

Raccomandazioni per l'ottimizzazione della fase pre-analitica per una corretta determinazione della glicemia in ambito diabetologico

Correct determination of glycemia in the management of diabetes: recommendations for the optimization of the pre-analytical phase

Graziella Bonetti¹ · Mariarosa Carta² · Annunziata Lapolla³ · Roberto Miccoli⁴ · Roberto Testa⁵  · Andrea Mosca⁶

Ricevuto: 7 giugno 2018 / Accettato: 30 luglio 2018 / Pubblicato online: 24 agosto 2018
© Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio 2018

Riassunto La diminuzione del glucosio nelle provette è tempo-dipendente dopo il prelievo e può causare artificialmente bassi valori di glicemia se la glicolisi non è appropriatamente inibita dall'uso corretto dell'anticoagulante. In questo lavoro abbiamo fatto una accurata revisione della letteratura sul possibile uso del citrato assieme al sodio EDTA e al sodio fluoruro. Noi concludiamo che, per lo screening e la diagnosi del diabete mellito, incluso il diabete gestazionale, il glucosio dovrebbe essere determinato nel plasma usando la sopra menzionata miscela sia allo stato solido che allo stato liquido (in questo caso deve essere applicato il corretto fattore di conversione numerico). Per la misura del glucosio

in pazienti con diabete già diagnosticato per il monitoraggio in follow up, provette con litio eparina possono essere usate ma la separazione del plasma deve essere rapidamente condotta. In alternativa possono essere usate provette per siero con acceleratore della coagulazione e gel separatore.

Parole chiave Glucosio · Diabete · Fase pre analitica

Summary *The time-dependent decrease of glucose in tubes after venipuncture may cause artificially lower values, if glycolysis is not appropriately inhibited by the correct anticoagulant. In this work we have extensively reviewed the current literature about the possible use of citrate buffer together with sodium EDTA and sodium fluoride. We conclude that, for screening and diagnosis of diabetes mellitus, including gestational diabetes, glucose has to be determined in plasma by using the above mentioned ternary mixture either as solid than in liquid state (in this case the correct numerical conversion factor has to be employed). For the measurement of glucose in patients with already known diabetes and following monitoring, lithium heparin tubes may be used providing that plasma separation should be rapidly performed. Alternatively, serum-separating tubes with particles promoting rapid clotting could also be employed.*

Keywords Glucose · Diabetes · Pre-analytical phase

La misura della glicemia a digiuno o dopo carico orale di glucosio è uno dei punti chiave della diagnosi di diabete e/o di alterata regolazione glicemica e riveste, inoltre, un ruolo fondamentale anche nel monitoraggio del paziente diabetico [1, 2]. Una glicemia accurata rappresenta anche uno dei

(In qualità di delegati SIBioC (Società Italiana di Biochimica Clinica), SIPMeL (Società Italiana di Patologia Clinica e di Medicina di Laboratorio) e SID (Società Italiana di Diabetologia)) e per il GdS SIBioC-SIPMeL Diabete mellito.

Questo articolo è pubblicato simultaneamente in La Rivista Italiana della Medicina di Laboratorio e in Biochimica Clinica.

✉ R. Testa
r.testa@inrca.it

- ¹ UOC Laboratorio Centrale Analisi Chimico-Cliniche, ASST-Spedali Civili, Brescia, Italia
- ² Laboratorio di Chimica Clinica ed Ematologia, Ospedale San Bortolo, Vicenza, Italia
- ³ Dipartimento di Medicina, Università degli Studi di Padova, Padova, Italia
- ⁴ Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Sezione Diabetologia e Malattie Metaboliche, Università di Pisa, Pisa, Italia
- ⁵ Laboratorio di analisi chimico-cliniche e molecolari, Istituto Nazionale di Ricovero e Cura per gli Anziani INRCA-IRCCS, Ancona, Italia
- ⁶ Dipartimento di Fisiopatologia medico-chirurgica e dei Trapianti, Università degli Studi di Milano, Milano, Italia

parametri della classificazione del paziente (insieme ai marker di autoimmunità e al peptide C), oltre che della gestione clinica insieme alla misurazione dell'HbA_{1c}.

La fase pre-analitica può essere però causa di numerosi problemi. Il prelievo per la glicemia deve essere eseguito alla mattina [3] dopo un digiuno di 8–12 ore [4]. Il soggetto non deve presentare infezioni, febbre o aver subito recenti ospedalizzazioni se il prelievo viene eseguito per screening. L'assunzione di alcol e caffè deve essere evitata, così come il fumo di sigaretta, lo stress e gli sforzi fisici eccessivi [5] nei momenti che precedono il prelievo ematico.

Di fondamentale importanza è comunque la scelta dell'anticoagulante e del tipo di campione da analizzare. Esistono infatti significative differenze nei risultati ottenuti su campioni diversi (sangue intero, plasma, sangue capillare, siero). Le principali Società scientifiche e organismi professionali raccomandano di eseguire il dosaggio della glicemia su plasma; la provetta andrebbe però posizionata in un bagno di acqua e ghiaccio fondente e centrifugata entro 30 minuti, oppure centrifugata immediatamente dopo il prelievo, e il plasma separato dalla parte corpuscolata [6]. Questi accorgimenti sono necessari per bloccare la glicolisi che procede *in vitro* dopo il prelievo di sangue e che determina una diminuzione della glicemia pari al 6–7% l'ora.

Tuttavia, spesso l'organizzazione dei Laboratori non consente una rapida centrifugazione dei campioni. È allora necessario ricorrere all'utilizzo di anticoagulanti in grado di inibire gli enzimi della glicolisi. Tra i più utilizzati ancora oggi a questo scopo vi è il fluoruro di sodio (NaF), che però inibisce un enzima situato nella parte distale della glicolisi, l'enolasi. Gli enzimi posizionati nella parte iniziale della via glicolitica restano attivi, la fosforilazione dei glucidi continua finché l'adenosin trifosfato (ATP) non si esaurisce e questo causa un consumo del glucosio. Quindi, anche in presenza di NaF, il blocco della glicolisi non avviene nelle prime 2 ore dalla raccolta del campione, come dimostrato da numerosi studi. Infatti, la concentrazione del glucosio diminuisce gradualmente e la sua stabilizzazione si ha solo dopo 90–120 minuti dal prelievo [7].

È stato quindi proposto l'utilizzo di provette contenenti tampone citrato: l'acidificazione del campione blocca istantaneamente l'esochinasi e la fosfofruttochinasi, enzimi che agiscono precocemente nella via glicolitica [8]. Anche se viene riportato un lieve decremento della glicemia dopo 24 ore [9], è stato descritto in recenti studi come tale inibizione possa durare fino a 96 h a temperatura ambiente [10].

L'utilizzo di provette contenenti acido citrico e fluoruro di sodio (per garantire comunque un'inibizione a lungo termine) è stato raccomandato dalla *National Academy of Clinical Biochemistry* (NACB) nel 2011 in tutti quei casi in cui non può essere assicurata una pronta centrifugazione del campione [6], mentre l'utilizzo delle provette contenenti solo sodio fluoruro viene scoraggiato in quanto garantisce solo

un'inibizione tardiva della glicolisi. La miscela acidificata, contenente tampone citrato, NaF e Na₂EDTA, raccomandata dalla NACB, era presente in forma liofila in provette già validate in numerosi studi [8–11], ma ora non più disponibili in commercio. Tale miscela è presente in forma liquida in altre provette che hanno mostrato inibire in maniera efficace e pronta la glicolisi [12]. Tuttavia è necessario che le provette vengano riempite correttamente e si utilizzi un opportuno fattore di conversione indicato dal produttore per correggere l'effetto di diluizione.

Recentemente è stata proposta una nuova provetta contenente tampone citrato e sodio fluoruro in forma liofila. La provetta con miscela ternaria acidificata è dedicata al dosaggio della glicemia. Questa provetta ha dimostrato un'efficacia analoga alla precedente provetta, ora non più disponibile, nello stabilizzare la glicemia fino a 48 ore [13]. Il suo utilizzo è stato validato anche nell'esecuzione della curva da carico orale di glucosio (OGTT) nello screening del diabete gestazionale [14], confrontandole con le provette contenenti NaF-ossalato utilizzate nello studio "*Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes* (HAPO)", studio che è servito per stabilire i *cut-off* decisionali per la diagnosi di diabete gestazionale [15].

In seguito a una revisione sistematica della letteratura [16], il *Working Group* sulla Fase Pre-analitica della *European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (EFLM) ha di recente indicato come l'impiego delle provette con miscela acidificata rappresenti un'unica opportunità e un considerevole passo avanti verso il raggiungimento di determinazioni più accurate e attendibili della glicemia.

Sintesi delle raccomandazioni

Per lo screening e la diagnosi del diabete mellito, compreso il diabete gestazionale:

1. il soggetto deve essere a digiuno da almeno 8 ore e non oltre le 12 ore. Non deve aver presentato di recente febbre, infezioni acute o aver subito recenti traumi o interventi chirurgici;
2. la determinazione della glicemia deve essere eseguita su plasma con metodo enzimatico;
3. deve essere ottenuto un efficace blocco della glicolisi mediante l'impiego di uno dei seguenti metodi:
 - a. posizionando la provetta in acqua con ghiaccio fondente e centrifugandola entro 30 minuti,
 - b. centrifugando immediatamente la provetta e separando il plasma dalla parte corpuscolata,
 - c. impiegando, qualora i procedimenti e i tempi di cui sopra non possano essere rispettati, un anticoagulante in grado di svolgere una rapida e duratura inibizione

della glicolisi (NaF, tampone citrato, EDTA), presente in forma liofila oppure in forma liquida (in tal caso sarà applicato un opportuno fattore di conversione¹);

4. Nelle condizioni di cui sopra la glicemia è stabile per 48 ore a temperatura ambiente, 24 ore a 37 °C e per 3 giorni a 4–6 °C.

Per la misurazione della glicemia ai fini del monitoraggio del controllo glicemico nel paziente con diabete noto si possono continuare a utilizzare provette con LiHep con rapida centrifugazione e analisi o siero con acceleratore della coagulazione e gel separatore.

Conflitti di interesse Nessuno.

Studi condotti su esseri umani e animali Non applicabile.

Bibliografia

1. American Diabetes Association (2017) Classification and diagnosis of diabetes. Sec 2. In: Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care* 40(Suppl 1):S11–S24
2. Standard Italiani per la cura del diabete mellito (2018). <http://aemmedi.it/wp-content/uploads/2009/06/AMD-Standard-unico1.pdf> (Accesso 30 luglio 2018)
3. Troisi RJ, Cowie CC, Harris MI (2000) Diurnal variation in fasting plasma glucose: implications for diagnosis of diabetes in patients examined in the afternoon. *JAMA* 284:3157–3159
4. Statland BE, Winkel P (1981) Response of clinical chemistry quantity values to selected physical, dietary, and smoking activities. *Prog Clin Pathol* 8:25–44
5. Guder WG, Narayanan S, Wisser H et al (2009) *Diagnostic Samples: from the patient to the laboratory. the impact of preanalytical variables on the quality of laboratory results*, 4th edn. Wiley-Blackwell, New York
6. Sacks DB, Arnold M, Bakris GL et al (2011) Guidelines and recommendation for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 34:e61–e99
7. Gambino R (2013) Sodium fluoride: an ineffective inhibitor of glycolysis. *Ann Clin Biochem* 50:3–5
8. Gambino R, Piscitelli J, Ackattupathil TA et al (2009) Acidification of blood is superior to sodium fluoride alone as an inhibitor of glycolysis. *Clin Chem* 55:1019–1021
9. Fobker M (2014) Stability of glucose in plasma with different anticoagulants. *Clin Chem Lab Med* 52:1057–1060
10. Winter T, Greiser A, Nauck M et al (2016) Long-term stability of glucose: 96-h study using Terumo Glycaemia tubes. *Clin Chem Lab Med* 54:407–410
11. Bonetti G, Carta M, Montagnana M et al (2016) Effectiveness of citrate buffer-fluoride mixture in Terumo tubes as an inhibitor of in vitro glycolysis. *Biochem Med (Zagreb)* 26:68–76
12. Bonetti G, Cancelli V, Coccoli G et al (2016) Which sample tube should be used for routine glucose determination? *Prim Care Diabetes* 10:227–232
13. Bonetti G, Carta M (2017) The new Greiner FC-Mix Tubes equal the old Terumo ones and are useful as glucose stabilizer after prolonged storage of samples. *Biochem Med (Zagreb)* <https://doi.org/10.11613/BM.2017.030901>
14. van der Hagen EAE, Fokkert MJ, Kleefman AMD et al (2017) Technical and clinical validation of the Greiner FC-Mix glycaemia tube. *Clin Chem Lab Med* 55:1530–1536
15. Metzger BE, Lowe LP, Dyer AR et al (2008) Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. *N Engl J Med* 358:1991–2002
16. Lippi G, Nybo M, Cadamuro J et al (2018) Blood glucose determination: effect of tube additives. *Adv Clin Chem* 84:101–123

¹Il fattore di correzione indicato sulle provette dall'azienda che produce la miscela ternaria in forma liquida è 1,16.