

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

Graziella Bonetti¹, Mariarosa Carta², Annunziata Lapolla³, Roberto Miccoli⁴, Roberto Testa⁵, Andrea Mosca⁶ in qualità di delegati SIBioC, Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio (SIPMeL) e Società Italiana di Diabetologia (SID) e per il Gruppo di Studio SIBioC-SIPMeL Diabete Mellito

¹Laboratorio Centrale Analisi Chimico-Cliniche, Azienda Sanitaria Socio Territoriale - Spedali Civili, Brescia

²Laboratorio di Chimica Clinica ed Ematologia, Ospedale San Bortolo, Vicenza

³Dipartimento di Medicina, Università degli Studi, Padova

⁴Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Sezione Diabetologia e Malattie Metaboliche, Università degli Studi, Pisa

⁵Laboratorio analisi chimico-cliniche e molecolari, Istituto Nazionale di Ricovero e Cura per gli Anziani (INRCA), Ancona

⁶Dipartimento di Fisiopatologia medico-chirurgica e dei Trapianti, Università degli Studi, Milano

ABSTRACT

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

PREMESSA

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 parametri della classificazione del paziente (insieme ai marcatori di autoimmunità e al peptide C), oltre che della gestione clinica insieme alla misurazione della 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 alcool 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 ed organismi professionali raccomandano di eseguire la misura 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 ed 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% all'ora.

*Questo articolo è pubblicato simultaneamente da *Biochimica Clinica* e dalla *Rivista di Medicina di Laboratorio*.

Corrispondenza a: Andrea Mosca, Dipartimento di Fisiopatologia medico-chirurgica e dei trapianti, Università degli Studi di Milano, Via Fratelli Cervi 93, 20090 Segrate (MI). E-mail andrea.mosca@unimi.it

Ricevuto: 23.05.2018

Accettato: 04.06.2018

Pubblicato on-line: 14.06.2018

DOI: 10.19186/BC_2018.037

Tuttavia spesso l'organizzazione dei laboratori non consente una rapida centrifugazione dei campioni. E' necessario allora 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 due 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).

E' 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 ore a temperatura ambiente (10).

L'utilizzo di provette contenenti acido citrico e NaF (per garantire comunque una 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 NaF viene scoraggiato in quanto garantisce solo una 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 che 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, NaF ed EDTA. La provetta con miscela ternaria acidificata è dedicata alla determinazione della glicemia. Questa provetta ha dimostrato una 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 valori decisionali per la diagnosi di diabete gestazionale (15).

In seguito ad una revisione sistematica della letteratura (16), il Working Group sulla Fase Pre-analitica di EFLM ha di recente indicato come l'impiego delle provette con miscela acidificata rappresenti un'unica opportunità ed un considerevole passo avanti verso il raggiungimento di determinazioni più accurate ed 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, oppure
 - b. centrifugando immediatamente la provetta e separando il plasma dalla parte corpuscolata, oppure
 - 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 conversione^a).
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 misura della glicemia ai fini del monitoraggio del controllo glicemico nel paziente con diabete noto si possono continuare ad utilizzare provette con litio-eparina con rapida centrifugazione e analisi o siero con acceleratore della coagulazione e gel separatore.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2017;10:S11-24.
2. Standard Italiani per la cura del diabete mellito 2016. www.standarditaliani.it (ultimo accesso: giugno 2018)
3. Troisi RJ, Cowie CC, Harris MI. Diurnal variation in fasting plasma glucose. *JAMA* 2000;284:3157-9.
4. Statland BE, Winkel P. Response of clinical chemistry quantity values to selected physical, dietary, and smoking activities. *Prog Clin Pathol* 1981;8:25-44.

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

5. Guder WG, Narayanan S, Wisser H, et al. Samples: from the patient to the laboratory. The impact of preanalytical variables on the quality of laboratory results. 4th ed. Weinheim: Wiley-Blackwell, 2009:6-14.
6. Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, et al. Guidelines and recommendation for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2011;34:e61-9.
7. Gambino R. Sodium fluoride: an ineffective inhibitor of glycolysis. *Ann Clin Biochem* 2013;50:3-5.
8. Gambino R, Piscitelli J, Ackattupathil TA, et al. Acidification of blood is superior to sodium fluoride alone as an inhibitor of glycolysis. *Clin Chem* 2009;55:1019-21.
9. Fobker M. Stability of glucose in plasma with different anticoagulants. *Clin Chem Lab Med* 2014;52:1057-60.
10. Winter T, Greiser A, Nauck M, et al. Long-term stability of glucose: 96-h study using Terumo Glycaemia tubes. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:407-10.
11. Bonetti G, Carta M, Montagnana M, et al. Effectiveness of citrate buffer-fluoride mixture in Terumo tubes as an inhibitor of in vitro glycolysis. *Biochem Med* 2016;26:68-76.
12. Bonetti G, Cancelli V, Coccoli G, et al. Which sample tube should be used for routine glucose determination? *Prim Care Diabetes* 2016;10:227-32.
13. Bonetti G, Carta M. The new Greiner FC-Mix Tubes equal the old Terumo ones and are useful as glucose stabilizer after prolonged storage of samples. *Biochem Med* 2017;27:584-9.
14. van der Hagen EAE, Fokkert MJ, Kleefman AMD, et al. Technical and clinical validation of the Greiner FC-Mix glycaemia tube. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:1530-6.
15. HAPO Study Cooperative Research Group. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. *N Engl J Med* 2008;358:1991-2002.
16. Lippi G, Nybo M, Cadamuro J, et al. Blood glucose determination: effect of tube additives. *Adv Clin Chem* 2018;84:101-23.