

# eAG : un anno di sperimentazione

Dott. Enrico Aprea, laboratorio di analisi cliniche BIOLABOR s.a.s., ASL Napoli 3 SUD

Direttore Tecnico Dott.sa Lucia Rossi

## RIASSUNTO

Il dosaggio della glicemia è uno degli esami "fondamentali" che fanno parte della comune pratica di laboratorio oramai da diversi decenni. Nel corso del tempo il controllo della glicemia si è arricchito del dosaggio dell'emoglobina glicosilata (HbA1c) e, in tempi relativamente recenti, della stima dell'eAG (glicemia media) grazie alla messa a punto di una formula matematica che estrapola il valore della glicemia media a partire da quello della HbA1c. Scopo dello studio è di valutare la correlazione dei due valori (glicemia a digiuno ed eAG) in un ampio campione di pazienti afferenti alla nostra struttura.

## INTRODUZIONE

Il dosaggio della glicemia è un test semplice ed economico, che ha un ruolo essenziale nel monitoraggio della concentrazione del glucosio ematico, dosaggio molto importante che risulta assolutamente essenziale nei pazienti diabetici, in quanto, come è ben noto, in questi ultimi risulta assolutamente indispensabile mantenere il livello glicemico entro limiti ben precisi.

E' altrettanto noto che il tasso glicemico oscilla considerevolmente nell'arco della giornata, con variazioni incrementali, come è ovvio, nell'immediato post-prandiale o legate all'azione combinata di più ormoni, come il "fenomeno alba" dovuto all'elevata produzione durante la notte dell'ormone della crescita e di cortisolo nelle prime ore del mattino, che causano un incremento nella produzione di glucosio da parte del fegato. Nel soggetto non diabetico questo effetto viene corretto da una maggiore produzione di insulina verso le ore 5.00 - 6.00 del mattino; naturalmente questo non succede nel soggetto diabetico che è chiamato ad un impegno in più per trovare il giusto equilibrio tra la dose serale di insulina e la glicemia del mattino.

Da molti anni per il monitoraggio della glicemia si è affiancato al dosaggio del glucosio uno strumento analitico molto potente rappresentato dal dosaggio ematico dell'emoglobina glicosilata (HbA1c).

Nel normale arco di vita (di circa 120 giorni) dei globuli rossi, le molecole di glucosio reagiscono con l'emoglobina formando appunto emoglobina glicosilata. In soggetti diabetici, che hanno scarso controllo della glicemia, la quantità della emoglobina glicosilata che si forma è molto più elevata che nei soggetti sani o nei soggetti diabetici con un buon controllo glicemico ottenuto dalla terapia. Un aumento di emoglobina glicosilata all'interno dei globuli rossi, pertanto, riflette il livello medio di glucosio al quale l'emazia è stata esposta durante il suo ciclo vitale. Il dosaggio della emoglobina glicosilata fornisce dunque valori indicativi dell'efficacia della terapia monitorando la regolazione a lungo termine del glucosio sierico e, per essere più precisi, va sottolineato che il livello di HbA1c è proporzionale alla concentrazione media del glucosio durante i due – tre mesi precedenti al suo dosaggio, anche se alcuni ricercatori affermano che il suo maggiore significato diagnostico sia da restringere ad un periodo di tempo relativamente più corto, da quattro a sei settimane.<sup>[1]</sup>

L'aumento di HbA1c nel paziente diabetico fu descritto per la prima volta nel 1969 da Samuel Rahbar e collaboratori<sup>[2]</sup>. La reazione che porta alla sua formazione fu caratterizzata da Bunn ed i suoi collaboratori

nel 1975.<sup>[3]</sup>, mentre l'uso dell'emoglobina A1c per il monitoraggio del metabolismo glucidico in pazienti diabetici fu proposto nel 1976 da Anthony Cerami, Ronald Koenig e collaboratori.<sup>[4]</sup>

Per completezza di informazione va però precisato che, sia pur in determinati casi, il dosaggio dell'emoglobina glicosilata, può subire delle interferenze : infatti livelli falsamente bassi di HBA1c si possono avere in caso di anemia o, peggio, in caso di forti emorragie; un falso sovradosaggio di HBA1c si ha invece in caso di grave carenza di ferro. Inoltre le emoglobinopatie (HbS, HbC, HbF e HbE) anche possono indurre interferenze, in senso positivo o negativo, sia in fase analitica, sia soprattutto in quella biologica essendo provocata dalla modifica della vita media eritrocitaria tipica di queste condizioni patologiche. Infatti qualunque stato che altera il turnover degli eritrociti interferisce sul dosaggio di HbA1c.

A parte dunque queste eccezioni che si registrano in un numero comunque basso di casi, il dosaggio di HBA1c è diventato di enorme importanza nel monitoraggio della glicemia e, in tempi più recenti, il suo legame con esso ha visto aumentare la sua significatività grazie alla messa a punto della formula che, a partite da HBA1c, consente di ricavare il valore della glicemia ad esso corrispondente (eAG : Estimated Average Glucose, studio presentato alla 68<sup>a</sup> Sessione Scientifica Annuale dell'Associazione Americana Diabete (ADA)).<sup>[5]</sup>

Fatta questa premessa, veniamo dunque ai fatti :

## **MATERIALI E METODI**

All'inizio del 2014 ci siamo riproposti di fare un dosaggio su larga scala della HBA1c in tutti i pazienti afferenti alla nostra struttura, comprendendo cioè nel test sia soggetti diabetici che non, sia persone giovani che più anziane, ed eseguendo per ciascun paziente nell'ordine : il dosaggio della glicemia, il dosaggio della HBA1c, il calcolo dell'eAG.

Il dosaggio del glucosio è stato effettuato su apparecchio automatico Dimension RxL Max della Siemens, impiegando il reattivo [INSERIRE IL NOME ESATTO] della Siemens, mentre il dosaggio della HBA1C è stato effettuato su apparecchio ichroma della Bodytech, mediante test per il dosaggio della HBA1c in immunofluorescenza. Il calcolo dell'eAG è stato effettuato impiegando la versione più aggiornata dell'equazione di conversione, secondo quanto pubblicato nello studio "Translating the A1C Assay Into Estimated Average Glucose Values"<sup>[5]</sup>

Abbiamo poi raccolto i dati sia in forma aggregata sia in forma disaggregata, distinguendo il campione in "toto" o per classi ( fasce di età, sesso, malattia diabetica, soggetti non diabetici), allo scopo di esaminare, sia in toto che per classi, la sovrapponibilità di glicemia ed eAG. I risultati ottenuti, pur nei limiti di un campionamento che, aumentando il numero di dati, darà nel tempo risultati sempre più precisi e significativi, offrono a nostro parere interessanti spunti di discussione.

## **RISULTATI**

Per cominciare una premessa : il campione, nel suo complesso, è costituito da circa 700 pazienti; su questo campione "grezzo" abbiamo però operato una scrematura per rendere i risultati più significativi. Il campione è stato così "raffinato" selezionando i pazienti sia su base anamnestica che sperimentale, e cioè si sono creati i due gruppi principali (diabetici e non diabetici) sia sulla base di una diagnosi conclamata di diabete, sia eseguendo una elaborazione alquanto complessa dei dati presenti nel nostro database,

incrociando sia i dati ricavati da questa tornata sperimentale, sia quelli "storici" di eventuali dosaggi della glicemia eseguiti sui medesimi pazienti nel corso degli anni nel nostro centro. Come è noto infatti, si considera normale una glicemia a digiuno fino a 110 mg/dl, ed in base alle ultime indicazioni della American Diabetes Association, valori di glicemia a digiuno uguali o superiori a 126 mg/dl in almeno due determinazioni distinte sono indicativi per la diagnosi di diabete<sup>[6]</sup> : **FPG (Fasting Plasma Glucose** cioè una concentrazione  $\geq 126$  mg/dl dopo un digiuno assoluto di almeno 8 ore); la selezione del gruppo di pazienti diabetici ha avuto dunque luogo sia riferendoci a chiare diagnosi di malattia diabetica, sia selezionando i soggetti in base all'andamento della glicemia nel corso degli anni (con riferimento a quanto poc'anzi esposto) .

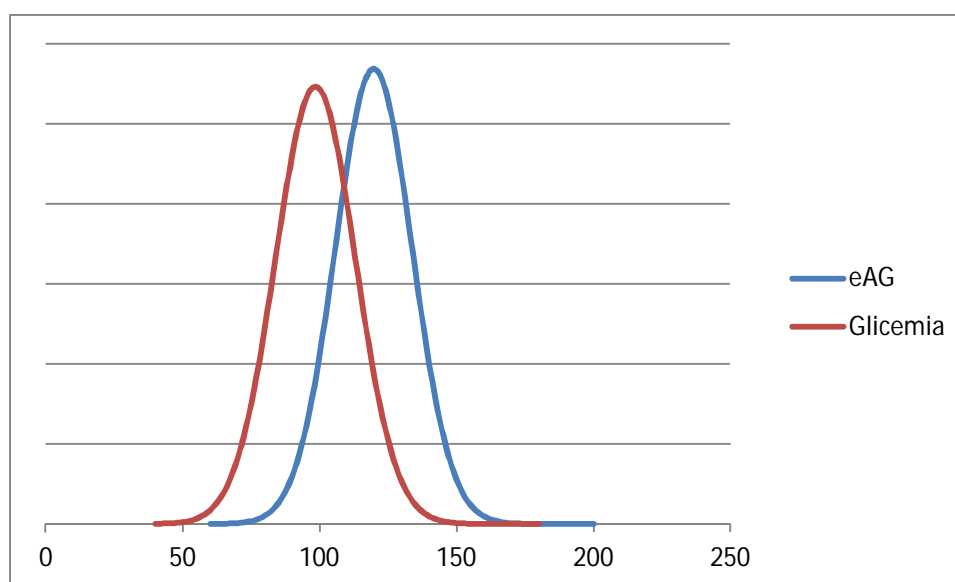
Consideriamo innanzitutto i dati aggregati riferiti a pazienti non diabetici, ed escludendo i pazienti con patologia diabetica conclamata che verranno trattati a parte : è stato eseguito il test in un campione di 476 pazienti, cui è stato praticato il prelievo a digiuno con conseguente dosaggio di HBA1c, glicemia, e calcolo dell'eAG.

I risultati ottenuti sono riassunti nella tabella seguente:

Tabella 1

Determinazione	Media	Deviazione standard
eAG	119,62	14,02
Glicemia	98,45	14,59

Si percepisce immediatamente che la media dei dosaggi della glicemia è risultata più bassa se paragonata alla media dei corrispondenti valori di eAG, con un grado di dispersione intorno al valore medio lievemente superiore (S.D. 14,58 invece di 14,02). Il tutto è visivamente riassunto dal confronto delle due distribuzioni:



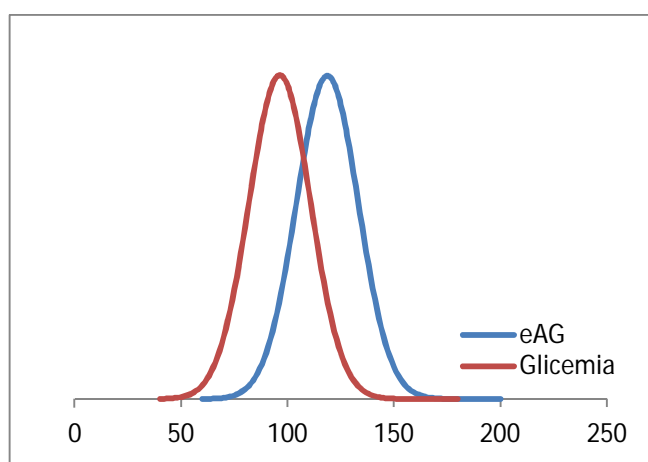
Il dato sicuramente più interessante viene però dall'esecuzione del t di Student tra le due distribuzioni :

l'esito del test indica infatti che la differenza tra le due medie è significativa per  $p < 0,01$ , suggerendo dunque che i risultati che derivano dal dosaggio della glicemia a digiuno, e dell'HBA1c con successivo calcolo dell'eAG non sono sovrapponibili o, come si usa dire in statistica, sono significativamente differenti.

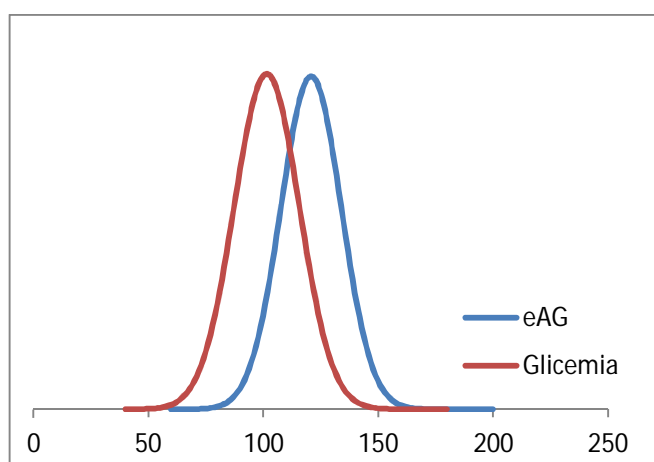
Se adesso prendiamo in esame i dati dei due sottogruppi distinti per sesso, cioè uomini e donne sempre selezionati dal gruppo di pazienti non diabetici, otteniamo i risultati seguenti :

Tabella 2

Gruppo	Media eAG	S.D. eAG	Media Glicemia	S.D. Glicemia	p
Donne (284)	118,70	14,55	96,34	14,51	< 0,01
Uomini (192)	120,96	13,13	101,56	14,18	< 0,01



Distribuzione solo donne



Distribuzione solo uomini

I risultati, come si vede, sono estremamente sovrapponibili, sia tra di loro che con quelli della popolazione intera (cioè uomini e donne insieme), sia per quanto riguarda i valori medi, sia per quanto riguarda le dispersioni attorno alla media. Di nuovo, per entrambi i gruppi, è da notare che il confronto statistico tra i due gruppi di valori (calcolo eAG e glicemia) implementando il t di Student, ha mostrato una  $p < 0,01$ , che significa, come prima, che la differenza tra i dati riguardanti il calcolo dell'eAG e quelli riguardanti il dosaggio della glicemia è significativa.

A questo punto sembrerebbe emergere un dato incontrovertibile, e cioè che i valori della glicemia media stimata (a partire dalla HBA1c) siano sempre, significativamente, più alti rispetto ai valori di glicemia a digiuno dosati sugli stessi pazienti.

Questo trend è confermato dall'analisi dei dati distinguendo solo i pazienti affetti da diabete (204 in tutto quelli del test):

Tabella 3

Gruppo	Media eAG	S.D. eAG	Media Glicemia	S.D. Glicemia	P
Pazienti diabetici	163,37	35,88	150,46	64,96	<0,05 >0,01

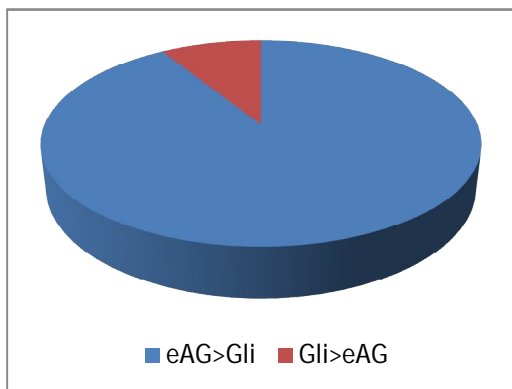
Anche in questo caso la media dei valori della glicemia a digiuno dei pazienti si posiziona su valori inferiori rispetto alla media della glicemia stimata dalla HBA1c. Il dato va però confrontato con le deviazioni standard delle due distribuzioni : la dispersione della distribuzione dei valori della glicemia attorno al valor medio è infatti molto ampia (S.D. 64,96) rispetto alla deviazione standard dell'eAG (S.D. 35,88); raffrontando poi le due distribuzioni con l'esecuzione del T di Student notiamo, stavolta, che la differenza tra le medie è significativa per  $p < 0,05$ , ma non per  $p < 0,01$ . Nei pazienti diabetici dunque il comportamento sembra lievemente diverso rispetto ai pazienti non diabetici: a riguardo vanno però fatte alcune considerazioni :

1. Il test del t ha dato valori che inizialmente erano ancora più distanti, con  $p > 0,05$ , ma il livello di significatività nella differenza tra le due medie è andato aumentando man mano che il numero di pazienti arruolati nel campionamento è aumentato.
2. Non si può non osservare che per il campione rappresentato da soli soggetti diabetici quello che colpisce siano i valori delle deviazioni standard sia della glicemia che dell'eAG, cosa che ci illustra una grande dispersione dei valori attorno alla media campionaria.

In ogni caso  $p$  è risultata pari a 0,0257, cosa che, se da un lato rende meno significativa la differenza tra le due medie campionarie, dall'altra suggerisce comunque una marcata differenza tra i valori di glicemia e di eAG riscontrati nei pazienti.

Le considerazioni fin qui illustrate autorizzano dunque a dire che per la globalità dei pazienti il dosaggio della glicemia sia un test che "fotografa", pressochè all'istante, la concentrazione di glucosio nel sangue, e che per una valutazione più "profonda" del metabolismo glucidico, la stima dell'eAG sulla base della concentrazione della HBA1c sia uno strumento molto più "completo", perchè mette spesso il clinico nella condizione di vedere ciò che un semplice dosaggio della glicemia può più o meno nascondere.

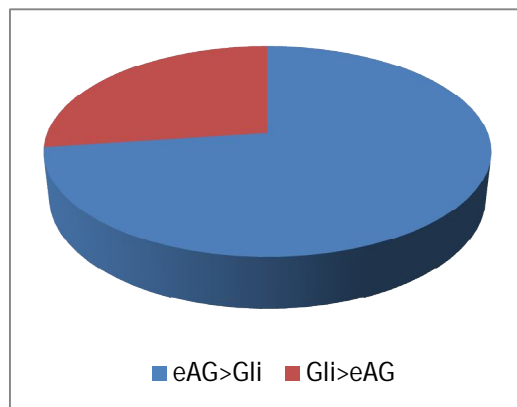
A conferma di quest'ultima considerazione, facciamo un altro piccolo "esperimento" e cioè confrontiamo di quanto , in percentuale, è risultato per ogni singolo paziente che la glicemia stimata (eAG) sia risultata più alta della glicemia: per agevolare il confronto oltre ai numeri utilizziamo i grafici a torta. Incominciamo raffrontando il gruppo di pazienti in toto, cioè tutti i pazienti non diabetici, di entrambi i sessi e non distinti per fasce di età, col corrispondente gruppo di pazienti affetti da patologia diabetica:



Pazienti NON diabetici (uomini e donne)

**eAG > Glicemia** : 91,14%

**Glicemia > eAG** : 8,86%



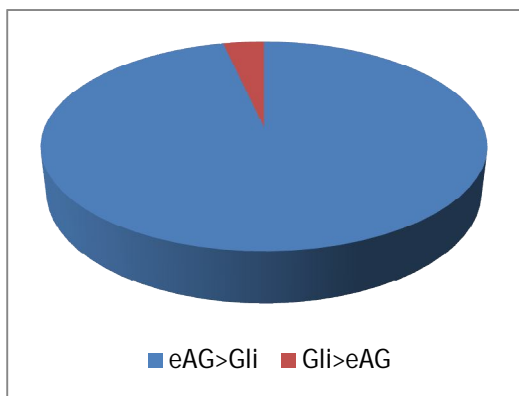
Pazienti diabetici ( uomini e donne)

**eAG > Glicemia** : 72,90%

**Glicemia > eAG** : 27,10%

Come si diceva, risulta più probabile nel paziente diabetico, rispetto al paziente non diabetico, riscontrare che il valore della glicemia sia più alto di quello della glicemia media stimata (eAG), ma in entrambi i gruppi si osserva che è sempre più frequente la percentuale di soggetti in cui il dosaggio della glicemia a digiuno sia risultato più basso rispetto al calcolo dell'eAG.

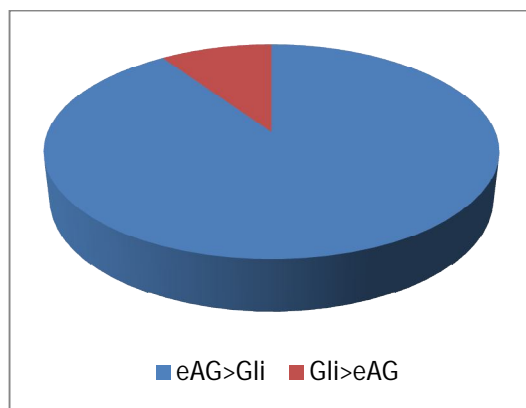
Questo stesso "trend" si riscontra anche prendendo in esame sia i pazienti di sesso femminile che quelli di sesso maschile NON affetti da malattia diabetica, e distinguendoli in due sottogruppi ( fino a 50 anni ed oltre i 50 anni di età ):



Donne Non diabetiche fino a 50 anni

**eAG > Glicemia** : 96,47%

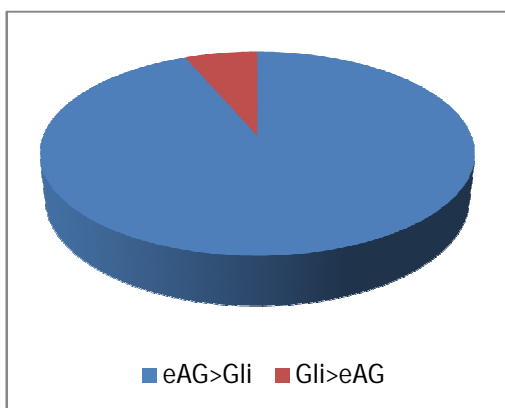
**Glicemia > eAG** : 3,53%



Donne Non diabetiche oltre 50 anni

**eAG > Glicemia** : 90,55%

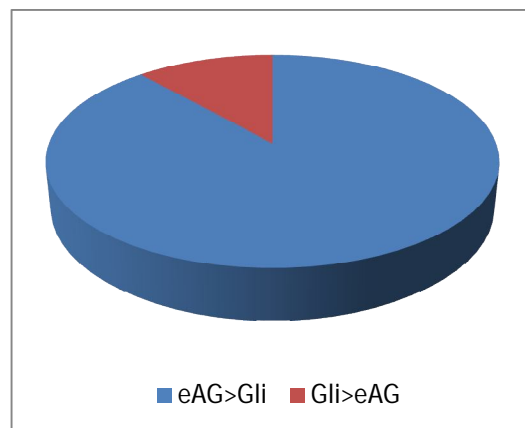
**Glicemia > eAG** : 9,45%



Uomini non diabetici fino a 50 anni

**eAG > Glicemia** : 93,62%

**Glicemia > eAG** : 6,38%



Uomini non diabetici oltre 50 anni

**eAG > Glicemia** : 88,44%

**Glicemia > eAG** : 11,56%

I dati globali, completi cioè di media e di deviazione standard per i vari sottogruppi, sono riassunti nella tabella seguente:

Tabella 4

Gruppo	Media eAG	S.D. eAG	Media Glicemia	S.D. Glicemia	P
Donne fino a 50	111,6	12,62	86,95	11,33	< 0,01
Donne oltre 50	121,90	14,18	100,23	13,83	< 0,01
Uomini fino a 50	116,96	13,64	94,70	11,25	< 0,01
Uomini oltre 50	122,24	12,67	103,69	14,29	< 0,01

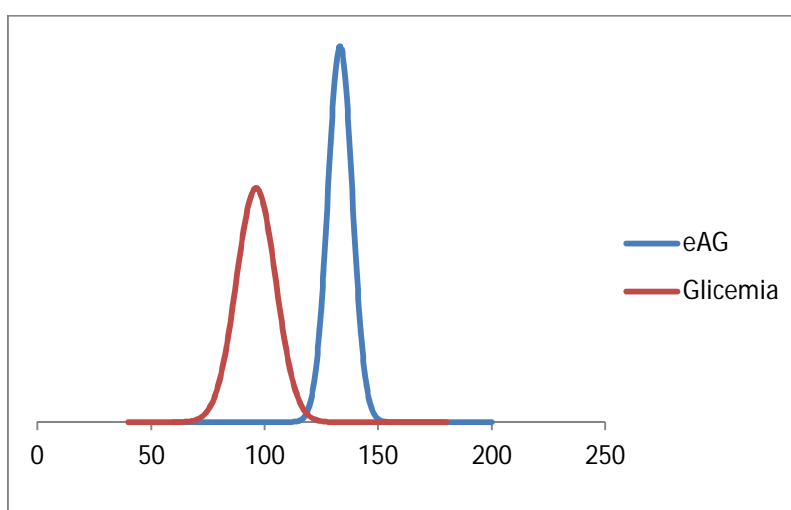
Come si vede grazie alla tabella, le medie sia della glicemia che di eAG aumentano con l'aumentare dell'età, e si conferma anche che, in tutti e quattro i gruppi considerati, la differenza tra la media dell'eAG e quella della glicemia sia statisticamente significativa.

Per finire, forse il dato più importante di tutti. Nell'intero campione di 476 pazienti, abbiamo provato a vedere, sulla base di questo trend in cui eAG si mostrava, mediamente, sempre superiore al valore della glicemia dosata nel medesimo paziente, se per caso ci fosse stato qualche paziente in cui ad una glicemia con valore normale (cioè al di sotto di 110 mg/ml) facesse da controparte una eAG con valore alterato (cioè oltre 126 mg/dl, che come è noto, rappresenta una soglia di allarme).

La tabella che segue raccoglie i risultati :

Tabella 5

Pazienti con Glicemia <110mg/dl ed eAG >126 mg/dl	Media eAG	S.D. eAG	Media Glicemia	S.D. Glicemia	p
80	133,22	5,39	96,25	8,66	< 0,01



In verità quest'ultimo è un dato davvero notevole, soprattutto ricordando che il campione comprende pazienti senza patologia diabetica diagnosticata e senza alcuna determinazione di glicemia, nella nostra base di dati, che rispondesse ai criteri citati prima : perlomeno due determinazioni a digiuno  $\geq$  a 126: su

476 pazienti senza apparenti problemi di iperglicemia, 80 (il 16,8%) hanno mostrato, con questa analisi, di essere quantomeno esposti a rischi di incorretto metabolismo glucidico.

## CONCLUSIONI

Questa breve discussione non ha certo la pretesa di essere esaustiva, vuole piuttosto essere uno spunto per mettere a fuoco una problematica, quella dell'omeostasi glicemica, che è di cruciale importanza se si considera l'incidenza sociale che essa comporta. In ogni caso, e pur con la doverosa osservazione che il livello di significatività delle nostre osservazioni è direttamente proporzionale alla quantità di dati, si può affermare che ai fini di un corretto monitoraggio del tasso glicemico, risulta indispensabile associare al dosaggio della glicemia quello dell' HBA1C con successivo calcolo dell'eAG.

Ispirati da queste osservazioni, ed incoraggiati dai dati risultati dall'elaborazione della nostra esperienza, riteniamo che questa associazione sia lo strumento più corretto per monitorare efficacemente il metabolismo glucidico di tutti pazienti, diabetici e non e, nei limiti delle nostre possibilità, abbiamo deciso di rendere i due dosaggi una pratica analitica standard nel nostro centro.

## BIBLIOGRAFIA

1. Jason Whalen, Donald Giacherio, Rod Hayward : [Hemoglobin A1c Fact Sheet](#) (*Michigan Diabetes Research & Training Center*). URL consultato il 6 agosto 2014.
2. Rahbar S, Blumenfeld O, Ranney HM, [Studies of an unusual hemoglobin in patients with diabetes mellitus](#) in *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 36, n° 5, 1969, pp. 838–43.
3. Bunn HF, Haney DN, Gabbay KH, Gallop PM, [Further identification of the nature and linkage of the carbohydrate in hemoglobin A1c](#) in *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 67, n° 1, 1975, pp. 103–9.
4. Koenig RJ, Peterson CM, Jones RL, Saudek C, Lehrman M, Cerami A, [Correlation of glucose regulation and hemoglobin A1c in diabetes mellitus](#) in *N. Engl. J. Med.*, vol. 295, n° 8, 1976, pp. 417–20.
5. David M. Nathan, Judith Kuenen, Rikke Borg, Hui Zheng, David Schoenfeld, Robert J. Heine, and for the A1c-Derived Average Glucose (ADAG) Study Group [Translating the A1C assay into estimated average glucose values](#).
6. [Executive Summary: Standards of Medical Care in Diabetes—2010](#): Current criteria for the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* January 2010 33:S4-S10; doi:10.2337/dc10-S004