

## ARTÍCULO ORIGINAL

# Evaluación del inhibidor de la glucólisis citrato-fluoruro y su aplicación en el diagnóstico de diabetes gestacional

Fares Taie, S.<sup>1</sup>; Barbieri, D.<sup>1</sup>; Vilche Juarez, A.<sup>1</sup>; Bollati, M.<sup>2</sup>; Llui, E.<sup>2</sup>; Quiroga, S.<sup>2</sup>; Correa, V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Universitario CEMIC (IUC). Valdenegro 4337, CABA, Argentina.

<sup>2</sup>Departamento de Análisis Clínico, CEMIC. Galván 4102, CABA, Argentina.

**Contacto:** Fares Taie, S.; mail: santiago@farestaie.com.ar

## Resumen

La diabetes gestacional (DG) es una entidad que pone en riesgo la salud materna y fetal. Su prevalencia varía en función de la población estudiada y del test de laboratorio utilizado, ya que no existe consenso nacional ni internacional sobre este punto. En todos los casos, el diagnóstico requiere determinaciones de glucemia plasmática en sangre venosa. Ha sido demostrado que el anticoagulante habitualmente utilizado, EDTA-fluoruro, no logra detener el proceso de glucólisis anaeróbica en las primeras horas post-extracción y que el citrato-fluoruro resulta un mejor inhibidor de la glucólisis. Esto aporta una nueva fuente de variabilidad al diagnóstico. Los objetivos del presente estudio fueron: a) comparar los resultados de glucosa plasmática obtenidos con diferentes inhibidores (heparina y baño de hielo, EDTA-fluoruro y citrato-fluoruro) procesados en diferentes tiempos; b) evaluar si la utilización de uno u otro inhibidor altera el diagnóstico de DG. Se recolectaron 190 muestras de adultos (no embarazadas) para efectuar la comparación y 312 muestras correspondientes a 52 pacientes embarazadas para evaluar el diagnóstico de DG con los distintos anticoagulantes siguiendo el protocolo de IADPSG. Los resultados mostraron que el EDTA-fluoruro no mantiene constante la concentración de glucosa en el tiempo evaluado. El citrato-fluoruro logra una inhibición de la glucólisis comparable al tubo con heparina en baño de agua-hielo (*gold standard*). En la población de mujeres embarazadas, el inhibidor citrato-fluoruro reveló una mayor sensibilidad para el diagnóstico de DG. Por lo tanto, resulta imprescindible, estandarizar las pruebas y los valores de corte con este anticoagulante.

**Palabras clave:** diabetes gestacional, prueba de tolerancia oral a la glucosa, inhibidor de glucólisis anaeróbica, citrato-fluoruro.

## Abstract

Gestational diabetes (GD) is a pathological condition that threatens the maternal and fetal health. The prevalence depends on the population studied and the laboratory tests, as there is no national or international consensus on this point. Venous blood plasma glucose assay is required for diagnosis in all cases. EDTA-fluoride do not inhibit anaerobic glycolysis during the first two hours post blood-withdrawal and citrate-fluoride is a more efficient glycolysis inhibitor. This provides a new source of pre-analytical variability in the diagnosis. The aims of the present study were to: a) compare the results obtained with different plasma glucose inhibitors (Heparin in ice-water bath, EDTA-fluoride and citrate-fluoride) processed immediately and after 2 hours of incubation; b) assess whether the use of EDTA-fluoride or citrate-fluoride modifies GD diagnosis. One hundred and ninety adult samples were collected to reach objective "a" and 312 samples from 52 pregnant patients to assess the GD diagnosis following the IADPSG protocol. Results showed that EDTA-fluoride do not inhibit glycolysis efficiently during the evaluated time. Citrate-fluoride achieved a superior glycolysis inhibition, compared to heparin in ice-water bath (*gold standard*). Citrate-fluoride inhibitor showed a higher sensitivity for the diagnosis of GD. Therefore, it is essential to standardize the pre-analytical phase and the cut-off values for this inhibitor-anticoagulant.

**Key words:** gestational diabetes, glucose tolerance test, anaerobic glycolysis inhibitor, citrate-fluoride.

## Introducción

La *American Diabetes Association* propone diversos estudios para el diagnóstico de diabetes mellitus que involucran mediciones de glucemia plasmática y hemoglobina glicosilada. Estas recomendaciones han alcanzado consenso internacional. No sucede lo mismo con el diagnóstico de diabetes gestacional (DG), en el que aún se discute la definición y los criterios diagnósticos.

La DG es una entidad que pone en riesgo la salud materna y fetal. Su presencia se asocia con riesgos perinatales: macrosomía, distocia de hombros, cesárea y preeclampsia. Se ha demostrado, también, su asociación con riesgos futuros, como obesidad y diabetes en el niño y diabetes tipo II en la madre, años después del embarazo. La prevalencia varía de 1 a 14 % de los embarazos<sup>1</sup>, en función de la población estudiada y del test de laboratorio utilizado, ya que no existe consenso nacional ni internacional sobre este punto. Los criterios diagnósticos comúnmente usados son: WHO 1999, el que requiere una sobrecarga con 75 gramos de glucosa y mediciones de glucemia basal y a las 2 horas<sup>2</sup>. *American Congress of Obstetricians and Gynecologists* propone una sobrecarga con 100g de glucosa y mediciones de glucemia basal, a los 60, 120 y 180 minutos<sup>3</sup>. *Canadian Diabetes Association* utiliza una sobrecarga con 75 gramos de glucosa y mediciones basal, a los 60 y 120 minutos<sup>4</sup>. *International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups (IADPSG)* propone el mismo desafío que *Canadian Diabetes Association* pero con valores de corte diferentes<sup>5</sup>. En todos los casos, el diagnóstico requiere determinaciones de glucemia plasmática en sangre venosa.

Ha sido demostrado que el anticoagulante habitualmente usado en los laboratorios clínicos, EDTA-FLORURO, no logra detener el proceso de glucólisis anaeróbica en las primeras horas post-extracción, ya que inhibe la Enolasa, una de las últimas enzimas de la vía glucolítica. Actualmente se propone<sup>7,8</sup> citrato-fluoruro como mejor inhibidor de la glucólisis, porque actuaría sobre las enzimas Hexoquinasa y Fosfofructoquinasa-1, activas en el inicio de la ruta glucolítica. Estas enzimas alcanzan un máximo de actividad a pH 8, no observándose actividad de las mismas a pH menor de 7. El rol del aditivo Citrato/Ácido Cítrico es justamente disminuir el pH por debajo de 7 para inhibir la actividad enzimática<sup>7,8</sup>. Se ha reportado que con este inhibidor se logran resultados similares a los obtenidos cuando se extrae sangre con heparina y se colocan los tubos en baño de agua-hielo, separándose los plasmas antes de las dos horas. Este último método se considera *gold standard*, aunque es muy poco utilizado ya que resulta de muy difícil implementación.

Esta alternativa pre-analítica aporta una nueva fuente de variabilidad al diagnóstico de DG, ya que con los distintos anticoagulantes-inhibidores se obtienen resultados de glucemia diferentes. El diagnóstico de DG no sólo dependerá de la sensibilidad del test seleccionado, sino también del sistema anticoagulante-inhibidor de glucólisis utilizado. Sería necesario una estandarización de la fase pre-analítica y/o

validación de los puntos de corte para cada sistema anti-coagulante-inhibidor de la glucólisis.

Es por eso que los objetivos del presente trabajo fueron: comparar los resultados de glucosa en plasma obtenido de tubos con distintos inhibidores y diferentes tiempos de contacto con el paquete globular: tubos con heparina (H) conservados en baño de agua-hielo hasta la separación del plasma, tubos con EDTA-fluoruro (F) y tubos con citrato-fluoruro (C). Paralelamente, se evaluó si la utilización de uno u otro inhibidor (F o C) altera el diagnóstico de DG en las pacientes embarazadas que asistieron al laboratorio con solicitud médica de prueba de tolerancia oral a la glucosa según IADPSG.

## Materiales y métodos

Los anticoagulantes-Inhibidores de la glucólisis utilizados fueron F: EDTA-G, Wiener, solución equilibrada de sales sódicas y potásicas de EDTA (0,274 mol/l) y fluoruro (0,86 mol/l), pH 7,2.; C: Citrato 10mg%, fluoruro 0.8 M, pH=3,2 (preparado en el laboratorio), H: tubos Vacutainer con heparina sódica 68 USP Becton & Dickinson en baño de agua-hielo.

Todas las mediciones se realizaron en un único instrumento, Cobas 6000, módulo C 501, con reactivo dedicado Hexoquinasa (Roche Diagnostics). Precisión intermedia 0.92 % para glucemias de valor medio 81 mg/dl y 0.98 % para glucemias de valor medio 288 mg/dl.

**Análisis de Datos:** El análisis estadístico se realizó con el programa Medcalc 11.3.0 y IBM SPSS Statistics 21.0.

**Experimento A:** con el fin de evaluar la eficacia inhibitoria de la vía glucolítica de F y C frente al *gold standard* H se extrajo sangre a 28 adultos voluntarios (rango etario: 25 – 51 años; media 35 años), tres tubos por paciente (H, F y C), en ayunas o postprandial (con el fin de obtener resultados más elevados de glucemia). Las muestras se fraccionaron en dos alícuotas. A la primera, se le separó el plasma por centrifugación y se midió la glucemia inmediatamente luego de la extracción ( $H^A_0$ ,  $F^A_0$  y  $C^A_0$ ). La segunda se mantuvo en contacto con el paquete globular durante dos horas (H en baño de agua-hielo; F y C a temperatura ambiente). Cumplido el tiempo estipulado, se separó el plasma por centrifugación (H en centrífuga refrigerada, a 4°C) y se midió la glucemia ( $H^A_2$ ,  $F^A_2$  y  $C^A_2$ ).

**Experimento B:** para analizar la diferencia de resultados entre EDTA-fluoruro y citrato-fluoruro se extrajo sangre a 53 pacientes adultos en tubos F y C (rango etario: 27 – 53 años; media 33 años). Rango de concentración de las muestras: 59 – 144 mg/dl. Todos los plasmas se procesaron por duplicado inmediatamente ( $F^B_0$ ,  $C^B_0$ ) y luego de dos horas de contacto con el paquete globular ( $F^B_2$ ,  $C^B_2$ ), también por duplicado.

**Experimento C:** con el fin de evaluar la influencia del inhibidor glucolítico en el diagnóstico de DG se recolectaron muestras con ambos inhibidores, EDTA-fluoruro y citrato-fluoruro, de 52 pacientes embarazadas que acudieron al laboratorio para realizar la prueba de tolerancia oral a la glucosa, según

protocolo IADPSG, entre la semana 24-28 de embarazo. El rango etario de la población en estudio fue de 22 – 45 años [media 33 años]. Las muestras se recogieron en ayunas ( $F^C_0, C^C_0$ ) y luego de la ingestión de 75 gramos de glucosa en solución acuosa, a los 60 y 120 minutos ( $F^C_1, C^C_1$  y  $F^C_2, C^C_2$  respectivamente). El análisis se realizó habiendo considerado los puntos de corte propuestos por el protocolo HAP0<sup>9</sup>: basal 92 mg/dl; 1 hora: 180 mg/dl; 2 horas: 153 mg/dl.

**Resultados**

*Experimento A:* los resultados de glucosa medida a tiempo cero y a las dos horas se muestran en la tabla I. Se observa que, al comparar los resultados de EDTA-fluoruro ( $F^A_2$ ) y

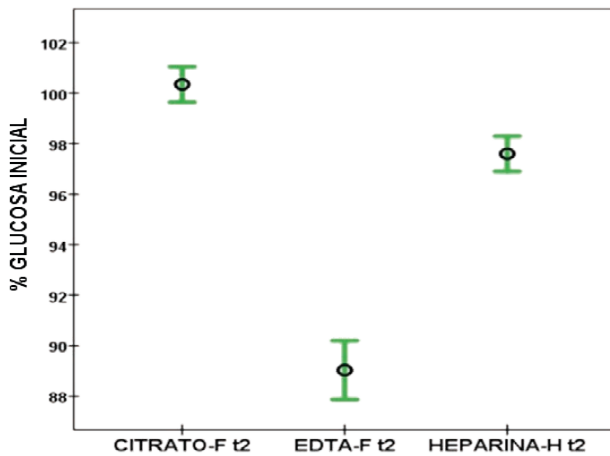
citrato-fluoruro ( $C^A_2$ ) a las 2 horas post-extracción frente a heparina ( $H^A_2$ ) hay en promedio una disminución de 7,9 mg/dl [Student T:  $p < 0,01$ ] y un aumento de 2,5mg% [Student T:  $p = 0,33$ , diferencia no significativa], respectivamente. Asimismo, la diferencia media entre  $F^A_2$  y  $C^A_2$  es de 9,8 mg/dl [Student T:  $p < 0,01$ ].

En la figura 1, se grafican los datos de glucemia obtenidos con los diferentes anticoagulantes, normalizados con heparina a tiempo 0 ( $H^A_0$ ), con su intervalo de confianza del 95 % [IC]. Al normalizar los datos con el *gold standard* observamos que luego de dos horas el tubo con heparina conserva el 97,6 % [IC: 96,9 - 98,3] de la glucemia inicial, el citrato-fluoruro mantiene el 100,3 % [IC: 99,6 - 101,0] y el EDTA-fluoruro el 89% [IC 87,9 - 90,2]. La diferencia es estadísticamente significativa para EDTA-fluoruro frente a heparina y citrato-fluoruro (ANOVA:  $p < 0,001$ )

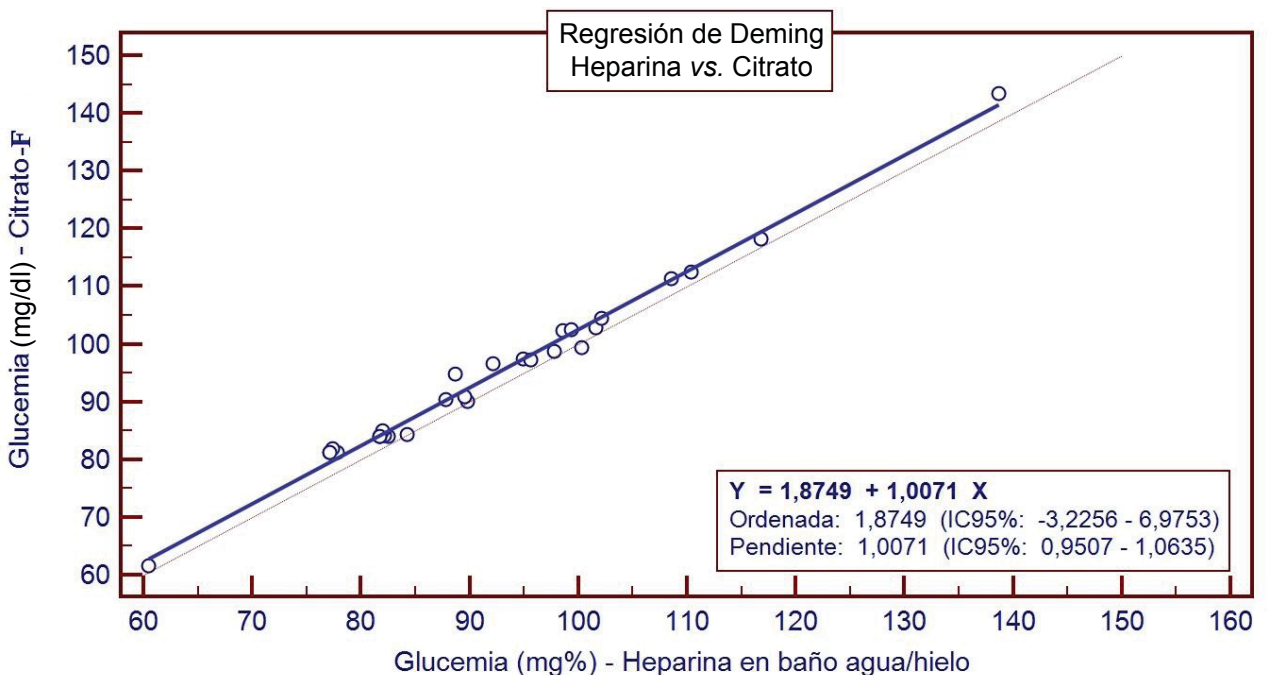
La figura 2.1 muestra la correlación entre los resultados obtenidos con heparina y con citrato-fluoruro para cada par de muestras. El IC 95 % de la pendiente de la recta incluye al 1 y la ordenada al origen incluye al 0. Los resultados indican que existe una gran similitud entre los resultados obtenidos entre los dos anticoagulantes-inhibidores.

El gráfico superior de la figura 2.2 representa las diferencias de glucemias obtenidas con citrato-fluoruro y heparina luego de 2 horas en contacto con el paquete globular. Los resultados muestran que la diferencia promedio entre ambos anticoagulantes es de 2,5 mg/dl [IC: -0,6 a 5,7]. El gráfico inferior representa las diferencias de glucemias obtenidas con EDTA-fluoruro y heparina luego de 2 horas en contacto con el paquete globular. Los resultados muestran que la diferencia promedio entre ambos anticoagulantes es de -7,9 mg/dl [IC: -4,0 a -11,7].

**Figura 1.** Glucemia normalizada con heparina a tiempo 0: Glucemia a tiempo 2 en tubos con citrato-fluoruro, EDTA-fluoruro y heparina. Intervalo de confianza del 95 %.



**Figura 2.1.** Regresión de Deming: Resultados de glucemia obtenidos con heparina en baño agua-hielo y citrato-fluoruro.



*Experimento B:* los resultados de los 53 pares de muestras obtenidas con F y C se grafican normalizados con citrato-fluoruro a tiempo 0, en la figura 3.

Se observa que la glucosa fue, en promedio, 4,51 mg/dl menor en los tubos  $F_0^B$ , que en los tubos de  $C_0^B$ , y en  $F_2^B$  fue 7,80 mg/dl menor que  $C_2^B$ .

En los tubos con EDTA-fluoruro la reducción de la concentración de glucosa a las 2 horas fue en promedio 5,15 mg/dl (IC: 4,43 - 5,88) y en los tubos con citrato-fluoruro la reducción promedio fue 1,33 mg/dl (IC: 0,55 - 2,10) [Tabla II]. La diferencia es estadísticamente significativa [Student t:  $p < 0,01$ ].

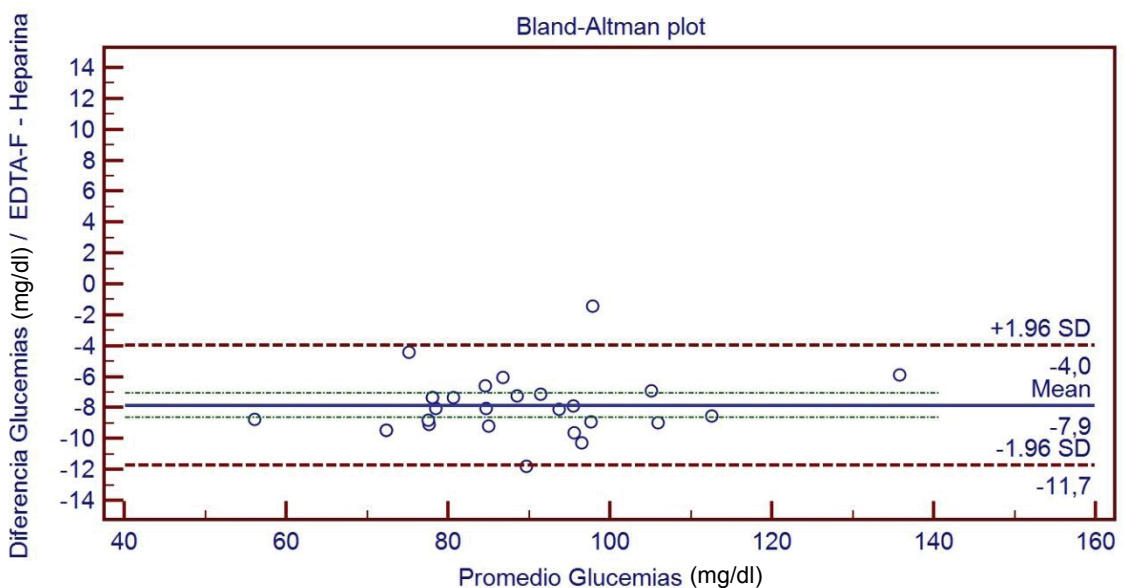
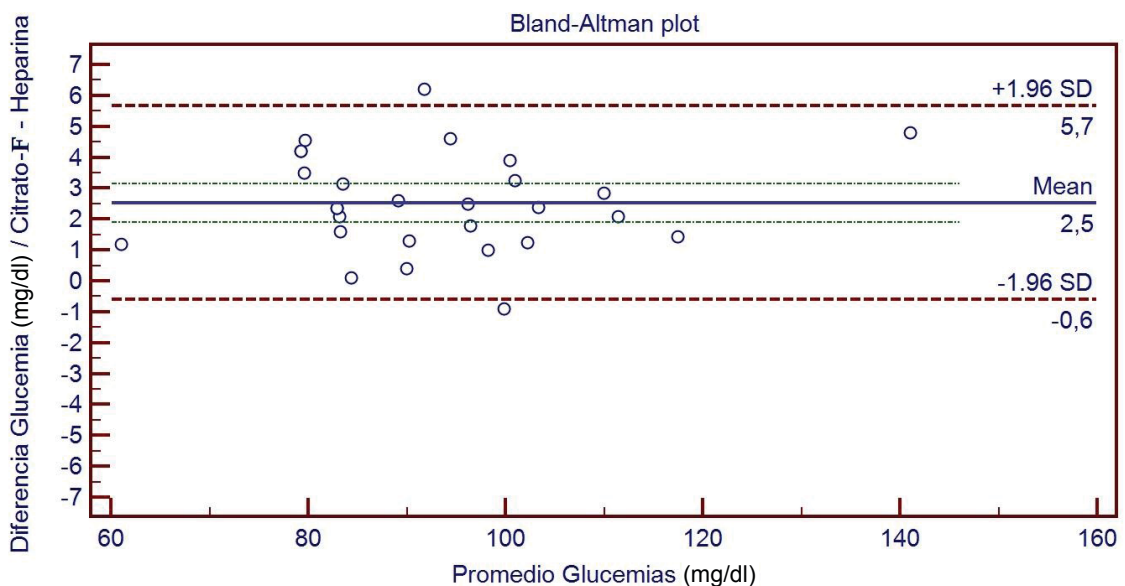
Si se considera el total de muestras de ambos experimentos [experimentos A y B], el consumo de glucosa lue-

go de dos horas de la extracción de sangre fue: para F: 6,85 mg/dl, C: 1,13 mg/dl y H: 2,19 mg/dl. Las diferencias son estadísticamente significativas [Student t:  $p < 0,01$ ] excepto para el caso de citrato-fluoruro/heparina [Student t:  $p = 0,40$ ]. [Tabla III].

*Experimento C:* Prueba de tolerancia oral a la glucosa en pacientes embarazadas, protocolo IADPSG. La distribución de muestras positivas (mayores al valor de corte respectivo) y negativas para DG se muestran en la Tabla IV.

Todas las muestras que resultaron mayores al valor de corte con EDTA-fluoruro, también lo fueron con citrato-fluoruro. Sin embargo, 18 muestras fueron positivas con EDTA-fluoruro y 25 lo fueron con citrato-fluoruro, es decir que hubo 7 diferencias clínica y estadísticamente significativas

**Figura 2.2.** (Arriba) Gráfico de Bland-Altman: Glucemia (mg/dl) citrato-fluoruro vs. heparina en baño agua-hielo. (Abajo) Gráfico de Bland-Altman: Glucemia (mg/dl) EDTA-fluoruro vs. heparina en baño agua-hielo.



entre ambos anticoagulantes [Chi cuadrado:  $p < 0,001$ ]. Estas muestras corresponden a 5 pacientes (9,6% de la población en estudio).

Al utilizar EDTA-fluoruro como inhibidor glucolítico en la prueba oral de tolerancia a la glucosa se logró diagnosticar a 12 mujeres con diabetes gestacional (23%). En contraste, al considerar los datos de glucemia obtenidos con el inhibidor citrato-fluoruro identificamos a 17 mujeres con DG (33%) [Figura 4].

**Discusión**

En nuestro país, EDTA-fluoruro de sodio es el agente preferido por la mayoría de los laboratorios clínicos para la obtención de plasma y preservación de la glucemia, y se utiliza para el diagnóstico de diabetes mellitus y DG. Sin embargo, su acción no es inmediata,<sup>11</sup> ya que sólo logra detener el proceso de glucólisis anaeróbica en la sangre extraída, luego de 2 horas.

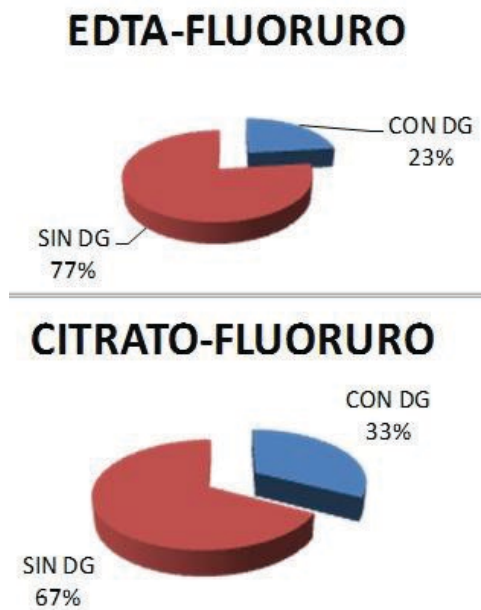
El método considerado *gold standard* es poco práctico y de muy difícil implementación en la práctica diaria, en especial en aquellos laboratorios que reciben un elevado número de pacientes y/o derivaciones desde centros periféricos.

El uso de la solución buffer citrato/ácido cítrico para acidificar el medio de reacción e inhibir la glucólisis ha sido descrito algunas décadas atrás, pero esta posibilidad no es muy conocida. No se comercializan en Argentina tubos con citrato como inhibidor de la glucólisis y hay pocos reportes al respecto<sup>8</sup>.

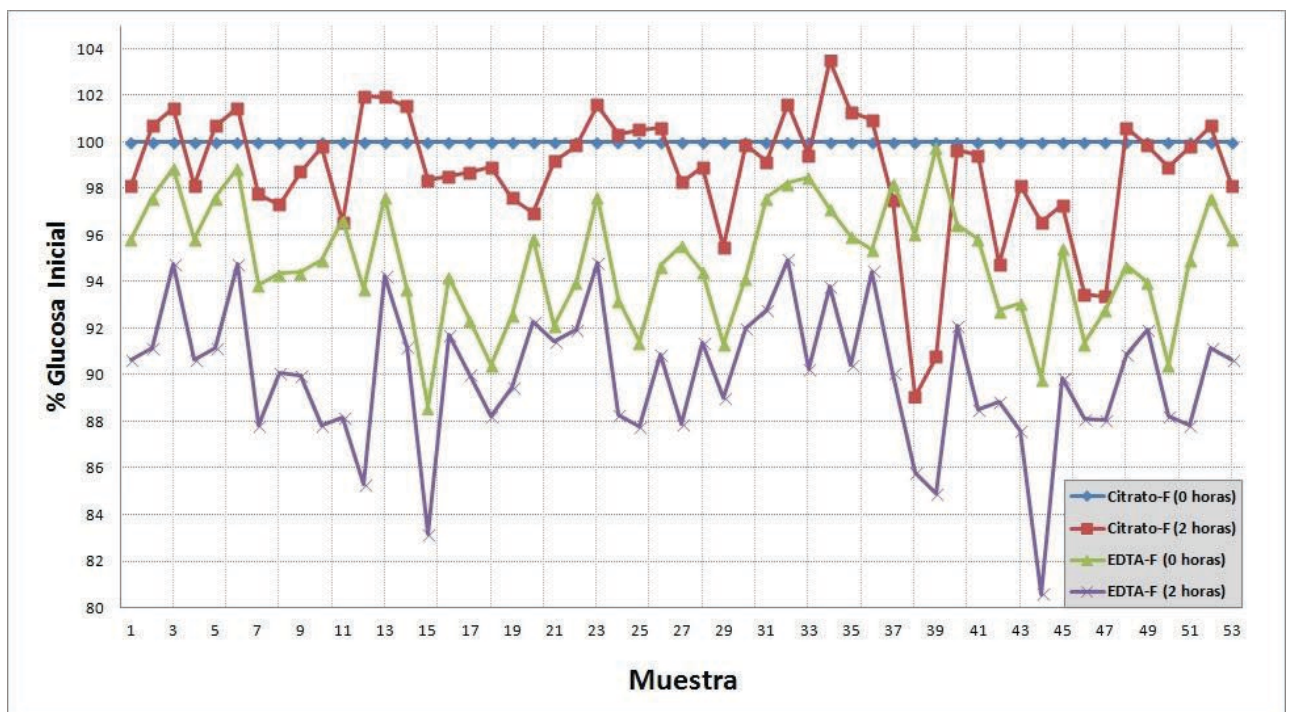
Con la experiencia A hemos demostrado que el sistema anticoagulante-inhibidor citrato-fluoruro se comporta de manera similar al *gold standard*, heparina en baño de agua-

hielo. El sistema EDTA-fluoruro, en cambio, produce un decaimiento de la glucemia en las dos primeras horas post extracción y esta diferencia es estadísticamente significativa. Se puede argumentar que el número de pacientes involucrados es bajo, pero se debe considerar que se tomaron muestras de voluntarios (3 tubos por cada paciente), se procesaron por duplicado y que la manipulación de la muestra de

**Figura 4.** Proporción de pacientes diagnosticadas con DG con cada anticoagulante respecto del total de la población (N=52).



**Figura 3.** Valores de glucemia normalizados con citrato a tiempo 0 para las 53 pares de muestras obtenidas con C y F.



heparina en baño de agua-hielo dificulta el procedimiento.

En la experiencia B se demuestra que el inhibidor citrato-fluoruro mantiene la concentración de glucosa plasmática luego de dos horas de contacto con el paquete globular, ya que la diferencia no es estadísticamente significativa respecto del basal. EDTA-fluoruro no muestra igual comportamiento y, además, la muestra basal correspondiente tiene menor concentración de glucosa que la de citrato-fluoruro basal, indicando que aún procediendo de forma inmediata, la concentración de glucosa decae en los tubos con EDTA-fluoruro. El decaimiento de la glucemia a las 2 horas (respecto del basal) con citrato-fluoruro y con heparina no difiere estadísticamente, pero sí es diferente en términos absolutos. Esto se debe, sin dudas, a la dificultad en la implementación del método de inhibición enzimática por enfriamiento. La eficacia del método se ve disminuida por el manipulado de las muestras.

Al evaluar el diagnóstico de DG (experiencia C) con cada anticoagulante (C y F) se comprobó que el inhibidor citrato-fluoruro detecta mayor cantidad de resultados por encima del valor de corte asignado para cada tiempo.

Según el protocolo IADPSG, una sola muestra positiva es suficiente para diagnosticar DG. Este protocolo se basa en el estudio HAPO, que utilizó muestras recolectadas con heparina en baño de agua-hielo<sup>11</sup>. Dado que se ha demostrado que el citrato-fluoruro es un inhibidor tan eficaz como el enfriamiento y que el EDTA-fluoruro, en cambio, permite el decaimiento de los niveles de glucosa en plasma, se puede afirmar, entonces, que con el inhibidor EDTA-fluoruro hay un

**Tabla I.** Glucemias promedio medidas a distintos tiempos.

Glucemia promedio	Tiempo 0 (mg/dl)	Tiempo 2 (mg/dl)	Δ Glucemia (mg/dl)
EDTA-fluoruro	95,2	84,7*	-10,5*
citrato-fluoruro	95,8	94,5	-1,3
Heparina	94,2	92,0	-2,2

Glucemias promedio en mg/dl obtenidas a tiempo basal y 2 horas post extracción con distintos anticoagulantes. Los resultados con EDTA-fluoruro difieren respecto de Citrato y de heparina a las 2 hs (ANOVA: \* p < 0,01).

**Tabla II.** Disminución de glucosa luego de 2 horas de demora en el procesamiento utilizando distintos inhibidores

Inhibidor	Δ Glu (mg/dl) T2-T0	IC 95 %
EDTA-fluoruro	5,15	4,43 a 5,88
citrato-fluoruro	1,33	0,55 a 2,10

Diferencia de glucemia observada entre tiempo 2 y tiempo 0 con distintos anticoagulantes-inhibidores (experiencia B). La diferencia de las medias calculadas son estadísticamente significativas (Student t: p < 0,01) y de heparina a las 2 hs (ANOVA: \* p < 0,01).

sub-diagnóstico de DG en un 10% de los casos.

Se ha discutido mucho sobre la distinta sensibilidad de los test diagnósticos para DG. IADPSG adoptó el criterio del estudio HAPO, y definió los puntos de corte como las cifras de glucemia a partir de las cuales la morbilidad era 1,75 veces la de la media de la población en relación a tres variables: peso al nacer, adiposidad subcutánea y péptido C en cordón superiores al percentilo 90.<sup>[5]</sup>

El criterio diagnóstico quedó entonces definido con las cifras de 92 mg/dl para la glucemia en ayunas, 180 mg/dl y 153 mg/dl en la primera y segunda hora, respectivamente. Se consideró el test positivo cuando se encontraba un único valor alterado, sea basal, 1 o 2 horas tras la ingesta de glucosa<sup>9</sup>. Al disminuir el valor de la concentración de los puntos de corte y exigir sólo una muestra positiva para diagnosticar al paciente con DG, el test se hace altamente sensible y requiere una medición muy exacta de la glucemia. Un pequeño error pre-analítico o analítico puede llevar a que una paciente sea mal clasificada y no reciba el consejo médico adecuado.

La utilización de este test en el laboratorio clínico exige un procedimiento que asegure la conservación de la glucemia en la fase pre-analítica.

**Tabla III.** Disminución de glucosa luego de 2 horas de demora en el procesamiento utilizando distintos inhibidores considerando el total de muestras analizadas.

Inhibidor	Δ Glucemia en mg/dl (T2 – T0)
EDTA-fluoruro	6,85*
citrato-fluoruro	1,13
Heparina-baño de agua-hielo	2,19

Diferencia promedio de glucemias observada entre tiempo 2 y tiempo 0 con distintos anticoagulantes-inhibidores considerando el total de muestras (experiencia A+B). La diferencia promedio obtenida con EDTA-fluoruro difiere estadísticamente de los resultados con citrato-fluoruro y heparina (\*Student T: p < 0,01), significativas (Student t: p < 0,01) y de heparina a las 2 hs (ANOVA: \* p < 0,01).

**Tabla IV.** Clasificación de los resultados según el punto de corte propuesto por estudio HAPO.

Inhibidor	EDTA-fluoruro	citrato-fluoruro
Muestras positivas	18	25
Muestras negativas	138	131

Distribución de los resultados de las 312 muestras (basal, 60 y 120 minutos) pertenecientes a 52 pacientes embarazadas. Los criterios de positividad considerados son los del estudio HAPO. Los resultados positivos obtenidos con los distintos inhibidores difieren entre sí con significancia estadística (Chi<sup>2</sup>: p < 0,01).

Se ha probado que, durante el tiempo evaluado, el sistema EDTA-fluoruro no logra una inhibición de la glucólisis tan eficaz como heparina en baño de agua-hielo. Citrato-fluoruro logra inhibir eficientemente la glucólisis, presentando valores de glucemia comparables al *gold standard* y resulta una alternativa sencilla y de fácil implementación en el laboratorio clínico.

Aplicando estas consideraciones al diagnóstico de DG, se observa que alrededor de un 10 % de las pacientes pueden ser mal clasificadas si se utiliza el inhibidor tradicional. Es recomendable modificar los procedimientos pre-analíticos y asegurar la conservación de la glucosa para garantizar un diagnóstico correcto de DG.

### Conflicto de interés

Los autores declaran estar libres de conflictos de intereses.

### Referencias bibliográficas

- Voto, L.; Nicolotti, A.; Salcedo, L.; González Alcántar, M.; Nasiff, C.; Elizalde Cremonte Ortiz, A. "Consenso de diabetes. Recopilación, actualización y recomendaciones para el diagnóstico y tratamiento de la diabetes gestacional" [en línea]. Septiembre de 2012. <http://www.ms.gba.gov.ar/sitios/tocoginecologia/files/2014/10/Consenso-Diab%C3%A9tes-y-Embarazo.pdf>
- World Health Organization. "Definition, Diagnosis and Classification of diabetes mellitus and its Complications. Part 1: Diagnosis and Classification of diabetes mellitus" [en línea]. WHO/NCD/NCS/99.2 ed. Geneva: World Health Organization; 1999 [http://apps.who.int/iris/bits-tream/10665/66040/1/WHO\\_NCD\\_NCS\\_99.2.pdf](http://apps.who.int/iris/bits-tream/10665/66040/1/WHO_NCD_NCS_99.2.pdf)
- American College of Obstetricians and Gynecologists. Committee Opinion No. 504. Screening and diagnosis of gestational diabetes mellitus. *Obstetrics & Gynecology* 2011; 118(3):751-753.
- Canadian Diabetes Association 2008 Clinical Practice Guidelines for the Prevention and Management of Diabetes in Canada. *Canadian Journal of Diabetes* 2008; 32(Suppl 1).
- 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(3):676-682.
- Chan, A. Y.; Swaminathan, R.; Cockram, C.S. Effectiveness of sodium fluoride as a preservative of glucose in blood. *Clin Chem* 1989, 35:315-7
- Saenz-Mateos, L.; Muñoz-Colmenero, A.; Cabrera-Morales, C.; Palomino-Muñoz, T.; Sastre-Gomez, A.; Chico-Sepúlveda, P. Papel del citrato combinado con el fluoruro sódico en la estabilidad de la glucemia en la fase preanalítica [en línea]. *Boletín científico del HGUCR*; 2013. <http://apuntes.hgucr.es/2013/01/17/>
- Gambino, R.; Piscitelli, J.; Ackattupathil, T.; Theriault, J.; Andrin, R.; Sanfilippo, R.; Etienne. Acidification of blood is superior to sodium fluoride alone as an inhibitor of glycolysis. *Clin Chem*. 2009 May; 55(5):1019-21.
- HAPO Study Cooperative Research Group. Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes. *N Engl J Med* 2008; 358(19):1991-2002.
- ADA; Diagnosis and Classification of diabetes mellitus; *Diabetes Care*. 2010; 33 (Suppl 1): S62–S69
- Burns, D.; Knowler, W. Stabilization of Glucose in Blood Samples: Why it Matters. *Clin Chem* 55:5 850-852 (2009).