus blood glucose monitoring. *Diabetes Technol Ther.* 2009; 11 Suppl 1: S11-S16.
13. Haecel R, Raber R, Wosniok W. Prevalence-dependent decision limits for the early detection of type 2 diabetes mellitus in venous blood, venous plasma and capillary blood during glucose challenge. *Clin Chem Lab Med.* 2006; 44: 1462-1471.
14. Rush E, Crook N, Simmons D. Point-of-care testing as a tool for screening for diabetes and pre-diabetes. *Diabet Med.* 2008; 25: 1070-1075.
15. Kuwa K, Nakayama T, Hoshino T, Tominaga M. Relationships of glucose concentrations in capillary whole blood, venous whole blood and venous plasma. *Clin Chim Acta.* 2001; 307: 187-192.
16. Stavrianos C, Anastasiou E. Oral glucose tolerance test evaluation with forearm and fingertip glucose measurements in pregnant women. *Diabetes Care.* 2004; 27: 627-628.

Summary

Van den Berg SAA, Thelen MHM, Boonen KJM. Inventarisatie of the (pre)analytical aspects of the glucose determination in Dutch laboratories: time for harmonization. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk. 2015; 40: 69-72

Well controlled pre-analytical variables are essential to ensure a correct glucose measurement. Due to ongoing glycolysis, glucose levels are known to drop in vitro. To prevent this, glycolysis inhibitors are added to the tube. The most commonly used inhibitor (sodium fluoride), however, is not an immediate inhibitor, and it takes several hours to achieve the maximum effect. To inhibit glycolysis during the initial phase, guidelines recommend to choose between three alternatives: immediate cooling of the material, immediate separation of cells and plasma, or the use of direct glycolysis inhibitors. To gain insight in the protocols used in Dutch clinical laboratories, a survey was sent out to all heads of laboratories. Surprisingly, large differences exist between laboratories concerning specimen handling and, even more surprisingly, most of the laboratories used no direct glycolysis inhibition at all.