

Impatto delle variabili preanalitiche e analitiche sulla diagnosi di diabete melito gestazionale

Mariarosa Carta¹, Davide Giavarina¹, Graziella Bonetti²

¹Medicina di Laboratorio, Ospedale S. Bortolo, AULSS 8 Berica, Vicenza

²Laboratorio di Patologia Clinica, A.S.S.T. Valcamonica

Caro Editore,

le Linee Guida per la gravidanza fisiologica (1) raccomandano l'esecuzione dello screening per il diabete gestazionale secondo le indicazioni del documento di consensus internazionale degli esperti dell' International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups (IADPSG) (2).

Tali raccomandazioni sono basate sullo studio Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) (3) che ha evidenziato una relazione lineare tra i livelli di glicemia registrati a digiuno e dopo 1 e 2 ore dal carico orale con 75 grammi di glucosio e l'aumento della frequenza degli esiti primari e secondari avversi.

Per la diagnosi di diabete melito gestazionale è sufficiente un solo valore che eguagli o ecceda il valore soglia indicato poiché è stato dimostrato che ognuno dei tre campioni contribuisce in maniera indipendente alla predizione degli eventi avversi neonatali (4).

È evidente che uno screening così progettato richiede una elevata qualità degli esami di laboratorio, in questo caso della determinazione del glucosio, che deve presentare variabilità analitiche e preanalitiche minime. Per quanto riguarda la fase preanalitica una grande importanza riveste l'impatto della glicolisi *in vitro* (5), che può provocare una diminuzione della concentrazione di glucosio pari a 5-7%/ora; per questo motivo l'American Diabetes Association (ADA) raccomanda il blocco della glicolisi tramite la centrifugazione immediata e separazione del plasma dalla parte corpuscolata, oppure l'immersione della provetta in ghiaccio fondente e la separazione del plasma entro 30 minuti dal prelievo, oppure ancora l'utilizzo di una provetta contenente un inibitore immediato della glicolisi [fluoruro di sodio (NaF), e tampone citrato] (6).

Nell'HAPO Study la glicolisi è stata inibita posizionando immediatamente le provette in un bagno di ghiaccio fondente e centrifugandole nel più breve tempo possibile (7). Tuttavia, quando lo screening viene trasferito nella realtà dei laboratori clinici distribuiti in tutto il mondo, difficilmente è possibile garantire condizioni pre-analitiche così controllate ma soprattutto così standardizzate.

Una recente indagine condotta sul web (8) evidenzia ad esempio la situazione spagnola, dove ben il 37% dei laboratori utilizza sistemi POCT per la misura della glicemia delle curve da carico e solo un 19% dei laboratori utilizza provette con inibitori della glicolisi, nella quasi totalità si tratta del solo NaF. L'utilizzo di provette con NaF è molto diffuso anche nei laboratori italiani anche se è ben noto che il fluoruro di sodio agisce su un enzima posto a valle della cascata glicolitica e quindi la glicolisi viene bloccata non prima di 90 minuti (9).

L'implementazione, consigliata dalle linee guida, di provette contenenti oltre al NaF anche tampone citrato, in grado di bloccare in maniera rapida la glicolisi, è avvenuta, per il momento, solo in pochi laboratori italiani. È evidente che l'impatto clinico legato all'utilizzo di tali provette sarà quello di aumentare il numero di casi diagnosticati, come evidenziato in alcuni studi preliminari (10, 11,12).

Nel laboratorio di Vicenza, tali provette sono state introdotte per l'esecuzione delle curve da carico sia negli adulti che nelle donne in gravidanza, agli inizi del 2019. Abbiamo quindi confrontato i risultati dello screening eseguito nelle donne in gravidanza nel 2018, quando venivano utilizzate provette con solo NaF (Vacutest Kima, Arzegrade Padova, Italia), con quello eseguito nel 2019 utilizzando provette contenenti NaF e tampone citrato (FC-Mix, Greiner BioOne, Cassina de Pecchi, Milano, Italia). Nel 2018 abbiamo diagnosticato 274 casi di diabete gestazionale su 2058 pazienti (13,3%), mentre nel 2019 325 casi su 1876 pazienti (17,3%) ($p < 0,0001$, test Chi quadrato). Considerando la positività dello screening per i singoli punti, si può notare che mentre nel 2018 i pazienti con una glicemia a digiuno

Corrispondenza a: Mariarosa Carta, Medicina di Laboratorio, Ospedale S. Bortolo, AULSS 8 Berica, Vicenza, Tel 0444752486, E-mail mariarosa.cart@aulss8.veneto.it

Ricevuto: 10.02.2020

Revisionato: 27.02.2020

Accettato: 03.03.2020

Pubblicato on-line: 15.04.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.028

superiore a 91 mg/dL erano il 7,7%, nel 2019 sono stati 12,1% ($p < 0,0001$), mentre le positività per gli altri due valori soglia relativi ai prelievi dopo 60 e 120 minuti dal carico orale di glucosio risultano pressochè sovrapponibili dopo 60 minuti (8,4% *versus* 8,3%, $p = 0,95$) e con una differenza comunque non significativa dopo 120 minuti (5,8% *versus* 7,3%, $p = 0,06$).

Questo riscontro era prevedibile perché l'effetto di blocco della glicolisi è evidente soprattutto nei prelievi basali, probabilmente per un effetto metabolico di saturazione di glucosio che avviene subito dopo l'assunzione del carico orale di glucosio (13). Il problema preanalitico legato al mancato blocco della glicolisi interessa proprio il primo punto dello screening che peraltro è quello che nella nostra casistica, così come nell'HAPO Study determina il maggior numero di diagnosi di diabete mellito gestazionale (14).

Il primo punto dello screening è anche quello che richiede un più stretto controllo della variabilità. Infatti, se si analizza la curva della distribuzione di frequenza della glicemia basale a digiuno, si nota che il valore soglia di 92 mg/dL cade in una zona della curva dove piccole oscillazioni potrebbero far cambiare categoria a numerose pazienti, mentre invece analizzando le distribuzioni di frequenza delle glicemie dopo 60 e 120 minuti dal carico orale di glucosio, i valori soglia si trovano in una zona più piatta della curva, dove eventuali variazioni del dato hanno ripercussioni meno importanti dal punto di vista quantitativo (Figura 1).

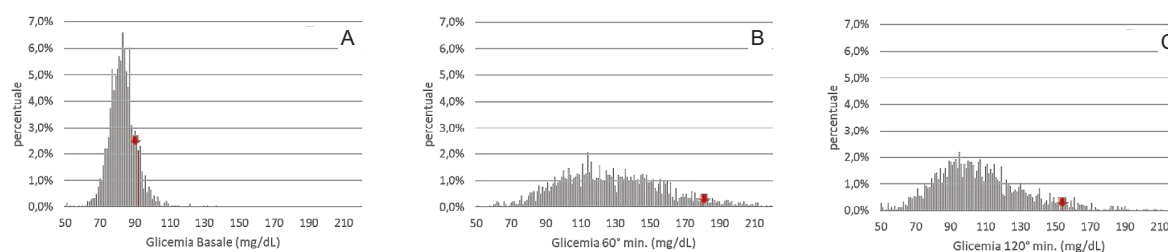


Figura 1

A: Curva di distribuzione della glicemia basale

B: Curva di distribuzione della glicemia dopo 60' dall'assunzione di carico orale di glucosio

C: Curva di distribuzione della glicemia dopo 120' dall'assunzione di carico orale di glucosio

L'incertezza della misura ha, in altri termini, una maggior rilevanza se il valore si trova in una curva di distribuzione molto stretta, come quella relativa alla distribuzione della glicemie del punto basale, mentre è meno impattante quando le concentrazioni hanno una distribuzione di frequenza più ampia e il valore cade ai margini della distribuzione, come avviene per la distribuzione delle glicemie dopo 60 e 120 minuti (Figure 1B e 1C). Ad esempio, nella popolazione studiata, una variabilità del dato legata solo all'imprecisione e ipoteticamente ottimale, secondo le specifiche di qualità richieste, ($\pm 2,2\%$) (14), potrebbe comportare una perdita di diagnosi pari al 4,2% (82 donne con glicemia basale compresa tra 92 e 93 mg/dL) oppure una sovra-diagnosi del 5,4% (100 donne con glicemia basale compresa tra 90 e 91 mg/dL). Considerazioni analoghe possono essere fatte per l'influenza del bias analitico, teoricamente azzerato nell'HAPO Study, dal momento che le determinazioni erano centralizzate.

Ad esempio, confrontando i risultati della VEQ (Randox International Quality Assessment Scheme RIQAS), le prestazioni del nostro laboratorio, relativamente alla misura della glicemia, risultavano in linea con quelle di altri utilizzatori dello stesso metodo e strumento (106,95 mg/dL *versus* 107,00 mg/dL). Tuttavia, confrontando questo valore con la media ottenuta con altri metodi sempre basati sull'esochinasi (109,8 mg/dL) i risultati ottenuti nel nostro laboratorio risultavano più bassi con un bias pari circa al 3%, che arrivava al 4% considerando le glicemie misurate con metodi diversi dall'esochinasi (glucosio deidrogenasi, chimica secca.). L'impatto di tale bias, pur soddisfacendo alle specifiche di qualità, non è trascurabile da un punto di vista clinico: se ad esempio, nella popolazione studiata si fosse utilizzato un metodo basato sempre su esochinasi ma implementato su diverso analizzatore, con caratteristiche analitiche precise ed assolutamente in linea con le VEQ, (corrispondente esattamente al valore medio ottenuto tra tutti i metodi esochinasi), il numero di casi diagnosticati di diabete mellito gestazionale sarebbe del 26,2% (+8,9%). Imprecisione e inesattezza producono quindi un possibile errore totale estremamente significativo, ed è evidente quindi che uno screening basato su un valore soglia netto come quello suggerito dagli esperti della IASDGP può determinare diverse incidenze di diabete gestazionale nella popolazione studiata, anche garantendo le specifiche di qualità suggerite per la glicemia.

Le variabili analitiche possono e devono essere controllate e limitate ma non possono essere azzerate. Resta comunque imperativo cercare la maggior standardizzazione possibile dei dati e quindi risulta necessario agire dove possibile, ovvero garantendo un blocco completo della glicolisi, variabile che altrimenti incide sul valore della glicemia con un decremento quantitativamente molto significativo (6-7%) (15).

È evidente che questo porterà ad un incremento del numero di casi di diabete mellito gestazionale, ma garantirà una maggior standardizzazione e confrontabilità dei dati tra laboratori diversi e soprattutto renderà le glicemie

confrontabili con i valori soglia definiti dall'HAPO Study. Tuttavia, le considerazioni sull'importanza della variabilità analitica e sul loro impatto sullo screening del diabete mellito gestazionale devono essere tenute in considerazione dai clinici nel considerare i valori ottenuti con la curva da carico dalle loro pazienti.

Anche se la diagnosi di diabete mellito gestazionale comporta, almeno nella prima fase, solo l'adozione di un migliore "stile di vita" con misure dietetiche e rivalutazione successiva, tuttavia per le considerazioni analitiche sopra esposte è importante sottolineare come i clinici debbano considerare con cautela valori di glicemia basale posizionati attorno al valore soglia di 92 mg/dL.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Linee guida per la gravidanza fisiologica. 2011 Update. Diagnosi del diabete gestazionale, vol 1, pp 169-173. http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_1436_allegato.pdf (ultimo accesso gennaio 2020).
2. International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Consensus Panel. International association of diabetes and pregnancy study groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. *Diabetes Care* 2010;33:676-82.
3. The HAPO Study Cooperative Research Group. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. *N Engl J Med* 2008;358:1991-2002.
4. Coustan DR, Lowe LP, Metzger BE, et al. The HAPO Study: paving the way for the new diagnostic criteria for GDM. *Am J Obstet Gynecol* 2010;202:654-60.
5. Daly N, Flynn I, Carroll C, et al. Impact of implementing preanalytical laboratory standards on the diagnosis of gestational diabetes mellitus: a prospective observational study. *Clin Chem* 2016;62:387-91.
6. American Diabetes Association. Standards of Medical Care. Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* 2019;42 (Suppl 1):S13-S28.
7. Gambino R, Bruns DE. Stabilization of glucose in blood samples: out with the old, in with the new. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:1883-5.
8. Garcia del Pino I, Bauca JM, Gomez C et al. Preanalytical issues related to routine and diagnostic glucose tests: results from a survey in Spain. *Biochem Med* 2020;30:1-8.
9. Chan A, Swaminathan R, Cockram C. Effectiveness of sodium fluoride as a preservative of glucose in blood. *Clin Chem* 1989;35:315-7.
10. Bonetti G, Giavarina D, Urbani D, et al. Il tipo di campione per la curva da carico orale di glucosio è fondamentale per una corretta identificazione del diabete mellito gestazionale. *Biochim Clin* 2020;44:143-8.
11. Song D, Lia M, Hurley JC. Recommended pre-analytical plasma glucose sampling methodology may distort gestational diabetes mellitus prevalence: implications for diagnostic thresholds. *Diabet Med* 2019;36:1226-33.
12. Daly N, Flynn I, Carroll C, et al. Comparison of citratefluoride-EDTA with fluoride-EDTA additives to stabilize plasma glucose measurements in women being screened during pregnancy with an oral glucose tolerance test: a prospective observational study. *Clin Chem* 2016;62:886-7.
13. Yoa RG, Rapin JR, Wiernsperger NF, et al. Demonstration of defective glucose uptake and storage in erythrocytes from non-insulin dependent diabetic patients and effect of metformin. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1993;20:563-7.
14. <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm> (ultimo accesso febbraio 2020).
15. Bonetti G, Carta M, Lapolla A et al. On behalf of the SiBioC-SiPMel working group on Diabetes. Correct determination of glycemia in the diagnosis and management of diabetes: recommendations for the optimization of the pre-analytical phase, *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2018 <https://doi.org/10.1016/J.numecd.2018.09.013>.