rassegna

Linee Guida e Raccomandazioni per le Analisi di Laboratorio nella Diagnosi e nella Gestione del Diabete Mellito*

David B. Sacks,[1*] David E. Bruns,[2] David E. Goldstein,[3] Noel K. Maclaren,[4] Jay M. Mcdonald, [5,6] and Marian Parrott[7]

[1] Department of Pathology, Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School, Thorn 530,75 Francis St., Boston, MA 02115.
[2]Department of Pathology, University of Virginia Medical School, PO Box 800214, Charlottesville, VA 22908.
[3]Department of Child Health, University of Missouri School of Medicine, 1 Hospital Dr., Columbia, MO 65212.
[4] Weill Medical College of Cornell University, 1300 York Ave. Suite LC-623, New York, NY 10021.
[5] Departement of Pathology, University of Alabama at Birmingham, 701 S. 19th St. Birmingham, AL 35294.
[6]Veterans Administration Medical Center, Birmingham, AL 35233.
[7]American Diabetes Association, 1701 Beauregard St., Alexandria, VA 22311.
**Author for correspondence fax 617-278-6921; e-mail dsacks@rics.bwh.harvard.edu.*
Una Approved Guideline of the National Academy of Clinical Biochemistry "Laboratory Medicine Practice Guideline". Queste linee guida sono state revisionate dal Professional Practice Committee della American Diabetes Association (ADA) nel Giugno 2001 e sono risultate conformi a quanto l'ADA ha pubblicato delle Clinical Practice Recommendations. Le Clinical Practice Recommendations dell'ADA, vengono aggiornate ogni anno, e deve essere consultata la più recente versione.
Presentata in parte, il 25 giugno 2000 al Meeting annuale della American Association for Clinical Chemistry.
Ricevuto 17 Dicembre, 2001; accettato 21 Dicembre, 2001.

***Queste linee guida sono state tradotte con il permesso degli autori e di Clinical Chemistry da Romolo M. Dorizzi, Mariarosa Carta e Grazia Ferrai. Revisione di Roberto Testa.**

Contenuto: Molti esami di laboratorio vengono usati nella diagnosi e nella gestione del paziente con diabete mellito. La qualità dell'evidenza scientifica a sostegno dell'uso di questi esami è molto diversa.
Approccio: Un comitato d'esperti ha tracciato una prima stesura di una serie di raccomandazioni basate sull'evidenza per l'uso degli esami di laboratorio nei pazienti con diabete. Un gruppo esterno d'esperti ha rivisto la prima stesura delle linee guida che è stata modificata seguendo i suggerimenti dei revisori. Il documento revisionato è stato reso disponibile in Internet ed è stato presentato al Meeting Annuale dell'AACC nel Luglio 2000. Le raccomandazioni sono state modificate ancora in risposta a commenti verbali o scritti. Il Professional Practice Committee of the American Diabetes Association ha fatto una revisione finale delle linee guida.
Contenuto: La misurazione del glucosio plasmatico resta l'unico criterio diagnostico per il diabete. Il monitoraggio del controllo glicemico è eseguito dai pazienti, che misurano la propria concentrazione di glucosio nel plasma o nel sangue con misuratori portatili, o dal laboratorio con la misurazione dell'emoglobina glicata. Viene affrontato il ruolo potenziale di monitoraggio glicemico non invasivo, di ricerche genetiche, autoanticorpi, microalbuminuria, proinsulina, C-peptide, ed altre analisi.
Riassunto: Le linee guida forniscono specifiche raccomandazioni basate su dati pubblicati o derivate dal consenso d'esperti. Numerosi analiti hanno, al momento, un valore clinico minimo e la loro misurazione non è raccomandata.

Linee guida sintetiche

Le linee guida seguenti forniscono raccomandazioni basate sulla migliore evidenza disponibile ricavata da dati pubblicati o approvata degli esperti.

GLUCOSIO

Laboratori accreditati

Per stabilire la diagnosi di diabete e per individuare i soggetti ad alto rischio, il glucosio deve essere misurato in un laboratorio accreditato. L'analisi in un laboratorio accreditato non è raccomandata come la

procedura prioritaria per un monitoraggio routinario o per valutare la terapia negli individui con diabete. Il sangue deve essere prelevato dopo che il soggetto ha digiunato tutta la notte. Se il plasma non può essere separato dagli elementi corpuscolati entro 60 minuti, è necessario usare una provetta contenente un inibitore della glicolisi. Il glucosio deve essere misurato nel plasma. Sebbene i metodi per l'analisi del glucosio mostrino una bassa imprecisione ai limiti decisionali diagnostici di 7.0 mmol/L [(126 mg/dL), a digiuno] e di 11.1 mmol/L [(200 mg/dL), dopo carico di glucosio], la variabilità biologica intraindividuale relativamente ampia (CV di ~ 5-7%) può generare errori di classificazione. Sulla base della variabilità biologica, la determinazione del glucosio deve avere imprecisione analitica <3.3%, bias <2.5% ed errore totale <7.9%.

Misuratori portatili

I misuratori portatili sono usati dagli operatori sanitari nelle strutture per pazienti acuti e cronici, negli ambulatori medici e dai pazienti. A causa dell'imprecisione e della variabilità fra misuratori portatili, questi non devono essere usati per la diagnosi di diabete e hanno un valore limitato nello screening.

L'autocontrollo glicemico (SMBG) è raccomandato per tutti i pazienti trattati con insulina. Deve essere eseguito almeno tre volte al giorno nei pazienti con diabete di tipo 1. L'efficacia del SMBG nei pazienti con diabete di tipo 2 non è stata stabilita.

Sono stati proposti molteplici obiettivi per le prestazioni dei misuratori portatili. Questi obiettivi variano ampiamente e non esiste consenso su quale scegliere. Sono necessari studi clinici per determinare questi obiettivi analitici. Noi raccomandiamo misuratori portatili che misurano e refertano la concentrazione del glucosio plasmatico.

Test di tolleranza al carico orale di glucosio (OGTT)

Non raccomandiamo l'OGTT per la diagnosi routinaria di diabete di tipo 1 o 2. Questo argomento è controverso e la WHO sostiene il suo utilizzo. L'elemento limitante dell'OGTT è la sua scarsa riproducibilità. Coloro che lo sostengono, tuttavia, affermano che esso ha una sensibilità leggermente più alta rispetto al glucosio a digiuno nel diagnosticare il diabete.

Analisi del glucosio non invasive o minimamente invasive

Le analisi del glucosio non invasive non si possono, al momento, raccomandare in sostituzione del SMGB od alle misurazioni del glucosio presso un laboratorio accreditato. Sebbene siano promettenti, gli studi clinici su di esse rimangono limitati. Varie metodologie sono disponibili, ma gli obiettivi delle performance analitiche non sono stati definiti.

CHETONI

I chetoni devono essere misurati nelle urine e nel sangue dei pazienti con diabete, a casa ed in ospedale, come complemento alla diagnosi di diabete chetoacidosico (DKA). I metodi basati sulla reazione al nitroprussiato non devono essere usati per monitorare il trattamento del DKA. Anche se è possibile la misurazione specifica del β-idrossibutirrato, ulteriori studi sono necessari per accertare se questa offra vantaggi clinici.

EMOGLOBINA GLICATA (GHb)

La GHb deve essere misurata almeno due volte all'anno in tutti i pazienti con diabete per documentare il loro controllo glicemico. Gli obiettivi del trattamento devono basarsi sul risultato di trial clinici prospettici randomizzati, come Diabetes Control and Complications Trial (DCCT), che documenta la relazione fra controllo glicemico (quantificato dall'analisi dell'GHb) ed il rischio per lo sviluppo e la progressione delle complicazioni croniche del diabete.

I laboratori degli Stati Uniti devono usare metodi per GHb certificati dal National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) che assicurano la tracciabilità al metodo di riferimento DCCT. La concentrazione di GHb deve essere mantenuta ad un valore <7 %, e la terapia deve essere modificata se l'GHb, misurata con metodi certificati dall'NGSP, è >8%. I laboratori devono partecipare a controlli di qualità. Sono in corso tentativi per raggiungere un'armonizzazione globale dell'analisi GHb, obiettivo davvero importante.

MARCATORI GENETICI

La misurazione routinaria dei marcatori genetici non è al momento raccomandata per la diagnosi e la gestione del paziente con diabete.

MARCATORI AUTOIMMUNITARI

Molti autoanticorpi sono stati individuati nei soggetti con diabete di tipo 1. Comunque, hanno scarsa specificità, e non sono raccomandati per la diagnosi routinaria o lo screening del diabete. Fintanto che il diabete di tipo 1 non può essere prevenuto, la misurazione degli autoanticorpi anti cellule insulari, deve essere essenzialmente confinata ai protocolli di ricerca.

MICROALBUMINURIA

Il diabete è la principale causa di patologie renali allo stadio terminale. La microalbuminuria deve essere misurata ogni anno in pazienti senza proteinuria clinica. Per essere utili, i test di screening semiquantitativi o qualitativi, devono dimostrare di essere positivi in >95% dei pazienti con microalbuminuria. I risultati positivi di tali esami devono essere confermati mediante esami quantitativi in laboratori accreditati.

MISCELLANEA DI ANALITI POTENZIALMENTE IMPORTANTI

Molti altri analiti sono misurati nei pazienti con diabete. Tutti i soggetti adulti con diabete devono eseguire ogni anno il profilo lipidico. Per la maggior parte dei pazienti con diabete esami come insulina, C-peptide, o proinsulina non hanno nessun ruolo. Questi esami sono utili soprattutto in ricerca. Analogamente esami come amilina e leptina non sono attualmente utili nella gestione dei pazienti con diabete.

Introduzione

Per diabete mellito s'intende un gruppo di disordini del metabolismo dei carboidrati in cui il glucosio è poco utilizzato determinando iperglicemia. La malattia è classificata in diverse categorie. La revisione della classificazione, pubblicata nel 1997 (1) è mostrata nella tabella I. Il diabete mellito di tipo 1, precedentemente noto come diabete mellito insulino-dipendente o diabete mellito ad insorgenza giovanile, è causato dalla distruzione autoimmune delle β-cellule del pancreas, rendendo il pancreas inabile alla sintesi e alla secrezione d'insulina (2). Il diabete mellito di tipo 2, noto come diabete mellito non-insulino dipendente o diabete ad insorgenza nell'adulto, risulta dalla combinazione dell'insulino resistenza e di un'inadeguata secrezione insulinica (3, 4). Altri tipi di diabete sono rari. Il tipo 2 è il più comune, e comprende il 90-95% dei casi di diabete nei paesi sviluppati.

Nel 1992, i costi per il diabete negli Stati Uniti sono stati stimati essere pari a 98 miliardi di dollari (5). La media annuale dei costi pro-capite per cure sanitarie per un individuo con diabete, era approssimativamente quattro volte più alta che negli individui che non hanno il diabete (5). Analogamente, nel Regno Unito, il diabete consuma approssimativamente il 10% del budget del servizio sanitario nazionale (49 miliardi di sterline).

Gli alti costi per il diabete sono attribuibili alle cure per le condizioni acute (come l'ipoglicemia e la chetoacidosi) e le complicanze debilitanti (6). Queste ultime comprendono sia le complicanze, microvascolari- più frequentemente retinopatia, nefropatia, e neuropatia- che le complicanze macrovascolari, in particolare ictus e coronaropatie (CAD).[8] Assieme queste fanno del diabete la settima più comune causa di morte nel mondo sviluppato (7).

Tabella I. Classificazione del diabete mellito.[a]

Diabete di tipo 1
A. Immunomediato
B. Idiopatico
Diabete di tipo 2
Altri tipi specifici
Difetti genetici della funzione delle β-cellule
Difetti genetici dell'azione dell'insulina
Patologie del pancreas esocrino
Endocrinopatie
Indotto da farmaci o sostanze chimiche
Infezioni
Forme non comuni di diabete immuno-mediato (IMD)
Altre sindromi genetiche talora associate a diabete
GDM

[a]Tratto da ADA (1).

L'American Diabetes Association (ADA) pubblica nel gennaio di ogni anno un supplemento di Diabetes Care dal titolo Clinical Practice Recommendations. Si tratta di una raccolta di tutti i "position paper" (le raccomandazioni ufficiali) dell'ADA in relazione alla pratica medica, e costituisce un'importante risorsa per i sanitari che si occupano di diabetici. La National Academy of Clinical Biochemestry ha preparato delle linee guida basate sull'evidenza per la pratica della medicina di laboratorio. Le linee guida in questo documento sono basate sulla migliore evidenza pubblicata. Sono stati valutati tutti gli analiti in teoria usabili nella diagnosi e nella gestione dei pazienti con diabete. Le risultanti linee guida, destinate ai laboratoristi e a chi si occupa di assistenza, sono state esaminate dall'ADA Professional Practice

[8]Abbreviazioni non standardizzate: CAD, coronary artery disease (patologia delle arterie coronariche); ADA, American Diabetes Association; FPG, fasting plasma glucose (glicemia a digiuno); OGTT, oral glucose tolerance test (Test di tolleranza al carico orale di glucosio); GHb, glycated hemoglobin (emoglobina glicata); CAP, College of American Pathologists; CI, confidence interval (intervallo di confidenza); DKA, Diabetic Ketoacidosis (Chetoacidosi diabetica); SMBG, self-monitoring of blood glucose (autocontrollo diabetico); GDM, gestational diabetes mellitus (diabete mellito gestazionale); DCCT, Diabetes Control and Complications Trial; UKPDS, United Kingdom Prospective Diabetes Study; NHANES, National Health and Nutrition Examination Survey; IGT, impaired glucose tolerance (tolleranza glicemica ridotta); IFG, imparied fasting glucose (glicemia a digiuno alterata); FDA, Food and Drug Administration; AcAc, acetoacetate (acetoacetato); bHBA, b-hydroxybutyrate b-idrossibutirrato); Hb, hemoglobin (emoglobina); NGSP, National Glycohemoglobin Standardization Program; IMD, immune-mediated diabetes (diabete immuno-mediato); MODY, maturity onset diabetes of youth (diabete giovanile ad insorgenza nell'adulto); HNF, hepatocyte nuclear factor (fattore nucleare epatocitico); IPF-1, insulin promoter factor-1 (fattore promovente l'insulina 1); ICA, islet-cell cytoplasm antibody (anticorpi anti-cellule insulari); IAA, insulin autoantibody (autoanticorpi anti-insulina); GAD65, 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase (isoforma a 65-kDa delle decarbossilosi dell'acido glutammico); IA, insulinoma- associated antigen (antigene associato all'insulinoma); JDF, Juvenile Diabetes Foundation; apo, apolipoprotein (apolipoproteina); POCT = Point-of-care-testing.

Tabella II. Sistema di punteggio dell'evidenza delle raccomandazioni ADA per la pratica medica.

Livello di evidenza	Descrizione
A	Evidenza chiara ricavata da trial controllati randomizzati, ben condotti, generalizzabili, con potenza statistica adeguata che comprende: Evidenza da trial multicentrici ben condotti Evidenza da metanalisi che comprendono una valutazione della qualità dell'analisi. Evidenza non sperimentale convincente, basata per esempio sulla regola "tutto o niente" sviluppata dal Center for Evidence Based Medicine at Oxford[a] Evidenze da trial controllati ben condotti, randomizzati, con potenza statistica adeguata, che comprende: Evidenza da un trial controllato ben condotto da uno o più centri Evidenza da una metanalisi che comprende una valutazione della qualità dell'analisi
B	Supportata da evidenze da studi ben condotti a coorti Evidenze da uno studio prospettico a coorti o a registrazioni ben condotto Evidenze da uno studio prospettico a coorti ben condotto Evidenze da una metaanalisi ben condotta di studi a coorti Supportata da evidenze da uno studio caso-controllo ben condotto
C	Supportata da evidenza da studi poco controllati o non controllati Evidenza da trial clinici randomizzati con uno o più difetti metodologici gravi o tre o più difetti lievi che potrebbero invalidare i risultati Evidenza da studi osservazionali con alto potenziale di bias (come serie di casi confrontati con controlli storici) Evidenza da una serie di casi o relazioni su casi Evidenza contrastante, con prevalenza dell'evidenza a favore delle raccomandazioni
E	Consenso di esperti o esperienza clinica

[a] O tutti i pazienti sono morti prima della terapia o almeno qualcuno è sopravvissuto con la terapia, o qualche paziente è morto senza terapia e nessuno è morto con la terapia. Esempio: Uso di insulina nel trattamento del DKA

Committee e sono risultate conformi in quelle aree dove l'ADA ha pubblicato le Clinical Practice Recommandations. Le linee guida in questo documento non intendono sostituire le raccomandazioni dell'ADA. L'obiettivo è quello di integrare le raccomandazioni ADA, con particolare attenzione agli aspetti del diabete che riguardano il laboratorio.

L'ADA ha sviluppato un sistema che quantifica la qualità dell'evidenza scientifica (Tabella II). Questo schema è stato usato in questo documento per descrivere la qualità dell'evidenza e sulla quale si basa ciascuna raccomandazione. Il punteggio va da A fino a C, dove A rappresenta la massima qualità dell'evidenza. La categoria E, opinione di esperti, è usata per raccomandazioni, per le quali non è disponibile l'evidenza di studi clinici, o dove è stata pubblicate evidenze conflittuali. Per facilitare la comprensione ed assistere il lettore, ciascun analita è diviso in più capitoli e sottocapitoli. Questi sono: impiego (diagnosi, screening, monitoraggio e prognosi), razionale (diagnosi e screening), considerazioni analitiche [preanalitiche (inclusi valori di riferimento) ed analitici (come i metodi)], interpretazione (compresa frequenza di misurazione, il turnaround time), e dove sono applicabili, considerazioni emergenti che informano il lettore in merito agli studi in corso e ai potenziali aspetti rilevanti futuri per questo analita.

Glucosio

USO

Diagnosi/ Screening

Raccomandazione: il Glucosio deve essere misurato nel plasma, presso laboratori accreditati, per stabilire la diagnosi di diabete.

Livello di evidenza: A

Il Glucosio deve essere misurato nel plasma, presso laboratori accreditati, per lo screening dei soggetti ad alto rischio.

Livello di evidenza: E

L'analisi in laboratori accreditati non è necessaria per il monitoraggio di routine.

Livello di evidenza: E

La diagnosi di diabete è stabilita esclusivamente con la documentazione di iperglicemia (aumento della concentrazione di glucosio nel plasma). Nel 1997, i criteri diagnostici (8) furono modificati (1) per meglio identificare individui ad alto rischio di retinopatia e neuropatia. I criteri attuali includono: (a) Sintomi di diabete e occasionale (vale a dire, indipendentemente dal tempo trascorso dal pasto precedente) glicemia plasmatica >11.1 mmol/L (200 mg/dL); (b) Glicemia plasmatica a digiuno (FPG) >7.0 mmol/L (126

mg/dL); o (c) glicemia 2-ore dopo il pasto >11.1 mmol/L (200 mg/dL) durante un test di tolleranza da carico orale di glucosio (OGTT) (1). Se qualcuno di questi tre criteri è soddisfatto, per formulare la diagnosi è necessario, riconfermare il dato con la ripetizione dell'esame in un giorno successivo. (Nota che la ripetizione dell'esame non è necessaria nei pazienti che hanno un'iperglicemia inequivocabile con scompenso metabolico acuto). Anche se compreso nei criteri, l'OGTT non è raccomandata per un uso clinico di routine in soggetti non in gravidanza (vedi di seguito).
Lo screening della popolazione per il diabete di tipo 2, precedentemente controverso, è ora raccomandato per coloro che sono a rischio di sviluppare la malattia (1, 9). L'ADA propone che l'FPG debba essere misurata in tutte le persone con >45 anni d'età. Se i risultati sono <6.1 mmol/L (110 mg/dL), la determinazione deve essere ripetuta ad intervalli di 3 anni. Lo screening deve essere preso in considerazione ad età inferiore più giovane o effettuato più frequentemente nei soggetti a maggior rischio di diabete [vedi Ref (1) per le condizioni associate ad aumentato rischio]. A causa dell'incremento della prevalenza del diabete di tipo 2 nei bambini, è stato recentemente proposto lo screening nei bambini (10). Partendo dai 10 anni d'età, la determinazione deve essere effettuata ogni 2 anni nei soggetti sovrappeso e che hanno due altri fattori di rischio, tra cui familiarità, razza/etnia, e sintomi di insulino resistenza (10). Nonostante queste raccomandazioni, dalla letteratura non emerge evidenza dell'utilità del trattamento basato sullo screening. E' stato valutato il costo-beneficio dello screening per i due tipi di diabete. L'incremento del costo per lo screening di tutte le persone sopra i 25 anni è stato stimato 236449 dollari per ogni anno di vita guadagnato e 56649 dollari per ogni anno di vita "quality adjusted" (di qualità standardizzata) (1). E' interessante notare che il rapporto costo-beneficio dello screening è migliore per età più bassa piuttosto che ai 45 anni attualmente raccomandati.

Monitoraggio/Prognosi

Raccomandazione: Anche se vi è evidenza che l'elevata concentrazione plasmatica del glucosio è collegata ad un esito sfavorevole, sono disponibili molti più dati che correlano direttamente l'aumento dell'emoglobina glicata (GHb) con le complicanze del diabete. Misurazioni di routine della concentrazione di glucosio nel plasma in laboratori accreditati, non sono raccomandate come principale misura del monitoraggio o valutazione della terapia negli individui con diabete.

Livello di evidenza: E

Vi è una relazione diretta tra grado di controllo del glucosio plasmatico ed il rischio di successive complicanze renali, retiniche e neurologiche. Questa correlazione è stata dimostrata per il diabete di tipo 1 (12) e più recentemente per il diabete di tipo 2 (13). Pazienti con diabete di tipo 1 che mantenevano una concentrazione media del glucosio plasmatico, più bassa mostravano una incidenza di complicazioni microvascolari, cioè retinopatia diabetica, nefropatia e neuropatia significativamente minore (12). Anche se la terapia insulinica intensiva riduce l'ipercolesterolemia del 34%, il rischio di malattia macrovascolare non era significativamente diminuito. Risultati simili sono stati ottenuti nei pazienti con diabete di tipo 2 (13). Un controllo intensivo del glucosio plasmatico nei pazienti con diabete di tipo 2 riduce significativamente le complicazioni microvascolari, ma non è stata trovata una significativa differenza per le malattie macrovascolari (infarto del miocardio, ictus) (13). In entrambi gli studi, i pazienti del gruppo a trattamento intensivo, mantenevano una concentrazione media del glucosio plasmatici più bassa. L'analisi degli esiti erano correlati con GHb, che era usata per valutare il controllo glicemico, piuttosto che con la concentrazione del glucosio. Inoltre, la maggior parte dei clinici usa le raccomandazioni dell'ADA, che definiscono una determinata concentrazione di GHb come obiettivo per un controllo glicemico ottimale (14).
Vi sono alcune evidenze che correlano direttamente l'alta concentrazione di glucosio con una prognosi sfavorevole. Per esempio, la sopravvivenza dopo 10 anni in una popolazione di 6681 soggetti in una cittadina giapponese era ridotta se l'FPG era >7.8 mmol/l (140 mg/L). Simile riscontro fu ottenuto in 1939 pazienti con diabete di tipo 2, seguiti per una media di 15 anni; una regressione logistica multipla ha rilevato che il rischio di morte era aumentato significativamente nei pazienti con FPG >7.8 mmol/L (140 mg/dL) (16). Pazienti con diabete di tipo 2 con FPG >7.8 mmol/L (140 mg/dL) hanno una mortalità cardiovascolare aumentata (17). Inoltre, il confronto di 300 pazienti al primo infarto miocardico e 300 controlli appaiati, ha mostrato che un moderato incremento di FPG era un fattore di rischio per infarto (18). Nonostante queste osservazioni, né la concentrazione di glucosio misurata nel corso della giornata, né a digiuno, deve essere determinata in un laboratorio accreditato come mezzo principale per il monitoraggio routinario dei pazienti con il diabete. La determinazione del glucosio plasmatico in laboratorio può essere usata come supplemento d'informazione degli altri dosaggi, per valutare l'accuratezza dell'autocontrollo (vedi dopo), o quando viene modificata la posologia dell'agente ipoglicemizzante orale (9). Inoltre, pazienti con un diabete di tipo 2 ben controllato che non sono in terapia insulinica possono essere monitorati con misurazioni periodiche del FPG, anche se l'analisi non deve essere eseguita necessariamente in laboratori accreditati (19, 20).

RAZIONALE

Diagnosi
L'alterato metabolismo dei carboidrati che sta alla

base del diabete si manifesta con l'iperglicemia. Quindi la misurazione del glucosio nel plasma è l'unico criterio diagnostico. Questa strategia è indiretta poiché l'iperglicemia riflette la conseguenza della alterazione metabolica e non la causa. Tuttavia, fino a quando non sarà riconosciuta la fisiopatologia molecolare della malattia, è probabile che la concentrazione del glucosio nel plasma rimanga una modalità diagnostica essenziale.

Screening

Lo screening è raccomandato per numerose ragioni. Si stima che il diabete di tipo 2 inizi circa 4-7 anni prima della diagnosi clinica (21), ed evidenze epidemiologiche indicano che le complicanze possono cominciare molti anni prima della diagnosi clinica. Inoltre, negli Stati Uniti almeno il 30% delle persone con diabete di tipo 2 non è diagnosticato (22). Nonostante questa raccomandazione, non vi è evidenza che lo screening della concentrazione plasmatica del glucosio della popolazione produca qualche beneficio. Per giustificare lo screening devono essere eseguiti studi sui risultati e sugli effetti (*outcome*).

CONSIDERAZIONI ANALITICHE

Fase preanalitica

> Raccomandazione: Il sangue per l'analisi del glucosio plasmatico deve essere prelevato dopo che la persona ha digiunato per una notte (almeno 8 ore). Il plasma deve essere separato dalle cellule entro 60 minuti; se questo non è possibile, per raccogliere il sangue deve essere usata una provetta contenente un inibitore della glicolisi come il fluoruro di sodio.
>
> Livello di evidenza: B

Il sangue deve essere prelevato al mattino dopo una notte di digiuno [nessuna assunzione di calorie nelle ultime 8 ore, durante questo tempo il soggetto può consumare acqua a volontà (1)]. Recenti evidenze hanno rilevato una variazione del FPG nel corso della giornata, con valori medi di FPG più alti nel mattino che nel pomeriggio; ciò significa che molti casi non diagnosticati di diabete non sarebbero stati individuati se i pazienti fossero stati esaminati nel pomeriggio (23). La concentrazione del glucosio diminuisce con il tempo nel sangue intero una volta prelevato a causa della glicolisi. E' stato segnalato che la velocità della glicolisi, è in media del 5-7% [circa 0.6 mmol/L (10 mg/L) per ora (24) e varia con la concentrazione del glucosio, la temperatura, il numero di globuli bianchi ed altri fattori (25). La glicolisi può essere ridotta da inibitori dell'enolasi con fluoruro di sodio (2.5 mg di fluoruro/mL di sangue) o meno comunemente, iodoacetato di litio (0.5 mg/mL di sangue). Questi reagenti si possono usare da soli o, più comunemente, con anticoagulanti come l'ossalato di potassio, EDTA, citrato o litio eparina. Anche se il fluoruro mantiene stabile il glucosio a lungo, la velocità di diminuzione del glucosio nella prima ora successiva alla raccolta del campione in provette con e senza fluoruro è virtualmente identica. (24). (Notare che la leucocitosi può aumentare la glicolisi anche in presenza di fluoruro se il numero di globuli bianchi è molto alto). Dopo 4 ore, la concentrazione del glucosio è stabile nel sangue intero per 72 ore a temperatura ambiente in presenza di fluoruro (24). Nel siero separato, non emolizzato, sterile, senza fluoruro, la concentrazione del glucosio è stabile per 8 ore a 25 °C e 72 ore a 4 °C (26).

Il glucosio può essere misurato nel sangue intero, nel siero o nel plasma, ma il plasma è raccomandato per la diagnosi. La molalità del glucosio (vale a dire, la quantità di glucosio per unità di massa d'acqua) nel sangue intero e nel plasma è identica. Anche se i globuli rossi del sangue sono essenzialmente permeabili liberamente al glucosio (il glucosio entra per trasporto facilitato), la concentrazione dell'acqua (Kg/L) nel plasma è circa 11% più alta che nel sangue intero. Quindi, le concentrazioni del glucosio nel plasma sono circa 11% più alte che nel sangue intero se l'ematocrito è normale. Le concentrazioni del glucosio nel sangue eparinizzato sono riportate essere 5% più basse che nel siero (27). Le ragioni di quest'ultima differenza non sono chiare, ma possono essere attribuibili al passaggio nei fluidi dagli eritrociti al plasma a causa causato dagli anticoagulanti. Le concentrazioni del glucosio nel sangue capillare durante un OGTT sono significativamente più alte di quelle nel sangue venoso [media di 1.7 mmol/L (30 mg/dL), equivalente al 20-25% (28)] ma la differenza media nei campioni a digiuno è di solo di 0.1 mmol/L (2 mg/dL) (28) (29).

Valori di riferimento. Le concentrazioni del glucosio negli individui sani variano con l'età. Gli intervalli di riferimento nei bambini sono 3.3 - 5.6 mmol/L (60-100 mg/dL), simili all'intervallo degli adulti, di 4.1- 5.9 mmol/L (74-106 mg/dL) (26). E' da notare per la diagnosi di diabete sono usati i criteri dell'ADA (1), non gli intervalli di riferimento. Inoltre, la soglia per la diagnosi di ipoglicemia è variabile. I valori di riferimento non sono utili per la diagnosi di queste condizioni. Negli adulti, il glucosio plasmatico medio a digiuno aumenta con l'aumentare dell'età dalla terza alla sesta decade (30), ma non vi sono aumenti significativi dopo i 60 anni (31, 32). L'evidenza di un'associazione con l'incremento dell'insulino resistenza con l'età non è confermata (33).

Fase analitica

> Raccomandazione: I metodi enzimatici per l'analisi del glucosio sono relativamente ben standardizzati. Malgrado la bassa imprecisione ai limiti decisionali diagnostici di 7.0 mmol/L (126 mg/dL) e 11.1 mmol/L (200 mg/dL), si possono verificare errori di classificazione. A causa della variabilità biologica intraindividuale relativamente ampia (CV di circa 5-7%), i valori di FPG di 5.8-6.9 mmol/L (105-125 mg/dL), devono essere confermati e deve essere considerato un follow up ad intervallo più breve di quello di tre anni attualmente raccomandato dall'ADA per i soggetti con FPG di 5.3-5.7 mmol/L (96-104 mg/dL).
>
> Livello di evidenza: E

Il glucosio è misurato quasi esclusivamente con metodi enzimatici. L'analisi del Programma di Verifica Esterna di Qualità gestito dal College of American Pathologists (CAP) ha rivelato che l'esochinasi o la glucosio ossidasi sono usati virtualmente in tutte le analisi eseguite negli Stati Uniti (26). Pochi laboratori (circa l'1%) usano la glucosio deidrogenasi. Alla concentrazione plasmatica di circa 8.2 mmol/L (147 mg/dL), l'imprecisione tra laboratori che usano lo stesso metodo aveva un CV < 4%, escludendo i metodi basati sulla glucosio deidrogenasi (26). Risultati analoghi sono stati riportati per l'analisi del glucosio nei campioni da pazienti. Per esempio, il confronto dei campioni di plasma di 240 pazienti ha rilevato una differenza del 5% nella concentrazione media del glucosio misurata con il metodo dell'esochinasi e della glucosio ossidasi. (34).

Non è stato raggiunto il consenso sugli obiettivi per l'analisi del glucosio. Numerosi criteri sono stati proposti per stabilire i goal analitici. Questi comprendono opinioni di esperti (consensus conferences), opinioni di clinici, regolamenti, stato dell'arte e variabilità biologica (35). Una raccomandazione razionale e realistica che ha ricevuto qualche sostegno è l'uso dei criteri biologici come base per i goal analitici. E' stato suggerito che l'imprecisione non deve superare la metà del CV biologico intra-soggetto (36, 37). Per il glucosio plasmatico, è stato suggerito come obiettivo per l'imprecisione un CV < 2.2%, con un bias dello 0% (37). Anche se questa raccomandazione è stata proposta per l'errore intra-laboratorio, è desiderabile ottenere questo obiettivo per l'imprecisione interlaboratorio per minimizzare le differenze tra laboratori nella diagnosi di diabete negli individui la cui concentrazione di glucosio è prossima ai valori soglia. Quindi, il goal per l'analisi del glucosio deve essere di minimizzare l'errore analitico totale, e i metodi non devono presentare un bias misurabile. Deve essere sviluppato un programma nazionale che usi campioni (come plasma fresco congelato) che eliminino l'effetto matrice per contribuire al conseguimento di questo obiettivo.

INTERPRETAZIONE

La conoscenza della variabilità intraindividuale delle concentrazioni del FPG è essenziale per comprendere correttamente i valori del paziente. Un primo studio, in cui l'OGTT era ripetuto in 31 adulti non diabetici a 48 ore d'intervallo, ha rilevato che l'FPG variava di <10% in 22 partecipanti (77%) e di <20% in 30 partecipanti (97%) (38). La variazione biologica comprende variazione entro e tra i soggetti. Un'accurata valutazione eseguita per molti giorni consecutivi ha rivelato che la variazione intraindividuale del FPG in soggetti sani [glucosio medio, 4.9 mmol/L (88 mg/dL)] mostrava dei CV nei e tra i soggetti di 4.8-6.1% e 7.5-7.8%, rispettivamente (39, 40). Studi più estesi hanno rilevato dei CV di 6.4-6.9% per l'FPG in 246 soggetti apparentemente sani (41) e in 193 pazienti con diabete di tipo 2 non trattati alla prima diagnosi (42). Questo secondo studio che misurava l'FPG con la glucosio ossidasi (CV intra- e interdosaggio <2%) in due giorni consecutivi, ha ottenuto intervalli di confidenza al 95% (CI) di + 14.8% per la variabiltà totale e + 13.7% per la variabilità biologica. Se un CV (biologico) di 6.9% è applicato ad una vera concentrazione di glucosio di 7.0 mmol/L (126 mg/dL), il CI 95% deve comprendere le concentrazioni di glucosio di 6.1-7.9 mmol/L (109-143 mg/dL). Se il CV dell'analisi del glucosio (circa 4%) viene compreso, il CI 95% è approssimativamente + 18%. In questo modo, il CI 95% per la concentrazione del glucosio a digiuno di 7.0 mmol/L (126 mg/dL) deve essere 7.0 mmol/L + 18% (126 mg/dL + 18%), cioè 5.7-8.3 mmol/L (103-149 mg/dL). L'uso di un'imprecisione analitica del 4% (CV) (escludendo la variabilità biologica) produrrebbe un CI 95% fra laboratori di 6.4-7.6 mmol/L (116-136 mg/dL), per una concentrazione vera di 7.0 mmol/L (126 mg/dL). Si deve ricordare che questi intervalli comprendono il 95% degli individui e che gli altri individui sono fuori da questo intervallo. La variabilità biologica è molto più grande della variabilità analitica. Usando la variabilità biologica come base per derivare le caratteristiche delle prestazioni analitiche (35), Ricos et al. (43) hanno proposto le seguenti specifiche desiderabili per il glucosio: imprecisione analitica < 3.3%, bias < 2.5%, ed errore totale < 7.9%.

Di solito non è necessario un tempo di risposta breve per l'analisi del glucosio per la diagnosi di diabete. In alcune situazioni cliniche, come episodi di iper o ipoglicemie acute in dipartimento di emergenza o nel trattamento della chetoacidosi diabetica (DKA), è desiderabile un'analisi rapida. E' stato proposto (44) un tempo di risposta di 30 minuti. Tuttavia, questo valore è basato sulle richieste dei clinici, e non sono stati pubblicati dati di outcome (risultati) per sostenere questo valore. La gestione del paziente diabetico ricoverato può richiedere in certe occasioni un tempo di risposta rapido (minuti, non ore). Il monitoraggio al letto del malato con misuratori portatili di glucosio (vedi di seguito) è stato usato da molti come soluzione pratica (45).

Frequenza di misurazione. La frequenza delle misurazioni del glucosio plasmatico è dettata dalla situazione clinica. L'ADA raccomanda che un aumento dell' FPG o un OGTT alterato devono essere confermati per fare la diagnosi di diabete (1). Lo screening con FPG è raccomandato ogni 3 anni se risulta <6.1 mmol/L (< 110 mg/dL), più frequentemente nelle persone ad alto rischio; tuttavia, la frequenza dell'analisi in quest'ultimo gruppo non è specificata. Il monitoraggio è compiuto dal paziente stesso, che misura il glucosio con misuratori portatili, e con la determinazione del GHb presso laboratori accredita-

ti (vedi di seguito). Intervalli appropriati fra la misurazione del glucosio in situazioni cliniche acute (per esempio, pazienti in ospedale o con DKA o ipoglicemia neonatale) sono molto variabili, e possono andare da 30 minuti a > 24 ore.

CONSIDERAZIONI EMERGENTI

Per analisi non invasive o minimalmente invasive per il glucosio vedere di seguito.

Misuratori portatili

I misuratori portatili per la determinazione della concentrazione del glucosio nel sangue sono usati principalmente in tre situazioni a) in strutture per acuti o cronici (al letto del malato, in clinica o in ospedale); b) nell'ambulatorio medico; c) dal paziente stesso a casa, al lavoro, e a scuola. In quest'ultimo caso, l'automonitoraggio del glucosio ematico (Self-Monitoring of Blood Glucose) (SMGB), è eseguito almeno una volta al giorno rispettivamente da 40% e 26% dei pazienti con diabete di tipo 1 e 2, negli Stati Uniti (46). Il mercato mondiale per l'SMBG è di 2.7 miliardi di dollari per anno, con un incremento annuo stimato del 12% (47). L'ADA elenca le seguenti indicazioni per SMBG: a) raggiungere e mantenere il controllo glicemico; b) prevenire e rivelare l'ipoglicemia; c) evitare l'iperglicemia grave; d) adattarsi ai cambiamenti nello stile di vita; (e) determinare la necessità di iniziare la terapia insulinica nel diabete mellito gestazionale (GDM) (48). E' raccomandato che tutti gli individui con diabete, cerchino di raggiungere e mantenere la concentrazione del glucosio ematico il più vicino possibile a quella propria degli individui non diabetici senza rischiare l'ipoglicemia (14).

USO

Diagnosi/screening

> Raccomandazione: Non sono stati pubblicati dati a supporto del ruolo dei misuratori portatili nella diagnosi del diabete o per lo screening della popolazione. L'imprecisione dei misuratori portatili, insieme alle sostanziali differenze tra i misuratori portatili stessi, ne preclude l'uso nella diagnosi del diabete e limita la loro utilità nello screening per il diabete.
>
> Livello di evidenza: E

I criteri per la diagnosi del diabete sono basati sui dati di "outcome" (rischio di patologie micro e macrovascolari) correlati con la concentrazione plasmatica di glucosio, sia a digiuno che due ore dopo carico di glucosio, misurati in laboratori accreditati (1). Nei misuratori portatili viene usato il sangue intero. Nonostante molti misuratori portatili siano stati programmati per dare come risultato la concentrazione plasmatica del glucosio, l'imprecisione dei misuratori portatili odierni (vedi di seguito) preclude il loro uso nella diagnosi di diabete. Analogamente, lo screening con i misuratori portatili, anche se interessante per comodità, facilità ed accessibilità, potrebbe generare falsi positivi e falsi negativi.

Monitoraggio/prognosi

> Raccomandazione: l'SMGB è raccomandato per tutti i pazienti con diabete in trattamento insulinico.
> Per i pazienti con diabete di tipo 1, SMGB è raccomandato tre o più volte al giorno. L'SMGB può essere desiderabile in pazienti trattati con sulfanilurea o altri farmaci stimolatori della secrezione di insulina ed in tutti i pazienti che non raggiungono gli obiettivi di concentrazione di glucosio.
>
> Livello di evidenza: B
>
> Nei pazienti con diabete di tipo 2, l'SMGB può aiutare ad ottenere un controllo migliore, in particolare quando la terapia è iniziata o cambiata. Tuttavia, non ci sono dati a supporto di questo concetto. Il ruolo del SMBG nei pazienti con diabete di tipo 2 stabile controllato con la dieta è sconosciuto.
>
> Livello di evidenza: C

L'SMBG è raccomandato per tutti i pazienti con diabete che assumono insulina. Un controllo glicemico rigido può diminuire le complicazioni microvascolari nei pazienti con diabete di tipo 1 (12) o diabete di tipo 2 (13). Un controllo intensivo del glucosio plasmatico nei pazienti con diabete di tipo 1 è stato raggiunto nel Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) i cui partecipanti effettuavano l'SMGB almeno quattro volte al giorno (12). La terapia nei pazienti con diabete di tipo 2 nello United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) (13) è stata regolata in funzione della concentrazione FPG; l'SMBG non è stato valutato.

Faas et al (49) hanno analizzato 11 studi, pubblicati tra 1976 e il 1996, che valutavano l'SMBG in pazienti con diabete di tipo 2. Solamente uno degli studi pubblicati riferiva che l'SMBG produce un miglioramento significativo, cioè una GHb più bassa. Gli autori dello studio conclusero che l'efficacia dell'SMBG nel diabete di tipo 2 è discutibile (49). Una simile conclusione è stata raggiunta da una recente metanalisi (50) e da un campione di pazienti con diabete di tipo 2 nella National Health e Nutrition Examination Survery (NHANES) (51). Anche se l'SMBG può essere utile all'inizio o al cambio della terapia in pazienti con diabete di tipo 2, sono necessari studi clinici per definire il suo ruolo nell'outcome (i risultati) nei pazienti con diabete di tipo 2.

RAZIONALE

L'SMBG permette ai pazienti con diabete di raggiungere e mantenere specifici obiettivi glicemici. La conoscenza della concentrazione del glucosio plasmatico o ematico è necessaria per i pazienti che necessitano di insulina, in particolare per quelli con diabete

di tipo 1, al fine di determinare le appropriate dosi di insulina nelle differenti ore nel giorno (48). I pazienti regolano la quantità di insulina basandosi sulla loro concentrazione plasmatica o ematica di glucosio. Un SMBG frequente è particolarmente importante per un controllo rigido nel diabete di tipo 1.

L'ipoglicemia è la complicanza principale e potenzialmente letale nel trattamento del diabete. Il rischio di ipoglicemia aumenta significativamente con terapie farmacologiche dirette al mantenimento della glicemia il più possibile vicina a quella trovata nei soggetti non diabetici (12,13). In trial clinici su pazienti con diabete di tipo 1 e diabete di tipo 2 l'incidenza di episodi di ipoglicemia gravi, richiedenti l'aiuto di terzi o l'intervento del medico, è risultata due o tre volte più alta nel gruppo "intensivo" che nel gruppo "convenzionale" (12,13). Inoltre molti pazienti diabetici, in particolare quelli con diabete di tipo 1, persero i sintomi autonomici involontari di allarme che normalmente precedono la neuroglicopenia ("inconsapevolezza ipoglicemica") (52), aumentando il rischio di ipoglicemia. L'SMBG può essere utile per determinare le ipoglicemie asintomatiche e per permettere ai pazienti di evitare gravi episodi di ipoglicemia.

CONSIDERAZIONI ANALITICHE

Fase preanalitica

Raccomandazione: I pazienti devono essere istruiti al corretto uso dei misuratori portatili di glucosio, compreso il controllo di qualità. Il confronto tra l'SMBG e la corrispondente analisi del glucosio in laboratorio deve essere effettuata ad intervalli regolari per valutare l'accuratezza dei risultati del paziente.

Livello di evidenza: B

Molti fattori possono interferire con l'analisi del glucosio dei misuratori portatili. Molti di questi, come l'applicazione inappropriata del campione, l'errato calcolo del tempo e la scorretta rimozione dell'eccesso di sangue (26) sono stati eliminati dai progressi tecnologici. Importanti variabili che possono influire sul risultato del monitoraggio del glucosio al letto del malato comprendono variazioni dell'ematocrito (53), altitudine, temperatura ambientale o umidità, ipotensione, ipossia, e alta concentrazione di trigliceridi (54). Inoltre, la maggior parte dei misuratori portatili è inaccurata a concentrazioni di glucosio molto alte o molto basse. Un altro fattore importante è la variabilità dei risultati fra differenti misuratori portatili di glucosio. La diversità della tecnologia dei metodi analitici portano a mancanza di correlazione fra i misuratori portatili, anche se prodotti dalla stessa azienda. Infatti, è stato osservato che due misuratori portatili della stessa azienda differiscono sostanzialmente in accuratezza (55, 56). Anche il fattore paziente è importante, particolarmente un adeguato addestramento. La ripetizione delle istruzioni in occasione delle visite cliniche ed il confronto del SMBG con la relativa analisi del glucosio in laboratorio, ha migliorato l'accuratezza dei risultati della misurazione del glucosio nel sangue del paziente (57). In aggiunta, è importante valutare la tecnica del paziente ad intervalli regolari (9).

Fase analitica

Raccomandazione: Sono stati proposti numerosi obiettivi per le prestazioni dei misuratori portatili di glucosio. Questi obiettivi variano ampiamente e sono molto controversi. Non sono stati pubblicati studi che hanno raggiunto gli obiettivi proposti dall'ADA. I produttori devono lavorare per migliorare la precisione dei misuratori portatili.

Livello di evidenza: E

Raccomandiamo misuratori portatili che misurino e la concentrazione del glucosio plasmatici e producano un referto per facilitare il confronto con le analisi eseguite nei laboratori accreditati.

Livello di evidenza: E

Almeno 25 differenti misuratori portatili sono disponibili in commercio e sono stati esaminati dall'ADA's Buyer's Guide to Diabetes Products (58). Praticamente tutti i misuratori portatili usano strisce reattive che contengono glucosio ossidasi o esochinasi. Una goccia di sangue intero viene applicata alla striscia che contiene tutti i reagenti necessari per l'analisi. Alcuni misuratori portatili hanno una membrana porosa che separa gli eritrociti e l'analisi è eseguita sul plasma derivato. I misuratori portatili possono essere calibrati in modo da refertare il valore del glucosio plasmatico, anche se il glucosio è misurato sul sangue intero. Un gruppo di lavoro dell'IFCC ha raccomandato recentemente che i misuratori portatili di glucosio siano armonizzati con la concentrazione del glucosio plasmatico, indipendentemente dal tipo di campione e di tecnologia usati (59). I misuratori portatili usano la fotometria a riflettanza o l'elettrochimica per misurare la velocità di reazione o la concentrazione finale dei prodotti. I misuratori portatili sono provvisti di un display digitale della concentrazione di glucosio. La maggior parte dei misuratori portatili dichiarano un'ambito di linearità compreso tra 1.7 e 33.3 mmol/L (30-600 mg/dL).

Numerose importanti innovazioni tecnologiche che diminuiscono l'errore dell'operatore sono state introdotte negli ultimi anni. Queste comprendono "no-wipe strip" (la striscia non deve essere asciugata), attivazione automatica della temporizzazione quando sia il campione che la striscia sono nel misuratore, richiesta di volumi minori, un segnale di errore se il volume del campione è inadeguato, un" blocco" se non è stato analizzato il controllo, un lettore di codice a barre e la capacità di memorizzare molte centinaia di risultati che possono essere successivamente

scaricati per effettuare una valutazione. L'insieme di questi accorgimenti ha prodotto prestazioni di qualità superiore nei nuovi misuratori portatili.

Molti obiettivi analitici sono stati proposti per le prestazioni dei misuratori portatili di glucosio. Il razionale di questi non è sempre chiaro. Nel 1987, l'ADA ha raccomandato come obiettivo per l'errore totale (dell'operatore più l'analitico) del 10%, alla concentrazione del glucosio di 1.7-22.2 mmol/L (30-400 mg/dL) nel 100% dei casi. Inoltre, è stato proposto che i valori devono differire di < 15% da quelli ottenuti con i metodi di riferimento in laboratorio. La raccomandazione è stata modificata in conseguenza della riduzione significativa di complicanze dimostrata con lo stretto controllo dal DCCT. Gli obiettivi delle prestazioni rivisti, pubblicati nel 1996 (48), sono di un errore analitico <5 %. A nostra conoscenza non sono stati pubblicati studi su misuratori portatili di glucosio che abbiano raggiunto gli obiettivi ADA per un errore analitico < 5%.

Gli obiettivi del CLIA 1988 sono meno severi di quello dell'ADA; i risultati con misuratori portatili devono essere entro il 10% del valore bersaglio o + 0.3 mmol/L (6 mg/dL), a seconda di quale dei due è più ampio. Le raccomandazioni NCCLS (62) sono + 20% del risultato di glicemia misurata dal laboratorio ad una concentrazione > 5.5 mmol/L (100 mg/dL), e + 0.83 mmol/L (15 mg/dL) se la concentrazione del glucosio è < 5.5 mmol/L (100 mg/dL). Sono in corso delle revisioni di queste raccomandazioni. Le nuove linee guida NCCLS, che è stato anticipato saranno pubblicate nel 2002, propongono che la discrepanza tra i misuratori portatili ed il laboratorio centrale deve essere, per concentrazioni di glucosio > 4.2 mmol/L (75 mg/dL), < 20%; per una concentrazione di glucosio < 4.2 mmol/L (75 mg/dL), la discrepanza non deve eccedere 0.83 mmol/L (15 mg/dL; NCCLS, in preparazione).

Un differente approccio è stato proposto da Clarke et al. (63), che hanno sviluppato una "griglia degli errori" che tenta di definire l'importanza clinica degli errori definendo come obiettivi intervalli abbastanza ampi. Inoltre due nuovi approcci sono stati suggeriti molto recentemente. Nel primo, a 201 pazienti con diabete di tipo 1 insorto da molto tempo, è stato chiesto quali erano le aspettative sulla qualità dei misuratori portatili di glucosio (64). Sulla base della percezione, da parte dei pazienti, dei loro bisogni e delle loro azioni riferite in risposta alle variazioni della concentrazione di glucosio misurata, l'obiettivo per la qualità analitica a concentrazioni ipoglicemiche era un CV di 3.1%. Escludendo l'ipoglicemia, il CV analitico che soddisfaceva le aspettative del 75% dei pazienti era tra il 6.4 e il 9.7%. Gli autori hanno raccomandato un CV analitico di 5%, con un bias < 5% (64). Il secondo metodo ha usato un modello di simulazione di errore nel dosaggio dell'insulina (65). E' risultato che i misuratori portatili che raggiungono sia un CV che un bias <5%, raramente conducono ad errori importanti nella posologia dell'insulina. Ad ogni modo, per fornire la posologia d'insulina desiderata nel 95% dei casi, il bias ed il CV devono essere <1-2%, e dipendono dallo schema di posologia di insulina e dall'ambito di concentrazione di glucosio di ogni singolo paziente (65). Nessun misuratore portatile ha dimostrato di raggiungere CV di 1-2% nell'uso routinario. Considerando il bias e l'imprecisione dei misuratori portatili, nessuno studio ha valutato questo obiettivo, che si basa su modelli simulati. La mancanza di consenso nella qualità degli obiettivi per i misuratori portatili del glucosio, riflette l'assenza di criteri oggettivi condivisi. Usando gli stessi criteri basati sulla variabilità biologica descritti nella sezione precedente "Interpretazione" a proposito dell'analisi del glucosio nei laboratori accreditati, noi suggeriamo un obiettivo per l'errore totale (che comprende sia bias che imprecisione) di < 7.9%. Tuttavia, studi ulteriori sono necessari per definire accuratamente questo obiettivo.

La variabilità nelle prestazioni dei differenti misuratori portatili è molto ampia. Anche se alcuni misuratori portatili attuali, come già detto, hanno prestazioni superiori a quelle dei misuratori portatili della generazione precedente (60), l'imprecisione rimane alta. Per esempio, in uno studio condotto, in condizioni attentamente controllate, in cui tutte le determinazioni sono state eseguite da un singolo tecnico di laboratorio, solo circa il 50% delle analisi soddisfacevano i criteri ADA di uno scostamento di < 5 % dal valore di riferimento (60). Le prestazioni dei misuratori portatili di generazione precedente erano sostanzialmente peggiori: due dei quattro misuratori portatili valutati nello studio hanno fornito risultati entro il 5% dai valori di riferimento solo nel 33% delle analisi. Un altro studio recente che ha valutato la prestazione dei misuratori portatili in 226 ospedali con il metodo del campione diviso misurato simultaneamente con misuratori portatili ed in laboratorio, ha evidenziato che rispettivamente il 45.6%, il 25% ed il 14% differivano tra loro rispettivamente di >10%, >15% e >20% (66). Una recente analisi della accuratezza clinica ed analitica dei misuratori portatili (tutte le misurazioni effettuate dalla stessa persona) dimostrano che nessuno dei misuratori portatili soddisfaceva i criteri ADA e che solo due misuratori portatili producevano il 100% delle determinazioni nelle zone clinicamente accettabili in base all'analisi della griglia degli errori (67).

Raccomandazione: Studi clinici sono necessari per determinare gli obiettivi analitici dei misuratori portatili di glucosio. Come minimo, i punti finali devono essere l'GHb e la frequenza di episodi ipoglicemici. Idealmente dovrebbe essere esaminato anche l'outcome (per esempio complicanze a lungo termine ed ipoglicemia).

Livello di evidenza: E

Frequenza di misurazione. L'SMBG deve essere effettuato almeno quattro volte al giorno nei pazienti con diabete di tipo 1. Una frequenza di monitoraggio inferiore a quattro volte al giorno può causare un deterioramento del controllo glicemico (48, 68, 69). Studi pubblicati rivelano che l'automonitoraggio è eseguito dai pazienti molto meno frequentemente di quanto raccomandato. Dati dell'NHANES III raccolti tra il 1988 e il 1994 rivelano che l'SMBG era eseguito almeno una volta al giorno dal 39% di pazienti che assumevano insulina e dal 5-6% di quelli trattati con farmaci orali o solo la dieta (51). Ancora, il 29% e il 65% di pazienti trattati rispettivamente con insulina o agenti orali, controllavano il loro glucosio nel sangue meno di una volta al mese. Ad ogni modo, nessuna valutazione è stata fatta per verificare se quattro volte al giorno è l'ideale o se alcune altre frequenze o temporizzazioni (per esempio esami postprandiali) potrebbero migliorare il controllo glicemico. Per esempio, un aggiustamento della terapia insulinica nelle donne con GDM, sulla base dei risultati della concentrazione plasmatica del glucosio post-prandiale, piuttosto che prima del pasto, ha migliorato il controllo glicemico e ha ridotto il rischio di complicanze neonatali (70). La frequenza ottimale dell'SMBG per i pazienti con diabete di tipo 2 è sconosciuta.
Le attuali raccomandazioni dell'ADA suggeriscono l'SMBG quotidiano per i pazienti trattati con insulina o sulfanilurea (14) per rilevare l'ipoglicemia. Ad ogni modo, i risultati pubblicati non mostrano alcuna correlazione tra la frequenza dell'SMGB nel diabete di tipo 2 e il controllo glicemico (49, 50, 51), Non è riconosciuto nessun ruolo dell'SMBG nei pazienti con diabete di tipo 2 che sono stati trattati solo con la dieta.

OGTT

Raccomandazione: l'OGTT non è raccomandato nella diagnosi routinaria di diabete mellito di tipo 1 o 2. E' raccomandato per porre diagnosi di GDM.

Livello di evidenza: B

USO

L'OGTT, un tempo *gold standard* nella diagnosi di diabete mellito, non è ora raccomandato dall'ADA per la diagnosi di diabete mellito di tipo 1 o 2, mentre continua ad essere raccomandato, anche se in casi limitati, dal WHO (71, 72). Il carico orale di glucosio è invece raccomandato, sia dall'ADA che dal WHO, per porre diagnosi di GDM (diabete mellito gestazionale). Nè ADA né WHO raccomandano di allungare la durata del test fino a cinque ore nella pratica routinaria.

RAZIONALE

L'incapacità a rispondere in maniera appropriata ad un carico di glucosio rappresenta il principale difetto patologico nel diabete mellito. L'ADA non raccomanda l'utilizzo routinario di tale test nella diagnosi di diabete mellito basandosi sulla considerazione che un utilizzo appropriato della glicemia plasmatica a digiuno (FPG) permette di identificare anomalie del metabolismo glucidico nella popolazione con la stessa prevalenza dell'OGTT. Inoltre l'OGTT è poco pratico nella pratica di routine. E' stato stabilito come cut off un valore di glicemia alla seconda ora pari a 11.1 mmol/L (200 mg/dL), poiché tale valore è stato dimostrato predittivo di microangiopatia (72). Comunque approssimativamente solo 1/4 degli individui con un valore ≥ 11.1 mmol/L (200 mg/dL) ha un FPG≥ 7.8 mmol/L (140 mg/dL), valore raccomandato precedentemente per porre diagnosi di diabete. L'attuale cut off di 7.0 mmol/L (126 mg/dL) correla in maniera migliore con il valore glicemico in corso di OGTT alla seconda ora di 11.1 mmol/L (200 mg/dL) e quindi anche con lo sviluppo delle complicanze.
L'uso dell'OGTT per classificare individui con ridotta tolleranza al glucosio (IGT) e diabete rimane controverso. Studi recenti (73-76) indicano che individui classificati con IGT in base all'OGTT (criteri WHO) hanno un aumentato rischio di malattia cardiovascolare, ma molti di questi pazienti non hanno una glicemia a digiuno (IFG) aumentata in base ai nuovi criteri ADA. Inoltre l'OGTT (criteri WHO) identifica il diabete nel 2% di pazienti in più rispetto all'FPG (criteri ADA) (77). Infine pazienti diabetici con alterazione sia del valore glicemico basale a digiuno che dell'OGTT hanno un rischio di morte prematura maggiore rispetto a quelli che hanno solo un aumentato FPG (78).
Il test di tolleranza al glucosio a 2 ore continua ad essere raccomandato nella diagnosi di GDM sia dall'ADA che dal WHO (71,72). Un'alterazione della tolleranza glicemica avviene frequentemente in gravidanza, specialmente nel terzo trimestre. La diagnosi ed il trattamento del diabete mellito gestazionale sono essenziali per prevenire morbidità e mortalità perinatali.

CONSIDERAZIONI ANALITICHE

La riproducibilità dell'OGTT è stata oggetto di molta attenzione. Secondo numerosi studi, la riproducibilità del test nel classificare i pazienti era intorno al 50-66% (79). Fattori che contribuiscono alla scarsa riproducibilità sono la variabilità biologica della glicemia, gli effetti variabili legati alla somministrazione di una soluzione iperosmolare sullo svuotamento gastrico e gli effetti della temperatura ambientale (41, 79-81). L'accuratezza e la riproducibilità della determinazione glicemica non sono fattori limitanti a questo proposito.

INTERPRETAZIONE

Diagnosi di diabete di tipo 1 e 2

L'ADA e il WHO forniscono raccomandazioni diverse:

ADA: non raccomanda l'uso dell'OGTT nella routine con l'eccezione delle donne in gravidanza.
WHO: quando la concentrazione glicemica a digiuno è compresa tra 6.1 mmol/L e 7 mmol/L (110-126 mg/dL) viene raccomandato l'esecuzione di un OGTT (71).
Dopo 3 giorni di dieta non ristretta e un periodo di digiuno di almeno 8 ore e non superiore alle 14 ore, viene misurata la glicemia plasmatica basale, seguita dalla somministrazione di 75 grammi di glucosio per os sciolto in 250-300 mL di acqua che dev'essere assunta in 5 minuti. Per i bambini la dose è di 1.75 g glucosio/kg fino ai 75 g di glucosio utilizzati nell'adulto. Due ore dopo il carico è eseguito il prelievo e viene misurata la glicemia plasmatica.
I risultati sono vanno interpretati come descritto nella tabella III.

Tabella III. Criteri WHO per l'interpretazione dell'OGTT a 2 ore.[a]

	Concentrazione glicemica plasmatica, mmol/L (mg/dL)	
	0 ore	**2 ore**
IFG	≥6.1 (110)	< 7.8 (140)
	<7.0 (126)	
IGT	<7.0 (126)	≥7.8 e <11.1 (140-200)
diabete	≥7.0 (126)	≥11.1 (200)

[a]ogni singolo valore alterato deve essere ripetuto in una giornata diversa

GDM

L'ADA ha modificato le raccomandazioni per la diagnosi di laboratorio del diabete mellito gestazionale nel 2000 (82). Le linee guida proposte sono le seguenti:

1. Le *pazienti a basso rischio* non richiedono nessun esame.
   Una paziente è a basso rischio se soddisfa tutti questi criteri
   • Età < 25 anni
   • Peso normale prima della gravidanza
   • Appartenenza ad un gruppo etnico con bassa prevalenza di GDM
   • Nessun caso di diabete nei familiari di primo grado
   • Anamnesi negativa per alterata tolleranza al glucosio
   • Anamnesi negativa per gravidanza con complicanze
2. Le pazienti *a medio rischio* devono essere sottoposte a screening tra la 24 e 28 settimana di gestazione. Una paziente è a medio rischio se non appartiene né alla categoria a basso rischio, né a quella ad alto rischio.
3. Le pazienti ad alto rischio devono eseguire il test al più presto possibile.
   Una paziente è *ad alto rischio* se presenta una delle seguenti caratteristiche:
   • obesità marcata
   • storia personale di GDM
   • glicosuria
   • forte familiarità per diabete

La prima fase della diagnosi di laboratorio del GDM è identica a quella per la diagnosi di diabete di tipo 1 o 2, cioè una glicemia a digiuno ≥ 7.0 mmol/L (126 mg/dL) o una glicemia casuale ≥ 11.1 mmol/L (200 mg/dL), se confermate da un prelievo eseguito nei giorni immediatamente successivi, consentono di porre diagnosi di diabete. Comunque, se tali esami sono nella norma, l'ADA raccomanda che tutte le pazienti ad alto e medio rischio vengano sottoposte ad un carico orale di glucosio, seguendo una delle due modalità:

1. In unica fase: questo approccio, che rappresenta un rapporto costo/efficacia valido nei pazienti ad alto rischio o in alcune popolazioni particolari notoriamente ad alto rischio, si basa sulla esecuzione di una curva da carico con somministrazione di 100 g o 75 g di glucosio.
   • La curva con 100 g di glucosio è la più utilizzata ed anche la più convalidata. Quando due o più valori sono più alti dei valori indicati nella Tabella IV si può porre diagnosi di diabete.
   • In alternativa si può eseguire una curva con 75 g di glucosio, anche se questa curva non è stata validata come la precedente. I criteri diagnostici sono gli stessi utilizzati per la curva con 100 g di glucosio, ma i prelievi si arrestano alla seconda ora. Due o più risultati più alti del valore di cut-off consentono di porre diagnosi.
2. In due fasi: la prima fase consiste in un carico orale di 50 g di glucosio (la paziente non deve necessariamente essere a digiuno), seguiti dalla determinazione della glicemia dopo 1 ora. Un valore ≥ 7.8 mmol/L (140 mg/dL), indica la necessità di procedere nell'iter diagnostico. Un cut off più basso, 7.2 mmol/L (130 mg/dL), potrebbe essere utilizzato per scoprire circa il 10% di casi di diabete in più.

Tabella IV: Criteri interpretativi dell'OGTT con somministrazione di 100 g di glucosio.[a]

	Concentrazione plasmatica di glucosio	
	mmol/L	**mg/dL**
A digiuno	5.3	95
1 h	10.0	180
2 h	8.6	155
3 h	7.8	140

[a]Il test deve essere eseguito al mattino dopo un digiuno compreso tra le 8 e le 14 ore e dopo una dieta non ristretta (≥150 g carboidrati/die) ed attività fisica non limitata. La paziente deve rimanere seduta e non fumare durante l'esecuzione del test.

Il test successivo è rappresentato da una delle due curve da carico orale di glucosio descritte precedentemente.

CONSIDERAZIONI EMERGENTI

I principali argomenti controversi sono:
(a) La più bassa sensibilità della glicemia a digiuno (FPG) rispetto al test da carico orale di glucosio (OGTT) nella diagnosi di diabete mellito (2% di casi di diabete persi con FPG)
(b) Il valore di classificare pazienti come pazienti con aumentata tolleranza al glucosio (IGT) (raccomandazione dell'ADA e non del WHO).
(c) L'uso appropriato dell'OGTT nel diabete mellito gestazionale

La più bassa sensibilità della glicemia a digiuno confrontata con l'OGTT nella diagnosi di diabete mellito, è strettamente correlata all'evidenza epidemiologica che l'OGTT identifica meglio i pazienti a rischio di sviluppare complicanze del diabete. Questo include la valutazione del rischio di sviluppare malattie cardiovascolari (83), macrosomia (84) e predittività del rischio di morte (85). Le organizzazioni professionali australiane e della Nuova Zelanda in particolare, sostengono l'utilità dell'OGTT nella diagnosi di diabete mellito (86).
L'uso appropriato dell'OGTT per la diagnosi di GDM è particolarmente controverso. L'ADA ha accettato la raccomandazione emersa derivata dal Fourth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus (87) in cui si suggeriva di abbassare i valori glicemici limite del 5-10% nella diagnosi di GDM.
Rimane invece una mancanza di consensi circa l'utilizzo della curva con 100 g di glucosio invece di quella con 75 g per la diagnosi definitiva di diabete gestazionale. Sembrerebbe più pratica e con capacità diagnostica accettabile, la curva con la somministrazione di 75 g di glucosio. Tuttavia i valori soglia appropriati continuano ad essere oggetto di disputa (86, 88).
Queste discrepanze nelle raccomandazioni riflettono lo stato delle conoscenze sul GDM, che continuano ad evolvere di pari passo con la ricerca clinica.

Glicosuria

Raccomandazione: La determinazione semiquantitativa della glicosuria non è raccomandata nell'assistenza routinaria dei pazienti con diabete mellito
Livello di evidenza: C

USO

La determinazione semiquantitativa della glicosuria, un tempo fondamentale nel follow up del paziente diabetico in ambiente domicilare, è stata ora soppiantata dall'autocontrollo glicemico (SMBG vedi altrove).
La glicosuria deve essere presa in considerazione solo nei pazienti che non sono in grado di fare l'autocontrollo glicemico o lo rifiutano, dal momento che la concentrazione di glucosio nelle urine non riflette accuratamente la concentrazione di glucosio nel plasma (89,90).

RAZIONALE

Sebbene il glucosio diventi dosabile nelle urine dei pazienti con un grossolano aumento della concentrazione di glucosio nel sangue, essa non fornisce informazioni circa la concentrazione glicemica oltre il valore di soglia renale (circa 10 mmol/L, 180 mg/dL). Ciò limita la sua efficacia nel monitoraggio del paziente diabetico alla luce delle attuali raccomandazioni sul follow up. Inoltre il grado di concentrazione delle urine stesse influenza la concentrazione di glucosio nelle urine, e solo il valore medio di glicosuria tra due minzioni successive potrebbe riflettere la glicemia; questo minimizza ulteriormente il valore della glicosuria.

CONSIDERAZIONI ANALITICHE

Vengono raccomandati diversi metodi per la determinazione semiquantitativa della glicosuria, basati su reazioni specifiche. La maggior parte delle strisce reattive in commercio si basa sulla reazione della glucosio-ossidasi (26). Altri metodi che si basano invece su reazioni di riduzione, non sono raccomandati, perché soggetti a numerose interferenze da parte, per esempio, di numerosi farmaci e sostanze non glucidiche.

INTERPRETAZIONE

Poiché l'utilizzo della glicosuria è limitato, i metodi semiquantitativi delle strisce reattive, sono considerati adeguati.

Strumenti per l'autodeterminazione glicemica non invasivi o poco invasivi

Raccomandazione: I dispositivi per la determinazione della glicemia in modo non invasivo o poco invasivo non possono essere raccomandati come sostitutivi dell'autocontrollo glicemico o della determinazione della glicemia effettuata in un laboratorio accreditato. Progressi in corso in questo campo come l'impiego del nuovo Gluco Watch Biographer, possono influenzare questa raccomandazione.

Livello di evidenza:E

USO

La necessità di un dispositivo per il monitoraggio "continuo" in vivo della glicemia è prioritario dal momento che i pazienti devono controllare la loro glicemia in maniera molto stretta (12,72,90). Al momento ci sono solo 2 dispositivi approvati dall'FDA per la determinazione non invasiva della glicemia: Gluco Watch Biographer (Cygnus) e Continuous Glucose Monitoring System (MiniMed). Sebbene promettente, l'uso routinario di questi dispostivi non

può essere raccomandato in questo momento, poiché gli studi clinici sono ancora limitati. Entrambi i dispositivi richiedono calibrazione e conferma dell'accuratezza con gli strumenti convenzionali per l'autocontrollo glicemico.

RAZIONALE

Il primo obiettivo nella messa a punto di un sensore glicemico in vivo affidabile è quello di rilevare una ipoglicemia non sospettata. L'importanza di questo obiettivo è stata apprezzata sempre più quando si è compreso che un controllo glicemico stretto si accompagna ad un aumento marcato del rischio di ipoglicemia (12, 90). Da qui deriva l'importanza di un sensore in grado di rilevare una ipoglicemia severa. Al contrario, un monitoraggio in vivo della glicemia con un intervallo più ampio, è il prerequisito per lo sviluppo di un pancreas artificiale che misuri la concentrazione glicemica e aggiusti automaticamente il rilascio di insulina.

CONSIDERAZIONI ANALITICHE

L'obiettivo non è qui quello di fare una revisione completa dello stato dell'arte su questo importante argomento, ma solo di dare raccomandazioni per l'uso attuale di questi dispostivi. Recentemente sono state pubblicate numerose rassegne su questo argomento (91,92) che è stato oggetto di congressi. Per esempio l'AACC Oak Ridge Conference del 1999 si è concentrato con particolare attenzione sulla tecnologia dei sensori di glucosio (93) e un simposio al congresso dell'ADA sempre nel 1999 ha invece trattato i sensori non invasivi (94).

I progressi tecnologici fondamentali nei dispositivi non invasivi o minimamente invasivi per la determinazione del glucosio sono riassunti nella Tabella V.

I sensori transcutanei e quelli impiantati usano dei sistemi multipli di rivelazione, come enzimi (di solito glucosio ossidasi), elettrodi e fluorescenza. Sono in corso di sviluppo molecole alternative agli enzimi per riconoscere il glucosio, compresi dei "recettori" artificiali di glucosio (95,96). Le tecnologie basate sulla fluorescenza prevedono l'uso di molecole ingegnerizzate che presentano una intensità di fluorescenza o delle caratteristiche spettrali alterate nel momento in cui si legano al glucosio o l'uso di dosaggi competitivi che comprendono due molecole fluorescenti nella tecnica di trasferimento di energia di risonanza fluorescente (97-101).

I metodi per la valutazione glicemica nei tessuti, spesso definiti "noninvasivi" sono in realtà "minimamente invasivi" e variano tra i diversi sistemi. Il concetto fondamentale alla base di questi sistemi è quello che la concentrazione di glucosio nel fluido interstiziale si correla con la glicemia. La maggior parte dei sistemi di microdialisi sono inseriti sottocute (102-105). La "iontoforesi inversa", che è alla base del "Gluco Watch" (Cignus) approvato dall'FDA, usa invece l'applicazione sulla pelle di una corrente elettrica di bassa intensità che, per trasporto convettivo (elettroosmosi) muove il glucosio attraverso la pelle. La concentrazione di glucosio è poi misurata da un elettrodo rivelatore che impiega la glucosio ossidasi.

Molta ricerca è stata dedicata allo sviluppo di una tecnologia totalmente noninvasiva per i sensori di glucosio. La spettroscopia vicina all'infrarosso è stata la tecnologia più intensamente studiata, ma variazioni spettrali imprevedibili ne hanno ostacolato lo sviluppo (108-112). Problemi simili hanno ostacolato l'impiego dello scatter di luce (113-114). La spettroscopia fotoacustica, anche se meno studiata, ha prodotto alcuni risultati preclinici incoraggianti. In questa tecnica, la luce infrarossa pulsata, quando assorbita dalle molecole, produce delle onde ultrasonore rilevabili, l'intensità e i pattern delle quali possono essere teoricamente sintonizzate per rilevare il glucosio (115-117).

Tabella V. Metodologie per il monitoraggio glicemico in vivo con dispositivi non invasivi o minimamente invasivi.[a]

Elettrodi transcutanei enzimatici ad ago
Sensori totalmente impiantati
Elettrodi enzimatici
Basati sulla fluorescenza vicina all'infrarosso
Tecnologie di prelievo
Microdialisi
Iontoforesi inversa
Tecnologie non invasive
Spettroscopia vicina all'infrarosso
Scatter della luce
Spettroscopia fotoacustica

[a] da Pickup et al (91)

INTERPRETAZIONE

Attualmente solo Gluco Watch Biographer e Continuous Monitoring System hanno ricevuto l'approvazione dall'FDA. Per questo motivo consideriamo solo questi. I due strumenti hanno campi applicativi molto diversi. Gluco Watch è stato concepito per misurare la glicemia 3 volte all'ora per un periodo che va fino a 12 ore, e appare particolarmente adatto a rivelare ipoglicemie non sospettate. Il Continuous Monitoring System è progettato invece per un impiego occasionale piuttosto che continuo per tutto il giorno. L'informazione che questi strumenti possono fornire verrà poi utilizzata dal medico per guidare il paziente nel migliorare il controllo glicemico; i risultati sono infatti trasferiti in un computer nell'ambulatorio del medico.

Il Continuous Monitoring System consiste in un sensore di glucosio sottocutaneo collegato ad un monitor esterno. La glicemia viene misurata ogni 5 minuti per 72 ore e i dati vengono trasferiti in un computer per l'analisi. I valori non appaiono sul display del monitor esterno.

Il Gluco Watch fornisce misurazioni frequenti per un periodo fino a 12 ore dopo una singola calibrazione. Lo strumento richiede una calibrazione con valori di

glicemia plasmatica di riferimento ed il tempo di campionamento limita la frequenza delle misurazioni a circa tre all'ora. Alcuni trial clinici promettenti, anche se con casistiche limitate, hanno mostrato una buona correlazione con l'automonitoraggio glicemico (SMBG) (106,110). Per esempio in 28 pazienti con diabete di tipo 1, monitorati in ambiente ospedaliero, Gluco Watch ha mostrato una correlazione con r=0.90 (1554 campioni) con la glicemia misurata da sangue capillare. In 12 pazienti, monitorati in ambiente domiciliare, la correlazione del Gluco Watch con SMBG era r= 0.85 (205 campioni). La correlazione tra 2 Gluco Watch usati simultaneamente era r= 0.94 (107). Nonostante la recente approvazione del Gluco Watch da parte dell'FDA il suo uso non è stato valutato in modo rigoroso in un contesto clinico complesso, come quello domiciliare, né nei bambini. Tuttavia, se sarà dimostrata la sua utilità nel rilevare episodi di ipoglicemia insospettati in tali contesti, si può prevedere un maggior utilizzo del Gluco Watch e continui miglioramenti tecnologici dello stesso.
Al momento non ci sono standard analitici per questi dispositivi non invasivi o minimamente invasivi. Tali standard dovranno necessariamente essere diversi a seconda dei diversi modi di utilizzo proposti. Per esempio l'affidabilità, la precisione e l'accuratezza richiesti per un sensore di glucosio che è collegato ad un sistema che automaticamente aggiusta la dose di insulina, saranno molto diverse rispetto ai requisiti richiesti ad un sensore che generi allarmi in caso di sospetta iper o ipo-glicemia. E' intuitivo come una imprecisione maggiore possa essere tollerata in dispositivi che eseguono più letture all'ora piuttosto che in uno strumento usato solo 2/3 volte al giorno per aggiustare una porzione rilevante della dose quotidiana di insulina di un paziente.

CONSIDERAZIONI EMERGENTI

Una volta che l'FDA ha approvato l'automonitoraggio eseguito con questi dispositivi non invasivi o minimamente invasivi, si può anticipare che saranno rinnovati gli sforzi per portare avanti nuove tecnologie e valutarle in trial clinici. Vedremo quindi progressi nei dispositivi non invasivi o minimamente invasivi per la determinazione della glicemia, che diventeranno complementari alle tecniche attuali di monitoraggio del glucosio.

Corpi chetonici

USO

> Raccomandazione: I corpi chetonici devono essere dosati nelle urine o nel sangue dei pazienti diabetici in ambiente domiciliare o ambulatoriale/ospedaliero come supporto alla diagnosi di chetoacidosi diabetica (DKA)
>
> Livello di evidenza: E

L'acetoacetato (AcAc), l'acetone e l'acido β-idrossibutirrico (βHBA) sono prodotti dal catabolismo degli acidi grassi liberi.
La determinazione dei corpi chetonici nelle urine e nel sangue è largamente utilizzata nel follow up come ausilio nella diagnosi e nel monitoraggio della chetoacidosi diabetica.
I corpi chetonici sono misurati sia in ambiente ospedaliero che domiciliare/ambulatoriale.
Le raccomandazioni ADA prevedono che una valutazione iniziale del paziente con DM includa anche la determinazione della chetonuria e che l'esame debba essere disponibile anche nell'ambulatorio medico per un uso immediato in caso di necessità (14).
L'ADA sottolinea inoltre come l'esame per la chetonuria sia parte importante del monitoraggio del paziente con diabete, soprattutto nei pazienti con diabete di tipo 1, gravidanza con diabete pre-esistente e GDM (9). Tutti i pazienti con DM debbono inoltre eseguire la determinazione della chetonuria durante malattie acute, stress o persistente iperglicemia (glicemia > 16.7 mmol/L, 300 mg/dL), gravidanza o sintomi di DKA, come nausea, vomito o dolore addominale (9,14).

RAZIONALE

I corpi chetonici sono normalmente presenti nelle urine e nel sangue in bassissima concentrazione (per esempio, chetoni totali nel siero < 0.5 mmol/L). Un aumento della concentrazione dei corpi chetonici nei pazienti con diabete mellito già diagnosticato o in pazienti con iperglicemia suggerisce una DKA imminente o instaurata. I 2 principali meccanismi che provocano l'incremento dei corpi chetonici nei pazienti con diabete sono l'aumentata produzione a partire dai trigliceridi e la diminuita utilizzazione nel fegato; entrambe sono il risultato di un deficit di insulina assoluto o relativo e dell'aumento degli ormoni contro-regolatori come cortisolo, glucagone, ormone della crescita, adrenalina (118).
I principali corpi chetonici βHBA e AcAc, sono generalmente presenti in quantità equimolecolari. L'acetone, generalmente presente solo in piccole quantità, deriva dalla decarbossilazione spontanea dell'AcAc. L'equilibrio tra AcAc e βHBA è spostato verso la formazione di βHBA in tutte le situazioni che alterano lo stato redox dei mitocondri epatici rivolto ad un aumento della concentrazione di NADH come ipossia, digiuno, disordini metabolici (inclusa DKA) e chetoacidosi alcolica (119-121). Quindi i metodi di determinazione dei corpi chetonici che non comprendono la determinazione del βHBA possono fornire informazioni fuorvianti sottostimando la concentrazione dei corpi chetonici totali (90, 122).

CONSIDERAZIONI ANALITICHE

Chetonuria

Fase preanalitica. Generalmente la concentrazione dei corpi chetonici nelle urine è al di sotto del limite di sensibilità dei metodi in commercio. Risultati fal-

samente positivi sono stati riportati con urine fortemente colorate e in presenza di farmaci come gli ACE-inibitori (123). I reagenti per gli esami sulle urine si deteriorano con l'esposizione all'aria producendo risultati falsamente negativi. I reagenti devono essere conservati in contenitori appositi ed eliminati dopo la data di scadenza indicata (124).
Risultati falsamente negativi sono stati descritti in campioni di urina fortemente acida, come quella che viene prodotta dopo l'ingestione di grandi quantità di acido ascorbico. La perdita di chetoni con le urine attribuibile all'azione microbica può essere un'altra causa di risultati falsamente negativi. Poiché l'acetone è sostanza altamente volatile, i campioni devono essere conservati in contenitori chiusi. Per analisi POCT (Point Of Care Testing) in ambiente ospedaliero e domiciliare sarebbe opportuno l'utilizzo di materiale di controllo (con valori sia positivi che negativi) che però non sono disponibili in commercio.

Fase analitica. Sono stati descritte numerose metodologie di misura. La metodologia più usata è la reazione colorimetrica che avviene tra corpi chetonici e nitroprussato (sodio ferrocianuro) e che produce colore porpora (26). Questo metodo è ampiamente disponibile in forma di strisce reattive e di compresse ed è utilizzato per misurare chetonuria e chetonemia (nel siero e nel plasma). Alcuni produttori producono strisce reattive che misurano sia glucosio che chetoni; la striscia combinata è necessaria solo se il paziente esegue il monitoraggio della glicosuria invece o in aggiunta a quello della glicemia. Il metodo del nitroprussiato misura solo AcAc a meno che il reagente non contenga glicina, nel qual caso misura anche l'acetone. Il reagente contenente nitroprussiato è molto più sensibile all'AcAc che all'acetone per quanto riguarda la produzione di colore. Da sottolineare come questo reagente non misuri il βHBA (122).

Corpi chetonici nel sangue
Fase preanalitica. I corpi chetonici possono essere dosati nel siero o nel plasma con strisce reattive e compresse analoghe a quelle utilizzate per la chetonuria. Anche se i campioni possano essere diluiti con soluzione fisiologica per titolare la concentrazione di chetoni (i risultati vengono generalmente espressi come positivi ad una diluizione 1/x), anche in questo caso, come per la chetonuria, non viene dosato l'βHBA, il corpo chetonico prevalente nella chetoacidosi diabetica.
Per la determinazione specifica di βHBA, come descritto in seguito, i vari metodi richiedono tipi di campione diversi. I campioni possono essere raccolti in provette contenenti eparina, EDTA, fluoruro, citrato o ossalato (Secondo il produttore fluoruro e ossalato non sono stati valutati nel sistema BioScanner). L'acido ascorbico interferisce con alcuni di questi metodi, così come l'AcAc, a meno che i campioni non siano molto diluiti. La stabilità dei campioni è diversa a seconda dei metodi, ma in genere il sangue intero è stabile a 4 °C per 24 ore. I campioni di siero/plasma sono stabili fino a 1 settimana a 4 °C ed alcune settimane a –20 °C (dati sulla stabilità a lungo termine non sono disponibili per la maggior parte dei metodi di misura).
Fase analitica. Anche se numerosi metodi di misura (colorimetrico, gas cromatografico, elettroforesi capillare, enzimatico) sono stati descritti per la determinazione dei chetoni nel sangue, tra cui un metodo specifico per il βHBA, il metodo enzimatico è quello più utilizzato per misurare il βHBA (125-127).
Il principio del metodo enzimatico si basa sulla conversione del βHBA in presenza di NAD+ in AcAc e NADH per mezzo della β-idrossibutirrato dedrogenasi. In condizioni alcaline (pH 8.5-9.5) la reazione favorisce la formazione di AcAc a partire dal βHBA. L'NADH prodotto può essere quantificato spettrofotometricamente (di solito in cinetica) mediante l'impiego di una perossidasi (Analox Instrument USA). Un produttore offre un metodo che utilizza una "card" (tavoletta) impregnata con i reagenti (KetoSite; GDS Diagnostics). La maggior parte dei metodi consente l'utilizzo di sangue intero, plasma o siero (generalmente i volumi richiesti sono ≤ 200 μL). Alcuni metodi consentono l'analisi di più parametri contemporaneamente e sono progettati per il POCT. Numerosi metodi sono disponibili come misuratori portatili che sono approvati dall'FDA sia per l'uso laboratoristico che domiciliare [per esempio, BioScanner Ketone (Polymer Technology System) e MediSense Precision Xtra (Abbott Laboratories)] (127). Questi metodi utilizzano strisce reattive a cui viene aggiunta una goccia di sangue intero, siero o plasma. I risultati appaiono sul display dello strumento entro ~ 2 minuti.

INTERPRETAZIONE

Determinazione dei corpi chetonici nelle urine

> Raccomandazione: La determinazione dei corpi chetonici nelle urine non deve essere utilizzata nella diagnosi o nel monitoraggio di DKA.
>
> Livello di evidenza:A

In un paziente con diabete mellito o in un paziente in cui il diabete non era stato diagnosticato ma che presenta sintomi tipici di diabete e iperglicemia, la presenza di chetonuria suggerisce la possibilità di chetoacidosi diabetica imminente o presente. Anche se la DKA è associata di solito al diabete di tipo 1, può presentarsi di rado anche in pazienti con diabete di tipo 2 (128). Pazienti con chetoacidosi alcolica avranno chetonuria, ma generalmente non iperglicemia. La presenza di chetonuria è riscontrata anche nel 30% dei campioni di urine della prima minzione delle donne in gravidanza (con o senza diabete), durante digiuno e dopo ipoglicemia (90, 122, 129).

Determinazione dei corpi chetonici nel sangue

> Raccomandazione: La determinazione dei corpi chetonici nel sangue che si basano sulla reazione al nitroprussiato deve essere utilizzata solo per confermare la diagnosi di DKA e non nel monitoraggio del trattamento. Dosaggi specifici per il βHBA nel sangue possono essere utilizzate per la diagnosi ed il monitoraggio di DKA. Altri studi sono necessari per determinare se l'esame offre qualche vantaggio clinico rispetto all'approccio tradizionale (ad esempio determinazione della CO2 nel siero, del gap anionico o del pH).
>
> Livello di evidenza: E

I dosaggi dei corpi chetonici che si basano sulla reazione al nitroprussiato devono essere utilizzati con cautela nella diagnosi di DKA poiché non quantificano il βHBA, il chetone predominante nella DKA. L'esame non deve essere usato per monitorare la terapia poiché AcAc e acetone possono aumentare mentre βHBA può diminuire nel corso di trattamento che ha successo (90, 118-122). Le determinazioni dei corpi chetonici che misurano in maniera specifica βHBA sono utili sia per la diagnosi che per il follow up di DKA (121, 130-132). Gli intervalli di riferimento per βHBA si diversificano nei vari metodi di misura, ma la concentrazione in soggetti sani a digiuno è generalmente < 0.5 mmol/L. Pazienti con DKA ben documentato [(CO2 < 17 mmol/L; pH arterioso < 7.3; glicemia > 14.9 mmol/L (250 mg/dL)] hanno generalmente una concentrazione di βHBA > 2 mmol/L.
Ulteriori studi sono anche necessari per stabilire se, nei pazienti con DM è preferibile la determinazione dei corpi chetonici nel sangue piuttosto che nelle urine.

Emoglobina glicata

USO

> Raccomandazione: L'emoglobina glicata deve essere misurata di routine in tutti i pazienti con diabete mellito per documentare il grado di controllo glicemico. Gli obiettivi del trattamento devono basarsi sui risultati di studi prospettici randomizzati come il DCCT e l'UKPDS. Questi trial hanno ben documentato la relazione esistente tra il controllo glicemico, quantificato con determinazioni seriate dell'emoglobina glicata, ed il rischio di comparsa e di progressione delle complicanze croniche del diabete.
> I laboratori devono conoscere le potenziali interferenze, come le emoglobinopatie, che possono influenzare i risultati della determinazione della GHb. Nello scegliere i metodi di misura, i laboratori devono considerare i potenziali interferenti nella propria popolazione di pazienti.
>
> Livello di evidenza: A

La determinazione delle proteine glicate, in particolare l'emoglobina glicata (GHb), è ampiamente utilizzato per il monitoraggio di routine a lungo termine dello stato glicemico nei pazienti con diabete mellito.[9] L'emoglobina glicata è utilizzata sia come indice di glicemia media che come valutazione del rischio di sviluppare le complicanze del diabete (90, 122, 133). Questo esame è anche utilizzato sempre di più nei programmi di valutazione della qualità dell'assistenza per diabetici; infatti, per esempio, viene richiesto alle strutture sanitarie di documentare con quale frequenza l'emoglobina glicata è misurata nei loro pazienti diabetici e la proporzione di pazienti con valori di GHb al di sotto di un certo valore (134, 135).
L'ADA e altre organizzazioni che che si sono occupate di questo problema, raccomandano la determinazione dell'emoglobina glicata nei pazienti con diabete di tipo 1 e 2, sia per documentare il grado di controllo glicemico, sia come parte dell'assistenza continuativa (14). L'ADA ha individuato e raccomandato specifici obiettivi terapeutici per l'emoglobina glicata basandosi sui risultati del DCCT (12, 133), ma anche del più recente UKPDS (13). Poiché metodi di determinazione dell'emoglobina glicata diversi danno valori di GHb diversi, l'ADA raccomanda che i laboratori utilizzino solo metodi di determinazione di cui possa essere certificata la tracciabilità ai valori del DCCT (122,133); questi risultati sono espressi come HbA_{1c}.

RAZIONALE

Le proteine glicate derivano da una reazione posttraduzionale non enzimatica tra il glucosio e i gruppi amminici delle proteine (136). Per quanto riguarda l'emoglobina, la quota di sintesi di GHb è funzione principalmente della concentrazione di glucosio cui gli eritrociti sono esposti. GHb è un indice clinicamente utile della glicemia media dei 120 giorni precedenti, che rappresentano la vita media degli eritrociti (90, 136-143). Anche se studi controllati hanno documentato una stretta relazione tra la concentrazione di GHb e la glicemia media, le determinazioni di routine della glicemia in ambito domiciliare o ospedaliero, non sono considerate così affidabili come l'emoglobina glicata per quantificare la glicemia media (19, 90, 137, 138, 144-146). Anche le concentrazioni di altre proteine glicate circolanti (come le proteine glicate in siero/plasma, "fruttosamina") riflettono la glicemia, ma per un periodo più breve rispetto alla GHb: 15-30 giorni per le proteine pla-

[9] I termini emoglobina glicata, glicoemoglobina, emoglobina glicosilata (che non deve essere usato), HbA1 e HbA1c sono tutti stati utilizzati per riferirsi all'emoglobina modificata con l'aggiunta di residui glucidici grazie ad una reazione non enzimatica. Comunque questi termini non sono tra loro intercambiabili. Le emoglobine glicate comprendono Hb A_1 e altre emoglobine con legati residui glucidici, mentre HbA1 è data solo da HbA_{1a}, HbA_{1b} e HbA_{1c}.
HbA_{1c} è la principale componente (circa 80%) di HbA1. Per eliminare questa confusione legata alla nomenclatura, si suggerisce di tulizzare il termine A_{1c}. Come descritto nel testo, la maggior parte dei dati relativi alle correlazioni esistenti tra controllo metabolico e complicanze del diabete (basate sul DCCT e su UKPDS), sono basati su metodi di dosaggio che quantificano l'HbA_{1C}. In questo testo utilizziamo l'abbreviazione GHb che comprende tutte le forme di emoglobine glicate.

smatiche contro 60-120 giorni per la GHb (90, 136-144, 147, 148). Comunque l'utilità clinica delle proteine glicate diverse dall'emoglobina, non è stata chiaramente stabilita, e al momento non esiste evidenza chiara che le concentrazioni di tali proteine correlino con il rischio di sviluppare le complicanze croniche del diabete (90, 122).

CONSIDERAZIONI ANALITICHE

Raccomandazione: I laboratori devono utilizzare solo metodi di determinazione della GHb di cui è stata certificata dal National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) la tracciabilità al metodo DCCT. Inoltre i laboratori che misurano la GHb devono partecipare ad un programma di Verifica Esterna di Qualità, come il CAP Glycohemoglobin Survey, che utilizza campioni di sangue fresco con valori target fissati dall' NGSP Laboratory Network.

Livello di evidenza: B

Sono attualmente in uso numerosi (più di 30) numerosi metodi di misura. Questi vanno da sistemi di ricerca e manuali a microcolonna a sistemi altamente automatizzati, dedicati alla determinazione dell'emoglobina glicata. La maggior parte dei metodi può essere classificata in 2 due gruppi principali: il primo gruppo comprende metodi che quantificano l'emoglobina glicata sulla base della differenza di carica tra componenti glicate e non glicate; per esempio, cromatografia a scambio cationico ed elettroforesi su agar gel. Il secondo gruppo comprende metodi che eseguono la separazione sulla base di differenze strutturali tra componenti glicate e non glicate; per esempio cromatografia ad affinità e immunodosaggi.
La maggior parte dei metodi basati sulla differenza di carica e gli immunodosaggi quantificano l'HbA_{1c}, definita come l'emoglobina A con un residuo di glucosio legato alla valina NH2 terminale di una o di entrambe le catene β. Altri metodi quantificano "l'emoglobina glicata totale" che comprende sia l'HbA_{1c} che altri addotti emoglobina- glucosio (per esempio gli addotti glucosio-lisina e gli addotti glucosio valina NH2 terminale della catena α. legati in altri siti. Generalmente i risultati dei metodi che usano principi diversi mostrano correlazioni eccellenti e non ci sono dati convincenti che mostrino che un certo metodo o un certo analita sia clinicamente superiore ad un altro. Tuttavia i valori di emoglobina glicata ottenuti sullo stesso campione di sangue possono differire considerevolmente a seconda dei metodi utilizzati a meno che non si utilizzi una standardizzazione ad un riferimento comune (per esempio senza standardizzazione il risultato sullo stesso campione può essere 7% in un laboratorio e 9% in un altro) (90, 139, 149- 155).
Nel 1996 l'NGSP ha iniziato a standardizzare i risultati di GHb tra i laboratori riferendosi a valori equivalenti DCCT (154-156). Il razionale per standardizzare i risultati di GHb ai valori DCCT era che il DCCT ha dimostrato la relazione esistente tra la concentrazione di emoglobina glicata ed i rischi a lungo termine nei pazienti con diabete mellito (12, 14, 90, 122). L'NGSP si è sviluppato sotto gli auspici dell'AACC ed è sostenuto dall'ADA che raccomanda che i laboratori usino solo metodi per l'emoglobina glicata certificati dall'NGSP. Inoltre l'ADA raccomanda che tutti i laboratori che dosano l'emoglobina glicata partecipino ad un programma di verifica esterna di qualità per emoglobina glicata che utilizza campioni di sangue intero fresco (157).
L'NGSP Laboratory Network comprende numerosi metodi di determinazione, ognuno calibrato con il riferimento DCCT. Il riferimento DCCT è un metodo HPLC a scambio cationico che quantifica HbA_{1c} ed è il metodo definito di riferimento dall'NCCLS (140, 158). Questo metodo di misura viene utilizzato dal 1978 ed ha dimostrato una buona precisione a lungo termine (CV tre le serie < 3%) (157). I laboratori della NGSP network interagiscono con le ditte produttrici dei metodi di misura della GHb per assisterli prima nella calibrazione dei loro metodi e poi nel fornire i dati di confronto per la certificazione della tracciabilità al DCCT. La certificazione è valida per 1 anno. Una parte importante è il programma per la verifica esterna di qualità per la GHb organizzato dal CAP. Dal 1996 (iniziando con un progetto pilota che comprendeva 500 laboratori e allargatosi a tutti i laboratori nel 1998), il programma ha utilizzato campioni di sangue intero fresco con valori target (bersaglio) assegnati dal NGSP.
Da quando è iniziato nel 1996 l'NGSP, il programma di controllo di qualità ha documentato un notevole miglioramento nella confrontabilità dei valori di emoglobina glicata tra i laboratori, sia all'interno dello stesso metodo che tra metodi diversi. In generale i metodi NGSP-certificati hanno dimostrato minor variabilità e maggiore confrontabilità rispetto ai valori target assegnati dall'NGSP dei metodi non certificati (157). Il sito NGSP (htpp://www.missouri.edu/~diabetes/ngsp.html) fornisce informazioni dettagliate sul processo di certificazione e fornisce una lista dei metodi di determinazione certificati.

Fase preanalitica

Variabili legate al paziente. Non ci sono effetti clinicamente significativi di età, sesso, etnia o stagione sui risultati dell'emoglobina glicata. Gli effetti dell'età sull'emoglobina glicata sono controversi (159-161). Alcuni studi hanno mostrato un incremento legato all'età della GHb, pari circa allo 0.1% per decade dopo i 30 anni. Altri lavori hanno mostrato un incremento piccolo o nullo. Differenze nei risultati tra gli studi sono probabilmente da attribuire a differenze nella selezione dei partecipanti allo studio; quando gli studi erano ristretti a partecipanti con tolleranza al glucosio normale (ad esempio soggetti con glicemia a digiuno e glicemia post-prandiale entro l'intervallo di riferimento) l'incremento dell'emoglobi-

na glicata legato all'età era modesto o nullo. Anche la presenza di malattie acute non influenzava significativamente i risultati.
Ogni condizione che provoca un accorciamento della sopravvivenza eritrocitaria o comunque diminuisce la vita media eritrocitaria (come convalescenza dopo emorragia acuta o anemia emolitica) provoca un falso abbassamento dei valori di emoglobina glicata indipendentemente dai metodi di misura (90). E' stato segnalato che le vitamine C ed E provocano risultati falsi negativi, probabilmente per inibizione della glicazione dell'emoglobina (162, 163), ma la vitamina C può provocare un incremento dei valori in alcuni dosaggi (164). L'assunzione di cibo non provoca effetti sostanziali. Ipertrigliceridemia, iperbilirubinemia, uremia, alcoolismo cronico, ingestione cronica di salicilati e dipendenza da oppiacei interferiscono con alcuni metodi di determinazione, causando risultati falsamente aumentati (139, 165-167).
Alcune emoglobinopatie (per esempio HbS, HbC, Graz, Sherwood Forest, D e Padova) e derivati chimicamente modificati dell'emoglobina interferiscono con alcuni metodi di determinazione, indipendentemente dalla sopravvivenza eritrocitaria [(168-170); per una rassegna sull'argomento vedi Ref (171)]. A seconda della particolare emoglobinopatia e del metodo di misura, i risultati possono essere falsamente aumentati o diminuiti. Alcuni metodi possono dare un risultato all'interno dell'intervallo di riferimento nei pazienti non diabetici con una variante emoglobinica, ma questo non significa che l'interferenza non ci sia. L'interferenza può essere lieve all'interno dell'intervallo di riferimento, ma può aumentare marcatamente con l'aumento della concentrazione di emoglobina glicata. La cromatografia di affinità basata sul boronato viene generalmente considerata come meno sensibile all'interferenza legata alla presenza delle emoglobinopatie rispetto a metodi che separano componenti glicate da quelle non glicate sulla base della differenza di carica. In alcuni casi come con la maggior parte dei metodi HPLC a scambio cationico, l'ispezione visiva dei cromatogrammi può suggerire al laboratorio la presenza di una variante o di un possibile interferente. In queste situazioni possono essere utili metodi alternativi non basati sulla emoglobina per valutare il controllo glicemico a lungo termine (171).
Poiché le interferenze sono metodo-specifiche, le istruzioni fornite dalle ditte produttrici devono essere esaminate attentamente prima di utilizzare i metodi di determinazione per la GHb. Nella scelta di un metodo di determinazione, il laboratorio deve anche considerare le caratteristiche della popolazione locale, come ad esempio la prevalenza di emoglobinopatie.

Prelievo e conservazione del campione. Il sangue può essere ottenuto con prelievo venoso oppure capillare dal polpastrello (172, 173). L'anticoagulante da utilizzare è l'EDTA a meno di indicazioni diverse da parte delle ditte produttrici. La stabilità del campione è legata al metodo di determinazione (174,175). In generale i campioni di sangue intero sono stabili per 1 settimana a 4 °C. Per la maggior parte dei metodi i campioni conservati a – 70 °C o a temperatura inferiore sono stabili per lunghi periodi (almeno 1 anno), ma i campioni non sono stabili a –20 °C. Una conservazione impropria dei campioni, per esempio a temperature elevate, può provocare artefatti notevoli che non sono sempre identificabili, a seconda del metodo di determinazione utilizzato.
Recentemente sono stati proposti numerosi sistemi per la raccolta del campione, come filtri di carta e piccole provette contenenti lisanti e stabilizzanti (176 – 178). Questi sistemi sono progettati per la raccolta dei campioni sul campo e l'invio successivo al laboratorio. Questi sistemi sono generalmente abbinati a specifici metodi di determinazione e devono essere utilizzati solo dopo lo svolgimento di studi che confrontino questi nuovi dispositivi di raccolta del campione con quelli tradizionali per lo specifico metodo usato.

Fase analitica

Raccomandazione: I laboratori devono utilizzare metodi di misura dell'emoglobina glicata con CV interdosaggio <5% (idealmente < 3%). Devono essere utilizzati almeno 2 diversi campioni di controllo, a 2 diversi livelli come misura indipendente delle prestazioni del dosaggio. I laboratori devono verificare e rianalizzare i campioni che risultano con un valore inferiore all'intervallo di riferimento o superiore del 15 %. E' necessario rimuovere, prima della determinazione, la base di Schiff (pre-HbA_{1c} labile) se questa interferisce con il metodo di misura.

Livello di evidenza: C

Obiettivi di performance e controllo di qualità. Numerosi gruppi di esperti hanno proposto delle raccomandazioni circa i requisiti dei dosaggi dell'emoglobina glicata. I primi articoli raccomandavano un CV < 5 % per le concentrazioni di emoglobina glicata che si riscontrano sia nei pazienti sani che in quelli diabetici (179). Articoli più recenti suggeriscono invece CV più bassi, per esempio un CV intralaboratorio < 3 % e inter-laboratori < 5% (180). Queste raccomandazioni appaiono ragionevoli; i CV intraindividuali sono molto piccoli (< 2%) e molti dei metodi di determinazione attuali possono raggiungere CV < 3%. Noi raccomandiamo un CV intralaboratorio <3%.
I laboratori devono inserire, all'inizio e alla fine della seduta analitica di ogni giornata, due campioni di controllo a due valori diversi (alto e basso). Controlli di sangue intero congelati a –70 °C in singole aliquote sono stabili per mesi o perfino anni, a seconda del metodo di determinazione impiegato. Sono anche disponibili in commercio controlli liofilizzati, ma, a seconda del metodo impiegato, possono presentare un effetto matrice quando si introdu-

cono reagenti nuovi o colonne nuove. Si raccomanda che il laboratorio consideri di utilizzare sia controlli commerciali che controlli interni per ottimizzare le sue prestazioni.

Intervalli di riferimento. Il laboratorio deve determinare il proprio intervallo di riferimento secondo le linee guida NCCLS (Documento NCCLS C28A), anche se il produttore ne fornisce uno. La popolazione su cui determinare l'intervallo di riferimento deve essere non obesa e presentare una glicemia a digiuno inferiore a 6.1 mmol/L (110 mg/dL). Per i metodi certificati dal NGSP, la DS per l'intervallo di riferimento è generalmente ≤ 0.5% dell'emoglobina glicata; il CI al 95% risulta < 2% (per esempio HbA_{1c} media ± 2 DS = 5.0% ± 1.0%). Per i metodi certificati dell'NGSP gli intervalli di riferimento non devono deviare in maniera significativa (vale a dire > 0.5%) dall'intervallo 4-6%. Da notare che per valutare il controllo metabolico di un paziente si utilizzano i valori target raccomandati dall'ADA e derivati dai due trial DCCT e UKPDS (9) e non i valori di riferimento.

Campioni al di fuori dell'intervallo di riferimento. I laboratori devono rianalizzare tutti i campioni che presentano un risultato più basso del limite inferiore dell'intervallo di riferimento. Se questo viene confermato, si devono raccogliere informazioni presso il medico curante circa la presenza di una emoglobinopatia o di una causa di emolisi. Inoltre anche i campioni con valori superiori del 15 % al limite inferiore devono essere rianalizzati e, se confermati, anche in questo caso si deve indagare l'eventuale presenza di una emoglobinopatia. (171).

Rimozione della fase labile. La formazione dell'emoglobina glicata comporta la formazione di un composto intermedio chiamato base di Schiff o "pre-A_{1c}" o A_{1c} labile (181, 182). Questo composto si forma rapidamente in corso di iperglicemia e interferisce con alcuni metodi di determinazione, in particolare con quelli che si basano sulle differenze di carica. E' necessario per questi metodi attenersi alle indicazioni del produttore per rimuovere questo composto intermedio labile.

INTERPRETAZIONE

Interazione laboratorio/medico curante

Il laboratorio deve lavorare in stretto contatto con i medici curanti che richiedono la GHb per i loro pazienti. L'interpretazione dei risultati dell'esame richiede una preliminare conoscenza del metodo di determinazione ed in particolare delle interferenze conosciute. Per esempio, se il metodo di determinazione risente della presenza di una emoglobina anomala (anche se la sopravvivenza degli eritrociti non è diminuita) o di uremia, il medico curante deve esserne informato.

Un importante vantaggio relativo all'uso di metodi certificati NGSP è che i laboratori, possono dare specifiche informazioni che correlano i risultati dell'emoglobina glicata sia ai livelli di glicemia media sia ai rischi di complicanze definiti dal DCCT e dall'UKPDS (12, 90, 122). Queste informazioni sono disponibili sul sito NGSP. Ad esempio ogni variazione del 1% di GHb è correlata ad una variazione della glicemia plasmatica di circa 2 mmol/L (35 mg/dL).

Alcuni studi suggeriscono che se il paziente ottiene già al momento della visita anche i risultati dell'emoglobina glicata, il loro controllo glicemico a lungo termine migliora (183). Comunque sono necessari altri studi per confermare tale segnalazione prima di raccomandare questa strategia. Per poter ottenere il risultato dell'esame al momento della visita è necessario o eseguire il prelievo poco prima della visita o ricorrere ad un metodo di determinazione rapido che si può adattare alle necessità cliniche.

Applicazioni cliniche

> Raccomandazione: Gli obiettivi del trattamento devono basarsi sulle raccomandazioni ADA, che prevedono il mantenimento della concentrazione di GHb < 7% e la rivalutazione del regime terapeutico se i valori di GHb > 8%. (Da notare che questi criteri sono applicabili solo se il metodo di misura è tra quelli certificati come tracciabili con il metodo di riferimento DCCT). La determinazione dell'emoglobina glicata deve essere eseguita due volte l'anno in tutti i pazienti e quattro volte l'anno nei casi in cui la terapia sia stata cambiata o non siano stati raggiunti gli obiettivi di trattamento.
>
> Livello di evidenza: B

Obiettivi del trattamento. La determinazione dell'emoglobina glicata fa parte della gestione clinica routinaria dei pazienti con diabete mellito. Soprattutto in base ai risultati del DCCT, l'ADA ha raccomandato che uno degli obiettivi terapeutici principali sia di mantenere la GHb <7 % e che i medici curanti devono rivalutare la terapia nei pazienti con valori di GHb > 8% (9, 10). Questi valori di GHb sono applicabili solo ai metodi di determinazione certificati come tracciabili al metodo di riferimento DCCT, con un intervallo di riferimento dell'HbA_{1c} compreso all'incirca nell'intervallo 4-6%. Nel DCCT ogni diminuzione della GHb del 10% (ad esempio da 12% a 10.8% o da 8% a 7.2%) era associata ad una diminuzione del rischio di progressione di retinopatia diabetica del 45% (184). Una riduzione del rischio simile è stata trovata anche nell'UKPDS (133). Si deve tuttavia notare che sia nell'UKPDS che in nel DCCT la diminuzione dei valori di GHb era associata ad un aumentato rischio di grave ipoglicemia.

Frequenza dei dosaggi. Non vi è consenso sulla frequenza ottimale dei dosaggi di emoglobina glicata. L'ADA raccomanda che "per ogni singolo paziente la frequenza di determinazioni di GHb sia legata al giudizio del medico curante. In assenza di

studi rigorosi che suggeriscano un particolare protocollo di monitoraggio, l'opinione degli esperti è che l'emoglobina glicata deve essere misurata almeno due volte l'anno nei pazienti che abbiano raggiunto gli obiettivi terapeutici (e che siano in controllo glicemico stabile) e più frequentemente (quattro volte l'anno) nei pazienti la cui terapia sia stata modificata o che non abbiamo raggiunto gli obiettivi terapeutici (14). Queste raccomandazioni riguardano sia i pazienti con diabete di tipo 1 che i pazienti con diabete di tipo 2. I programmi di verifica della qualità dell'assistenza dei diabetici come ADA Provider Recognition Program e HEDIS 2000 (134, 135) hanno generalmente richiesto come documentazione la percentuale dei pazienti con diabete che hanno avuto almeno una determinazione di GHb nell'anno precedente. Alcuni studi hanno stabilito che misurazioni seriate (quattro volte l'anno) dell'emoglobina glicata producono un netto miglioramento dei valori di emoglobina glicata nei pazienti con diabete di tipo 1 (185).

Interpretazione. I valori di GHb nei pazienti con diabete si distribuiscono in modo continuo: vanno da valori normali in una piccola percentuale di pazienti in cui la concentrazione glicemica plasmatica media è vicina a quella degli individui non diabetici, a valori molto aumentati, con incrementi di due- tre volte in alcuni pazienti, che rivelano una marcatissima iperglicemia. L'equazione che lega emoglobina glicata e glicemia, che è usata solo dai produttori (non dai singoli laboratori clinici) richiede confronti multipli. Per poter comunque interpretare il risultato di una GHb in modo corretto è necessario che il medico conosca la relazione esistente tra i valori di GHb e la glicemia media, la cinetica della GHb, e i limiti e/o interferenze del metodo di misura (90). Piccole variazioni della GHb (± 0.5 %) possono riflettere la variabilità analitica piuttosto che un vero cambiamento dello stato glicemico.

CONSIDERAZIONI EMERGENTI

Uso della GHb per lo screening e la diagnosi di diabete

Al momento l'ADA non raccomanda la determinazione della GHb nello screening e nella diagnosi del diabete (186). Su questo argomento, tuttavia, i pareri sono molto discordanti e sono necessari ulteriori studi per determinare se la GHb è utile nella diagnosi e nello screening del diabete (187-190). L'uso ottimale della GHb nella diagnosi e nello screening del diabete richiederà anche metodi molto precisi.

Uso di altre proteine glicate, comprese gli Advanced Glycation End-Products (prodotti finali di glicazione avanzata) nella gestione dei pazienti con diabete mellito

Ulteriori studi sono necessari per stabilire se altre proteine glicate, come la fruttosamina, siano clinicamente utili per valutare routinariamente lo stato glicemico dei pazienti nella routine. Ulteriori studi sono anche necessari anche per valutare se la determinazione dei prodotti finali di glicazione avanzata è clinicamente utile nel predire il rischio di complicanze croniche del diabete (191). Nessuno di questi analiti è stato valutato dal DCCT o dall'UKPDS.

Standardizzazione globale dei metodi di determinazione dell'emoglobina glicata

Nel 1995, l'IFCC (Federazione Internazionale di Chimica Clinica) ha formato un Gruppo di Studio sulla standardizzazione dell'HbA_{1c} [Working Group on HbA_{1c} Standardization (IFCC-WG)]. Questo comitato, che comprende membri del NGSP Steering Committee and Laboratory Network, sta valutando numerosi metodi e materiali di GHb purificata (HbA_{1c} purificata) candidati a diventare di riferimento che potenzialmente potrebbe fungere da legame tra NGSP e i programmi di standardizzazione della GHb in altri paesi (192). Questo programma è particolarmente interessante perché consentirebbe di confrontare un valore di GHb ottenuto in qualsiasi parte del mondo con quelli ottenuti nel DCCT e nell'UKPDS. L'IFCC ha creato una rete di laboratori che utilizzano sia la spettroscopia di massa che l'elettroforesi capillare come candidati a diventare al metodo di riferimento. Il materiale candidato a diventare di riferimento è una miscela di HbA_{1c} e HbA_0 purificate (193-195). Confronti preliminari tra i campioni analizzati dall'IFCC Laboratory Network e dal NGSP Laboratory Network sono incoraggianti; sembra esserci una relazione lineare tra i due sistemi di riferimento (comunicazione personale di Kor Miedema, Chairperson, IFCC-WG, 17 gennaio 2000). Se ulteriori studi confermeranno la relazione tra i due network, sarà possibile utilizzare uno dei metodi di riferimento IFCC per rimpiazzare l'attuale riferimento NGSP (un metodo di confronto adottato fino ad oggi molto meno specifico per l'HbA_{1c} rispetto alla spettrometria di massa e l'elettroforesi capillare).

Supponendo che il sistema di riferimento IFCC sia adottato dal NGSP e da altri programmi di standardizzazione, un problema importante che deve essere affrontato sono i valori diversi ottenuti dai due network. Il sistema di riferimento IFCC dà valori di GHb più bassi rispetto a quelli ottenuti nel DCCT e UKPDS. Quindi c'è da chiedersi se si devono utilizzare i nuovi valori più bassi IFCC insieme con il nuovo sistema di riferimento o se si deve continuare ad usare i valori attuali, tracciabili al DCCT ed ampiamente utilizzati. In questo caso i risultati ottenuti con il sistema di riferimento IFCC devono essere convertiti in concentrazioni DCCT-equivalenti con una equazione. Per definire questa equazione che sarà usata solo dai produttori (non dai singoli laboratori clinici) saranno necessari numerosi confronti tra i due sistemi per definire la tracciabilità. La soluzione corretta di questo importante problema richiederà un consenso internazio-

nale con un processo che coinvolga sia clinici che laboratoristi.

Marker genetici
USO

Diagnosi/Screening
Diabete di tipo 1

Raccomandazione: La determinazione routinaria dei marker genetici non è oggi utile per la diagnosi o la gestione dei pazienti con diabete di tipo 1. In sindromi diabetiche particolari, possono essere ottenute informazioni utili dalla definizione di mutazioni associate al diabete

Livello di evidenza: E

I marker genetici sono oggi di utilità limitata nella valutazione e nella gestione dei pazienti con il diabete anche se nel futuro potrebbero averne. Per il diabete di tipo 1 immuno-mediato (IMD) la tipizzazione HLA può essere usata per indicare il rischio assoluto di diabete (vedi Tabella VI), come esteso dalla tipizzazione del gene insulina (INS) (ed in alcune popolazioni dalla tipizzazione del gene CTLA-4) e può essere utile nell'assegnare una probabilità nella diagnosi di IMD al diabete ad eziologia incerta (196). Come indicato di seguito, la tipizzazione HLA-DR-DQ può essere utile per indicare il rischio modificato di IMD in persone con anticorpi anti- insula positivi poiché gli alleli protettivi non prevengono la comparsa di autoanticorpi anti-insula (più spesso come singoli anticorpi) ma proteggono dal diabete clinico. La tipizzazione degli antigeni di classe II del sistema maggiore di istocompatibilità o HLA-DRB1, -DQA1 e DQB1 non è diagnostico per IMD. Tuttavia, alcuni aplotipi danno suscettibilità mentre altri sostanziale protezione. Quindi la tipizzazione HLA-DR/DQ può essere usata solo per aumentare o diminuire la probabilità di manifestazione di IMD e non può essere raccomandata per la diagnosi clinica o per la classificazione (197).
I neonati possono essere sottoposti a screening per identificare quelli a rischio aumentato di sviluppare IMD (198, 199). Questa strategia non può essere raccomandata finchè non sarà disponibile un intervento per ritardare o impedire la malattia (200). Il razionale per l'approccio è quindi indicato di seguito sulla base di considerazioni emergenti.

Diabete di tipo 2 e diabete del giovane ad insorgenza nell'adulto (MODY)

Raccomandazione: Gli studi genetici non hanno nessun ruolo nella routine per i pazienti con diabete di tipo 2. Questi studi devono essere limitati all'ambito della ricerca ed alla valutazione di sindromi specifiche.

Livello di evidenza: E

Tabella VI. Rischio di contrarre il diabete di tipo 1 nel corso della vita in parenti di primo grado (probando diagnosticato prima dei 20 anni).[a]

Parente	Rischio%
Genitori	2.2±0.6
Bambini	5.6±2.8
Fratelli	6.9±1.3
HLA non identici	1.2
HLA-aploidentici	4.9
HLA-identici	15.9
Gemelli identici	30-40
Popolazione generale	0.3

[a]da Harrison (205)

Diabete di tipo 2: Meno del 5% dei pazienti con diabete di tipo 2 sono stati chiariti sulla base genetico-molecolare e non sorprende che la maggior parte di questi presenti una forma della malattia autosomica dominante o una resistenza insulinica di grado molto elevato. Il diabete di tipo 2 è una malattia poligenica eterogenea che presenta sia resistenza all'azione dell'insulina sia un deficit di secrezione di insulina (3,4). Molti fattori genetici interagiscono con influenze esogene per produrre il fenotipo. Risulta quindi molto complesso identificare i geni interessati.

MODY: E' tecnicamente possibile identificare la mutazione nei pazienti MODY e nei loro parenti. Tuttavia pochi laboratori eseguono questi esami sia per l'elevato costo dell'attrezzatura necessaria per individuare mutazioni sia per la grande abilità tecnica richiesta dall'analisi. E' probabile che, con la standardizzazione dell'automazione delle definizioni delle sequenze dei geni, l'individuazione di specifiche mutazioni genetiche diventerà più comune.

Monitoraggio/Prognosi
Anche se lo screening genetico può fornire informazioni sulla prognosi e potrebbe essere utile per dare consulenze genetiche, il genotipo può non correlarsi con il fenotipo. Oltre a fattori ambientali possono essere implicate anche interazioni tra espressioni multiple quantitative di loci-trait. L'identificazione genetica di una definita MODY sarà utile per anticipare la prognosi.

RAZIONALE
Il sistema HLA, che ha un ruolo fondamentale nella risposta immunitaria all'adattamento, presenta una grande complessità genetica. Il complesso HLA sul cromosoma 6 contiene geni classe I e II che codificano per numerose catene polipeptidiche (201). I geni principali (classici) di classe I sono HLA-A, -B e –C. I loci dei geni di classe II sono denominati da tre lettere: la prima (D) indica la classe, le seconda (M, O, P, Q o R) la famiglia e la terza (A o B) la catena. Le due classi di molecole sono eterodimeri: la classe I consiste di una catena α e di una β2-micro-

globulina, mentre la classe II ha catene α e β. La funzione delle molecole HLA è di presentare i piccoli peptidi derivati dai patogeni alle cellule T per iniziare la risposta immunitaria e di adattamento (201). Studi genetici hanno rivelato una associazione tra alcuni alleli HLA e malattie autoimmuni. Queste malattie comprendono, tra le altre, la spondilite anchilosante, la malattia celiaca, la malattia di Addison e il diabete di tipo 1 (201).
Gli esami genetici per le forme sindromiche di diabete sono gli stessi che per la sindrome sottostante. Il diabete può essere secondario all'obesità associata alla sindrome di Prader-Willi, "mappata" sul cromosoma 15q, o all'assenza di tessuto adiposo tipico della sindrome recessiva di Seip-Berardinelli della lipodistrofia generalizzata "mappata" sul cromosoma 9q34 (1,202). I disordini genetici distinti associati con intolleranza al glucosio o diabete franco sono più di 60. La maggior parte delle forme di diabete di tipo 2 (di solito a base fortemente familiare) sono probabilmente comprese in termini genetici precisi ma questo è ben lungi da verificarsi oggi. Alcuni dei geni per MODY sono stati identificati, ma vi sono molti individui mutanti. Soggetti a rischio nell'ambito di un pedigree MODY possono essere identificati con metodi genetici. A seconda della specifica mutazione MODY la malattia può essere lieve (ad esempio mutazione della glucochinasi) e non è associata di solito a complicanze diabetiche a lungo termine come il diabete di tipo 1 [(come mutazioni del fattore nucleare epatocitico (HNF)] (203). L'interesse nella genetica del MODY risiede nella speranza che chiarisca il diabete di tipo 2 (Notare che il MODY non è una forma di diabete di tipo 2).
Sono stati identificati cinque tipi diversi di MODY. MODY-1, -3, -4 e –5 risultano tutti da mutazioni nei geni che codificano i fattori di trascrizione che regolano l'espressione dei geni nelle cellule β pancreatiche. Questi geni sono HNF-4 α nel MODY-1, HNF-1 α nel MODY-3, HNF-1 α nel MODY-5 e IPF-1 (fattore promuovente l'insulina) nel MODY-4. E' stato dimostrato che mutazioni omozigoti del gene IPF-1 portano all'agenesia pancreatica e che mutazioni eterozigoti dell'IPF-1 portano al MODY-4 (202). Le modalità di azione delle lesioni HNF nel MODY non sono ancora chiare. E' probabile che la mutazione nell'HNF-1 α , -1 β e 4 α causino diabete perché ostacolano la secrezione di insulina. Il MODY-2 è causato da mutazioni nel gene della glucochinasi. Il prodotto del gene è un enzima essenziale nel meccanismo di sensibilità al glucosio delle cellule β che rilevano il glucosio e mutazioni di questo gene portano a deficit parziale della secrezione di insulina.

CONSIDERAZIONI ANALITICHE

Non si tenterà in questa sede di fare una rassegna dettagliata delle problematiche analitiche poiché le analisi genetiche non sono oggi raccomandate al di fuori dell'ambito di ricerca. La tipizzazione HLA sierologica deve essere sostituita da metodi molecolari come il priming (innesco) sequenza specifico poiché si è stimato che le reattività crociate danno risultati inaccurati in circa il 15% delle tipizzazioni.

Fasi preanalitica

La ricerca di mutazioni è eseguita usando DNA genomico estratto da leucociti di sangue periferico. I campioni di sangue devono essere raccolti in provette contenenti EDTA e le preparazioni di DNA devono essere effettuate entro tre giorni; intervalli più lunghi abbassano la resa e diminuiscono la qualità del DNA ottenuto. Il DNA genomico può essere isolato da sangue intero fresco o congelato mediante lisi, digestione con proteinasi K, estrazione con fenolo e dialisi. La resa media è 100-200 µg di DNA da 10 mL di sangue intero. I campioni di DNA sono meglio conservati a – 80 °C in soluzione di Tris-EDTA in cui l'integrità del campione si mantiene per un tempo virtualmente illimitato.

Fasi analitica

I metodi per l'individuazione di mutazioni differiscono nei diversi tipi di mutazione. I diversi tipi di MODY presentano sostituzione, delezione o inserimento di nucleotidi nelle regioni codificanti. Queste sono individuate mediante PCR. I protocolli dettagliati per l'individuazione di mutazioni specifiche va oltre lo scopo di questa rassegna.

CONSIDERAZIONI EMERGENTI

I geni HLA-D sono i più importanti nello screening del rischio di IMD nella popolazione generale poiché contribuiscono al 50% della suscettibilità genetica (196). I geni HLA-DQ mostrano avere un ruolo centrale nel rischio per IMD associato all'HLA, anche se i geni HLA-DR possono essere coinvolti in modo indipendente (per una rassegna vedere i riferimenti 204 e 205). Le proteine eterodimere che sono espresse sulle cellule che presentano l'antigene, linfociti B, piastrine e cellule T attivate ma non altre cellule somatiche, sono composte da due eterodimeri a catene α e β cis e trans complementate. Quindi quattro possibili dimeri DQ sono codificati in ogni individuo. Rischi positivi per IMD sono associati a catene α che presentano una origine sul residuo 52 e catene β che mancano di un acido aspartico sul residuo 57. Gli individui con maggior rischio genetico di IMD sono quelli in cui tutte le quattro combinazioni HLA-DQ soddisfano questo criterio. Quindi soggetti eterozigoti per HLA-DRB1*04-DQA1*0301-DQB1*0302 e DRB1*03-DQA1*0501-DQB1*0201 sono i più suscettibili, con un rischio assoluto nel corso della vita nella popolazione generale intorno a 1:12. Soggetti protetti dall'IMD sono quelli con aplotipi DRB1*15-DQA1*0201-DQB1*0602 (Asp 57+) in particolare (206), anche se sono protetti quelli con DRB1*11 o *04 che hanno anche DQB1*0301 (Asp 57+). L'H-

LA-DR è anche coinvolto nella suscettibilità all'IMD poiché i sottotipi B1*0401 e *0405 del DRB1*04 sono suscettibili, mentre i sottotipi *0403 e *0406 sono protettivi anche quando trovati negli aplotipi HLA del DQA1*0301-DQB1*0302 suscettibili. Anche le molecole DR sono eterodimere ma la catena DR α è uguale in tutte. Le catene aggiuntive DR β (B3, B4 e B5) non sono importanti.
La classe II del MCHC è coinvolta nella presentazione dell'antigene alle cellule CD4 helper ed è probabile che le associazioni indicate precedentemente siano spiegate da deficit di affinità ai peptidi antigenici delle cellule insulari portando alla persistenza di cellule T-helper che sfuggono alla ablazione del timo. Anche l'HLA classe I è implicato nell'IMD e anche loci multipli non-HLA contribuiscono alla suscettibilità al diabete di tipo 1 (204). Per esempio la ripetizione nucleotidica tandem che va a ritroso dal gene insulina (INS) al cromosoma 11q è utile per predire lo sviluppo di IMD; gli alleli con il tandem nucleotidico variabile più lungo ha effetti protettivi. La tipizzazione dei neonati sia per HLA-DR/DQ che, in grado minore, per il gene INS, migliora le previsioni di IMD a più di 1:10 nella popolazione generale. Il rischio di IMD in fratelli HLA-identici di un probando con IMD è 1:4 mentre i fratelli che hanno identità aplotipo HLA hanno un rischio 1:12 e quelli che non condividono l'aplotipo un rischio 1:100 (205). I numerosi altri intervalli genomici putativi che sono stati suggeriti essere legati all'IMD devono essere confermati e la discussione di questi esula dallo scopo di queste linee guida. Lo studio della sequenza del genoma umano e la formazione di consorzi porterà a progressi nella identificazione delle basi genetiche del diabete di tipo 1 e del diabete di tipo 2. Questi progressi dovrebbero consentire consulenza familiare, informazioni prognostiche e scelta della terapia ottimale (202, 207).

Marker autoimmuni

USO

> Raccomandazione: Gli anticorpi anti insula sono raccomandati per lo screening dei familiari non diabetici che desiderano donare parte del loro pancreas per trapianto ad un parente con un diabete di tipo 1 immunomediato terminale. Gli anticorpi anti insula non sono raccomandati per la diagnostica di routine del diabete o per lo screening.
>
> Livello di evidenza: E

Non è stato individuato nessun intervento terapeutico che previene il diabete (204, 205). Quindi anche se nei soggetti con diabete di tipo 1 sono stati individuati molti autoanticorpi, la loro determinazione ha una utilità molto limitata al di fuori di studi clinici. A causa delle indicazioni molto limitate dell'impiego degli autoanticorpi nella gestione routinaria dei pazienti con diabete, questa sezione si concentrerà sugli aspetti pratici attuali della determinazione degli autoanticorpi nel laboratorio clinico e tratterà brevemente alcune aree di dibattito.

Diagnosi/screening

Diagnosi. Nel diabete di tipo 1 le β cellule pancreatiche che producono insulina sono distrutte. Nella grande maggioranza di questi pazienti, la distruzione è mediata dalla cellule T (1). In questo caso la malattia è denominata diabete di tipo 1A o IMD (Tabella I). Gli anticorpi anti insula comprendono anticorpi contro il citoplasma delle cellule insulari (ICA); contro l'insulina nativa, denominati autoanticorpi anti insulina (IAA) (208); contro la decarbossilasi dell'acido glutammico ($GAD_{65}A$) (209-211) e due fosfatasi della tirosina [antigene associato all'insulinoma IA-2A (212) e IA-2 β A (213)]. Marker autoimmuni di distruzione immunitaria si trovano in circa l'85-90% dei soggetti con IMD quando viene scoperta inizialmente una iperglicemia a digiuno (1). La distruzione autoimmune delle cellule β ha predisposizioni genetiche multiple ed è modulata da influenze ambientali non definite. L'autoimmunità può essere presente mesi o anni prima della comparsa dei sintomi. I pazienti con diabete di tipo 1 presentano un rischio aumentato in modo significativo di altri disordini autoimmuni come la malattia celiaca, la malattia di Graves, la tiroidite, la malattia di Addison e l'anemia perniciosa (63). Fino a 1 su 4 donne con IMD hanno una malattia tiroidea autoimmune, mentre una su 280 sviluppa autoanticorpi anti-surrene ed insufficienza surrenalica. Una minoranza dei pazienti con diabete di tipo 1 (tipo 1 B; idiopatica) non hanno una eziologia conosciuta e nessuna evidenza di autoimmunità. La maggior parte di questi pazienti sono di origine africana o asiatica.
Circa il 10-15% dei pazienti adulti caucasici che presentano un fenotipo di diabete di tipo 2 presentano anche autoanticorpi anti-insula (214) soprattutto $GAD_{65}A$ che predicono la dipendenza all'insulina. Questo è stato definito diabete autoimmune latente dell'adulto (215). Anche se i pazienti diabetici ICA o $GAD_{65}A$-positivi progrediscono più rapidamente verso l'insulinopenia assoluta rispetto ai pazienti anticorpi negativi, anche molti adulti diabetici anticorpi negativi (tipo 2) progrediscono (ma più lentamente). La determinazione degli autoanticorpi anti cellule insulari non ha un ruolo nel diabete di tipo 2 poiché la terapia insulinica è instaurata sulla base del controllo glicemico.

Screening

> Raccomandazione: Oggi lo screening per autoanticorpi anti insula di parenti di pazienti con diabete di tipo 1 o della popolazione generale non è raccomandato.
>
> Livello di evidenza: E

Il rischio di sviluppare IMD da parte di parenti di pazienti con diabete di tipo 1 è intorno al 5% che è 15 volte più alto del rischio della popolazione generale (1:250-300 nel corso della vita). Lo screening per an-

ticorpi anti insula dei parenti dei pazienti con IMD può individuare quelli a rischio elevato di IMD. Tuttavia, fino all'1-2% dei soggetti sani presentano un solo anticorpo e hanno un rischio basso di sviluppare IMD (216). A causa della bassa prevalenza dell'IMD (intorno allo 0.3% nella popolazione generale), il valore predittivo positivo di un singolo anticorpo sarà basso (205). La presenza di multipli autoanticorpi anti-insula (IAA, $GAD_{65}A$ e IA-2A/IA-2 β A) è associato ad un rischio di IMD > 90% (216, 217). Tuttavia questi esami non possono essere raccomandati al di fuori di un ambito di ricerca fino a quando non sono messe a punto delle strategie di screening per i bambini efficaci dal punto di vista del costo e delle terapie per impedire lo svilupparsi della malattia. I bambini e i giovani adulti con alcune catene HLA-DR e/o DQB1 (*0602/ *0603/*0301) sono protetti in modo particolare dall'IMD, ma non dallo sviluppare autoanticorpi anti-insula (218). Poiché gli autoanticorpi anti insula in questi soggetti hanno un significato predittivo particolarmente scarso, questi devono essere esclusi dai trial dedicati alla prevenzione.

Monitoraggio /Prognosi

Raccomandazione: La determinazione degli anticorpi anti insula non ha oggi nessun ruolo nel monitoraggio dei pazienti nella pratica clinica. Gli anticorpi anti insula sono misurati in protocolli di ricerca ed in alcuni trial clinici come end-point surrogati.

Livello di evidenza: E

Non è stata dimostrata nessuna terapia accettabile per prolungare la sopravvivenza di cellule insulari una volta che la diagnosi di diabete è stata fatta o per impedire l'insorgenza clinica del diabete in pazienti positivi per anticorpi anti insula (204). Quindi attualmente non è clinicamente utile la determinazione degli anticorpi anti insula per monitorare l'autoimmunità delle insule. Nei trapianti di cellule insulari o di pancreas, la presenza o meno di autoanticorpi anti insula può chiarire se il fallimento di un trapianto di insule sia da attribuire a recidiva di malattia autoimmune o a rigetto del trapianto (219). Quando parte di pancreas è stata trapiantata da un gemello identico o da fratelli HLA-identici, la comparsa di autoanticorpi anti insula può suggerire la possibilità di impiegare agenti immunosoppressivi per cercare di arrestare la recidiva del diabete. Nonostante questi vantaggi teorici non è ancora stato definito il valore di questa strategia terapeutica.
Alcuni esperti hanno proposto che la determinazione degli anticorpi anti insula può essere utile nelle seguenti situazioni: a) identificare il sottogruppo di adulti ritenuti inizialmente essere affetti da diabete di tipo 2 ma che presentano anticorpi anti insula, marker di diabete di tipo 1 e che progrediscono verso la dipendenza da insulina; b) sottoporre a screening i membri non diabetici della famiglia che desiderano donare una parte del loro pancreas per trapianto; c) sottoporre a screening le donne con GDM per identificare quelle a rischio elevato di progressione verso il diabete di tipo 1; d) distinguere diabete di tipo 1 e diabete di tipo 2 nei bambini per instaurare la terapia insulinica al momento della diagnosi (221, 222). Per esempio alcuni diabetologi pediatrici stanno trattando i bambini che ritengono siano affetti da diabete di tipo 2 con farmaci orali e quelli positivi agli autoanticorpi immediatamente con insulina. Tuttavia, è possibile seguire i pazienti che sono positivi agli anticorpi anti-insula fino alla decompensazione metabolica e iniziare poi la terapia insulinica. Un trial pilota limitato giapponese suggerisce che la terapia insulinica nei pazienti positivi agli autoanticorpi anti insula può preservare il peptide C (misura della secrezione insulinica) rispetto ai farmaci orali (223), ma questa osservazione richiede conferma. Durante la revisione di questo manoscritto da parte di un pannello di esperti, è diventato evidente che esiste una grande variabilità nella pratica clinica relativa all'uso degli anticorpi anti insula. Anche se alcuni indicano che i risultati dei dosaggi di autoanticorpi sono utili dal punto di vista clinico, altri sostengono che non esistono evidenze per questa affermazione. Anche se alcuni clinici, soprattutto quelli che trattano i pazienti pediatrici, usano la determinazione degli autoanticorpi come indicato nel paragrafo precedente, sono necessari studi clinici per fornire i dati di outcome (risultato) per validare questo approccio. Non sono state dedicate rassegne sistematiche a questo tema.

RAZIONALE

La presenza di autoanticorpi suggerisce che la terapia insulinica è l'opzione più appropriata, soprattutto in un giovane. Di converso, può essere considerato un tentativo con farmaci orali o interventi sullo stile di vita nei bambini o giovani senza autoanticorpi anti insula. Le opinioni non sono unanimi, ma la presenza di autoanticorpi può alterare la terapia per alcuni sottogruppi di pazienti come bambini ispanici e afro-americani con diagnosi potenziale di non-IMD, adulti con autoanticorpi ma classificati clinicamente come affetti da diabete di tipo 2 e bambini con iperglicemia transitoria. La maggioranza dei soggetti non diabetici che presentano un solo autoanticorpo non svilupperanno mai diabete. Anche se l'espressione di autoanticorpi anti insula multipli è associata con un rischio di diabete molto aumentato (216, 217), circa il 20% dei casi di diabete esprimono al momento della diagnosi un solo autoanticorpo.

CONSIDERAZIONI ANALITICHE

Raccomandazione: E' importante che gli autoanticorpi siano misurati solo in un laboratorio accreditato, in cui è attivo un programma di controllo di qualità e che partecipa ad un programma di verifica esterna di qualità.

Livello di evidenza: E

Gli ICA sono misurati con una tecnica di immunofluorescenza indiretta su sezioni congelate di coda di pancreas umano (224). Gli ICA misurano il grado di legame delle immunoglobuline alle insule e sono confrontate con un siero standard del gruppo Immunology of Diabetes Workshop (225). I risultati sono riportati in unità della Juvenile Diabetes Foundation (JDF). La positività dell'esame dipende dallo studio o dal contesto in cui è usato ma molti laboratori usano 10 unità JDF misurate in due occasioni separate o un singolo risultato > 20 JDF come titoli significativi per indicare un rischio aumentato di IMD.

Per la determinazione degli IAA è raccomandato un metodo radioisotopico che calcola la percentuale di legame spiazzabile dell'insulina al radioligando dopo l'aggiunta di insulina non legata a tracciante (226). I risultati sono riportati come positivi quando il legame specifico dell'anticorpo è maggiore della media + 2 (o 3) DS dei soggetti sani. Ogni laboratorio deve misurare gli IAA in almeno 100 soggetti sani per determinare il proprio intervallo di riferimento. Molti laboratori usano un valore di cutoff tra 80 e 110 mU/L. Un caveat importante relativo alla determinazione degli IAA è che gli anticorpi anti insulina si sviluppano dopo terapia insulinica anche in quanti usano insulina umana.

Molti laboratori usano attualmente per gli anticorpi IA-2A e $GAD_{65}A$ un metodo RIA a doppio tracciante che impiega IA-2 ricombinante umano legato con il tracciante ^{35}Se e GAD_{65} ricombinante umano legato con il tracciante ^{3}H in un sistema di espressione di reticolociti di coniglio (216). Recentemente sono diventati commercialmente disponibili metodi sia per $GAD_{65}A$ che IA-2A. $GAD_{65}A$, IA-2A e IA-2 β A sono considerati positivi quando il segnale è >99.7% (3 DS) dei valori dei controlli sani (216). Il confronto eseguito in molti laboratori in tutto il mondo su un piccolo numero di sieri di controllo di qualità distribuiti da uno degli autori (NM) ha dimostrato una concordanza > 90% nella classificazione dei soggetti in positivi e negativi. Il CDC sta lavorando con l'Immunology of Diabetes Society per sviluppare il Diabetes Autoantibody Standardization Program. E' stato iniziato recentemente un Programma di Verifica Esterna di Qualità pilota limitato usando campioni ottenuti da pazienti con diabete di tipo 1. Non è ancora noto se questo programma sarà ampliato.

INTERPRETAZIONE

Nei pazienti in cui è stata fatta diagnosi di diabete di tipo 1, gli ICA sono trovati in circa 75-85% dei soggetti, i $GAD_{65}A$ intorno al 60%, gli IA-2A in circa il 40% e gli IA-2 β A intorno al 20%. Gli IAA sono positivi in >90% dei bambini che sviluppano il diabete di tipo 1 prima dei 5 anni, ma in meno del 40% dei soggetti che sviluppano il diabete dopo i 12 anni. In alcuni laboratori la determinazione degli ICA è considerato l'esame più sensibile e specifico per la individuazione del diabete di tipo 1. Tuttavia la determinazione degli ICA è complessa, difficile da standardizzare e in alcuni workshop è stata dimostrata una notevole variabilità nella sensibilità e nella specificità tra laboratori diversi (207, 227). Pochi laboratori clinici adotteranno questo esame mentre i metodi immunologici sono più riproducibili. La determinazione della reattività delle cellule T nel sangue periferico è teoricamente interessante (poiché le cellule T mediano la distruzione delle insule), ma la variabilità di questi esami impedisce il loro uso in ambito clinico (228, 229).

La positività agli autoanticorpi è riportata (per definizione) in alcuni soggetti sani anche se l'anamnesi familiare per malattie autoimmuni è negativa. Gli autoanticorpi anti-insula non fanno eccezione. Se si trova un anticorpo, è necessario ricercare gli altri perché il rischio di IMD aumenta se due o più autoanticorpi sono positivi (205, 217). Un titolo confermato di un metodo ICA standardizzato superiore a 10 JDF consente di predire un rischio aumentato di diabete.

Analogamente anche concentrazioni di IAA sopra la media + 3 DS dei soggetti di controllo consentono di predire un rischio aumentato di diabete e, quando associate a ICA o ad un altro anticorpo, portano ad un rischio di 20-50%.

Atkinson e Eisenbarth (204) hanno formulato i seguenti suggerimenti come un approccio razionale all'uso degli autoanticorpi nel diabete: a) i dosaggi di anticorpi devono avere una specificità > 99%; b) deve essere documentata la partecipazione a programmi di VEQ; c) devono essere misurati molti autoanticorpi; d) devono essere eseguiti dosaggi sequenziali. Queste strategie riducono i risultati falsi-positivi e falsi-negativi.

PROBLEMATICHE EMERGENTI

La disponibilità di metodi immunologici per ICA, GAD e IA-2A/IA-2 β A rende probabile che un pannello di questi autoanticorpi sarà usato per screening, con gli ICA usati probabilmente come esame di conferma. Poiché gli ICA possono rappresentare o i $GAD_{65}A$ o gli IA-2A e gli ICA sono difficili da standardizzare, alcuni esperti del settore non usano affatto gli ICA. A parte considerazioni di costo, il miglior screening sarebbe l'esecuzione di tutti gli anticorpi citati, compresi gli ICA. Questa raccomandazione è controversa ed alcuni esperti non la condividono.

E' probabile che altri antigeni della cellula insulare saranno scoperti in futuro e questo potrebbe condurre ad altri esami diagnostici ed esami predittivi per IMD. Per esempio il GLIMA-38 (230) è associato all'IMD, ma non è stato stabilito il suo significato prognostico. In futuro appare del tutto possibile lo screening autoanticorpale su campioni di sangue capillare prelevato dal polpastrello. Negli individui in

cui gli anticorpi anti insula sono positivi, la genotipizzazione HLA-DR/DQ può aiutare a definire il rischio assoluto di diabete.
Molti trial clinici sono in corso per impedire l'IMD (205). Tali trial possono essere oggi condotti in parenti di pazienti con diabete di tipo 1 o nella popolazione generale sulla base dello status degli anticorpi anti insula e/o del genotipo HLA-DR/DQ. Il rischio può essere stimato sulla base dei soli anticorpi anti insula, senza la necessità di valutare le riserve endogene di insulina come è stato fatto nel trial DPT-1 compiuto negli Stati Uniti. La percentuale della positività degli autoanticorpi è molto più bassa nella popolazione generale piuttosto che nei parenti di soggetti con IMD e quindi i trial in quest'ultimo gruppo sono più economici. Interventi terapeutici potenziali (per l'IMD) per trial clinici comprendono l'insulina per via orale o nasale somministrata ai pazienti al momento della diagnosi di diabete o a soggetti non diabetici, ma anticorpi anti-insula positivi e parenti di pazienti con IMD. E' in programma l'inizio tra breve di vaccini basati sull'immunizzazione con peptide della catena β dell'insulina o GAD_{65}.In futuro sono probabili altri trial di immunoterapie basate su antigeni, adiuvanti, citochine e agenti bloccanti le molecole accessorie delle cellule T (200). Uno delle misure importanti di outcome di queste terapie sarà la diminuzione dell'autoimmunità alle insule.

Microalbuminuria

USO

Diagnosi/Screening

Il diabete è la principale causa di insufficienza renale negli Stati Uniti ed in Europa (231). La diagnosi precoce di nefropatia diabetica si affida ad un esame per la determinazione dell'escrezione urinaria di albumina. Gli esami quantitativi convenzionali per l'albuminuria (strisce reattive) non rilevano i piccoli aumenti di escrezione dell'albumina urinaria che si verifica negli stadi precoci della nefropatia. A questo scopo sono impiegati esami per la microalbuminuria. La microalbuminuria è definita (231) come l'escrezione di 30-300 mg di albumina/24 ore (o 20-200 µg/min o 30-300 µg/mg di creatinina; Tabella VII) in due su tre raccolte [10]
L'ADA raccomanda il controllo periodico della albumina urinaria con metodi qualitativi (strisce reattive) negli adulti con diabete (231). La positività dell'esame indica "albuminuria clinica" o "nefropatia conclamata" secondo le raccomandazioni dell'ADA poichè corrispondono ad una escrezione di proteine >300 mg/24 ore (>200 µg/min o >300 µg/mg di creatinina; Tabella VII). In questi pazienti la determinazione quantitativa delle proteine urinarie è impiegata nella valutazione della gravità e della progressione della proteinuria, per programmare la terapia e per determinarne l'efficacia. La determinazione della clearance della creatinina come indice di filtrazione glomerulare può essere eseguita sulle stessa raccolta temporizzata di urine (di solito 12 o 24 ore). In caso di esami negativi per "proteinuria clinica" impiegando una striscia reattiva (escrezione di albumina < 300 mg/die) si deve eseguire un esame per microalbuminuria. Nei bambini con diabete di tipo 1, si raccomanda che la ricerca della microalbuminuria inizi dopo la pubertà o 5 anni dopo la comparsa del diabete.
La raccomandazione di compiere lo screening per microalbumina è basata sulla opinione di esperti che deriva dalla storia naturale della nefropatia diabetica e dall'evidenza di molti trial randomizzati sui benefici del trattamento dei pazienti in cui è stata riscontrata microalbuminuria.
Nell'algoritmo dell'ADA relativo agli esami urinari (231), la diagnosi di microalbuminuria richiede la dimostrazione che l'escrezione urinaria di albumina (come descritto precedentemente) in due su tre esami eseguiti ad intervalli di 3-6 mesi dopo che sono state escluse le condizioni che riducono l'affidabilità dell'esame.

Prognosi

La microalbuminuria ha un significato prognostico. Nell'80% dei pazienti con diabete di tipo 1 e microalbuminuria l'escrezione urinaria di albumina aumenta di una percentuale del 10-20% per anno portando a proteinuria clinica (>300 mg di albumina/die) in 10-15 anni. Dopo lo sviluppo di una proteinuria clinica la maggior parte dei pazienti (> 80%) peggiorano e sviluppano una diminuzione del filtrato glomerulare e, con il tempo, insufficienza renale. Nel diabete di tipo 2, il 20-40% dei pazienti

[10] Anche se è noto che microalbuminuria è un termine improprio (l'albumina non è piccola) l'uso è ben consolidato e non è probabile che sarà sostituito da altri termini come paucialbuminuria o aumentata escrezione di albumina urinaria (UAE).

Tabella VII. Definizione di microalbumina e albuminuria clinica.[a]

Escrezione di albumina	**mg/24 ore**	**µg/min**	**µg/mg di creatinina**
Normale	<30	<20	<30
Microalbumina	30-300	20-200	30-300
Albuminuria clinica[b]	>300	>200	>300

[a] Da ADA (14).
[b] Chiamata anche nefropatia conclamata.

con microalbuminuria progrediscono alla nefropatia conclamata, ma solo il 20% sviluppa insufficienza renale entro 20 anni. I pazienti con diabete (tipo 1 e 2) e microalbuminuria presentano anche un rischio aumentato di malattia cardiovascolare.

Monitoraggio

Il ruolo dell'esame urine standard e della determinazione della albumina è meno chiaro nei pazienti con diagnosi di microalbuminuria. Alcuni hanno proposto la determinazione delle proteine urinarie per monitorare il trattamento che può comprendere un migliore controllo glicemico, un controllo più stretto dell'ipertensione, una restrizione delle proteine nella dieta e terapia con inibitori dell'angiotensina (231). E' stato dimostrato che la terapia (per esempio con inibitori dell'enzima convertente l'angiotensina) rallenta la velocità di aumento dell'escrezione dell'albumina urinaria e che un controllo intensivo della glicemia è associato con una progressione rallentata dell'escrezione di albumina urinaria [per uno studio recente, vedi (232)].I pazienti a cui sono stati prescritti inibitori dell'enzima convertente l'angiotensina non sono controllati frequentemente come gli altri (233). Questo dato indica una ambiguità nelle linee guida attuali perché non sono ben definite le raccomandazioni per lo screening renale nei pazienti in terapia con inibitori dell'enzima convertente l'angiotensina.

RAZIONALE

Raccomandazione: La misurazione annuale della microalbumina nei pazienti alla pubertà o dopo la pubertà che non presentano proteinuria clinica deve essere cominciata 5 anni dopo la diagnosi di diabete di tipo 1 ed al momento della diagnosi di diabete di tipo 2. Non è chiaro il ruolo dell'esame nei pazienti in terapia con inibitori dell'enzima convertente l'angiotensina e in quelli con attesa di vita breve.

Livello di evidenza: E

La diagnosi precoce di microalbuminuria consente un intervento precoce con l'obiettivo di ritardare l'insorgenza della nefropatia diabetica conclamata. Come indicato precedentemente, la microalbuminuria è un marker di aumentato rischio di morbilità e mortalità cardiovascolare sia nel diabete di tipo 1 che nel diabete di tipo 2. Quindi rappresenta un segnale per intensificare gli sforzi per ridurre i fattori di rischio cardiovascolare.

La microalbuminuria compare di rado nel diabete di tipo 1 di recente insorgenza o prima della pubertà. In queste situazioni l'esecuzione dell'esame è meno urgente. Anche se la difficoltà nella datazione precisa dell'insorgenza del diabete di tipo 2 richiede l'inizio dell'esecuzione annuale dell'esame dopo la diagnosi di diabete i pazienti più anziani (età > 75 anni o attesa di vita < 20 anni) possono non essere mai a rischio di nefropatia clinicamente significativa poiché gli anni di vita che possono essere previsti sono troppo pochi perché si sviluppi una patologia renale. In questi pazienti il ruolo del trattamento della microalbuminuria non è affatto chiaro e la necessità dello screening è per lo meno incerta.

CONSIDERAZIONI ANALITICHE

Analisi

Raccomandazione: Il CV analitico dei metodi per misurare la microalbuminuria deve essere < 15%.

Livello di evidenza: E

Gli obiettivi analitici possono essere correlati alla variabilità biologica, cosicché è richiesta una precisione minore per analiti che variano molto nei soggetti in cui sono misurati. La variabilità intra-soggetto della escrezione urinaria di albumina è ampia nei soggetti senza diabete ed anche maggiore in quelli con diabete. Howey et al (234) hanno studiato la variabilità tra giorni in 3-4 settimane dell'escrezione di albumina nelle 24 ore, della concentrazione di albumina e del rapporto albumina/creatinina. Gli ultimi due parametri sono stati misurati in un campione di urine delle 24 ore e anche a) nella prima minzione del mattino e b) in un campione random di urine. In soggetti sani, la CV intra-soggetto più bassa è stata trovata per la concentrazione dell'albumina nella prima minzione del mattino (36%) e per il rapporto albumina/creatinina in quel campione (31%). Gli autori hanno quindi raccomandato l'impiego della concentrazione dell'albumina nelle urine della prima minzione piuttosto che l'escrezione di albumina nelle 24 ore che presenta un CV intra-soggetto più alto.

Per mantenere il CV analitico più basso della metà del CV biologico, Howey et al (234) hanno proposto un obiettivo analitico di un CV del 18%. Alternativamente se deve essere usato il rapporto albumina/creatinina, si può calcolare la necessità per una imprecisione minore (ovvero una precisione maggiore) per consentire il CV biologico più basso per il rapporto e l'imprecisione dovuta alla determinazione della creatinina. Assumendo un CV del 5% per la determinazione della creatinina, noi calcoliamo un obiettivo del 14.7% per il CV analitico dell'albumina quando è usata per calcolare il rapporto albumina/creatinina. Un obiettivo del 15% appare ragionevole per consentire l'uso della concentrazione di albumina misurata per il calcolo della escrezione temporizzata o del rapporto albumina:creatinina.

Nei pazienti con diabete la variabilità (CV) intra-soggetto era del 61% per la concentrazione di albumina nella prima minzione e del 39% nel rapporto albumina/creatinina. Quindi gli obiettivi sopraindicati appaiono più che adeguati per i pazienti con diabete.

Fasi preanalitiche

Raccomandazione: Campioni accettabili per dimostrare una aumentata escrezione di albumina sono raccolte temporizzate di urine (12 o 24 ore) per la determinazione della concentrazione di albumina o campioni di urine non temporizzate per la determinazione del rapporto albumina/creatinina. Per lo screening, si può considerare un campione non temporizzato per la misura dell'albumina (senza creatinina) se è usato un valore di cutoff che consente una sensibilità elevata per rivelare un aumento della velocità di escrezione dell'albumina

Livello di evidenza:E

La raccolta delle urine delle 24 ore ha dei vantaggi (per esempio la possibilità di misurare la clearance della creatinina) ma il rapporto albumina/creatinina sembra essere una alternativa accettabile. Il rapporto ha una variabilità biologica intra-persona simile a quella della velocità di escrezione e si correla bene con la concentrazione di albumina nella prima minzione del mattino (234). Un campione della prima minzione del mattino è in qualche modo preferibile per il rapporto perché ha una variabilità intra-persona più bassa rispetto a quella presentata da campioni raccolti in modo casuale nel corso della giornata (234). Anche se il rapporto appare del tutto accettabile per lo screening, i dati disponibili circa il suo uso nel monitoraggio della risposta alla terapia sono limitati e le raccolte di 12 o 24 ore possono essere preferibili.
L'albumina è stabile per almeno una settimana nelle urine non trattate conservate a 4 °C o 20 °C (235). Le urine possono essere conservate a –20 °C o –80 °C senza centrifugazione o filtrazione preliminari (236). La concentrazione di albumina diminuisce in urine centrifugate, in urine filtrate o in urine non trattate, dello 0.27% al giorno se conservate a –20 °C ma non dimostra alcuna diminuzione in 160 giorni a – 80 °C (236).
E' stato segnalato che la velocità di escrezione di albumina nelle urine ha un ritmo circadiano marcato nel diabete ma non nell'ipertensione essenziale (237).

Misura: limite di rivelabilità, imprecisione
I metodi quantitativi per la microalbuminuria disponibili in commercio hanno dei limiti di rivelabilità documentati intorno a 20 µg/L o minore. L'imprecisione intra-dosaggio e quella tra-giorni (totale) rimangono all'interno dell'obiettivo analitico del 15% e sono spesso più bassi. Uno studio recente ha dimostrato che la maggior parte dei metodi, ma non tutti, hanno una buona concordanza tra di loro e confermano un intervallo di riferimento di 2-20 µg di albumina per mg di creatinina (238).

Raccomandazione: I metodi semiquantitativi o qualitativi di screening per la microalbuminuria devono essere positivi in > del 95% dei pazienti con microalbuminuria per essere utili nello screening. I risultati positivi devono essere confermati dall'analisi in un laboratorio accreditato.

Livello di evidenza: E

Esami qualitatitivi (o semiquantitativi) per la microalbuminuria sono stati proposti come esami di screening. Per essere utili come esami di screening devono avere una elevata sensibilità clinica, cioè una elevata percentuale di identificazione dei campioni patologici. Anche se molti studi hanno valutato la capacità delle strisce reattive per microalbuminuria di individuare concentrazioni aumentate di albumina nell'urina, il quesito cruciale è se il metodo può identificare la microalbuminuria vale a dire una aumentata velocità di escrezione dell'albumina o il suo surrogato, un aumentato rapporto albumina/creatinina. Non sono stati pubblicati studi in cui la sensibilità per la identificazione di una velocità di escrezione di albumina aumentata ha raggiunto il 95%.
In un ampio studio (239) la sensibilità per l'identificazione di escrezione > 30 mg/24 ore è stata del 91% quando l'esame è stato eseguito da un singolo tecnico di laboratorio, dell'80% quando è stato eseguito da infermieri e del 66% quando è stato eseguito da medici di famiglia. In due studi più recenti (240, 241) la sensibilità era compresa tra il 67 e l'86%. Anche i risultati falsi positivi erano comuni con percentuali che arrivavano al 15% (239). Sembra quindi che almeno alcuni degli esami, soprattutto quando usati nella pratica clinica, posseggono delle caratteristiche non adatte allo screening a causa della bassa sensibilità (elevata percentuale di risultati falsi positivi) e i risultati positivi devono essere confermati con un metodo di laboratorio.
I metodi disponibili su strisce reattive per la microalbumina non sembrano essere adatti a programmi di screening nell'ambulatorio del medico di famiglia o a domicilio del soggetto. Gli esami tipici per lo screening (per esempio, per la fenilchetonuria) hanno una percentuale bassa di risultati falsi negativi e quindi solo i risultati positivi richiedono conferma con un metodo quantitativo. Quando un esame di screening ha una bassa sensibilità diagnostica, anche il risultato negativo deve essere confermato, rendendo l'approccio insostenibile. Con gli esami semiquantitativi, può essere possibile (o invero necessario) usare un cutoff < 20 mg/L per consentire di individuare i campioni con albumina >20 mg/L come misurato dai metodi di laboratorio.
Noi raccomandiamo di valutare i metodi su striscia reattiva analizzando campioni con concentrazione di albumina nell'intervallo 20-50 mg/L perché non è sufficiente dimostrare che i metodi possono rilevare l'albumina a concentrazioni più elevate.
Sono necessari ulteriori studi prima che le strisce reattive possano essere raccomandate come sostituti degli esami quantitativi. L'uso degli esami qualitativi nel Point of Care è ragionevole solo quando può essere dimostrato che evita l'esame quantitativo in una percentuale apprezzabile di soggetti ed assicura l'identificazione dei pazienti con una patologia renale iniziale.

INTERPRETAZIONE

Cause non analitiche di variazione Sono stati segnalati aumenti transitori di escrezione di albumina urinaria nell'iperglicemia transitoria, nell'esercizio fisico, nelle infezioni del tratto urinario, nell'ipertensione grave, nell'insufficienza cardiaca e nella malattia febbrile acuta (231).

Frequenza dell'analisi

L'ADA raccomanda la determinazione della microalbumina ogni anno nei pazienti con risultato negativo per proteinuria conclamata usando la striscia reattiva. Dopo la documentazione di una diagnosi di microalbuminuria (cioè con risultati definiti aumentati in due dei tre esami eseguiti in un periodo di 3-6 mesi), è ragionevole ripetere l'esame per determinare se la terapia scelta è efficace. Può essere anche utile determinare la velocità di progressione della malattia in modo da pianificare la terapia per l'insufficienza renale terminale. Anche se le raccomandazioni dell'ADA suggeriscono che questo esame non è generalmente necessario prima della pubertà, l'esame può essere considerato su base individuale se sembra appropriato per l'insorgenza precoce del diabete, cattivo controllo della malattia, anamnesi familiare positiva per nefropatia diabetica. Uno studio recente ha indicato che la durata del diabete prima della pubertà è un fattore di rischio importante in questo gruppo di età e quindi può essere usato per sostenere l'esecuzione di questo esame in singoli pazienti (232).

Analiti diversi potenzialmente importanti

INSULINA E SUOI PRECURSORI

Raccomandazione: Non vi è nessun ruolo per l'analisi routinaria di insulina, peptide C o pro-insulina nella maggior parte dei pazienti con diabete. La differenziazione tra diabete di tipo 1 e diabete di tipo 2 può essere basata nella maggior parte dei casi sulla presentazione clinica e sul decorso successivo. Non vi è nessun ruolo per la misurazione della concentrazione dell'insulina nella diagnosi della sindrome metabolica poiché la conoscenza di questo valore non modifica la gestione di questi pazienti.
Questi esami sono utili principalmente a scopo di ricerca e, in rari casi, per identificare i pazienti che richiedono assolutamente insulina prima di passare ai farmaci per os o per assistere i pazienti per ottenere la copertura assicurativa per acquistare le pompe per infusione sottocutanea continua di insulina.
Un possibile ruolo per la misurazione dell'insulina a digiuno e la valutazione della resistenza insulinica è la valutazione dei pazienti con sindrome dell'ovaio policistico che possono essere candidati al trattamento per diminuire la resistenza insulinica in assenza di diabete conclamato o intolleranza glucidica

Livello di evidenza: E

USO

Già da molti anni è aumentato l'interesse nella possibilità che la determinazione della concentrazione di insulina plasmatica e dei suoi precursori possa essere utile nella clinica. In particolare sono state pubblicate evidenze che concentrazioni aumentate di insulina e/o proinsulina in soggetti non diabetici consenta di predire lo sviluppo di CAD (242). Anche se questa possibilità può essere scientificamente valida, la sua utilità clinica è dubbia.Una concentrazione aumentata di insulina è un marker surrogato che può essere usato per stimare la resistenza all'utilizzo del glucosio mediato dall'insulina e può identificare soggetti a rischio di sviluppare la sindrome X, conosciuta anche come sindrome della resistenza all'insulina (243). Una misura accurata della sensibilità all'insulina richiede l'uso di metodi complessi, come la tecnica del clamp euglicemico iperinsulinemico, che è di solito confinato ai laboratori di ricerca (244, 245).

Tuttavia, per quanto questi cambiamenti possono identificare tali soggetti, non è chiaro se essi sono responsabili dell'aumentato rischio di CAD. Di conseguenza sembra di maggiore utilità clinica quantificare le conseguenze della resistenza insulinica e dell'iperinsulinemia (o iperproinsulinemia) piuttosto che la concentrazione stessa di ormone,vale a dire misurando la pressione sanguigna, l'intolleranza glucidica, la concentrazione di trigliceridi plasmatici e di colesterolo HDL. Su questi cambiamenti vanno concentrati gli interventi clinici, non sulla concentrazione nel plasma di insulina o proinsulina.

L'utilità clinica della misurazione di insulina, peptide C o proinsulina per aiutare a selezionare il migliore agente ipoglicemizzante per iniziare la terapia di pazienti con diabete di tipo 2 è un problema che deriva dalla fisiopatologia del diabete di tipo 2. In teoria, più bassa la concentrazione dell'insulina prima dell'intervento, più appropriata sarebbe l'insulina o un farmaco che stimola la secrezione di insulina come farmaco di prima scelta per iniziare il trattamento. Anche se questo tipo di ragionamento è corretto, non è dimostrato che la determinazione della concentrazione di insulina o proinsulina porterà ad un trattamento più efficace dei pazienti con diabete di tipo 2.

In contrasto alle considerazioni precedenti, la determinazione delle concentrazioni di insulina e proinsulina nel plasma è necessaria per stabilire la patogenesi dell'ipoglicemia a digiuno (246). La diagnosi di insulinoma è basato sulla persistenza di una concentrazione di insulina nel plasma inappropriatamente elevata associata a concentrazione diminuita di glucosio. Inoltre, un aumento del rapporto proinsulina/insulina nei pazienti ipoglicemici che hanno difficoltà a mantenere la condizione euglicemica suggerisce fortemente la presenza di un insulinoma. L'assenza di queste alterazioni associate nella concentrazione di glucosio, insulina e proinsulina in un soggetto con ipoglicemia a digiuno rende la diagnosi di insulinoma molto improbabile e si devono ricercare altre cause dell'incapacità di mantenere l'euglicemia a digiuno.

La misurazione della risposta del peptide C al gluca-

gone può aiutare nei rari casi in cui sia difficile differenziare la diagnosi tra diabete di tipo 1 e diabete di tipo 2 (247). Tuttavia anche in questa situazione clinica la risposta alla terapia farmacologia fornisce utili informazioni e la determinazione del peptide C non è clinicamente necessaria. In rari casi, può essere utile misurare la concentrazione di peptide C prima di interrompere l'insulina. Un esempio potrebbe essere un adolescente obeso che si presenta con DKA che potrebbe avere un diabete di tipo 2 e potrebbe essere trattato con antidiabetici orali dopo la risoluzione dell'episodio acuto (248). La determinazione del peptide C è essenziale nella valutazione di una possibile ipoglicemia autoprocurata dovuta ad assunzione di insulina non a scopi terapeutici (249).
Infine un impiego dell'insulina che sta emergendo è la valutazione e la gestione delle pazienti con sindrome dell'ovaio policistico. Le donne con questa sindrome presentano una resistenza insulinica a causa dell'eccesso di androgeni o per alterazioni nel metabolismo dei carboidrati; stanno emergendo delle evidenze che suggeriscono che le due alterazioni possono rispondere alla terapia con metformina e dioni tiazolidinici. Anche se i trial clinici hanno di solito usato il clamp iperinsulinemico euglicemico, il rapporto glucosio/insulina a digiuno e altre modalità per valutare la resistenza insulinica non è stata ancora definita chiaramente la modalità di laboratorio ottimale per valutare questi pazienti. E' certamente ragionevole documentare la resistenza insulinica in una paziente con sindrome dell'ovaio policistico che non ha diabete o IGT prima di iniziare la terapia con un agente sensibilizzante all'insulina come la metformina o dioni tiazolidinici (10).

Considerazioni analitiche
Anche se l'insulina è misurata da più di 40 anni non vi è un metodo standardizzato per la sua determinazione (248). Insulina, proinsulina e peptide C possono essere misurati con metodi immunometrici. Gli intervalli di riferimento non sono stati definiti in modo certo. L'intervallo di riferimento della proinsulina dipende dal metodo ed ogni laboratorio deve definire il proprio.
Anche se è stato suggerito da alcuni, non deve essere usata la determinazione dell'insulina nell'OGTT per fare diagnosi di diabete. Per quanto riguarda il peptide C vi sono discrepanze nell'affidabilità a causa della specificità variabile degli anticorpi, della mancanza di standardizzazione della calibrazione del peptide C e di reazioni incrociate variabili con la proinsulina. Si deve rilevare che gli US Centers for Medicare and Medicaid Services (CMS) hanno di recente introdotto l'obbligo che i pazienti assicurati da Medicare possano ottenere il rimborso della spesa per acquistare le pompe di insulina solo dopo che è stato determinato il peptide C. Inizialmente era richiesto che il peptide C fosse ≤ 0.5 µg/L; tuttavia, poiché i risultati ottenuti con i diversi metodi non erano confrontabili e avevano fatto rifiutare il rimborso ad alcuni pazienti con concentrazioni > 0.5 µg/L, la legge richiede oggi che la concentrazione di peptide C deve essere più bassa del limite inferiore dell'intervallo di riferimento per quel metodo più il 10% per tener conto dell'imprecisione dell'analisi.

ANTICORPI CONTRO L'INSULINA

Raccomandazione: Non vi sono evidenze in letteratura che sostengono la determinazione degli anticorpi anti insulina per la cura routinaria dei pazienti con diabete.

Livello di evidenza: E

Usando tecniche di sensibilità sufficiente si possono rilevare anticorpi anti-insulina in ogni paziente trattato con insulina esogena (248). Nella gran parte dei pazienti il titolo anticorpale è basso e la loro presenza non ha significato clinico. Livelli molto bassi sono trovati in pazienti trattati esclusivamente con insulina umana ricombinante (251). Tuttavia, in alcuni casi, il titolo di anticorpi anti insulina può essere molto alto ed associato ad una forte resistenza alla capacità dell'insulina esogena di abbassare la concentrazione di glucosio nel plasma. Questa situazione clinica è molto rara e compare di solito in pazienti con diabete di tipo 2 trattati con insulina e la relazione causa-effetto tra l'entità dell'aumento del titolo degli anticorpi ed il grado di resistenza all'insulina non è chiaro. Esistono numerosi approcci terapeutici per trattare questi pazienti e la stima quantitativa della concentrazione degli anticorpi anti insulina circolanti non sembra dare un sostanziale beneficio.

AMILINA

Raccomandazione: La determinazione dell'amilina non è clinicamente utile nella gestione del diabete. Questi studi devono essere confinati all'ambito della ricerca.

Livello di evidenza: E

L'amilina è un peptide pancreatico di 37 aminoacidi descritto per la prima volta nel 1987 (252, 253). L'amilina è co-secreta e co-localizzata con l'insulina dalla cellule β del pancreas in risposta all'introito alimentare. Il peptide sembra aiutare a regolare il metabolismo glucidico ritardando lo svuotamento gastrico e diminuendo la produzione di glucagone. Un deficit di amilina può insorgere nei pazienti insulinopenici tipo 2. Sono attualmente in corso dei trial con un analogo dell'amilina, il pramlintide. Attualmente la determinazione dell'amilina non ha indicazione clinica.

LEPTINA

Raccomandazione: La misurazione routinaria della leptina plasmatica non è utile attualmente nella valutazione o nella gestione dei pazienti con diabete o obesità

Livello di evidenza: E

La leptina è una proteina di 167 aminoacidi, scoperta recentemente, sintetizzata dal tessuto adiposo che sembra giocare un ruolo nel regolare l'appetito e l'introito energetico attraverso l'ipotalamo, influenzando la termogenesi e le funzioni riproduttive (254, 255) Anche se alcuni ceppi di topi obesi hanno un deficit di leptina e perdono peso quando la leptina è reintegrata, molti pazienti obesi hanno concentrazioni aumentate di leptina.
A parte rari casi di deficit di leptina, la concentrazione plasmatica di leptina sembra variare direttamente con l'adiposità e la concentrazione plasmatica di insulina. A questo stadio delle conoscenze, l'unica situazione in cui conoscere la concentrazione di leptina sarebbe utile è nei casi di sospetto di deficit di leptina caratterizzati da obesità massiva ad insorgenza precoce (256). Gli obesi presentano di solito una concentrazione di leptina aumentata nel siero e sembrano essere resistenti ai suoi effetti termogenici ed inibitori dell'appetito.

LIPIDI

Raccomandazione: Un profilo lipidico deve essere eseguito ogni anno in tutti i pazienti adulti con diabete. I soggetti a basso rischio, cioè quelli con LDL < 2.6 mmol/L (100 mg/dL) e HDL > 1.15 mmol/L (45 mg/dL) se uomini e > 1.4 mmol/L (55 mg/dL) se donne, possono sottoporsi allo screening meno frequentemente. Poiché molti pazienti con diabete sono candidati a terapie per ridurre la concentrazione di lipidi, possono essere richiesti controlli più frequenti fino a quando il controllo è raggiunto.

Livello di evidenza: A

Uso
La CAD è la principale causa di morbilità e mortalità nel pazienti con diabete di tipo 2 (257, 258) e i tentativi per migliorare questa situazione devono tenere nel dovuto conto la diagnosi ed il trattamento della dislipidemia quando presente. Quindi la determinazione della concentrazione dei lipidi costituisce una importante raccomandazione pratica per i pazienti con diabete, soprattutto di tipo 2; tuttavia anche i pazienti con il tipo 1 presentano un rischio aumentato di malattia cardiovascolare. Poiché questo argomento è trattato in dettaglio altrove (257, 260) in questa sede sarà trattato solo brevemente.
Particelle LDL piccole e dense, ipertrigliceridemia e basse concentrazioni di HDL caratterizzano la dislipidemia diabetica. In genere il tipo di screening lipidico che possono avere i pazienti diabetici è lo stesso di quello opportuno per la popolazione generale.
La valutazione dei pazienti con diabete di tipo 2 deve comprendere le concentrazioni nel plasma di colesterolo, colesterolo-LDL, colesterolo-HDL e trigliceridi. L'ADA classifica i pazienti ad alto rischio con LDL > 3.35 mmol/L (130 mg/dL), HDL < 0.90 mmol/L (35 mg/dL) se uomini e < 1.15 mmol/L (45 mg/dL) e trigliceridi > 4.5 mmol/L (400 mg/dL); a medio rischio con LDL > 2.60-3.35 mmol/L (100-129 mg/dL), concentrazioni di HDL di 0.90-1.15 mmol/L (35-45 mg/dL) e concentrazioni di trigliceridi di 2.30-4.5 mmol/L (200-399 mg/dL); a basso rischio con LDL < 2.60 mmol/L (100 mg/dL), concentrazioni di HDL di >1.15 mmol/L (45 mg/dL) se uomini e > 1.4 mmol/L (55 mg/dL) se donne (259). Queste linee guida sono anche in accordo con le recenti linee guida Adult Treatment Panel III (ATP-III) prodotte recentemente dal National Cholesterol Education Program (260, 261).

Considerazioni analitiche
Fase preanalitica. I profili lipidici devono essere eseguiti a digiuno poiché la concentrazione di LDL e soprattutto di trigliceridi è influenzata in modo drammatico dall'assunzione di cibo.
Fase analitica. Nella maggior parte dei casi, una misura accurata può essere ottenuta con le consuete metodiche di laboratorio o misurando direttamente il colesterolo totale e i trigliceridi nel plasma, precipitando il colesterolo HDL e misurando la concentrazione del colesterolo nel precipitato e calcolando la concentrazione di colesterolo LDL. Questo approccio è adeguato nella maggior parte delle situazioni, ma è inadeguato se la concentrazione di trigliceridi nel plasma e > 4.5 mmol/L (400 mg/dL). In questa circostanza per ottenere una quantificazione accurata di colesterolo-LDL e colesterolo-HDL sono necessarie ultracentrifugazione, separazione e determinazione delle concentrazioni di colesterolo e trigliceridi nelle specifiche frazioni lipoproteiche. Sono disponibili anche metodi per l'analisi diretta di LDL.
Esistono estesi programmi nazionali ed internazionali per assicurare l'accuratezza e l'affidabilità dei dosaggi di lipidi e lipoproteine. La Lipid Standardization Program del CDC e del National Heart, Lung and Blood Institute consente la standardizzazione della determinazione di lipidi e lipoproteine. La CDC ha istituito un Cholesterol Reference Laboratory Network per facilitare l'accesso al National Reference System for Cholesterol e fornire a laboratori clinici ed aziende un mezzo per verificare la tracciabilità al metodo di riferimento CDC (259).

Considerazioni emergenti: nuovi fattori di rischi cardiovascolare

Raccomandazioni: La determinazione di fattori di rischio cardiovascolare non tradizionali come la proteina C-reattiva, il fibrinogeno, l'apolipoproteina (apo) B e l'omocisteina non è raccomandata per la valutazione routinaria del rischio in pazienti con diabete poiché i risultati non porterebbero a cambiamenti della terapia. Se i trial in corso confermeranno l'utilità dell'uso dell'acido folico per diminuire il CAD abbassando la concentrazione di omocisteina o quella di altre terapie specifiche rivolte ad uno o più fattori di rischio non tradizionali, questa raccomandazione potrà cambiare.

Livello di evidenza: E

Recentemente è cominciato ad emergere che fattori di rischio cardiovascolare non tradizionali possono avere un ruolo importante nella patogenesi della CAD. I fattori di rischio di laboratorio tradizionali come l'iperlipidemia, la diminuzione dell'HDL e l'aumento del rapporto colesterolo totale/colesterolo LDL, chiaramente non spiegano tutta la variabilità delle percentuali di eventi cardiovascolari. Questi fattori di rischio cardiovascolare nuovi o non tradizionali comprendono l'omocisteina, la capacità fibrinolitica, il fibrinogeno e la proteina C-reattiva (262)

Le frazioni lipidiche che sono state studiate comprendono HDL-2 e HDL-3, lipoproteina (a), apo A-1 e apo B. In particolare è stato dimostrato in studi prospettici osservazionali che l'apo B è fortemente associata con gli eventi cardiovascolari (263). Le implicazioni terapeutiche di questa associazione non sono chiare poiché la terapia che diminuisce le concentrazioni di colesterolo-LDL riduce la percentuale di eventi senza modificare le concentrazioni di apo B. Attualmente ADA, National Cholesterol Education Program e American Heart Association raccomandano che le decisioni terapeutiche siano basate sui risultati dei profili lipidici convenzionali, comprendenti colesterolo totale, LDL, HDL, trigliceridi e sugli altri fattori di rischio. Non sono stati pubblicati studi che mostrano che la determinazione di ulteriori fazioni lipidiche è associata con un miglioramento dell'outcome terapeutico.

I processi infiammatori possono avere un ruolo nella patogenesi della malattia aterosclerotica. La proteina C reattiva è un marker sensibile di infiammazione e si aggiunge al valore predittivo del colesterolo totale e colesterolo HDL nel predire il rischio di un evento coronario futuro (264). Molti metodi immunometrici sono disponibili in commercio ma gli intervalli di riferimento cambiano nei diversi metodi (264). Il valore clinico di questi dosaggi deve essere ancora definito, ma è possibile che la determinazione della proteina C reattiva risulti utile nella stratificazione del rischio di soggetti con rischio medio sulla base degli esami del pannello lipidico; pazienti con rischio medio sulla base del colesterolo totale e colesterolo HDL ma con concentrazioni aumentate di proteina C reattiva possono avere più benefico dall'aspirina o dagli inibitori della idrossimetilglutaril-CoA reduttasi rispetto a quelli con concentrazioni basse o normali. La determinazione della proteina C reattiva può dare meno informazioni nei pazienti con diabete che sono tutti classificati come ad alto rischio.

Uno stato ipercolagulabile può contribuire al rischio cardiovascolare nel diabete. E' stato dimostrato in molti studi prospettici che il fibrinogeno è associato in modo positivo con eventi cardiovascolari. Altri fattori trombogenici che possono essere associati con la malattia comprendono l'inibitore 1 attivatore del plasminogeno, il fattore VII e l'attivatore del plasminogeno tessutale (262). Non è stato ancora definita l'utilità clinica di questi analiti.

Anche l'omocisteina ha ricevuto molta attenzione come possibile fattore di rischio modificabile per la CAD. Una recente rassegna sistematica ha concluso che vi è una notevole evidenza epidemiologica di un legame tra concentrazione di omocisteina e CAD (265, 266).

L'omocisteina può anche essere associata con mortalità aumentata dopo un evento coronario e con complicanze microvascolari. Un aumento della concentrazione di omocisteina totale è associata con un aumento della mortalità cardiovascolare nei pazienti con diabete di tipo 2 (260). Anche se misure relativamente semplici e poco costose come la supplementazione con folati, vitamina B6 e vitamina B12 possono ridurre l'omocisteina, non è chiaro se queste ridurranno la CAD. Sono in corso trial clinici per chiarire questo punto. D'altra parte, la fortificazione di tutti i derivati del grano arricchiti, obbligatoria negli Stati Uniti dal 1998, ha abbassato la concentrazione di omocisteina nella popolazione generale (267). Fino a quando non sarà definità l'efficacia di abbassare la concentrazione di omocisteina, non è certo qual vantaggio darà la misurazione dell'omocisteina.

Siamo profondamente in debito con i seguenti esperti che hanno dato approfonditi e validi commenti al documento: John Eckfeldt, University of Minnesota (Minneapolis, MN); Gorge Eisenbarth, University of Colorado Health Sciences Center (Denver, CO); Callum Fraser, Ninewells Hospital and Medical School (Dundee, Scotland); Len Harrison, Walter and Eliza Hall Institute, Royal Melbourne Hospital (Melbourne, Australia); Ake Lernmark, University of Washington (Seattle, WA); Randie Little, University of Missouri (Columbia, MO); Kor Miedema, Ziekenhuis De Weezenlanden (JW Zwolle, The Netherlands); David Nathan, Harvard Medical School (Boston, MA); and Michael Steffes, University of Minnesota (Minneapolis, MN).

Bibliografia

1. American Diabetes Association. Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 1997;20:1183–201.
2. Castano L, Eisenbarth GS. Type-I diabetes. A chronic autoimmune disease of human, mouse, and rat. Annu Rev Immunol 1990;8:647–79.
3. Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. Diabetes 1988;37:1595–607.
4. Sacks DB, McDonald JM. The pathogenesis of type II diabetes mellitus: a polygenic disease. Am J Clin Pathol 1996;105:149–56.
5. American Diabetes Association. Economic consequences of diabetes mellitus in the U.S. in 1997. Diabetes Care 1998;21:296–309.
6. Nathan DM. Long-term complications of diabetes mellitus. N Engl J Med 1993;328:1676–85.

7. Geiss L, Engelgau M, Frazier E, Tierney E. Diabetes surveillance, 1997. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention, U.S. Department of Health and Human Services, 1997.
8. National Diabetes Data Group. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. Diabetes 1979;28:1039–57.
9. American Diabetes Association. Tests of glycemia in diabetes. Diabetes Care 2001;24(Suppl 1):S80–2.
10. American Diabetes Association. Type 2 diabetes in children and adolescents. Diabetes Care 2000;23:381–9.
11. CDC. Diabetes Cost-Effectiveness Study Group. The cost-effectiveness of screening for type 2 diabetes. JAMA 1998;280: 1757–63.
12. DCCT Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med 1993;329:977–86.
13. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). Lancet 1998;352:837–53.
14. American Diabetes Association. Standards of medical care for patients with diabetes mellitus. Diabetes Care 2000;23(Suppl 1):S32–42.
15. Sasaki A. Assessment of the new criteria for diabetes mellitus according to 10-year relative survival rates. Diabetologia 1981; 20:195–8.
16. Sasaki A, Uehara M, Horiuchi N, Hasegawa K, Shimizu T. A 15-year follow-up study of patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) in Osaka, Japan. Factors predictive of the prognosis of diabetic patients. Diabetes Res Clin Pract 1997;36:41–7.
17. Andersson DKG, Svardsudd K. Long-term glycemic control relates to mortality in type II diabetes. Diabetes Care 1995;18: 1534–43.
18. Gerstein HC, Pais P, Pogue J, Yusuf S. Relationship of glucose and insulin levels to the risk of myocardial infarction: a case control study. J Amer Coll Cardiol 1999;33:612–9.
19. Howie-Davies S, Simson RW, Turner RC. Control of maturity onset diabetes by monitoring fasting blood glucose and body weight. Diabetes Care 1980;5:607–10.
20. Muir A, Howe-Davies SA, Turner RC. General practice care of non-insulin-dependent diabetes with fasting blood glucose measurements. Am J Med 1982;73:637–40.
21. Harris MI. Undiagnosed NIDDM. Clinical and public health issues. Diabetes Care 1993;16:642–52.
22. Harris MI, Flegal KM, Cowie CC, Eberhardt MS, Goldstein DE, Little RR, et al. Prevalence of diabetes, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance in U.S. adults. Diabetes Care 1998;21:518–24.
23. Troisi RJ, Cowie CC, Harris MI. Diurnal variation in fasting plasma glucose: implications for diagnosis of diabetes in patients examined in the afternoon. JAMA 2000;284:3157–9.
24. Chan AYW, Swaminathan R, Cockram CS. Effectiveness of sodium fluoride as a preservative of glucose in blood. Clin Chem 1989;35:315–7.
25. Ladenson JH. Nonanalytical sources of variation in clinical chemistry results. In: Sonnenwirth A, Jarett L, eds. Clinical laboratory methods and diagnosis. St. Louis, MO: CV Mosby, 1980:149–92.
26. Sacks DB. Carbohydrates. In: Burtis C, Ashwood E, eds. Tietz textbook of clinical chemistry, 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1999:750–808.
27. Ladenson JH, Tsai LM, Michael JM, Kessler G, Joist JH. Serum versus heparinized plasma for eighteen common chemistry tests: is serum the appropriate specimen? Am J Clin Pathol 1974;62:545–52.
28. Larsson-Cohn U. Differences between capillary and venous blood glucose during oral glucose tolerance tests. Scand J Clin Lab Invest 1976;36:805–8.
29. Lind T, De Groot HA, Brown G, Cheyne GA. Observations on blood glucose and insulin determinations. BMJ 1972;3:320–3.
30. Tchobroutsky G. Blood glucose levels in diabetic and nondiabetic subjects. Diabetologia 1991;34:67–73.
31. Blunt BA, Barrett-Connor E, Wingard DL. Evaluation of fasting plasma glucose as screening test for NIDDM in older adults. Diabetes Care 1991;14:989–93.
32. DECODE. Consequences of the new diagnostic criteria for diabetes in older men and women. Diabetes Care 1999;22:1667–71.
33. Ferrannini E, Vichi S, Beck-Nielsen H, Laakso M, Paolisso G, Smith U. Insulin action and age. European group for the study of insulin resistance (EGIR). Diabetes 1996;45:947–53.
34. Genter PM, Ipp E. Accuracy of plasma glucose measurements in the hypoglycemic range. Diabetes Care 1994;17:595–8.
35. Fraser CG, Petersen PH. Analytical performance characteristics should be judged against objective quality specifications. Clin Chem 1999;45:321–3.
36. Stockl D, Baadenhuijsen H, Fraser CG, Libeer JC, Petersen PH, Ricos C. Desirable routine analytical goals for quantities assayed in serum. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1995;33:157–69.
37. Fraser CG. The necessity of achieving good laboratory performance. Diabet Med 1990;7:490–3.
38. Olefsky JM, Reaven GM. Insulin and glucose responses to identical oral glucose tolerance tests performed 48 h apart. Diabetes 1974;23:449–53.
39. Widjaja A, Morris RJ, Levy JC, Frayn KN, Manley SE, Turner RC.Within- and between-subject variation in commonly measured anthropometric and biochemical variables. Clin Chem 1999;45:561–6.
40. Sebastian-Gambaro MA, Liron-Hernandez FJ, Fuentes-Arderiu X. Intra- and inter-individual biological variability data bank. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1997;35:845–52.
41. Mooy JM, Grootenhuis PA, de Vries H, Kostense PJ, Popp-Snijders C, Bouter LM, et al. Intra-individual variation of glucose, specific insulin and proinsulin concentrations measured by two oral glucose tolerance tests in a general Caucasian population: the Hoorn Study. Diabetologia 1996;39:298–305.
42. Ollerton RL, Playle R, Ahmed K, Dunstan FD, Luzio SD, Owens DR. Day-to-day variability of fasting plasma glucose in newly diagnosed type 2 diabetic subjects. Diabetes Care 1999;22:394–8.
43. Ricos C, Alvarez V, Cava F, Garcia-Lario JV, Hernandez A, Jimenez CV, et al. Current databases

on biological variation: pros, cons and progress. Scand J Clin Lab Invest 1999;59:491–500.
44. Howanitz PJ, Cembrowski GS, Steindel SJ, Long TA. Physician goals and laboratory test turnaround times. A College of American Pathologists Q-Probes study of 2763 clinicians and 722 institutions. Arch Pathol Lab Med 1993;117:22–8.
45. Lewandrowski K, Cheek R, Nathan DM, Godine JE, Hurxthal K, Eschenbach K, et al. Implementation of capillary blood glucose monitoring in a teaching hospital and determination of program requirements to maintain quality testing. Am J Med 1992;4: 419–26.
46. Harris MI, Cowie CC, Howie LJ. Self-monitoring of blood glucose by adults with diabetes in the United States population. Diabetes Care 1993;16:1116–23.
47. Thayer AM. Deciphering diseases. Chem Eng News 1999;August 30:19–28.
48. American Diabetes Association. Self-monitoring of blood glucose. Diabetes Care 1996;19(Suppl 1):S62–6.
49. Faas A, Schellevis FG, van Eijk JTM. The efficacy of self monitoring of blood glucose in NIDDM subjects. Diabetes Care 1997;20:1482–6.
50. Coster S, Gulliford MC, Seed PT, Powrie JK, Swaminathan R. Self-monitoring in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis. Diabet Med 2000;17:755–61.
51. Harris MI. Frequency of blood glucose monitoring in relation to glycemic control in patients with type 2 diabetes. Diabetes Care 2001;24:979–82.
52. Gerich JE, Mokan M, Veneman T, Korytkowski M, Mitrakou A. Hypoglycemia unawareness. Endocr Rev 1991;12:356–71.
53. Tang Z, Lee JH, Louie RF, Kost GJ. Effects of different hematocrit levels on glucose measurements with handheld meters for point-of-care testing. Arch Pathol Lab Med 2000;124:1135–40.
54. American Diabetes Association. Consensus statement on self monitoring of blood glucose. Diabetes Care 1994;17:81–6.
55. Tate PF, Clements CA, Walters JE. Accuracy of home blood glucose monitors. Diabetes Care 1992;15:536–8.
56. Chan JC, Wong RY, Cheung CK, Lam P, Chow CC, Yeung VT, et al.Accuracy, precision and user-acceptability of self blood glucose monitoring machines. Diabetes Res Clin Pract 1997;36:91–104.
57. Kabadi UM, O'Connell KM, Johnson J, Kabadi M. The effect of recurrent practice at home on the acceptability of capillary blood glucose readings. Accuracy of self blood glucose testing. Diabetes Care 1994;10:1110–23.
58. American Diabetes Association buyer's guide. Diabetes Forecast 2001;54:46–110.
59. Burnett RW, D'Orazio P, Fogh-Andersen N, Kuwa K, Kulpmann WR, Larsson L, et al. IFCC recommendation on reporting results for blood glucose. Clin Chim Acta 2001;307:205–9.
60. Weitgasser R, Gappmayer B, Pichler M. Newer portable glucose meters—analytical improvement compared with previous generation devices? Clin Chem 1999;45:1821–5.
61. American Diabetes Association. Consensus statement on self monitoring of blood glucose. Diabetes Care 1987;10:93–9.
62. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Ancillary (bedside) blood glucose testing in acute and chronic care facilities; approved guideline C30-A. Villanova, PA: NCCLS, 1994;14:1–14.
63. Clarke WL, Cox D, Goder-Frederick LA, Carter W, Pohl SL. Evaluating clinical accuracy of systems for self-monitoring of blood glucose. Diabetes Care 1987;10:622–8.
64. Skeie S, Thue G, Sandberg S. Patient-derived quality specifications for instruments used in self-monitoring of blood glucose. Clin Chem 2001;47:67–73.
65. Boyd JC, Bruns DE. Quality specifications for glucose meters: assessment by simulation modeling of errors in insulin dose. Clin Chem 2001;47:209–14.
66. Novis DA, Jones BA. Interinstitutional comparison of bedside blood glucose monitoring program characteristics, accuracy performance, and quality control documentation. Arch Pathol Lab Med 1998;122:495–502.
67. Brunner GA, Ellmerer M, Sendlhofer G, Wutte A, Trajanoski Z, Schaupp L, et al. Validation of home blood glucose meters with respect to clinical and analytical approaches. Diabetes Care 1998;21:585–90.
68. Schiffrin A, Belmonte M. Multiple daily self-glucose monitoring: its essential role in long-term glucose control in insulin-dependent diabetic patients treated with pump and multiple subcutaneous injections. Diabetes Care 1982;5:479–84.
69. Nathan DS. The importance of intensive supervision in determining the efficacy of insulin pump therapy. Diabetes Care 1983;6:295–7.
70. De Veciana M, Major CA, Morgan MA, Tamerou A, Toohey JS, Lien J, et al. Postprandial versus preprandial blood glucose monitoring in women with gestational diabetes mellitus requiring insulin therapy. N Engl J Med 1995;333:1237–41.
71. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1. Diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. Diabet Med 1998;15:539–53.
72. The Expert Committee. The Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 1999;22:S5–19.
73. Gimeno SGA, Ferreira SRG, Franco LJ, Junes M. The Japanese-Brazilian Diabetes Study Group. Comparison of glucose tolerance categories according to World Health Organization and American Diabetes Association diagnostic criteria in a population-based study in Brazil. Diabetes Care 1998;21:1889–992.
74. Tominaga M, Eguchi H, Manaka H, Igarashi K, Kato T, Sekikawa A. Impaired glucose tolerance is a risk factor for cardiovascular disease, but not impaired fasting glucose. The Funagata Diabetes Study. Diabetes Care 1999;22:920–4.
75. Perry RC, Baron AD. Impaired glucose tolerance. Why is it not a disease? Diabetes Care 1999;22:883–5.
76. Puavilai G, Chanprasertyotin S, Sriphrapradaeng A. Diagnostic criteria for diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance: 1997 criteria by the

Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (ADA), 1998 WHO consultation criteria, and 1985 WHO criteria. World Health Organization. Diabetes Res Clin Pract 1999;44:21–6.
77. Harris MI, Eastman RC, Cowie CC, Flegal KM, Eberhardt MS. Comparison of diabetes diagnostic categories in the U.S. population according to the 1997 American Diabetes Association and 1980–1985 World Health Organization diagnostic criteria. Diabetes Care 1997;20:1859–62.
78. Balkau B. The DECODE study. Diabetes epidemiology: collaborative analysis of diagnostic criteria in Europe. Diabetes Metab 2000;26:282–6.
79. Ko GT, Chan JC, Woo J, Lau E, Yeung VT, Chow CC, et al. The reproducibility and usefulness of the oral glucose tolerance test in screening for diabetes and other cardiovascular risk factors. Ann Clin Biochem 1998;35:62–7.
80. Moses RG, Patterson MJ, Regan JM, Chaunchaiyakul R, TaylorNA, Jenkins AB. A non-linear effect of ambient temperature on apparent glucose tolerance. Diabetes Res Clin Pract 1997;36: 35–40.
81. Ganda OP, Day JL, Soeldner JS, Connon JJ, Gleason RE. Reproducibility and comparative analysis of repeated intravenous and oral glucose tolerance tests. Diabetes 1978;27:715–25.
82. American Diabetes Association. Gestational diabetes mellitus.Diabetes Care 2000;23:S77–9.
83. Barzilay JI, Spiekerman CF, Wahl PW, Kuller LH, Cushman M, Furberg CD, et al. Cardiovascular disease in older adults with glucose disorders: comparison of American Diabetes Association criteria for diabetes mellitus with WHO criteria. Lancet 1999;354:622–5.
84. Naylor CD, Sermer M, Chen E, Sykora K. Cesarean delivery in relation to birth weight and gestational glucose tolerance: pathophysiology or practice style? Toronto Trihospital Gestational Diabetes Investigators. JAMA 1996;275:1165–70.
85. DECODE Study Group. Glucose tolerance and mortality: comparison of WHO and American Diabetes Association diagnostic criteria. The DECODE Study Group. European Diabetes Epidemiology Group. Diabetes Epidemiology: Collaborative analysis of diagnostic criteria in Europe. Lancet 1999;354:617–21.
86. Hoffman L, Nolan C, Wilson JD, Oats JJ, Simmons D. Gestational diabetes mellitus—management guidelines. The Australasian Diabetes in Pregnancy Society. Med J Aust 1998;169:93–7.
87. Colman PG, Thomas DW, Zimmet PZ, Welborn TA, Garcia-Webb P, Moore MP. New classification and criteria for diagnosis of diabetes mellitus. Position Statement from the Australian Diabetes Society, New Zealand Society for the Study of Diabetes, Royal College of Pathologists of Australasia and Australasian Association of Clinical Biochemists. Med J Aust 1999;170: 375–8.
88. Metzger BE, Coustan DR. Summary and recommendations of the Fourth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. The Organizing Committee. Diabetes Care 1998; 21:B161–7.
89. American Diabetes Association. Tests of glycemia in diabetes. Diabetes Care 1999;22:S77–9.
90. Goldstein DE, Little RR, Lorenz RA, Malone JI, Nathan D, Peterson CM. Tests of glycemia in diabetes. Diabetes Care 1995;18:896–909.
91. Pickup J, Rolinski O, Birch D. In vivo glucose sensing for diabetes management: progress towards non-invasive monitoring [Interview by Judy Jones]. BMJ 1999;319:1289–92.
92. Khalil OS. Spectroscopic and clinical aspects of noninvasive glucose measurements. Clin Chem 1999;45:165–77.
93. Smith KM. Oak Ridge Conference introduction. Clin Chem 1999; 45:1586.
94. Bloomgarden ZT. American Diabetes Association annual meeting, 1999. New approaches to insulin treatment and glucose monitoring. Diabetes Care 1999;22:2078–82.
95. Haupt K, Mosbach K. Plastic antibodies: developments and applications. Trends Biotechnol 1998;16:468–75.
96. Chen G, Guan Z, Chen CT, Fu L, Sundaresan V, Arnold FH. A glucose-sensing polymer. Nat Biotechnol 1997;15:354–7.
97. James TC, Sananayake DRAS, Shinkai S. A glucose-selective molecular fluorescence sensor. Angew Chem Int Ed Engl 1994; 33:2207–9.
98. Birch DJS, Imhof RE. Time-domain fluorescence spectroscopy using time-correlated single-photon counting. Top Fluorescence Spectrosc 1994;1:1–95.
99. Tolosa L, Szmacinski H, Rao G, Lakowicz JR. Lifetime-based sensing of glucose using energy transfer with a long lifetime donor. Anal Biochem 1997;250:102–8.
100. Rolinski OJ, Birch DJS, McCartney LJ, Pickup JC. Near-infrared assay for glucose determination. Soc Photooptical Instrum Eng Proc 1999;3602:6–14.
101. Marvin JS, Hellinga HW. Engineering biosensors by introducing fluorescent allosteric signal transducers: construction of a novel glucose sensor. J Am Chem Soc 1998;120:7–11.
102. Hoss U, Gessler R, Kalatz B, Salgado MI, Sternberg F, Fussganger R. Calibration-free continuous on-line glucose monitoring: the comparative microdialysis technique. Diabetologia 1998; 41(Suppl 1):45A.
103. Bolinder J, Ungerstedt U, Arner P. Microdialysis measurement of the absolute glucose concentration in subcutaneous adipose tissue allowing glucose monitoring in diabetic patients. Diabetologia 1992;35:1177–80.
104. Meyerhoff C, Bischof F, Sternberg F, Zier H, Pfeiffer EF. On line continuous monitoring of subcutaneous tissue glucose in men by combining portable glucosensor with microdialysis. Diabetologia 1992;35:1087–92.
105. Hashiguchi Y, Sakakida M, Nishida K, Uemura T, Kajiwara K, Shichiri M. Development of a miniaturized glucose monitoring system by combining a needle-type glucose sensor with microdialysis sampling method. Long-term subcutaneous tissue glucose monitoring in ambulatory diabetic patients. Diabetes Care 1994;17:387–96.
106. Tamada JA, Garg S, Jovanovic L, Pitzer KR, Fermi S, Potts RO. Noninvasive glucose monitoring: comprehensive clinical results. Cygnus Research Team. JAMA 1999;282:1839–44.

107. Garg SK, Potts RO, Ackerman NR, Fermi SJ, Tamada JA, Chase HP. Correlation of fingerstick blood glucose measurements with GlucoWatch Biographer glucose results in young subjects with type 1 diabetes. Diabetes Care 1999;22:1708–14.
108. Arnold MA. Non-invasive glucose monitoring. Curr Opin Biotechnol 1996;7:46–9.
109. Robinson MR, Eaton RP, Haaland DM, Koepp GW, Thomas EV, Stallard BR, et al. Noninvasive glucose monitoring in diabetic patients: a preliminary evaluation. Clin Chem 1992;38:1618–22.
110. Marbach R, Koschinski T, Gries FA, Heise HM. Noninvasive blood glucose assay by near-infrared diffuse reflectance spectroscopy of the human lip. Appl Spectrosc 1993;47:875–81.
111. Kajiwara K, Uemura T, Kishikawa H, Nishida K, Hashiguchi Y, Uehara M, et al. Noninvasive measurement of blood glucose concentrations by analysing Fourier transform infra-red absorbance
spectra through oral mucosa. Med Biol Eng Comput 1993;31:S17–22.
112. Gabriely I, Wozniak R, Mevorach M, Kaplan J, Aharon Y, Shamoon H. Transcutaneous glucose measurement using nearinfrared spectroscopy during hypoglycemia. Diabetes Care 1999;22:2026–32.
113. Heinemann L, Schmelzeisen-Redeker G. Non-invasive continuous glucose monitoring in Type I diabetic patients with optical glucose sensors. Non-Invasive Task Force (NITF). Diabetologia 1998;41:848–54.
114. Maier JS, Walker SA, Fantini S, Francheschini MA, Gratton E. Possible correlation between blood glucose concentration and the reduced light scattering coefficient of tissues in the near infrared. Optics Lett 1994;19:2062–4.
115. Christison GB, MacKenzie HA. Laser photoacoustic determination of physiological glucose concentrations in human whole blood. Med Biol Eng Comput 1993;31:284–90.
116. MacKenzie HA, Ashton HS, Spiers S, Shen Y, Freeborn SS, Hannigan J. Blood glucose measurements by photoacoustics. Biomed Optical Spectroscopy Diagnostics 1998;22:156–9.
117. MacKenzie HA, Ashton HS, Spiers S, Shen Y, Freeborn SS, Hannigan J, et al. Advances in photoacoustic noninvasive glucose testing. Clin Chem 1999;45:1587–95.
118. Kreisberg RA. Diabetic ketoacidosis: new concepts and trends in pathogenesis and treatment. Ann Intern Med 1978;88:681–95.
119. Owen OE, Trapp VE, Skutches CL, Mozzoli MA, Hoeldtke RD, Boden G, et al. Acetone metabolism during diabetic ketoacidosis. Diabetes 1982;31:242–8.
120. Stephens JM, Sulway MJ, Watkins PJ. Relationship of blood acetoacetate and 3-hydroxybutyrate in diabetes. Diabetes 1971; 20:485–9.
121. Porter WH, Yao HH, Karounos DG. Laboratory and clinical evaluation of assays for _-hydroxybutyrate. Am J Clin Pathol 1997;107:353–8.
122. American Diabetes Association. Tests of glycemia [Position Statement]. Diabetes Care 2000;23(Suppl 1):S80–2.
123. Csako G. Causes, consequences, and recognition of false positive reactions for ketones. Clin Chem 1990;36:1388–9.
124. Rosenbloom AL, Malone JI. Recognition of impending ketoacidosis delayed by ketone reagent strip failure. JAMA 1978;240: 2462–4.
125. McMurray CH, Blanchflower WJ, Rice DA. Automated kinetic method for D-3-hydroxybutyrate in plasma or serum. Clin Chem 1984;30:421–5.
126. Koch DD, Feldbruegge DH. Optimized kinetic method for automated determination of _-hydroxybutyrate. Clin Chem 1987;33:1761–6.
127. D'arrigo T. Beyond blood glucose. Diabetes Forecast 1999;52: 37–8.
128. Westphal SA. The occurrence of diabetic ketoacidosis in noninsulin-dependent diabetes and newly diagnosed diabetic adults. Am J Med 1996;101:19–24.
129. Jovanovic-Petersen L, Peterson CM. Sweet success, but an acid aftertaste? N Engl J Med 1991;325:959–60.
130. Mercer DW, Losos FJ 3rd, Mason L, Kessler GF Jr. Monitoring therapy with insulin in ketoacidotic patients by quantifying 3-hydroxybutyrate with a commercial kit. Clin Chem 1986;32:224–5.
131. Wiggam MI, O'Kane MJ, Harper R, Atkinson AB, Hadden DR, Trimble ER, et al. Treatment of diabetic ketoacidosis using normalization of blood 3-hydroxybutyrate concentration as the endpoint of emergency management. A randomized controlled study. Diabetes Care 1997;20:1347–52.
132. Umpierrez GE, Watts NB, Phillips LS. Clinical utility of _-hydroxybutyrate determined by reflectance meter in the management of diabetic ketoacidosis. Diabetes Care 1995;18:137–8.
133. American Diabetes Association. Implications of the Diabetes Control and Complications Trial [Position Statement]. Diabetes Care 2000;23(Suppl 1):S24–6.
134. Davidson MB. Diabetes research and diabetes care. Where do we stand? Diabetes Care 1998;21:2152–60.
135. American Diabetes Association. Provider Notes 2000;1:1–4.
136. Bunn HF. Nonenzymatic glycosylation of protein: relevance to diabetes. Am J Med 1981;70:325–30.
137. Jovanovic L, Peterson CM. The clinical utility of glycosylated hemoglobin. Am J Med 1981;70:331–8.
138. Nathan DM, Singer DE, Hurxthal K, Goodson JD. The clinical information value of the glycosylated hemoglobin assay. N Engl J Med 1984;310:341–6.
139. Goldstein DE, Little RR, Wiedmeyer HM, England JD, McKenzie EM. Glycated hemoglobin: methodologies and clinical applications. Clin Chem 1986;32:B64–70.
140. Goldstein DE, Little RR, England JD, Wiedemeyer H-M, McKenzie E. Methods of glycosylated hemoglobins: high performance liquid chromatography and thiobarbituric acid colorimetric methods.
In: Clarke WL, Larner J, Pohl SL, eds. Methods in diabetes research, Vol. 2. New York: John Wiley, 1986:475–504.
141. Tahara Y, Shima K. The response of GHb to stepwise plasma glucose change over time in diabetic patients. Diabetes Care 1993;16:1313–4.
142. Svendsen PA, Lauritzen T, Soegaard U, Nerup J. Glycosylated haemoglobin and steady-state mean blood glucose concentration in type 1 (insulin-dependent) diabetes. Diabetologia 1982; 23:403–5.
143. Cefalu WT, Wang ZQ, Bell-Farrow A, Kiger FD,

Izlar C. Glycohemoglobin measured by automated affinity HPLC correlates with both short-term and long-term antecedent glycemia. Clin Chem 1994;40:1317–21.
144. Singer DE, Coley CM, Samet JH, Nathan DM. Tests of glycemia in diabetes mellitus. Their use in establishing a diagnosis and in treatment. Ann Intern Med 1989;110:125–37.
145. Molnar GD. Clinical evaluation of metabolic control in diabetes. Diabetes 1978;27:216–25.
146. UK Prospective Diabetes Study. Reduction in HbA1c with basal insulin supplement, sulfonylurea or biguanide therapy in maturity-onset diabetes. Diabetes 1985;34:793–8.
147. Baker JR, Johnson RN, Scott DJ. Serum fructosamine concentrations in patients with type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus during changes in management. BMJ (Clin Res Ed) 1984;288:1484–6.
148. Tahara Y, Shima K. Kinetics of HbA1c, glycated albumin, and fructosamine and analysis of their weight functions against preceding plasma glucose level. Diabetes Care 1995;18:440–7.
149. Little RR, Goldstein DE. Measurements of glycated haemoglobin and other circulating glycated proteins. In: Mogensen CE, Standl E, eds. Research methodologies in human diabetes. Part I. Berlin: W de Gruyter, 1994:299–317.
150. Peterson CM, Jovanovic L, Raskin P, Goldstein DE. A comparative evaluation of glycosylated haemoglobin assays: feasibility of references and standards. Diabetologia 1984;26:214–7.
151. Little RR, Wiedmeyer HM, England JD, Wilke AL, Rohlfing CL, Wians FH Jr, et al. Interlaboratory standardization of measurements of glycohemoglobins. Clin Chem 1992;38:2472–8.
152. Bodor GS, Little RR, Garrett N, Brown W, Goldstein DE, Nahm MH. Standardization of glycohemoglobin determinations in the clinical laboratory: three years of experience. Clin Chem 1992; 38:2414–8.
153. Weykamp CW, Penders TJ, Muskiet FA, van der Slik W. Effect of calibration on dispersion of glycohemoglobin values determined by 111 laboratories using 21 methods. Clin Chem 1994;40: 138–44.
154. Little RR, Goldstein DE. Standardization of glycohemoglobin measurements. AACC Endo 1995;13:109–24.
155. Goldstein DE, Little RR. Bringing order to chaos: the National Glycohemoglobin Standardization Program. Contemp Int Med 1997;9:27–32.
156. NGSP Steering Committee. Implementation of the national glycohemoglobin standardization program (NGSP). Diabetes 1997; 46:151A.
157. Little RR, Rohlfing CL, Wiedmeyer H-M, Myers GL, Sacks DB, Goldstein DE. The National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP): a five-year progress report. Clin Chem 2001; 47:1985–92.
158. DCCT Research Group. Feasibility of centralized measurements of glycated hemoglobin in the diabetes control and complications trial: a multicenter study. Clin Chem 1987;33:2267–71.
159. Wiener K, Roberts NB. Age does not influence levels of HbA1c in normal subject. QJM 1999;92:169–73.
160. Kilpatrick ES, Dominiczak MH, Small M. The effects of ageing on glycation and the interpretation of glycaemic control in type 2 diabetes. QJM 1996;89:307–12.
161. Nuttall FQ. Effect of age on the percentage of hemoglobin A1c and the percentage of total glycohemoglobin in non-diabetic persons. J Lab Clin Med 1999;134:451–3.
162. Davie SJ, Gould BJ, Yudkin JS. Effects of vitamin C on glycosylation of proteins. Diabetes 1992;41:167–73.
163. Ceriello A, Giugliano D, Quatraro A, Donzella C, Dipalo G, Lefebvre PJ. Vitamin E reduction of protein glycosylation in diabetes. New prospect for prevention of diabetic complications? Diabetes Care 1991;14:68–72.
164. Tarim O, Kucukerdogan A, Gunay U, Eralp O, Ercan I. Effects of iron deficiency anemia on hemoglobin A1c in type 1 diabetes mellitus. Pediatr Int 1999;41:357–62.
165. Nathan DM, Francis TB, Palmer JL. Effect of aspirin on determinations of glycosylated hemoglobin. Clin Chem 1983;29:466–9.
166. Stevens VJ, Fantl WJ, Newman CB, Sims RV, Cerami A, Peterson CM. Acetaldehyde adducts with hemoglobin. J Clin Invest 1981; 67:361–9.
167. Ceriello A, Giugliano D, Dello Russo P, Sgambato S, D'Onofrio F. Increased glycosylated haemoglobin A1 in opiate addicts: evidence for a hyperglycaemic effect of morphine. Diabetologia 1982;22:379.
168. Roberts WL, Chiasera JM, Ward-Cook KM. Glycohemoglobin results in samples with hemoglobin C or S trait: a comparison of four test systems. Clin Chem 1999;45:906–9.
169. Weykamp CW, Penders TJ, Muskiet FA, van der Slik W. Influence of hemoglobin variants and derivatives on glycohemoglobin determinations, as investigated by 102 laboratories using 16 methods. Clin Chem 1993;39:1717–23.
170. Schnedl WJ, Krause R, Halwachs-Baumann G, Trinker M, Lipp RW, Krejs GJ. Evaluation of HbA1c determination methods in patients with hemoglobinopathies. Diabetes Care 2000;23: 339–44.
171. Bry L, Chen PC, Sacks DB. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin. Clin Chem 2001;47:153–63.
172. Rendell M, Brannan C, Nierenberg J, Rasbold K, Hestorff T. Fingerstick glycosylated hemoglobin, plasma protein, and albumin. Diabetes Care 1987;10:629–32.
173. Ferrell RE, Hanis CL, Aguilar L, Tulloch B, Garcia C, Schull WJ. Glycosylated hemoglobin determination from capillary blood samples. Utility in an epidemiologic survey of diabetes. Am J Epidemiol 1984;119:159–66.
174. Little RR, England JD, Wiedmeyer HM, Goldstein DE. Effects of whole blood storage on results for glycosylated hemoglobin as measured by ion-exchange chromatography, affinity chromatography, and colorimetry. Clin Chem 1983;29:1113–5.
175. Little RR, England JD, Wiedmeyer HM, Goldstein DE. Glycosylated hemoglobin measured by affinity chromatography: microsample collection and room-temperature storage. Clin Chem 1983;29:1080–2.
176. Baglin SK, Brown AS. Two capillary blood-collection techniques for estimating glycohemoglobin compa-

red. Clin Chem 1995;41: 330–2.
177. Voss EM, Cembrowski GS, Clasen BL, Spencer ML, Ainslie MB, Haig B. Evaluation of capillary collection system for HbA1c specimens. Diabetes Care 1992;15:700–1.
178. Little RR, Wiedmeyer HM, Huang DH, Goldstein DE, Parson RG, Kowal R, et al. A simple blood collection device for analysis of glycohemoglobin (GHB). Clin Chem 1998;44:A139.
179. Baynes JW, Bunn HF, Goldstein D, Harris M, Martin DB, Peterson C, et al. National Diabetes Data Group: report of the Expert Committee on glucosylated hemoglobin. Diabetes Care 1984;7: 602–6.
180. Marshall SM, Barth JH. Standardization of HbA1c measurements: a consensus statement. Ann Clin Biochem 2000;37: 45–6.
181. Goldstein DE, Peth SB, England JD, Hess RL, Da Costa J. Effects of acute changes in blood glucose on HbA1c. Diabetes 1980; 29:623–8.
182. Bannon P. Effect of pH on the elimination of the labile fraction of glycosylated hemoglobin. Clin Chem 1982;28:2183.
183. Cagliero E, Levina EV, Nathan DM. Immediate feedback of HbA1c levels improves glycemic control in type 1 and insulin treated type 2 diabetic patients. Diabetes Care 1999;22:1785–9.
184. DCCT Research Group. The relationship of glycemic exposure (HbA1c) to the risk of development and progression of retinopathy in the diabetes control and complications trial. Diabetes 1995;44:968–83.
185. Larsen ML, Horder M, Mogensen EF. Effect of long-term monitoring of glycosylated hemoglobin levels in insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med 1990;323:1021–5.
186. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 2000;23:S4–18.
187. Peters AL, Davidson MB, Schriger DL, Hasselblad V. A clinical approach for the diagnosis of diabetes mellitus: an analysis using glycosylated hemoglobin levels. Meta-analysis Research Group on the Diagnosis of Diabetes Using Glycated Hemoglobin Levels. JAMA 1996;276:1246–52.
188. Harris MI, Eastman RC. Early detection of undiagnosed noninsulin-dependent diabetes mellitus. JAMA 1996;276:1261–2.
189. Rohlfing CL, Little RR, Wiedmeyer HM, England JD, Madsen R, Harris MI, et al. Use of GHb (HbA1c) in screening for undiagnosed diabetes in the U.S. population. Diabetes Care 2000;23:187–91.
190. McCance DR, Hanson RL, Charles MA, Jacobsson LT, Pettitt DJ, Bennett PH, et al. Comparison of tests for glycated haemoglobin and fasting and two hour plasma glucose concentrations as diagnostic methods for diabetes. BMJ 1994;308:1323–8.
191. Makita Z, Radoff S, Rayfield EJ, Yang Z, Skolnik E, Delaney V, et al. Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy. N Engl J Med 1991;325:836–42.
192. Hoelzel W, Miedema K. Development of a reference system for the international standardization of HbA1c/glycohemoglobin determinations. J Int Fed Clin Chem 1996;9:62–4,66–7.
193. Kobold U, Jeppsson JO, Dulffer T, Finke A, Hoelzel W, Miedema K. Candidate reference methods for hemoglobin A1c based on peptide mapping. Clin Chem 1997;43:1944–51.
194. Eckfeldt JH, Bruns DE. Another step toward standardization of methods for measurement of hemoglobin A1c [Editorial]. Clin Chem 1997;43:1811–3.
195. Miedema K. Electrospray mass spectrometry for measurement of glycohemoglobin. Clin Chem 1997;43:705–7.
196. Todd JA. Genetics of type 1 diabetes. Pathol Biol (Paris) 1997; 45:219–27.
197. She JX. Susceptibility to type I diabetes: HLA-DQ and DR revisited. Immunol Today 1996;17:323–9.
198. Ziegler AG, Bachmann W, Rabl W. Prophylactic insulin treatment in relatives at high risk for type 1 diabetes. Diabetes Metab Rev 1993;9:289–93.
199. Rewers M, Bugawan TL, Norris JM, Blair A, Beaty B, Hoffman M, et al. Newborn screening for HLA markers associated with IDDM: diabetes autoimmunity study in the young (DAISY). Diabetologia 1996;39:807–12.
200. Kukreja A, Maclaren NK. Autoimmunity and diabetes. J Clin Endocrinol Metab 1999;84:4371–8.
201. Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. N Engl J Med 2000;343:702–9.
202. Taylor SI, Arioglu E. Genetically defined forms of diabetes in children. J Clin Endocrinol Metab 1999;84:4390–6.
203. Fajans SS, Bell GI, Bowden DW, Halter JB, Polonsky KS. Maturity onset diabetes of the young (MODY). Diabet Med 1996;13: S90–5.
204. Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. Lancet 2001;358: 221–9.
205. Harrison LC. Risk assessment, prediction and prevention of type 1 diabetes. Pediatr Diabetes 2001;2:71–82.
206. Redondo MJ, Kawasaki E, Mulgrew CL, Noble JA, Erlich HA, Freed BM, et al. DR- and DQ-associated protection from type 1A diabetes: comparison of DRB1*1401 and DQA1*0102-DQB1*0602*. J Clin Endocrinol Metab 2000;85:3793–7.
207. Maclaren NK, Kukreja A. Type 1 diabetes. In: Scriver CR, Sly WS, Childs B, Beaudet AR, Valle D, Kinzler KW, Vogelstein B, eds. The metabolic and molecular bases of inherited disease, 8th ed. St. Louis: McGraw-Hill, 2001:1471–88.
208. Palmer JP, Asplin CM, Clemons P, Lyen K, Tatpati O, Raghu PK, et al. Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. Science 1983;222:1337–9.
209. Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, et al. Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase [published erratum appears in Nature 1990;347:782]. Nature 1990;347:151–6.
210. Kaufman DL, Erlander MG, Clare-Salzler M, Atkinson MA, Maclaren NK, Tobin AJ. Autoimmunity to two forms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. J Clin Invest 1992;89:283–92.
211. Atkinson MA, Maclaren NK. Islet cell autoantigens in insulin dependent diabetes. J Clin Invest 1993;92:1608–16.

212. Lan MS, Wasserfall C, Maclaren NK, Notkins AL. IA-2, a transmembrane protein of the protein tyrosine phosphatase family, is a major autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus. ProcNatl Acad Sci U S A 1996;93:6367–70.
213. Lu J, Li Q, Xie H, Chen ZJ, Borovitskaya AE, Maclaren NK, et al.Identification of a second transmembrane protein tyrosine phosphatase,IA-2_, as an autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus: precursor of the 37-kDa tryptic fragment. Proc NatlAcad Sci U S A 1996;93:2307–11.
214. Turner R, Stratton I, Horton V, Manley S, Zimmet P, Mackay IR,et al. UKPDS 25: autoantibodies to islet-cell cytoplasm and glutamic acid decarboxylase for prediction of insulin requirement in type 2 diabetes. UK Prospective Diabetes Study Group [published erratum appears in Lancet 1998;351:376]. Lancet 1997;350:1288–93.
215. Pozzilli P, Di Mario U. Autoimmune diabetes not requiring insulin at diagnosis (Latent Autoimmune Diabetes of the Adult): definition,characterization, and potential prevention. Diabetes Care 2001;24:1460–7.
216. Maclaren N, Lan M, Coutant R, Schatz D, Silverstein J, Muir A, et al. Only multiple autoantibodies to islet cells (ICA), insulin, GAD65, IA-2 and IA-2_ predict immune-mediated (type 1) diabetes in relatives. J Autoimmun 1999;12:279–87.
217. Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M, Jackson RA, et al. Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. Diabetes 1996;45:926–33.
218. Schott M, Schatz D, Atkinson M, Krischer J, Mehta H, Vold B, et al. GAD65 autoantibodies increase the predictability but not the sensitivity of islet cell and insulin autoantibodies for developing insulin dependent diabetes mellitus. J Autoimmun 1994;7:865–72.
219. Braghi S, Bonifacio E, Secchi A. Di Carlo V, Pozza G, Bosi E.Modulation of humoral islet autoimmunity by pancreas allotransplantation influences allograft outcome in patients with type 1 diabetes. Diabetes 2000;49:218–24.
220. Zimmet P, Turner R, McCarty D, Rowley M, Mackay I. Crucial points at diagnosis. Type 2 diabetes or slow type 1 diabetes.Diabetes Care 1999;22:B59–64.
221. Petersen JS, Dyrberg T, Damm P, Kuhl C, Molsted-Pedersen L, Buschard K. GAD65 autoantibodies in women with gestational or insulin dependent diabetes mellitus diagnosed during pregnancy. Diabetologia 1996;39:1329–33.
222. Fuchtenbusch M, Ferber K, Standl E, Ziegler AG. Prediction of type 1 diabetes postpartum in patients with gestational diabetes mellitus by combined islet cell autoantibody screening: a prospective multicenter study. Diabetes 1997;46:1459–67.
223. Kobayashi T, Nakanishi K, Murase T, Kosaka K. Small doses of subcutaneous insulin as a strategy for preventing slowly progressive β-cell failure in islet cell antibody-positive patients with clinical features of NIDDM. Diabetes 1996;45:622–6.
224. Gleichmann H, Bottazzo GF. Progress toward standardization of cytoplasmic islet cell-antibody assay. Diabetes 1987;36:578–84.
225. Mire-Sluis AR, Gaines Das R, Lernmark A. The World Health Organization International Collaborative Study for islet cell antibodies. Diabetologia 2000;43:1282–92.
226. Williams AJ, Bingley PJ, Bonifacio E, Palmer JP, Gale EA. A novel micro-assay for insulin autoantibodies. J Autoimmun 1997;10: 473–8.
227. Verge CF, Stenger D, Bonifacio E, Colman PG, Pilcher C, Bingley PJ, et al. Combined use of autoantibodies (IA-2 autoantibody, GAD autoantibody, insulin autoantibody, cytoplasmic islet cell antibodies) in type 1 diabetes: Combinatorial Islet Autoantibody Workshop. Diabetes 1998;47:1857–66.
228. Ellis TM, Schatz DA, Ottendorfer EW, Lan MS, Wasserfall C, Salisbury PJ, et al. The relationship between humoral and cellular immunity to IA-2 in IDDM. Diabetes 1998;47:566–9.
229. Atkinson MA, Bowman MA, Campbell L, Darrow BL, Kaufman DL, Maclaren NK. Cellular immunity to a determinant common to glutamate decarboxylase and Coxsackie virus in insulin-dependent diabetes. J Clin Invest 1994;94:2125–9.
230. Aanstoot HJ, Kang SM, Kim J, Lindsay LA, Roll U, Knip M, et al. Identification and characterization of glima 38, a glycosylated islet cell membrane antigen, which together with GAD65 and IA2 marks the early phases of autoimmune response in type 1 diabetes. J Clin Invest 1996;97:2772–83.
231. American Diabetes Association. Diabetes nephropathy. Diabetes Care 1999;22(Suppl 1):S66–9.
232. Holl RW, Grabert M, Thon A, Heinze E. Urinary excretion of albumin in adolescents with type 1 diabetes: persistent versus intermittent microalbuminuria and relationship to duration of diabetes, sex, and metabolic control. Diabetes Care 1999;22:1555–60.
233. Sikka R, Waters J, Moore W, Sutton DR, Herman WH, Aubert RE.Renal assessment practices and the effect of nurse casemanagement of health maintenance organization patients with diabetes. Diabetes Care 1999;22:1–6.
234. Howey JE, Browning MC, Fraser CG. Biologic variation of urinary albumin: consequences for analysis, specimen collection, interpretation of results, and screening programs. Am J Kidney Dis 1989;13:35–7.
235. Collins AC, Sethi M, MacDonald FA, Brown D, Viberti GC. Storage temperature and differing methods of sample preparation in the measurement of urinary albumin. Diabetologia 1993;36:993–7.
236. MacNeil ML, Mueller PW, Caudill SP, Steinberg KK. Considerations when measuring urinary albumin: precision, substances that may interfere, and conditions for sample storage. Clin Chem 1991;37:2120–3.
237. Hishiki S, Tochikubo O, Miyajima E, Ishii M. Circadian variation of urinary microalbumin excretion and ambulatory blood pressure in patients with essential hypertension. J Hypertens 1998;16: 2101–8.
238. Roberts WL, Calcote CB, Cook CB, Gordon DL, Moore ML, Moore S, et al. Comparison of four commercial urinary albumin (microalbumin) methods: implications for detecting diabetic nephropathy using random urine specimens. Clin Chim Acta 1998; 273:21–33.
239. Poulsen PL, Hansen B, Amby T, Terkelsen T, Mogensen CE. Evaluation of a dipstick test for microalbuminuria in three different clinical settings, in-

cluding the correlation with urinary albumin excretion rate. Diabetes Metab 1992;18:395–400.
240. Fernandez Fernandez I, Paez Pinto JM, Hermosin Bono T, Vazquez Garijo P, Ortiz Camunez MA, Tarilonte Delgado MA. Rapid screening test evaluation for microalbuminuria in diabetes mellitus. Acta Diabetol 1998;35:199–202.
241. Leong SO, Lui KF, Ng WY, Thai AC. The use of semi-quantitativeurine test-strip (Micral Test) for microalbuminuria screening in patients with diabetes mellitus. Singapore Med J 1998;39: 101–3.
242. Grundy SM. Hypertriglyceridemia, insulin resistance, and the metabolic syndrome. Am J Cardiol 1999;83:25F–9F.
243. Reaven GM. Insulin resistance and its consequences; noninsulin dependent diabetes mellitus and coronary heart disease.In: LeRoith D, Taylor SI, Olefsky JM, eds. Diabetes mellitus: a fundamental clinical text. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996:509–19.
244. Chevenne D, Trivin F, Porquet D. Insulin assays and reference values. Diabetes Metab 1999;25:459–76.
245. Del Prato S. Measurement of insulin resistance in vivo. Drugs 1999;58:3–6,discussion 75–82.
246. Marks V. Recognition and differential diagnosis of spontaneous hypoglycaemia. Clin Endocrinol (Oxf) 1992;37:309–16.
247. Faber OK, Binder C. C-Peptide. an index of insulin secretion. Diabetes Metab Rev 1986;2:331–45.
248. Robbins DC, Andersen L, Bowsher R, Chance R, Dinesen B, Frank B, et al. Report of the American Diabetes Association's Task Force on standardization of the insulin assay. Diabetes 1996;45:242–56.
249. Marks V. Hypoglycemia: factitious and felonious. Endocrinol Metab Clin North Am 1999;28:579–601.
250. Health Care Financing Administration. C-Peptide levels as a criterion for use of the insulin pump. http://www.hcfa.-gov/coverage/8b3-ss2.htm (May 14, 2001).
251. Burge MR, Schade DS. Insulins. Endocrinol Metab Clin North Am1997;26:575–98.
252. Cooper GJ, Willis AC, Clark A, Turner RC, Sim RB, Reid KB.Purification and characterization of a peptide from amyloid-rich pancreases of type 2 diabetic patients. Proc Natl Acad Sci U S A 1987;84:8628–32.
253. Westermark P, Wernstedt C, Wilander E, Hayden DW, O'Brien TD, Johnson KH. Amyloid fibrils in human insulinoma and islets of Langerhans of the diabetic cat are derived from a neuropeptide-like protein also present in normal islet cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1987;84:3881–5.
254. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature 1994;372:425–32.
255. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. Nature 1998;395:763–70.
256. Clement K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cassuto D, et al. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. Nature 1998;392:398–401.
257. Wingard DL, Barrett-Connor E. Heart disease in diabetes in America, 2nd ed. Bethesda, MD: National Diabetes Data Group,NIH, 1995.
258. Haffner SM, Lehto S, Ronnemaa T, Pyorala K, Laakso M.Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without priormyocardial infarction. N Engl J Med 1998;339:229–34.
259. Warnick GR. Measurement of cholesterol and other lipoprotein constituents in the clinical laboratory. Clin Chem Lab Med 2000;38:287–300.
260. Haffner SM. Management of dyslipidemia in adults with diabetes [Technical Review]. Diabetes Care 1998;21:160–78.
261. Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). JAMA 2001; 285: 2486–97.
262. Ridker PM. Evaluating novel cardiovascular risk factors: can we better predict heart attacks? Ann Intern Med 1999;130:933–7.
263. Danesh J, Collins R, Peto R. Lipoprotein(a) and coronary heart disease. Meta-analysis of prospective studies. Circulation 2000; 102:1082–5.
264. Morrow DA, Ridker PM. C-reactive protein, inflammation, coronary risk. Med Clin North Am 2000;84:149–61,ix.
265. Harjai KJ. Potential new cardiovascular risk factors: left ventricular hypertrophy, homocysteine, lipoprotein(a), triglycerides, oxidative stress, and fibrinogen. Ann Intern Med 1999;131:376–86.
266. Saito I, Folsom AR, Brancati FL, Duncan BB, Chambless LE,McGovern PG. Nontraditional risk factors for coronary heart disease incidence among persons with diabetes: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. Ann Intern Med 2000; 133:81–91.
267. Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Wilson PW, Rosenberg IH. The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations. N Engl J Med 1999;340:1449–54.