

Sezione IV: Appendice pratica

15. Determinazioni di laboratorio

Romolo Dorizzi

15.a. Glucosio

(per informazioni sulla fisiopatologia, cfr capitolo 3.a. a pag. 51)

Metodi di determinazione

Il glucosio è misurato quasi esclusivamente con metodi enzimatici. L'analisi del Programma di Verifica Esterna di Qualità (VEQ) gestito dal *College of American Pathologists* (CAP) ha rivelato che negli Stati Uniti virtualmente tutti i laboratori misurano la concentrazione di glucosio nel sangue con metodiche basate su esochinasi o glucosio-ossidasi e solo l'1% utilizza metodi basati sulla glucosio-deidrogenasi. Il glucosio, una volta fosforilato dall'esochinasi, è ossidato dalla glucosio-6-fosfato deidrogenasi in presenza di NADP. L'NADPH generato è direttamente proporzionale alla concentrazione di glucosio. L'imprecisione (CV) nella determinazione del glucosio nel materiale di controllo e nei campioni dei pazienti è inferiore al 4%.

Raccolta dei campioni

Il campione deve essere raccolto al mattino dopo una notte di digiuno (durante questo tempo il soggetto può assumere solo acqua). Secondo recenti evidenze i valori medi di FPG sono più alti al mattino che al pomeriggio, per cui molti casi di diabete non sarebbero stati diagnosticati se i pazienti fossero stati esaminati nel pomeriggio.

Stabilità

La concentrazione del glucosio nel sangue intero diminuisce con il tempo a causa della glicolisi. La velocità della glicolisi è in media del 5-7% per ora (portando ad una diminuzione della concentrazione per ogni ora trascorsa dal prelievo di circa 0.6 mmol/L [10 mg/dL]). Tale velocità dipende, tra l'altro, da temperatura, concentrazione del glucosio e numero di globuli bianchi (tutti fattori che la aumentano, portando ad una più rapida diminuzione dei valori misurati). Il processo della glicolisi può essere rallentato (migliorando quindi la stabilità delle concentrazioni misurate) da inibitori dell'enzima, come il fluoruro di sodio (2.5 mg di fluoruro/mL di sangue) o, meno comunemente, lo iodo-acetato di litio (0.5 mg/mL di sangue). Questi reagenti si possono usare da soli o, più comunemente, con anticoagulanti come ossalato di potassio, EDTA, citrato o litio-eparina. Anche se il fluoruro mantiene stabile a lungo la concentrazione del glucosio, la velocità di diminuzione della glicemia nella prima ora successiva alla raccolta del campione è virtualmente identica in provette con e senza fluoruro (la leucocitosi può aumentare la glicolisi anche in presenza di fluoruro, se il numero di globuli bianchi è molto alto). Nel sangue intero a temperatura ambiente, dopo le prime 4 ore la concentrazione del glucosio è stabile per 72 ore in presenza di fluoruro. Nel siero separato, non emolizzato, sterile, senza fluoruro, la concentrazione del glucosio è stabile per 8 ore a 25 °C e per 72 ore a 4 °C.

Variabilità

Il glucosio può essere misurato nel sangue intero, nel siero o nel plasma, ma per la diagnosi è raccomandato il plasma. La molalità del glucosio (vale a dire la quantità di glucosio per unità di massa d'acqua) è identica nel sangue intero e nel plasma. Anche se i globuli rossi del sangue sono liberamente permeabili al glucosio (il glucosio vi entra per trasporto facilitato), il contenuto di acqua è di circa il 93% nel plasma e di circa il 73% negli eritrociti. Con un ematocrito del 45% possiamo calcolare un contenuto di acqua medio dell'84%. Infatti $0.45 \times 73\% + 0.55 \times 93\% = 84\%$. Poiché il glucosio è distribuito in modo uguale nella parte acquosa del sangue, il rapporto tra il contenuto di acqua del plasma e del sangue intero è $93\%/84\% = 1.107$. La concentrazione di glucosio nel plasma è quindi (quando l'ematocrito è del 45%) più alta dell'11% rispetto a quella nel sangue intero. La concentrazione del glucosio nel sangue raccolto in eparina è più bassa che nel siero, per il passaggio dagli eritrociti al plasma causato dagli anticoagulanti. Mentre il glucosio è significativamente più alto nel sangue capillare che nel sangue venoso durante OGTT, la differenza media nei campioni a digiuno è minima.

Tabella 15.a.1.

Glicemia	Plasma <i>vs.</i> sangue intero	Sangue eparinato <i>vs.</i> siero	Sangue capillare <i>vs.</i> venoso
<i>random</i>	↑ 11%	↓ 5%	
digiuno			↑ 2 mg/dL ↑ 0.1 mM/L
post-OGTT			↑ 20-25% ↑ 30 mg/dL ↑ 1.7 mM/L

Tabella 15.a.2.

Intervalli di riferimento della concentrazione di glucosio			
		mg/dL	mmol/L
Plasma	Adulti	74-106	4.5-5.9
	Bambini	60-100	3.5-5.6
	Neonati a termine	30-60	1.7-3.3
	Neonati prematuri	20-60	1.1-3.3
Sangue intero venoso		65-100	3.5-5.5
Sangue intero capillare		70-100	3.9-5.5
Liquor		20-60	1.1-3.3

Raccomandazioni

- La diagnosi di diabete richiede la misurazione del glucosio nel plasma. *Livello di evidenza: A.*
- Il sangue per l'analisi del glucosio plasmatico deve essere prelevato dopo almeno 8 ore di digiuno. Se il plasma non può essere separato dalle cellule entro 60 minuti, il sangue deve

essere raccolto in una provetta contenente un inibitore della glicolisi come il fluoruro di sodio. *Livello di evidenza: B.*

- c) Anche se i metodi di misura del glucosio sono ben standardizzati e l'imprecisione ai limiti decisionali diagnostici (7.0 e 11.1 mmol/L, 126 e 200 mg/dL) è bassa, si possono verificare errori di classificazione. A causa dell'ampia variabilità biologica intra-individuale (CV di circa 5-7%), i valori di FPG di 5.8-6.9 mmol/L (105-125 mg/dL) devono essere confermati. *Livello di evidenza: B.*

GLICOSURIA

Il rationale di questa determinazione è che la concentrazione di glucosio nelle urine riflette la concentrazione media di glucosio nel sangue durante il periodo della raccolta, nel caso che la raccolta si riferisca ad un determinato periodo di tempo (**di solito da 4 a 24 ore**), mentre il campione estemporaneo di urine riflette la concentrazione di glucosio al momento della raccolta.

Oggi si consiglia l'automonitoraggio del glucosio nelle urine solo per quei pazienti che non sono in grado o non vogliono eseguire l'automonitoraggio nel sangue (numero non irrilevante). I pazienti e, naturalmente, i medici che valutano i risultati debbono avere ben chiaro che le determinazioni su urine non forniscono nessuna informazione circa concentrazioni di glucosio circolante inferiori alla soglia renale.

I motivi per cui l'autodeterminazione nelle urine è meno consigliabile rispetto a quella nel sangue sono i seguenti.

1. Vi sono ampie oscillazioni nel valore di soglia renale per il glucosio, che spesso si discosta dalla concentrazione classica di 180 mg/dL. Questo è rilevante in molti casi, per esempio negli adulti con diabete mellito da lungo periodo, in cui la soglia può aumentare anche in modo notevole (portando quindi ad una sottostima della concentrazione di glucosio nel sangue), nei bambini e, in particolare, nelle donne in gravidanza che possono avere una soglia renale molto bassa o variabile.
2. L'assunzione di liquidi e la concentrazione delle urine può influenzare la determinazione di glucosio nelle urine.
3. La concentrazione di glucosio nelle urine riflette la concentrazione media di glucosio nel sangue a partire dall'ultima minzione e non al momento della raccolta.
4. Non rilevare glucosio nelle urine non discrimina tra ipoglicemia, euglicemia e iperglicemia lieve o moderata; questa analisi non è pertanto utile per prevenire ipo- ed iperglicemia.
5. La determinazione del glucosio che si basa sul confronto visivo con una carta di colori è meno accurata della misurazione nel sangue capillare, che di solito si avvale della lettura riflettometrica digitale.
6. La determinazione del glucosio nelle urine soffre di alcune interferenze con farmaci.

Per la determinazione vanno preferite strisce reattive che determinano il glucosio in modo specifico, piuttosto che mediante riduzione. Non è stato dimostrato che la determinazione del glucosio sulla seconda minzione offra dei vantaggi.

Note metodologiche

In passato il glucosio era misurato con metodi in cui erano rivelate le sostanze presenti nelle urine in grado di ridurre il rame. Poiché numerosissime sostanze, oltre al glucosio, possono avere un'azione riducente di questo tipo (ad esempio: fruttosio, lattosio, galattosio, maltosio, xilosio, ribosio, acido urico, acido ascorbico, creatinina, cisteina, corpi chetonici, sulfanilami-

de, acido ossalico, acido ippurico, acido glucuronico, isoniazide, salicilati), oggi sono impiegate metodiche basate sull'enzima glucosio-ossidasi. In genere le strisce reattive sono impregnate dell'enzima insieme al colorante o-toluidina, che produce una colorazione blu quando la concentrazione di glucosio nelle urine supera i 100 mg/dL. Risultati **falsi-positivi** possono essere dati dalla contaminazione delle urine con acqua ossigenata o ipoclorito (candeggina). Risultati **falsi-negativi** possono essere dati dalla presenza di chetoni, acido ascorbico (contenuto in numerosi antibiotici come conservante) e salicilati.

I metodi quantitativi per la determinazione del glucosio nelle urine sono gli stessi di quelli usati nel plasma: esochinasi, glucosio-ossidasi (che non comprendono la reazione H_2O_2 -perossidasi) e glucosio-deidrogenasi.

15.b. Corpi chetonici

(per informazioni sulla fisiopatologia, cfr capitolo 3.b. a pag. 53)

Metodi di determinazione

Sono state descritte numerose metodologie di misura. La più usata è la reazione colorimetrica che avviene tra corpi chetonici e nitroprussiato (sodio ferro-cianuro) e che produce colore porpora. 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). Sono commercializzate strisce reattive che misurano sia glucosio che chetoni. Il metodo del nitroprussiato misura solo AcAc (se il reagente contiene glicina, misura anche l'acetone, ma in modo molto meno sensibile). Poiché i metodi che si basano sulla reazione al nitroprussiato non quantificano il β -HBA, il chetone predominante nella DKA, essi devono essere utilizzati con cautela nella diagnosi di DKA e non devono essere usati per monitorarne la terapia, poiché nel corso di trattamento efficace il β -HBA diminuisce mentre AcAc e acetone possono aumentare. I metodi che misurano in maniera specifica il β -HBA sono utili sia per la diagnosi che per il *follow-up* della DKA.

Non vi è ancora consenso se nei pazienti diabetici i corpi chetonici debbano essere misurati nel sangue o nelle urine. Nel monitoraggio del trattamento della DKA la misura semi-quantitativa dei corpi chetonici è più accurata nel sangue che nelle urine. Tuttavia, anche se i corpi chetonici non sono escreti nelle urine in modo proporzionale alla loro concentrazione nel sangue, la determinazione nelle urine, che ha maggiore praticità, è più impiegata.

Raccolta dei campioni

I campioni per la determinazione dell'acetone, altamente volatile, devono essere conservati in contenitori chiusi. I corpi chetonici possono essere dosati nel siero o nel plasma con strisce reattive e compresse, analoghe a quelle utilizzate per la chetonuria ed i campioni possono essere diluiti con soluzione fisiologica per titolarne la concentrazione (i risultati sono espressi generalmente come positivi ad una diluizione 1:x). Anche in questo caso non viene dosato il β -HBA, il corpo chetonico prevalente nella DKA.

Stabilità

L'AcAc è labile ed è convertito rapidamente in β -HBA; può pertanto essere misurato solo in campioni addizionati con acido perclorico. Il β -HBA è stabile nel sangue intero per 4 ore a temperatura ambiente e per 48 ore in siero/plasma a 4-8 °C.

Variabilità

Gli intervalli di riferimento dei metodi di misura per il β -HBA sono diversi, ma la concentrazione in soggetti sani a digiuno è generalmente < 0.5 mmol/L (5 mg/dL). Pazienti con DKA

ben documentata [$\text{CO}_2 < 17 \text{ mmol/L}$; pH arterioso < 7.3 ; glicemia $> 14.9 \text{ mmol/L}$ (250 mg/dL)] hanno generalmente una concentrazione di $\beta\text{-HBA} > 2 \text{ mmol/L}$ (20 mg/dL). In condizioni fisiologiche il rapporto tra $\beta\text{-HBA}$ ed AcAc è 1:1; nel digiuno prolungato può salire a 6:1, nella DKA può superare 10:1.

Raccomandazioni

- a) La determinazione dei corpi chetonici nelle urine non deve essere utilizzata nella diagnosi o nel monitoraggio di DKA. *Livello di evidenza: A.*
- b) I metodi per misurare i corpi chetonici nel sangue che si basano sulla reazione al nitroprusiato possono essere utilizzati per confermare la diagnosi di DKA, ma non per monitorarne il trattamento. Per la diagnosi ed il monitoraggio di DKA devono essere utilizzati dosaggi specifici per il $\beta\text{-HBA}$ nel sangue. *Livello di evidenza: E.*

Bibliografia

Laffel L. *Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes.* *Diabetes Metab Res Rev* 1999, 15: 412–26.

15.c. Emoglobina glicata

(per informazioni sulla fisiopatologia, cfr capitolo 3.c. a pag. 56)

Metodi di determinazione

Sono disponibili numerose metodiche per misurare l'emoglobina glicata. Le più usate sono basate sulla differenza di carica elettrica tra HbA_{1c} ed HbA (mini-colonnine, HPLC, elettroforesi ed isoelettro-focalizzazione), sulla natura di determinanti antigenici dei primi 8 residui aminoacidici della catena β dell'emoglobina (metodiche immunometriche) e sulla presenza di glucosio legato covalentemente all'emoglobina (cromatografia di affinità). I metodi immunometrici di più recente commercializzazione sono dotati di particolari caratteristiche di specificità per l'emoglobina A_{1c}.

Generalmente, i risultati di tutti i metodi mostrano correlazioni eccellenti e non ci sono dati convincenti che mostrino che un certo metodo sia clinicamente superiore ad un altro. Tuttavia, i valori di HbA_{1c} ottenuti sullo stesso campione di sangue possono differire considerevolmente a seconda dei metodi utilizzati. Questo spiega, in parte, perché nel corso degli anni, in mancanza di uno *standard* di riferimento internazionale, si siano sviluppati intervalli di riferimento metodo-dipendenti e perché i dati ottenuti in ambiti diversi siano spesso non confrontabili tra loro. Nel 1996 il *National Glycohemoglobin Standardization Program* (NGSP) ha promosso un programma di standardizzazione dei risultati di HbA_{1c} tra i laboratori, riferendosi a valori equivalenti DCCT. Oggi sia l'*American Association for Clinical Chemistry* (AACC) che l'ADA raccomandano che i laboratori usino solo metodi per l'emoglobina glicata certificati dall'NGSP e che partecipino ad un programma di verifica esterna di qualità (VEQ).

Nuova posizione di consenso sulla determinazione dell'HbA_{1c}.

L'*American Diabetes Association*, l'*European Association for the Study of Diabetes*, l'*International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (IFCC), e l'*International Diabetes Federation* hanno raggiunto una posizione di consenso sulla standardizzazione mondiale della misura dell'emoglobina glicata. Il documento è pubblicato su *Diabetologia*, *Diabetes Care* e *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. È raccomandato che i risultati della misurazione dell'HbA_{1c}, compreso il sistema di riferimento e le modalità di produzione del referto, siano standardizzati a livello mondiale. Il nuovo sistema di riferimento IFCC è la sola base valida sulla quale implementare la standardizzazione dei test per l'HbA_{1c}. In tutto il mondo, i risultati di HbA_{1c} dovranno essere espressi nei referti in unità internazionali (mmol/mol), e le unità percentuali derivanti dal *National Glycohemoglobin Standardization Program* (NGSP) dovrebbero essere calcolate dall'equazione *master* dell'IFCC-NGSP. Se lo studio "*Average plasma glucose study*" fornirà le informazioni attese, sarà possibile e raccomandato fornire nel referto una media dei livelli di glicemia (ADAG), derivata dalle concentrazioni di HbA_{1c}, come interpretazione del risultato di HbA_{1c}. Nelle linee guida cliniche, gli obiettivi glicemici dovranno essere espressi in unità IFCC, in unità derivate NGSP e come ADAG.

Raccolta dei campioni

Anche se non occorre il digiuno, campioni lipemici possono dare letture fotometriche errate, a causa della torbidità. I campioni di sangue da utilizzare devono essere raccolti usando come anticoagulante EDTA, ossalato o fluoruro.

Stabilità

L'analisi deve essere eseguita il più presto possibile, perché la glicazione continua in vitro, soprattutto quando la glicemia è elevata. I campioni in eparina devono essere analizzati entro due giorni e possono non essere adatti ad alcuni metodi come l'elettroforesi. Dopo 3-4 giorni, il metabolismo cellulare produce delle emoglobine modificate, come l'HbA_{1d} e l'HbA₃, che possono interferire soprattutto con i metodi cromatografici. Una conservazione impropria dei campioni, per esempio a temperature elevate, può provocare artefatti rilevanti, dipendenti dal metodo di determinazione utilizzato, che non sono sempre identificabili. In generale, i campioni di sangue intero sono stabili per una settimana a 4 °C. Con la maggior parte dei metodi, i campioni conservati a -70 °C o a temperatura inferiore sono stabili per almeno un anno. I campioni non sono stabili a -20 °C.

Variabilità

Il *trial* DCCT ha stimato che ogni aumento dell'1% dell'emoglobina glicata corrisponde ad un aumento medio di 30 mg/dL (2 mmol/L) della glicemia, sia pure con una notevole dispersione dei risultati che rende poco impiegabile questo calcolo nel singolo paziente. Inoltre, i pazienti si distribuirebbero in due popolazioni, in cui l'emoglobina lega il glucosio ad alta ed a bassa velocità (rispettivamente "high" e "low" "glycators").

Anche la soglia renale può influenzare l'emoglobina glicata. Poiché una volta superata la soglia renale, tutto il glucosio che arriva al rene viene escreto, più alta è questa soglia, più alta è la concentrazione di glucosio (e di emoglobina glicata) che può essere raggiunta prima che il glucosio sia misurabile nelle urine.

I risultati relativi all'HbA_{1c}, poiché riflettono la concentrazione di glucosio delle settimane e mesi precedenti, non sono in grado di rivelare grandi variazioni di concentrazioni di glucosio se non dopo molte settimane. L'HbA_{1c} è una misura "pesata" della concentrazione media di glucosio. Il risultato finale è influenzato più dal passato recente che da quello remoto: la concentrazione media del mese precedente contribuisce per circa il 50% al risultato finale, mentre quella nel periodo compreso tra il 90° ed il 120° giorno precedente il prelievo "pesa" per circa il 10%.

Raccomandazioni

Queste raccomandazioni riguardano sia i pazienti con DM-T1 che quelli con DM-T2.

- a) L'HbA_{1c} deve essere misurata *rutinariamente* in tutti i pazienti con diabete mellito per documentarne il controllo glicemico. *Livello di evidenza: A.*
- b) I laboratori devono utilizzare solo metodi di determinazione dell'HbA_{1c} di cui sia stata certificata la "tracciabilità" al metodo DCCT. Infatti, solo i metodi con tale caratteristica producono risultati confrontabili con il metodo DCCT e tra di loro. *Livello di evidenza: B.*
- c) I laboratori devono utilizzare metodi di misura dell'emoglobina glicata con CV inter-dossaggio < 5%. *Livello di evidenza: C.*
- d) Gli obiettivi del trattamento prevedono il mantenimento della concentrazione di HbA_{1c} < 7% e la rivalutazione del regime terapeutico se i valori di HbA_{1c} sono > 8%. 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.*

Bibliografia

- Mosca IF, Goodall I, Hoshino T, et al. Global standardization of glycated hemoglobin measurement: the position of the IFCC Working Group. Clin Chem Lab Med 2007, 45: 1077-80.*
- Consensus statement on the worldwide standardization of the hemoglobin A1C measurement: the American Diabetes Association, European Association for the Study of Diabetes, International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, and the International Diabetes Federation. Diabetes Care 2007, 30: 2399-400.*
- Consensus statement on the worldwide standardization of the hemoglobin A1C measurement: the American Diabetes Association, European Association for the Study of Diabetes, International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, and the International Diabetes Federation. Diabetologia 2007, 50: 2042-3.*

15.d. Microalbuminuria

(per informazioni sulla fisiopatologia, cfr capitolo 3.d. a pag. 59)

Metodi di determinazione

Sono commercializzati numerosi metodi semi-quantitativi per lo *screening* della microalbuminuria. Si tratta di strisce reattive che sono ottimizzate per dare una lettura "positiva" ad una concentrazione pre-determinata di albumina. Per essere utili a questo scopo, devono avere un'elevata sensibilità clinica che, per l'identificazione di un'escrezione > 30 mg/24 ore, varia dal 95% al 65%, a seconda della competenza dell'operatore. La percentuale dei risultati falsi positivi arriva al 20%. I metodi disponibili, che impiegano strisce reattive per la microalbumina, non sembrano essere adatti a programmi di *screening* nell'ambulatorio del medico di famiglia o al domicilio del soggetto. I metodi adatti allo *screening* devono avere una bassa percentuale di falsi negativi, in maniera che solo i risultati positivi richiedano conferma con un metodo quantitativo. Il metodo Micral (Roche) usa IgG anti-albumina monoclonali complessate a β -galattosidasi. L'albumina presente nelle urine si lega all'anticorpo coniugato con l'enzima impregnato nella striscia reattiva e migra nella zona di reazione, dove reagisce con un substrato (rosso clorofenolo-galattoside) producendo un colore rosso. Il test richiede la semplice immersione della striscia reattiva nelle urine per 5 secondi (tempo critico) e l'intensità del colore, valutata dopo 5 minuti, è proporzionale alla concentrazione dell'albumina.

Tutti i metodi quantitativi per il dosaggio della microalbuminuria sono immunometrici e impiegano anticorpi contro l'albumina. Sono disponibili in commercio quattro metodologie: RIA, ELISA, immuno-diffusione radiale ed immuno-turbidimetria. I limiti di rivelabilità di tutti sono intorno a 20 mg/L e la maggior parte dei metodi presenta una buona concordanza. Tutte le tecnologie hanno vantaggi e svantaggi, ma quella immunometrica è la più diffusa, perché semplice, automatizzabile, rapida e poco costosa.

Raccolta dei campioni

Per ovviare alle difficoltà della raccolta, soprattutto nel paziente ambulatoriale (ma non solo), è stato proposto di utilizzare un campione estemporaneo (il primo del mattino), esprimendo il risultato in mg/L (in questo caso il valore soglia è 20 mg/L).

Il **campione ideale** è quello della raccolta delle **24 ore**. Campioni raccolti in intervalli più brevi possono essere accettati se si tiene conto della notevole variazione circadiana dell'escrezione di albumina (30-50% più bassa durante la notte).

Anche se la raccolta delle urine delle 24 ore ha dei vantaggi (per esempio la possibilità di misurare contemporaneamente la *clearance* della creatinina), il **rapporto albumina/creatinina** sembra essere un'alternativa accettabile. Il rapporto ha, infatti, 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. Per il calcolo del rapporto, è preferibile un campione della prima minzione del mattino, perché ha una variabilità intra-persona più bassa rispetto a quella presentata da campioni raccolti *random* nel corso della giornata (in questo caso il valore soglia è 30 mg/g di creatinina).

Il metodo raccomandato dall'ADA è quello di misurare il rapporto albumina-creatinina in un campione *random* (preferibilmente il primo del mattino).

Stabilità

L'albumina è stabile per almeno una settimana nelle urine non trattate, conservate tra +4 °C e +20 °C.

Le urine possono essere conservate a -20 °C o -80 °C senza centrifugazione o filtrazione preliminari. La concentrazione di albumina in urine non trattate oppure centrifugate o filtrate diminuisce dello 0.27% al giorno se conservate a -20 °C, ma non dimostra alcuna diminuzione dopo sei mesi a -80 °C.

Variabilità

La variabilità intra-soggetto dell'escrezione urinaria di albumina (della concentrazione di albumina e del rapporto albumina/creatinina nelle 24 ore) è notevole nei soggetti senza diabete ed anche maggiore in quelli con diabete.

Nei soggetti sani, la minore variabilità intra-soggetto (CV) dell'albumina (36%) e del rapporto albumina/creatinina (31%) si osserva nella prima minzione del mattino. È stato pertanto raccomandato di misurare la concentrazione dell'albumina nelle urine della prima minzione.

Nei pazienti con diabete, il CV intra-soggetto per la concentrazione di albumina nella prima minzione supera il 60% e quello del rapporto albumina/creatinina nello stesso tipo di campione si avvicina al 40%.

Tabella 15.d.1.

Metodologia adottata	Immuno-turbidimetria, ELISA, RIA, immuno-diffusione radiale.			
Campione richiesto	Raccolta 24 ore, estemporaneo, temporizzato.			
Volume minimo	5 mL.			
Stabilità del campione	Una settimana a 20-25 °C, 1 mese a 4-8 °C, 6 mesi a -20 °C.			
Intervallo di riferimento		mg/24 ore	µg/min	µg/mg creatinina
	Normale	< 30	< 20	< 30
	Microalbuminuria	30-300	20-200	30-300
	Albuminuria clinica	> 300	> 200	> 300

Raccomandazioni

a) La misurazione annuale della microalbuminuria nei pazienti alla pubertà o dopo la pubertà che non presentano proteinuria clinica deve cominciare 5 anni dopo la diagnosi di DM-T1 ed al momento della diagnosi di DM-T2.

Livello di evidenza: E (Consenso di esperti o esperienza clinica)

b) Il CV analitico dei metodi per misurare la microalbuminuria deve essere < 15%.

Livello di evidenza: E (Consenso di esperti o esperienza clinica)

- c) Sono accettabili raccolte temporizzate di urine (o campioni di urine non temporizzate) per la determinazione del rapporto albumina/creatinina.
Livello di evidenza: E (Consenso di esperti o esperienza clinica).

Bibliografia

- Thomas L. *Clinical laboratory diagnostics*. TH-Books; Frankfurt 1998.
- Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. *Tietz Textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. Elsevier's Saunders; St Louis 2006.
- Tencer J, Thysell H, Andersson K, Grubb A. Stability of albumin, protein HC, immunoglobulin G, k- l-chain immunoreactivity, orosomuroid and alpha1-antitrypsin in urine stored at various conditions. *Scand J Clin Lab Invest* 1994, 54: 199-206.
- Incerti J, Zelmanovitz T, Camargo JL, Gross JL, de Azevedo MJ. Evaluation of tests for microalbuminuria screening in patients with diabetes. *Nephrol Dial Transplant* 2005, 20: 2402-7
- Penders J, Fiers Delanghe JR. Quantitative evaluation of urinalysis test strips. *Clin Chem* 2002, 48: 2236-41.

15.e. Insulina, pro-insulina e peptide-C

(per informazioni sulla fisiopatologia, cfr capitolo 4.a. a pag. 65)

Metodi di determinazione

I metodi di dosaggio per insulina, pro-insulina e peptide-C hanno due applicazioni principali: la valutazione dell'ipoglicemia e quella, principalmente di ricerca, relativa alla patogenesi ed alla terapia del diabete.

In ambito clinico si devono valutare due aspetti:

- se l'ipoglicemia è associata ad una soppressione appropriata della (pro)insulina;
- se l'inappropriata elevazione dell'insulinemia è endogena (vale a dire accompagnata da un aumento della concentrazione di peptide-C).

Da molti anni è noto che le cellule adenomatose dell'insula producono pro-insulina ed una quantità variabile di insulina e che la concentrazione di pro-insulina circolante può variare nei diversi pazienti. Quasi il 90% dei pazienti con insulinoma presenta una quota di *Pro-insulin Like Component* (PLC) superiore al 25% del totale dell'insulina immuno-reattiva. È stato sostenuto, addirittura, che con l'uso di metodi specifici per la determinazione dell'insulina si potrebbe mancare la diagnosi di un insulinoma che produca soprattutto pro-insulina e che, analogamente, la somministrazione *factitia* di insulina animale potrebbe non essere rivelata. È da tenere presente anche il particolare rapporto che esiste tra insulina e glucosio nel neonato, a termine e prematuro, che presenta un'elevazione significativa di pro-insulina.

I bio-dosaggi sono poco utilizzati ed i metodi in spettrometria di massa danno dei risultati più bassi rispetto a quelli immunometrici (maggiormente impiegati, anche se sono spesso influenzati dagli anticorpi sviluppati dai pazienti trattati con insulina). Una misura accurata dell'insulina può essere effettuata precipitando con polietilen-glicole (PEG) gli anticorpi endogeni e l'insulina ad essi legata. Anche recentemente l'*Insulin Standardization Work Group*, istituito dall'*American Diabetes Association*, ha concluso che non tutti i metodi in commercio misurano l'insulina in modo preciso ed accurato con una sufficiente sensibilità. Attualmente si devono considerare alcuni aspetti fondamentali.

- Numerose preparazioni di insulina umana sono usate come calibratori, espressi di solito in UI: uno dei più utilizzati è il 1st IRP 66/304 che contiene il 100% di insulina umana (43 µg di questo materiale corrisponde a 1 UI).
- Anticorpi sviluppati contro l'insulina hanno una certa *cross*-reattività con la pro-insulina (ma non con il peptide-C). Anche se l'interferenza è poco rilevante nei soggetti sani (che hanno bassi livelli di pro-insulina), l'interferenza diventa rilevante nei pazienti con insulinoma e con diabete (che hanno un'elevata concentrazione di pro-insulina), portando ad una sovrastima della concentrazione di insulina. Poichè l'attività biologica della pro-insulina è molto bassa, il paziente può quindi essere classificato erroneamente.
- L'ADA non ritiene, al momento, raggiungibile la standardizzazione dei laboratori e ha raccomandato di promuovere la confrontabilità delle prestazioni analitiche dei metodi e dei laboratori.

Insulina

Tabella 15.e.1.

Metodologia adottata	RIA, IRMA, Chemiluminescenza.
Campione richiesto	Provetta da siero (tappo rosso) senza gel e con gel, 6 mL.
Volume minimo	500 µL.
Stabilità del campione	Il siero è stabile a temperatura ambiente per 24 ore, a 2-8 °C per una settimana, a - 20 °C per 3 mesi.
Intervallo di riferimento	2-25 mU/L. < 9 mU/L (metodi ad elevata specificità). < 200 mU/L (dopo OGTT).

Pro-insulina

La determinazione della pro-insulina risulta difficile per la bassa concentrazione della molecola e per la difficoltà della produzione di anticorpi che non *cross*-reagiscano con l'insulina ed il peptide-C, presenti in concentrazioni molto più alte (la pro-insulina *cross*-reagisce con gli anticorpi anti-insulina per una percentuale che può superare il 25%). I dati disponibili sono scarsi, per la difficoltà del reperimento di preparazioni pure di pro-insulina da usare per la calibrazione del dosaggio e perché i metodi disponibili misurano anche delle forme intermedie di clivaggio della pro-insulina. Solo recentemente è stata prodotta una molecola sintetica di pro-insulina che ha consentito di produrre anticorpi monoclonali e calibratori affidabili.

Tabella 15.e.2.

Metodologia adottata	RIA, IRMA.
Campione richiesto	Provetta da siero (tappo rosso) senza gel, 6 mL.
Volume minimo	500 µL.
Stabilità del campione	Il siero è stabile a - 70 °C per 3 mesi.
Intervallo di riferimento	1.1-6.9 pmol/L.

Peptide-C

Il peptide-C subisce un metabolismo epatico molto modesto e la sua determinazione non è influenzata dalla presenza di anticorpi anti-insulina. I metodi di dosaggio sono, tuttavia, caratterizzati da una specificità diversa degli anticorpi usati, da una *cross*-reazione variabile con la pro-insulina e dal tipo di calibratore impiegato. Inizialmente è stato utilizzato il calibratore IRR 84/510 e successivamente il 76/561.

Tabella 15.e.3.

Metodologia adottata	RIA, IRMA, Chemiluminescenza.
Campione richiesto	Provetta da siero (tappo rosso) senza gel, 6 mL.
Volume minimo	500 µL.
Stabilità del campione	Il siero NON è stabile a - 20 °C (diminuisce del 28% in 4 settimane); stabilità a - 70 °C non valutata.
Intervallo di riferimento	0.25-0.6 nmol/L. 0.9-1.9 nmol/L (dopo stimolo con glucosio o glucagone). 3-5 volte il valore pre-stimolo (dopo stimolo con glucosio o glucagone).

Bibliografia

- Clark PM. Assays for insulin, proinsulin(s) and C-peptide. *Ann Clin Biochem* 1999, 36: 541–64.
- Temple R, Clark PMS, Hales CN. Measurement of insulin secretion in type 2 diabetes: problems and pitfalls. *Diabet Med* 1992, 9: 503–12.
- Robbins DC, Andersen L, Bowshe R, et al. Report of the American Diabetes Association's Task Force on standardization of the insulin assay. *Diabetes* 1996, 45: 242–56.
- Marcovina S, Bowshe RR, Miller G, et al. Standardization of insulin immunoassays: report of the American Diabetes Association's Workgroup. *Clin Chem* 2007, 53: 711–6.
- Manley SE, Stratton IM, Clark PM, Luzio SD. Comparison of 11 human insulin assays: implications for clinical investigation and research. *Clin Chem* 2007, 53: 922–32.
- Sapin R. Insulin Immunoassays: Fast Approaching 50 Years of Existence and Still Calling for Standardization. *Clin Chem* 2007, 53: 810-1.

15.f. Ormoni controregolatori

(per informazioni sulla fisiopatologia, cfr capitolo 4.b. a pag. 67)

Glucagone

Sono disponibili alcuni metodi RIA che impiegano una separazione basata su PEG e doppio anticorpo e un calibratore WHO IS 69/194. In presenza di un adenoma ad α -cellule, si può misurare una concentrazione che supera il limite superiore dell'intervallo di riferimento anche di 500 volte.

Tabella 15.f.1.

Metodologia adottata	RIA.
Campione richiesto	Provetta da siero (tappo rosso) senza gel, 6 mL.
Volume minimo	500 μ L.
Stabilità del campione	Il siero è stabile a 2-8 °C per 24 ore, a - 20 °C per 3 mesi.
Intervallo di riferimento	20-52 pmol/L.

Adrenalina e Noradrenalina

La tecnica più usata per la determinazione delle catecolamine urinarie e plasmatiche è l'HPLC con rivelazione elettrochimica e fluorimetrica. La tecnica richiede personale addestrato, ma consente risultati riproducibili e rapidi con costi limitati.

Tabella 15.f.2.

Metodologia adottata	HPLC.	
Campione richiesto	Urine acidificate con HCl. Plasma EDTA (tappo viola).	
Volume minimo	1 mL.	
Stabilità del campione	Il plasma deve essere conservato a 2-8 °C fino al momento del congelamento a - 80 °C (a questa temperatura conservazione a lungo termine). Le urine si conservano a lungo a - 80 °C.	
Intervallo di riferimento	Plasma	
	Adrenalina	Noradrenalina
	Supino (30 min): 110-410 ng/L Seduto (15 min): 120-680 ng/L	Supino (30 min): < 50 ng/L Seduto (15 min): < 60 ng/L

	Urine	
	Adrenalina	Noradrenalina
Intervallo di riferimento	0-1 anni: < 2.5 µg/d 1-2 anni: < 3.5 µg/d 2-4 anni: < 6.0 µg/d 4-10 anni: 0.2-10 µg/d > 10 anni: 0.5-20 µg/d	0-1 anni: < 10 µg/d 1-2 anni: 1-17 µg/d 2-4 anni: 4-29 µg/d 4-7 anni: 8-45 µg/d 7-10 anni: 13-65 µg/d > 10 anni: 15-80 µg/d

Cortisolemia/Cortisoloria

I metodi immunometrici diretti (senza estrazione) hanno oggi sostanzialmente sostituito i metodi con estrazione immunometrici e cromatografici, con l'eccezione dei metodi per l'urina e la saliva. Sono stati messi a punto numerosi metodi cromatografici (gas-cromatografia, HPLC e GC-HPLC/MS) e di elettroforesi capillare. Tutti questi metodi posseggono un'eccellente specificità rispetto agli altri steroidi e ai metaboliti di questi, ma sono gravati da limiti importanti per i laboratori clinici: la scarsa produttività e la necessità di personale esperto che vi si dedichi con impegno. La gran parte di queste metodiche richiede, infatti, fasi pre-analitiche di estrazione in fase solida ed in fase liquida.

Metodiche immunometriche sono oggi disponibili su numerosi analizzatori automatici. La maggior parte dei metodi immunometrici è "diretta" e non richiede una fase di estrazione degli steroidi dal campione. L'elevata specificità degli anticorpi, l'elevata sensibilità consentita dai traccianti chemiluminescenti e la maggiore precisione rispetto ai metodi "estrattivi" consentono un'affidabile determinazione del cortisolo totale nel sangue.

I metodi per la determinazione del cortisolo libero nel sangue risultano invece assai impegnativi dal punto di vista tecnico e non sono utilizzati nella pratica clinica. Maggiore diffusione hanno invece i metodi per la determinazione della concentrazione del cortisolo libero urinario. La maggior parte dei metodi per la determinazione del cortisolo sierico totale possono essere utilizzati per misurare il cortisolo libero urinario dopo estrazione. L'estrazione è di solito necessaria, perché le urine contengono numerosi metaboliti e coniugati del cortisolo, che danno reazioni crociate con l'anticorpo impiegato nel dosaggio. La procedura di estrazione richiede mani esperte e la sua efficienza e precisione vanno attentamente monitorate. I metodi immunometrici diretti per il cortisolo libero urinario richiedono degli anticorpi molto specifici e danno in genere valori più alti rispetto a quelli estrattivi. Anche se gli anticorpi impiegati dai metodi immunometrici hanno una bassa reattività crociata con gli steroidi endogeni, questa è rilevante (20-30%) verso steroidi sintetici, come il prednisolone ed il 6-metil-prednisolone. La determinazione del CLU fornisce una misura integrata della secrezione di cortisolo, anche se ha lo svantaggio di richiedere una raccolta accurata (a tale proposito si può ricorrere alla raccolta delle urine per tre giorni o riportare la concentrazione di cortisolo a quella della creatinina, la cui escrezione rimane invece costante, quando il filtrato glomerulare è superiore a 30 mL/min). Inoltre, mentre la determinazione delle concentrazioni elevate risente di limiti di specificità dei metodi, le basse concentrazioni risentono dei problemi di bassa sensibilità.

I valori di cortisolemia nel corso della giornata vanno valutati nell'ambito del contesto clinico e non esistono più *cut-off* sicuri per la diagnosi di iper o ipocortisolismo.

Tabella 15.f.3. Cortisolemia

Metodologia adottata	RIA, IRMA, Chemiluminescenza.	
Campione richiesto	Provetta da siero (tappo rosso) senza gel, 6 mL.	
Volume minimo	500 µL.	
Stabilità del campione	Il siero è stabile a temperatura ambiente per una settimana, a 2-8 °C per una settimana, a - 20 °C per 3 mesi.	
Intervallo di riferimento	Ora	ARUP (Chemiluminescenza)
	8.00 20.00	6-23 µg/dL < 9 µg/dL
	Ora	Thomas L
	8.00 24.00	5-25 µg/dL < 5 µg/dL
	Ora	Tietz
	8.00 16.00 20.00	5-23 µg/dL 3-16 µg/dL Concentrazione < 50% di quella delle ore 8.00
	Ora	Massachusetts General Hospital
	8.00-12.00 12.00-20.00 20.00-8.00	5-25 µg/dL 5-15 µg/dL < 10 µg/dL
	Ora	Laboratorio, OCM Azienda Ospedaliera di Verona (Immulite 2000)
	mattino sera	120-620 nmol/L 85-460 nmol/L

Tabella 1.5.f.4. Cortisoluria

Metodologia adottata	HPLC, Spettrometria di massa, RIA, IRMA, Chemiluminescenza.	
Campione richiesto	Raccolta delle urine delle 24 ore; non aggiungere acido o conservanti; è possibile raccogliere un'aliquota di 10 mL dopo avere mescolato le urine accuratamente ed avere misurato accuratamente il volume.	
Volume minimo	1 mL.	
Stabilità del campione	Le urine sono stabili a temperatura ambiente per 2 giorni, a 2-8 °C per 1 settimana, a - 20 °C per 1 mese.	
Intervallo di riferimento	Età	ARUP (Chemiluminescenza)
	3-8 anni 9-12 anni 13-17 anni > 18 anni (F) > 18 anni (M)	< 18 µg/die < 37 µg/die < 56 µg/die < 45 µg/die < 60 µg/die
	Età	Thomas L (Metodo immunometrico con estrazione)
	1-10 anni 11-20 anni > 20 anni	2-27 µg/die 5-55 µg/die 20-90 µg/die

Intervallo di riferimento	Età	Tietz
	1-10 anni	2-27 µg/die (metodo immunometrico con estrazione)
	11-20 anni	5-55 µg/die (metodo immunometrico con estrazione)
	> 20 anni	20-90 µg/die (met. immunometrico con estrazione)
	2-11 anni	1-21 µg/die (HPLC)
	12-16 anni	2-38 µg/die (HPLC)
	> 16 anni	75-270 µg/die (met. immunometr. senza estrazione)
Massachusetts General Hospital		
Metodo immunometrico con estrazione: 20-70 µg/die		
Laboratorio, OCM Azienda Ospedaliera di Verona (Immulite 2000)		
150-1100 nmol/die (metodo immunometrico senza estrazione)		

GH

Nella pratica dei laboratori clinici il GH è misurato con metodi immunometrici: radioimmunologici, immuno-radiometrici, immuno-enzimatici ed in chemiluminescenza.

I metodi radioimmunologici classici (RIA) sono basati su una molecola di GH a cui è legato un tracciante radioattivo, su un anticorpo in concentrazione limitata e su un secondo anticorpo diretto verso il primo anticorpo che porta alla produzione di un precipitato. Gli anticorpi anti-GH possono essere policlonali, che danno risultati comparabili tra di loro, e monoclonali, che forniscono risultati più bassi, meno comparabili tra i diversi *kit*, con la capacità di rilevare concentrazioni basse in modo più affidabile. I metodi immuno-radiometrici (IRMA), in cui il tracciante è legato all'anticorpo, sono oggi poco usati se non in qualche variante immuno-enzimatica. Attualmente sono più utilizzati i metodi a doppio anticorpo monoclonale a *sandwich*, che impiegano traccianti enzimatici, fluorescenti e chemiluminescenti, e possono arrivare a sensibilità (cioè alla minima concentrazione distinguibile da zero) di 0.0001 µg/L. Le differenze dei risultati ottenuti con i diversi metodi dipendono da fattori diversi.

- Proteine leganti: i diversi metodi valutano quantitativamente in misura diversa il GH libero, il GH legato alla GH-binding protein ed il GH totale.
- Isoforme: in circolo sono presenti numerose isoforme, che comprendono monomeri ed oligomeri come il "big" GH ed il "big-big" GH, che *cross*-reagiscono in modo molto diverso con i vari metodi. In genere il 75% del GH in circolo è costituito da una proteina monomericamente di 22 kDa, il 10% da una proteina di 20 kDa. È stato dimostrato che il grado con cui il metodo riconosce l'isoforma 20 K è correlato con l'inaccuratezza ed è stato suggerito che tutti i metodi debbano misurare esclusivamente l'isoforma 22 K.
- Problemi di standardizzazione: i metodi di determinazione per il GH sono calibrati con materiali di riferimento che sono aggiornati periodicamente. Dal 2001 è disponibile il Secondo Standard Internazionale (IS) 98/574, allestito con tecnologia ricombinante, con un grado di purezza superiore al 95%, che ha sostituito gli *standard* estrattivi, precedentemente usati, che contenevano miscele di isoforme. L'adozione dello *standard* 2nd IS 98/574 consente di adottare un fattore di conversione fisso (3 IU/mg) tra unità e microgrammi.

Il *Groupe de travail* su "Evaluation des dosages des paramètres de l'axe somatotrope" della *Société Française de Biologie Clinique* (uno dei più attivi a livello internazionale) ha recentemente raccomandato l'adozione del siero come campione da utilizzare, dello *standard* 98/574, del calibratore 22 K, delle mIU/L come unità di misura. Il mondo anglo-sassone ha invece raggiunto il consenso tra Società scientifiche cliniche e di laboratorio (*Association for Clinical Biochemistry, British In vitro Diagnostics Association, National Institute for Biological Standards and*

Control, Royal College of Pathologists, Society for Endocrinology, UK National External Quality Assessment Service) ed industria (Beckman Coulter Inc, BioSource Europe SA, Invitrogen Endocrinology Assays, Invitrogen Corporation, Perkin Elmer Life and Analytical Sciences/Wallac Oy, TOSOH Bioscience Inc) di adottare, a partire dal gennaio 2007, l'unità di misura in massa ($\mu\text{g/L}$).

Il singolo valore di concentrazione di GH fornisce scarse informazioni per quanto riguarda la valutazione degli stati patologici di alterata secrezione di questo ormone, in quanto l'ipofisi produce il GH in modo pulsatile e le concentrazioni dell'ormone sono praticamente indosabili per la maggior parte della giornata, e intervallate da picchi secretori nelle 24 ore. Per valutare la presenza di secrezione anomala di GH si deve pertanto ricorrere a valutazioni dinamiche, diverse negli stati di iper- o iposecrezione.

Tabella 15f.5

Metodologia adottata	RIA, IRMA, Chemiluminescenza.		
Campione richiesto	Provetta da siero (tappo rosso) senza gel, 6 mL.		
Volume minimo	500 μL .		
Stabilità del campione	Il siero è stabile a temperatura ambiente per 3 giorni, a 2-8 °C per una settimana, a -20 °C per 2 mesi.		
Intervallo di riferimento	Massachusetts General Hospital		
	0.5-17 $\mu\text{g/L}$		
	Thomas L		
	< 4 $\mu\text{g/L}$		
	Tietz		
	< 2.5 $\mu\text{g/L}$		
	ARUP (Chemiluminescenza)		
	Età	Femmina	Maschio
	0-6 anni	0.1-8.8 $\mu\text{g/L}$	0.1-8.8 $\mu\text{g/L}$
	7-17 anni	0.06-23.8 $\mu\text{g/L}$	0.03-14.9 $\mu\text{g/L}$
	> 18 anni	0.03-10 $\mu\text{g/L}$	0.01-1 $\mu\text{g/L}$
	Laboratorio, OCM Azienda Ospedaliera di Verona (Immulate 2000)		
	Età	Femmina	Maschio
< 15 anni	< 8.7 $\mu\text{g/L}$	< 8.7 $\mu\text{g/L}$	
> 15 anni	< 10 $\mu\text{g/L}$	< 1 $\mu\text{g/L}$	

IGF-I

Le IGF possono essere misurate con numerosi metodi: *bio-assay* (in cui la bioattività di IGF-I e IGF-II è misurata con condrociti di coniglio, cartilagine di pollo o porcina), radiorecettoriali ed immunometrici. Poiché le IGF-BP mascherano gli epitopi dell'IGF-I o competono con questi, i dosaggi immunometrici devono essere preceduti dalla rimozione delle IGF-BP. Il

metodo di riferimento è quello che si basa sulla denaturazione dell'ALS e separazione cromatografica dell'IGF-I. I metodi più usati sono quelli RIA e quelli basati su traccianti chemiluminescenti che assicurano una reazione crociata minima (< 3%) con l'IGF-II.

I valori di riferimento dell'IGF-I sono dipendenti dall'età e dal sesso (nel corso dell'infanzia sono in genere più alti nella femmina), anche se la concentrazione deve essere misurata con cautela nei primi tre anni di vita, per la scarsa sensibilità dei metodi attualmente disponibili.

Tabella 15.f.6.

Metodologia adottata	RIA, IRMA, Chemiluminescenza.		
Campione richiesto	Provetta da siero (tappo rosso) senza gel, 6 mL.		
Volume minimo	500 µL.		
Stabilità del campione	Il siero è stabile a temperatura ambiente per 3 giorni, a 2-8 °C per una settimana, a - 20 °C per 2 mesi.		
Intervallo di riferimento			
Massachusetts General Hospital	16-24 anni	182-780 µg/L	
	25-39 anni	114-492 µg/L	
	40-54 anni	90-360 µg/L	
	> 54 anni	71-290 µg/L	
Thomas L	6-8 anni	50-250 µg/L	
	11-16 anni	180-800 µg/L	
	21-30 anni	165-434 µg/L	
	31-40 anni	155-329 µg/L	
	41-50 anni	115-286 µg/L	
	51-60 anni	100-285 µg/L	
Tietz	61-72 anni	69-262 µg/L	
	anni	F	M
	1-2	31-160 µg/L	11-206 µg/L
	3-6	16-288 µg/L	70-316 µg/L
	7-10	136-385 µg/L	123-396 µg/L
	11-12	136-440 µg/L	191-462 µg/L
	13-14	165-616 µg/L	286-660 µg/L
	15-18	134-836 µg/L	152-660 µg/L
	19-25	202-433 µg/L	231-550 µg/L
26-85	135-449 µg/L		

Bibliografia

Trainer PJ, Barth J, Sturgeon C, Wieringaon G. Consensus statement on the standardisation of GH assays. Eur J Endocrinol 2006, 155: 1-2.

15.g. Anticorpi

Valerio Chiarini e Alessandra Sforza

Generalità

(per informazioni sulla fisiopatologia, cfr capitolo 5 a pag. 73)

Dopo il primo *Workshop* per la standardizzazione degli Anticorpi anti-cellule insulari (ICA) del 1985, la *Immunology of Diabetes Society* ha sviluppato il *Diabetes Autoantibody Standardization Program* (DASP), finalizzato a definire le soglie di sensibilità e specificità e a standardizzare i reagenti, i controlli e le unità dei test di dosaggio degli autoanticorpi anti-insulari biochimici.

Dal 2000 il DASP organizza la distribuzione ai laboratori che ne facciano richiesta di aliquote di sieri di pazienti con nuova diagnosi di diabete e di controlli non diabetici da sottoporre alla ricerca di GADA, IA-2A e IAA.

In generale:

- il test più sensibile è la determinazione degli ICA mediante immuno-fluorescenza indiretta, ma è scarsamente riproducibile, soprattutto nei sieri con positività *border-line*;
- i metodi radioimmunologici (RIA) per GADA₆₅ e IA-2A hanno alta sensibilità e specificità (GADA₆₅ > IA2A);
- i metodi immuno-enzimatici (ELISA) per GADA₆₅ e IA-2A sono meno *performanti* e hanno un minor valore predittivo rispetto ai RIA, verosimilmente a causa di un assorbimento del GAD₆₅ o IA-2 sulla plastica, che può distruggere epitopi necessari per il legame dell'Ab all'antigene;
- la sensibilità dei test può essere aumentata, testando contemporaneamente GADA₆₅ e IA-2A;
- i test per IAA (RIA), anche con le più recenti tecniche di *micro-radioimmuno-assay*, hanno ancora una bassa sensibilità e la loro standardizzazione continua ad essere difficoltosa;
- per i GADA e gli IA-2A i risultati devono essere espressi in unità WHO/mL, utilizzando lo *standard* WHO non diluito che corrisponde a 250 U/mL (raccomandazione della *Immunology of Diabetes Society*);
- la componente dominante degli autoanticorpi insulari è la sottoclasse IgG₁. I test comunemente utilizzati per l'immuno-precipitazione impiegano Proteina A *Sepharose* che, mentre si lega efficacemente alla maggioranza delle IgG umane, lega scarsamente IgA, IgM e sottotipo IgG₃, che risultano pertanto scarsamente rappresentate nei correnti metodi di determinazione.

Tabella 15.g.1.
Sensibilità e specificità mediane degli autoanticorpi insulari

Test	Sensibilità (%)	Specificità (%)
ICA (immuno-fluorescenza indiretta)	81 (44-100)	96 (64-100)
GADA (RIA)	80	90
IA-2A (RIA)	57	99
IAA (RIA)	14	100
MIAA (micro-assay – RIA)	32	100
Combinazione di test (GADA65, IA-2A, MIAA)	80	100

Raccomandazione (livello di evidenza E)

- Gli anticorpi anti-insulari devono essere misurati solo in un laboratorio accreditato in cui sia attivo un programma di controllo della qualità e che partecipi ad un programma di verifica esterna della qualità

Al fine di ridurre i falsi negativi e i falsi positivi, Atkinson e Eisenbarth hanno suggerito un approccio razionale al dosaggio degli autoanticorpi nel diabete:

- nello *screening* utilizzare test di dosaggio degli autoanticorpi biochimici con una buona sensibilità e una specificità > 99%;
- il dosaggio degli ICA non va utilizzato nello *screening*, ma solo qualora sia necessaria una conferma;
- misurare molteplici autoanticorpi biochimici;
- effettuare dosaggi sequenziali nel tempo;
- verificare la partecipazione del laboratorio a programmi di verifica esterna della qualità (VEQ).

Anticorpi anti-GAD (GADA)

(per informazioni sulla fisiopatologia, cfr capitolo 5 a pag. 78)

Caratteristiche del dosaggio

- RIA a doppio tracciante, che utilizzano la molecola intatta di GAD65 umano ricombinante, radiomarcato con ³⁵S-metionina. Utilizzano piccoli volumi di siero (2-20 mL).
- ELISA, che utilizzano la molecola intatta di GAD65 umano ricombinante. Hanno il vantaggio di essere semplici, facili da automatizzare e di non utilizzare materiale radioattivo, ma lo svantaggio di richiedere maggiori volumi di siero (30-50 mL).
- Valore soglia di positività: > 99° centile del limite superiore normale ottenuto dalle curve ROC dei soggetti sani di controllo. In base allo *standard* WHO, il limite mediano di rilevabilità è 1:16 (16 U/mL).
- Sensibilità: RIA = 80%, ELISA = 76%.
- Specificità: RIA = 90%, ELISA = 90%.

I metodi radiomarcanti hanno ancora una sensibilità e specificità superiori a quelli immunoenzimatici.

Anticorpi anti-insulina (IAA)

(per informazioni sulla fisiopatologia, cfr capitolo 5 a pag. 78)

Caratteristiche del dosaggio

- Metodi RIA competitivi che utilizzano insulina umana ricombinante radiomarcata con ^{125}I , calcolando la percentuale di legame dell'insulina al radioligando spiazzabile dopo l'aggiunta di un eccesso di insulina non marcata.
- La precipitazione dei complessi immuni è in glicole di polietilene nei test *standard* che utilizzano volumi di siero di 100-600 mL, e in proteina A *Sepharose* o proteina A/Proteina G *Sepharose* nei *micro-assay* (MIAA) che utilizzano 10-30 mL di siero.
- Valore soglia di positività: > 99° centile del limite superiore normale ottenuto dalle curve ROC in soggetti sani di controllo.
- Sensibilità (mediana): IAA = 14%; MIAA = 31%.
- Specificità (mediana): IAA = 32%; MIAA = 100%.

Problematiche analitiche:

- ampia variabilità e scarsa concordanza fra i laboratori;
- bassa sensibilità nei test *standard*;
- sensibilità migliore nei *micro-assay*;
- interferenza con lo sviluppo di anticorpi anti-insulina dopo inizio della terapia insulinica (anche con insulina umana).

Anticorpi IA-2

(per informazioni sulla fisiopatologia, cfr capitolo 5 a pag. 80)

Caratteristiche del dosaggio

- RIA a doppio tracciante, che utilizzano la molecola intatta (aa 1-979) o frammenti a catena intra-cellulare corta o lunga dell'IA-2 umano ricombinante radiomarcato con ^{35}S -metionina o ^{125}I .
- ELISA, che utilizzano la porzione intra-cellulare dell'IA-2 umano ricombinante.
- Valore soglia di positività: > 99° centile del limite superiore normale ottenuto dalle curve ROC dei soggetti sani di controllo. In base allo *standard* WHO il limite mediano di rilevabilità è 1:64 (64 U/mL).
- Sensibilità: RIA = 57%, ELISA = 53%.
- Specificità: RIA = 99 %, ELISA = 90%.

Problematiche analitiche:

- i metodi radiomarcati hanno una sensibilità e specificità superiori a quelli immuno-enzimatici;
- i metodi che utilizzano la molecola intatta e la porzione intra-cellulare corta dell'IA-2 hanno una sensibilità e specificità superiori a quelli che impiegano la porzione intra-cellulare lunga dell'IA-2.

ICA (Islet cell antibodies)

Caratteristiche del dosaggio

- Immuno-fluorescenza indiretta su sezioni congelate di coda di pancreas umano.
- Unità di misura: unità della *Juvenile Diabetes Foundation* (unità JDF) sulla base di un sie-

ro *standard* di riferimento distribuito a livello internazionale dalla WHO *Expert Committee on Biological Standards*.

- Valore soglia di positività: 10 unità JDF misurate in due occasioni separate o un singolo risultato > 20 JDF.
- sensibilità (DASP): 44-100% (mediana 81%).
- specificità (DASP): 64-100% (mediana 96%).

Problematiche analitiche:

- problemi di standardizzazione;
- scarsa riproducibilità con i sieri a positività *borderline*.

Anticorpi verso la proteina di fusione GAD65/IA-2ic

- Dosaggio RIA
- Sensibilità: 88%.
- Specificità: 100%.

Bibliografia

Bingley PJ et al. Diabetes Antibody Standardization Program: First Assay Proficiency Evaluation. Diabetes 2003, 52: 1128-36.

Sacks DB et al. Guidelines and recommendations for Laboratory Analysis in the Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. Clin Chem 2002, 48: 436-72.

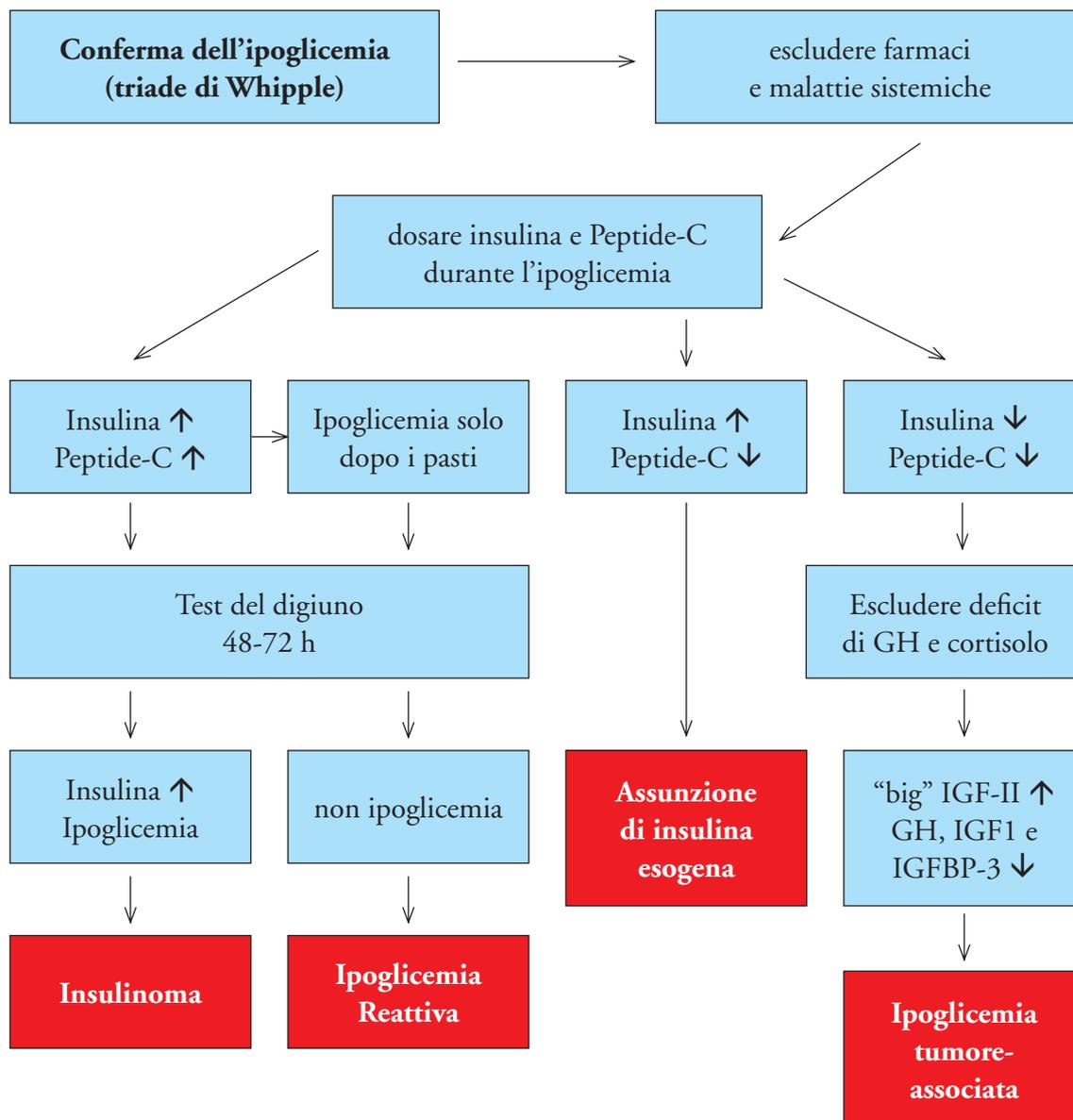
16. *Flow-charts* diagnostiche

Rinaldo Guglielmi

16.a. Ipoglicemie

(per classificazione, *cf* capitolo 1.b. a pag. 17)

(per quadri clinici, *cf* capitolo 2.b. a pag. 37)



17. Formule di uso frequente

Francesco Tassone

Legenda generale

* indica il segno di moltiplicazione

^ indica l'elevazione a potenza

/ indica il segno di divisione

1 mL = 20 gocce

Tabella 17.1.
Anion Gap

Cos'è	È la differenza fra la somma dei cationi (sodio, potassio, calcio, ecc.) e degli anioni (soprattutto cloro, bicarbonato e fosforo).
A cosa serve	Ad avere un'idea del livello di ioni idrogeno e quindi dell'acidosi.
Parametri necessari per il calcolo	Sodiemia in mEq/L. Cloremia in mM/L. Bicarbonatemia in mM/L.
Come calcolarlo	$AG = Na^+ - (Cl^- + HCO_3^-)$
Come calcolarlo con Excel	1. Scrivi Na nella casella A1; 2. Scrivi Cl nella casella B1; 3. Scrivi HCO ₃ nella casella C1; 4. scrivi in D1: =A1-(B1+C1) e, dopo aver schiacciato il tasto <i>enter</i> , il risultato comparirà automaticamente. Esempio: Na 135, Cl 99, HCO ₃ 23, AG = 13 mmol/L .
Parametri di riferimento	Normale: 10 - 12 mmol/L.

Tabella 17.2.
BMI (Body Mass Index)

Cos'è	L'indice di massa corporea sintetizza in un solo numero peso e altezza.
A cosa serve	Migliore correlazione (superiore al peso) con morbilità e mortalità.
Parametri necessari per il calcolo	Peso (espresso in kg). Altezza (espressa in metri: esempio 1.80).
Come calcolarlo	$Peso / (altezza * altezza)$.
Come calcolarlo con Excel	1. Scrivi il peso nella casella A1; 2. Scrivi l'altezza nella casella B1; 3. scrivi in C1: =A1/(B1^2) e, dopo aver schiacciato il tasto <i>enter</i> , il risultato comparirà automaticamente; 4. (se l'altezza è espressa in cm, scrivi in C1 =A1/((B1/100)^2)). Esempio: kg 77, m 1.81, BMI = 23.5 kg/m² .
Parametri di riferimento	Normale: 18.5 ÷ 25. Sovrappeso: 25 ÷ 30. Obeso: 30 ÷ 35. Gravemente obeso: > 35. Sottopeso: 17 ÷ 18.5. Gravemente sottopeso: < 17.

Tabella 17.3.
Formula di Broca per peso ideale

A cosa serve	Calcolare il peso ideale.
Parametri necessari per il calcolo	Altezza in cm.
Come calcolarla	Peso (in kg) = altezza – 100 nel maschio oppure altezza – 110 nella femmina
Come calcolarla con Excel	1. Scrivi altezza nella casella A1; 2. Scrivi nella casella B1 =A1-100 per il maschio, oppure =A1-110 per la femmina e, dopo aver schiacciato il tasto <i>enter</i> , il risultato comparirà automaticamente. Esempio: maschio di cm 175 = 75 kg ; femmina di cm 163 = 53 kg.

Tabella 17.4.
Calcemia corretta

A cosa serve	Ad eliminare l'influenza dell'albumina dalla valutazione dei livelli di calcemia.
Parametri necessari per il calcolo	Calcemia totale in mg/dL. Albuminemia in g/dL.
Come calcolarla	Calcemia corretta = calcemia totale + 0.8*(4-albuminemia)
Come calcolarla con Excel	1. Scrivi calcemia totale nella casella A1; 2. Scrivi albuminemia nella casella B1; 3. scrivi in C1: =A1+0.8*(4-B1) e, dopo aver schiacciato il tasto <i>enter</i> , il risultato comparirà automaticamente. Esempio: Ca 9.8, albumina 3.5, Ca corretta = 10.2 mg/dL .

Tabella 17.5.
Equazione di Cockcroft – Gault

Cos'è	Consente di stimare la <i>clearance</i> della creatininemia, tenendo conto del fatto che la produzione di creatinina aumenta con l'incremento della massa muscolare e si riduce con l'età.
Parametri necessari per il calcolo	Creatininemia in mg/dL. Sesso ed età. Peso in kg.
Come calcolarlo	$Clearance = ((140 - età) * peso) / (creatininemia * \text{fattore di correzione sesso})$. Il fattore di correzione per il sesso è 72 per il maschio e 85 per la femmina.
Come calcolarlo con Excel	1. Scrivi età nella casella A1; 2. scrivi peso nella casella B1; 3. scrivi creatininemia nella casella C1; 4. scrivi in D1: =((140-A1)*B1)/(C1*72) nei maschi e =((140-A1)*B1)/(C1*85) nelle femmine e, dopo aver schiacciato il tasto <i>enter</i> , il risultato comparirà automaticamente. Esempio: età 38, peso 65, creatininemia 0.8, <i>clearance</i> della creatinina = 115 mL/min nel maschio e 98 mL/min nella femmina .

Tabella 17.6.
Formula per calcolare deficit idrico

A cosa serve	Per calcolare il deficit idrico nelle situazioni di disidratazione.
Parametri necessari per il calcolo	Sodiemia in mEq/L. Peso in kg.
Come calcolarla	deficit idrico = [(sodiemia-140)/140]*(peso*0.4) (nelle femmine) oppure = [(sodiemia-140)/140]*(peso*0.5) (nei maschi).
Come calcolarla con Excel	<ol style="list-style-type: none"> 1. Scrivi sodiemia nella casella A1; 2. Scrivi peso nella casella B1; 3. scrivi in C1: $=((A1-140/140))*(B1*0.4)$ nella femmina, oppure $=((A1-140/140))*(B1*0.5)$ nel maschio e, dopo aver schiacciato il tasto <i>enter</i>, il risultato comparirà automaticamente. <p>Esempio: Na 155, kg 65, deficit = 2.78 litri nella femmina e 3.48 litri nel maschio.</p>

Tabella 17.7.
Formula di Friedewald

A cosa serve	Per calcolare LDL-colesterolo.
Parametri necessari per il calcolo	Colesterolemia totale in mg/dL. Colesterolemia HDL in mg/dL. Trigliceridemia in mg/dL (formula non applicabile per valori di trigliceridemia > 400 mg/dL).
Come calcolarla	LDL = colesterolemia totale – (HDL + (trigliceridemia/5)).
Come calcolarla con Excel	<ol style="list-style-type: none"> 1. Scrivi colesterolo totale nella casella A1; 2. Scrivi colesterolo HDL nella casella B1; 3. Scrivi trigliceridi nella casella C1; 4. scrivi in D1: $=A1-(B1+(C1/5))$ e, dopo aver schiacciato il tasto <i>enter</i>, il risultato comparirà automaticamente. <p>Esempio: colesterolo 220, HDL 45, trigliceridi 158, LDL = 143.4 mg/dL.</p>

Tabella 17.8.
Formula di Harris e Benedict

A cosa serve	Per stimare il fabbisogno energetico a riposo (REE = <i>Resting Energy Expenditure</i>) in kcal/die.
Parametri necessari per il calcolo	Peso in kg. Altezza in cm. Età in anni.
Come calcolarla	REE (maschi) = $66.473+(13.751*\text{peso})+(5.0033*\text{altezza})-(6.7550*\text{età})$ REE (femmine) = $655.0955 + (9.4634*\text{peso}) + (1.8496*\text{altezza}) - (4.6756*\text{età})$
Come calcolarla con Excel	<ol style="list-style-type: none"> 1. Scrivi peso nella casella A1; 2. Scrivi altezza nella casella B1; 3. Scrivi età nella casella C1; 4. scrivi in D1: $=66.473+(13.751*A1)+(5.0033*B1)-(6.755*C1)$ per i maschi oppure $=655.0955+(9.4634*D13)+(1.8496*E13)-(4.6756*F13)$ per le femmine e, dopo aver schiacciato il tasto <i>enter</i>, il risultato comparirà automaticamente. <p>Esempio: maschio kg 84, cm 188, età 50 = 1824 kcal/die; femmina kg 52, cm 158, età 48 = 1215 kcal/die.</p>

Tabella 17.9.
Formula per calcolare Osmolarità

Cos'è	È un metodo per calcolare l'osmolarità senza misurarla direttamente, partendo da parametri facilmente disponibili.
Parametri necessari per il calcolo	Sodiemia (in mM/L = mEq/L). Azotemia (in mM/L o mg/dL). Glicemia (in mM/L o mg/dL).
Come calcolarla	$(\text{Sodiemia} \times 1.86) + \text{glicemia} + \text{azotemia} + 9$.
Come calcolarla con Excel	<ol style="list-style-type: none"> 1. Scrivi la sodiemia nella casella A1; 2. scrivi l'azotemia nella casella B1; 3. scrivi la glicemia nella casella C1; 4. scrivi in D1 $=((1.86 \times A1) + B1 + C1 + 9)$ e, dopo aver schiacciato il tasto <i>enter</i>, comparirà automaticamente il risultato; 5. se azotemia e glicemia sono in mg/dL, scrivi in D1 $=((1.86 \times A1) + (B1 / 2.8) + (C1 / 18) + 9)$ e, dopo aver schiacciato il tasto <i>enter</i>, comparirà automaticamente il risultato. <p>Esempio: sodiemia 140 mEq/L, azotemia 30 mg/dL, glicemia 92 mg/dL, osmolarità calcolata = 285 mOsm/kg.</p>
Parametri di riferimento	280-295 mOsm/kg.

Tabella 17.10.
Formula di Vermeulen

A cosa serve	Per stimare testosterone libero.
Parametri necessari per il calcolo	Testosterone totale in ng/dL. SHBG in nM/L.
Come calcolarla	$FT = ([\text{Testosterone}] - (N \times [\text{Testosterone}])) / (Kt\{\text{SHBG} - [\text{Testosterone}] + N[\text{Testosterone}]\})$ <p>Kt è la costante di associazione dell'SHBG per il Testosterone. N è una costante pari a 23.4.</p>
Come calcolarla on-line	all'indirizzo: www.issam.ch/freetesto.htm

Tabella 17.11.
Indice HOMA-IR

A cosa serve	Per calcolare insulino-resistenza.
Parametri necessari per il calcolo	Glicemia in mg/dL. Insulinemia in $\mu\text{U/mL}$.
Come calcolarlo	$\text{HOMA-IR} = [(\text{glicemia}/18) \times \text{insulinemia}] / 22.5$.
Come calcolarla con Excel	<ol style="list-style-type: none"> 1. Scrivi glicemia nella casella A1; 2. scrivi insulinemia nella casella B1; 3. scrivi in C1: $=((A1/18) \times B1) / 22.5$ e, dopo aver schiacciato il tasto <i>enter</i>, il risultato comparirà automaticamente. <p>Esempio: glicemia 105, insulinemia 34, HOMA-IR = 8.8.</p>
Parametri di riferimento	Normale: < 2.77.

Tabella 17.12.
Superficie corporea (formula di Dubois)

Cos'è	Sintetizza in un solo numero peso e altezza.
A cosa serve	È utilizzata per calcolare la dose da somministrare di alcuni farmaci.
Parametri necessari per il calcolo	Peso (espresso in kg). Altezza (espressa in cm).
Come calcolarla	$0.007184 * \text{altezza}^{0.725} * \text{peso}^{0.425}$.
Come calcolarla con Excel	<ol style="list-style-type: none"> 1. Scrivi il peso nella casella A1; 2. Scrivi l'altezza nella casella B1; 3. Scrivi in C1 = (0.007184*(B1^0.725)*(A1^0.425)) e, dopo aver schiacciato il tasto <i>enter</i>, il risultato comparirà automaticamente, <p>Esempio: kg 77, m 1.81, superficie corporea = 1.97 m².</p>

Tabella 17.13.
Velocità di filtrazione glomerulare (GFR)

Cos'è	È un indice di funzionalità renale.
Parametri necessari per il calcolo	Creatininemia in mg/dL. Creatininuria in mg/dL. Volume urinario in mL/min.
Come calcolarlo	$GFR = (\text{creatininuria} * \text{volume urinario}) / \text{creatininemia}$.
Come calcolarla con Excel	<ol style="list-style-type: none"> 1. Scrivi creatininuria nella casella A1; 2. Scrivi volume urinario nella casella B1; 3. Scrivi creatininemia nella casella C1; 4. scrivi in D1: =(A1*B1)/C1 e, dopo aver schiacciato il tasto <i>enter</i>, il risultato comparirà automaticamente. <p>Esempio: creatininuria 80, volume urinario 1.2, creatininemia 0.8, GFR = 120 mL/min.</p>

Tabella 17.14.
Velocità di filtrazione glomerulare (GFR) con l'equazione di Levey

Cos'è	Formula elaborata dai dati dello studio MDRD (<i>Modification of Diet in Renal Disease</i>).
Parametri necessari per il calcolo	Sesso, età ed etnia. Creatininemia in mg/dL. Urea in mg/dL. Albuminemia in g/dL.
Come calcolarlo	$GFR = 170 * creatininemia^{-0.999} * Et\grave{a}^{-0.176} * urea^{-0.17} * albuminemia^{0.318} * \text{fattore di correzione sesso ed etnia.}$ Il fattore di correzione per il sesso è 0.762 (da applicare solo alle donne), per l'etnia è 1.18 (da applicare solo ai neri).
Come calcolarla con Excel	<ol style="list-style-type: none"> 1. Scrivi creatininemia nella casella A1; 2. Scrivi età nella casella B1; 3. Scrivi urea nella casella C1; 4. Scrivi albuminemia nella casella D1; 5. scrivi in E1: $=170*(A1^{-0.999})*(B1^{-0.176})*(C1^{-0.17})*(D1^{0.318})$ oppure $=170*(A1^{-0.999})*(B1^{-0.176})*(C1^{-0.17})*(D1^{0.318})*0.762$ se donna, oppure $=170*(A1^{-0.999})*(B1^{-0.176})*(C1^{-0.17})*(D1^{0.318})*1.18$ se nero, oppure $=170*(A1^{-0.999})*(B1^{-0.176})*(C1^{-0.17})*(D1^{0.318})*0.762*1.18$ se donna nera e, dopo aver schiacciato il tasto <i>enter</i>, il risultato comparirà automaticamente. <p>Esempio: creatininemia 1.1, età 30, urea 38, albumina 3.8, GFR = 70 mL/min, 53.3 mL/min se donna, 82.6 mL/min se nero, 62.9 mL/min se donna nera.</p>

Tabella 17.15.
Velocità di filtrazione glomerulare (GFR) con l'equazione semplificata

Cos'è	Formula elaborata dai dati dello studio MDRD (<i>Modification of Diet in Renal Disease</i>)
Parametri necessari per il calcolo	Sesso, età ed etnia Creatininemia in mg/dL
Come calcolarlo	$GFR = 186 * creatininemia^{-1.154} * Et\grave{a}^{-0.203} * \text{fattore di correzione sesso ed etnia}$ Il fattore di correzione per il sesso è 0.742 (da applicare solo alle donne), per l'etnia è 1.21 (da applicare solo ai neri)
Come calcolarla con Excel	<ol style="list-style-type: none"> 1. Scrivi creatininemia nella casella A1; 2. Scrivi età nella casella B1; 3. Scrivi casella C1: $=186*(A1^{-1.154})*(B1^{-0.203})$. oppure $=186*(A1^{-1.154})*(B1^{-0.203})*0.742$ se donna, oppure $=186*(A1^{-1.154})*(B1^{-0.203})*1.21$ se nero, oppure $=186*(A1^{-1.154})*(B1^{-0.203})*0.742*1.21$ se donna nera e, dopo aver schiacciato il tasto <i>enter</i>, il risultato comparirà automaticamente <p>Esempio: creatininemia 1.1, età 30, GFR = 83.5 mL/min, 62 mL/min se donna, 101.1 mL/min se nero, 75 mL/min se donna nera.</p>

Le formule per il calcolo del GFR sono disponibili anche su siti WEB:

- http://www.kidney.org/professionals/KLS/gfr_calculator.cfm
- <http://www.nephron.com/mdrd/default.html>

18. Farmaci e modalità di approvvigionamento

Antimo Aiello

Tabella 18.1. Bioarginina

Ditta fornitrice (titolare dell'autorizzazione all'immissione in commercio)	FARMACEUTICI DAMOR SpA Via E. Scaglione 27, 80145 Napoli.
Composizione	L-arginina cloridrato 20 g in flacone da 500 mL di fisiologica.
Forma farmaceutica	Soluzione iniettabile.
Natura e contenuto della confezione	1 flacone da 20 g in 500 mL per infusione endovenosa con deflussore sterile pronto per l'uso.
Speciali precauzioni per la conservazione	Il prodotto può essere conservato alle normali condizioni di temperatura, umidità e luce.
Periodo di validità	36 mesi.
Modalità di richiesta	Moduli interni, da chiedere in farmacia ospedaliera.

Tabella 18.2. Calcio Gluconato

Ditta fornitrice (titolare dell'autorizzazione all'immissione in commercio)	BIOINDUSTRIA LIM SpA Novi Ligure (AL)
Composizione	Una fiala contiene: Calcio Gluconato 950 mg, Calcio Saccarato 36 mg. Acqua per preparazioni iniettabili. Ca ⁺⁺ : 446 mEq/L a pH tra 6.0 e 8.2 (4.46 mEq per fiala).
Forma farmaceutica	Soluzione iniettabile.
Natura e contenuto della confezione	Fiale di vetro da 10 mL. Soluzione ipertonica endovenosa da usare con precauzione, subito dopo l'apertura del contenitore, a velocità controllata.
Speciali precauzioni per la conservazione	Serve per una sola somministrazione e l'eventuale residuo non può essere utilizzato. Conservare in contenitori ermeticamente chiusi.
Periodo di validità	36 mesi.
Modalità di richiesta	Moduli interni, da chiedere in farmacia ospedaliera.

Tabella 18.3. Glucagone

Ditta fornitrice (titolare dell'autorizzazione all'immissione in commercio)	NOVO NORDISK A/S 2880 Bagsvaerd, Danimarca
Composizione	Glucagone cloridrato da DNA ricombinante 1 mg (sintetico).
Forma farmaceutica	Liofilizzato e solvente per soluzioni iniettabili.
Natura e contenuto della confezione	Fiale di vetro trasparente. La confezione include 1 fiala di prodotto (tappo arancio) e 1 fiala di solvente (tappo bianco).
Speciali precauzioni per la conservazione	Il prodotto deve essere conservato al riparo della luce tra +2 °C e +8 °C.
Periodo di validità	36 mesi.
Modalità di richiesta	Moduli interni, da chiedere in farmacia ospedaliera.

Tabella 18.4. Glucosio 5% flacone 500 mL preparazione parenterale

Ditta fornitrice (titolare dell'autorizzazione all'immissione in commercio)	INDUSTRIA FARMACEUTICA GALENICA SENESE via Cassia Nord 351, 53014 Monteroni d'Arbia (Siena)
Composizione	1000 mL contengono: glucosio monoidrato g 55 (g 27.5 per flacone). Acqua per preparazioni iniettabili.
Forma farmaceutica	Soluzione sterile e apirogena, isotonica con il sangue.
Natura e contenuto della confezione	Flacone in vetro da 500 mL.
Speciali precauzioni per la conservazione	Conservazione in contenitori ermeticamente chiusi. Conservare a temperatura non superiore a 30 °C, non congelare.
Periodo di validità	36 mesi.
Modalità di richiesta	Moduli interni, da chiedere in farmacia ospedaliera.

Tabella 18.5. Glucosio 10% Flacone 250 mL preparazione parenterale

Ditta fornitrice (titolare dell'autorizzazione all'immissione in commercio)	BIEFFE MEDITAL SpA Grosotto (SO)
Composizione	1000 mL contengono: glucosio monoidrato g 110 (g 27.5 per flacone). Acqua per preparazioni iniettabili.
Forma farmaceutica	Soluzione sterile, ipertonica con il sangue.
Natura e contenuto della confezione	Flacone in vetro da 250 mL.
Speciali precauzioni per la conservazione	Conservare in contenitori ermeticamente chiusi. Non congelare.
Periodo di validità	36 mesi.
Modalità di richiesta	Moduli interni, da chiedere in farmacia ospedaliera.

Tabella 18.6. Glucosio 33% fiale

Ditta fornitrice (titolare dell'autorizzazione all'immissione in commercio)	B BRAUN MELSUNGEN AG D - 34209 Melsungen, Germania
Composizione	10 mL contengono: glucosio anidro g 3.3. Acqua per preparazioni iniettabili.
Forma farmaceutica	Soluzione iniettabile sterile e apirogena.
Natura e contenuto della confezione	Fiale da 10 mL in plastica.
Speciali precauzioni per la conservazione	Non congelare. Non conservare al di sopra di 25 °C.
Periodo di validità	36 mesi.
Modalità di richiesta	Moduli interni, da chiedere in farmacia ospedaliera.

Tabella 18.7
GLUCOSIO 33% Flacone 500 mL preparazione parenterale

Ditta fornitrice (titolare dell'autorizzazione all'immissione in commercio)	INDUSTRIA FARMACEUTICA GALENICA SENESE via Cassia Nord 351, 53014 Monteroni d'Arbia (Siena)
Composizione	1000 mL contengono: glucosio monoidrato g 363.0 (un flacone contiene g 181.5). Acqua per preparazioni iniettabili.
Forma farmaceutica	Soluzione sterile e apirogena.
Natura e contenuto della confezione	Flacone in vetro da 500 mL.
Speciali precauzioni per la conservazione	Conservazione in contenitori ermeticamente chiusi. Conservare a temperatura non superiore a 30 °C.
Periodo di validità	36 mesi.
Modalità di richiesta	Moduli interni, da chiedere in farmacia ospedaliera.

Tabella 18.8
Glucosio 50% Soluzione orale 150 mL

Ditta fornitrice (titolare dell'autorizzazione all'immissione in commercio)	SCLAVO Diagnostics Internazionale SrL Loc. Pian dei Mori 284, Sovicille (Siena)
Composizione	100 mL di soluzione contengono: glucosio g 50 (pari a g 75 per flacone o 0.5 g/mL).
Forma farmaceutica	Soluzione orale.
Natura e contenuto della confezione	Flacone di vetro da 150 mL di soluzione al 50%.
Speciali precauzioni per la conservazione	Il prodotto può deve essere conservato ben chiuso a temperatura ambiente.
Periodo di validità	5 anni.
Modalità di richiesta	Moduli interni, da chiedere in farmacia ospedaliera.

19. Fattori di conversione delle unità di misura convenzionali in Unità Internazionali (SI)

Roberto Attanasio, Romolo Dorizzi

La base delle unità di misura convenzionali è l'unità di massa, il chilogrammo, mentre l'unità di quantità di materia è la mole, che contiene tante entità elementari quanti sono gli atomi in 0.012 chilogrammi di carbonio 12. Mentre la concentrazione di massa si esprime per decilitro, per litro o per millilitro (con confusione e differenze), la quantità di materia si esprime sempre, in maniera univoca, per litro.

Tutti i principali organismi di standardizzazione (tra gli altri, l'Organizzazione Mondiale della Sanità, l'*International Federation of Clinical Chemistry*, la *World Association of Pathology Societies and Laboratory Medicine* e l'*International Committee for Standardization in Hematology*) hanno raccomandato l'impiego delle Unità SI (da Sistema Internazionale) e non di quelle convenzionali in Medicina di Laboratorio per numerose ragioni, tra cui le principali vengono di seguito elencate.

- I processi metabolici che avvengono nelle cellule seguono leggi chimiche che si svolgono in termini di atomi, ioni e molecole (e non di massa): le cellule e i loro recettori non rispondono a modificazioni di massa, ma a modificazioni del numero di molecole.
- La concentrazione di un calibrante è definita senza ambiguità, indipendentemente dalla forma chimica del materiale usato: 10 millimoli contengono la stessa quantità di glucosio, sia che il calibrante sia glucosio anidro o monoidrato (lo stesso non può dirsi per 180 mg/dL).
- L'uso delle Unità SI è appropriato per la maggior parte delle tecniche di misurazione di laboratorio (spettrometria, fluorimetria, immunometria, ...).

A partire dagli anni '70, il sistema SI è stato adottato per le analisi di laboratorio da molti paesi, mentre altri, come l'Italia e gli Stati Uniti, non lo hanno ancora adottato.

Non è difficile passare dalle Unità tradizionali a quelle SI e sarebbe preferibile passare direttamente alle nuove unità di misura, dopo un'adeguata preparazione degli interessati, in maniera omogenea a livello provinciale o regionale, senza periodi intermedi di doppia refertazione.

Per esempio per calcolare a quante mmol/L corrispondono 100 mg/dL di glucosio si procede come segue:

- si passa dalla concentrazione di massa per decilitro, alla concentrazione di massa per litro: $100 \text{ mg/dL} * 10 = 1000 \text{ mg/L}$;
- si passa dalla concentrazione di massa per litro alla quantità di materia per litro, dividendo per il peso molecolare (in questo caso 180): $1000/180 = 5.5 \text{ mmol/L}$.

Nella tabella 19.1 sono indicati i fattori di conversione di alcuni dei principali esami.

Tabella 19.1.

Analita	Unità Convenzionale	Fattore di Conversione*	Unità SI
ACTH	pg/mL = ng/L	0.22	pM/L
adrenalina	pg/mL = ng/L	5.458	pM/L
adrenalina urinaria	µg/24h	5.458	nM/24h
β-OH-butyrico	mg/dL	96.05	µM/L
catecolamine	µg/24h	5.911	nM/24h
CLU	µg/24h	2.759	nM/24h
colesterolo (totale/ HDL/LDL)	mg/dL	0.02586	mM/L
cortisolo	ng/mL = µg/L	2.759	nM/L
	µg/dL	27.59	nM/L
dopamina	pg/mL = ng/L	6.528	pM/L
FT ₄	ng/dL	12.87	pM/L
FT ₃	pg/dL	0.0154	pM/L
	pg/mL = ng/L	1.54	pM/L
GH	ng/mL = µg/L	45200	pM/L
	ng/mL = µg/L	2 (Brahams IRMA)	mU/L
		2.4 (Immulite 2000)	
2.6 (Beckman Access, Tosoh, AIA; Delfia)			
glucosio	mg/dL	0.05551	nM/L
glucagone	pg/mL = ng/L	0.282	pM/L
IGF-I	ng/mL = µg/L	0.131	nM/L
insulina	µU/mL = mU/L	7.175	pM/L
lattato	mg/dL	0.111	mM/L
metanefrine	mg/24h	5.458	µM/24h
noradrenalina	pg/mL = ng/L	0.005911	nM/L
noradrenalina urinaria	µg/24h	5.911	nM/24h
peptide-C	ng/mL = µg/L	0.331	nM/L
polipeptide pancreatico	pg/mL = ng/L	0.239	pM/L
trigliceridi	mg/dL	0.01129	mM/L
vanilmandelico	mg/24h	5.046	µM/24h

* moltiplica per passare da sinistra a destra (da unità convenzionali a unità SI) e dividi per passare da destra a sinistra (da unità SI a unità convenzionali).

20. Monitoraggio glicemico

20.a. Automonitoraggio Glicemico

Concetta Suraci

Definizione

Il termine **automonitoraggio** si riferisce alla misurazione delle glicemie capillari effettuata dal paziente diabetico o dai suoi familiari.

Il termine **autocontrollo** si riferisce, invece, all'interpretazione dei risultati delle glicemie capillari ed ai conseguenti interventi terapeutici (su alimentazione, attività fisica e/o farmaci) volti a migliorarli, che il paziente diabetico deve essere educato ad effettuare, in collaborazione con il personale sanitario. Il termine autocontrollo è più vicino al SMBG (*Self-Monitoring of Blood Glucose*) utilizzato a livello internazionale.

Nella pratica clinica i due termini vengono usati come sinonimi, con riferimento all'autoverifica domiciliare della glicemia, mentre si utilizza il termine **autogestione** per indicare l'adeguamento degli interventi terapeutici da parte del paziente. Il termine **domiciliare** va inteso in relazione a misurazioni effettuate nella vita di tutti i giorni, in contrapposizione alle misurazioni effettuate in ambiente sanitario.

Razionale

Nel **diabete mellito di tipo 1** (*cf. capitolo 2.a.1. a pag. 23*) i principali *trial* clinici hanno confermato il ruolo del controllo glicemico come elemento di strategia terapeutica nella **prevenzione delle complicanze croniche**.

Nel **diabete mellito di tipo 2** (*cf. capitolo 2.a.2. a pag. 27*), invece, il ruolo dell'automonitoraggio **non è ancora ben definito**, soprattutto per i pazienti in trattamento non-insulinico. Da un lato, infatti, diverse metanalisi concludono per un'evidenza non sufficiente, mentre una recente metanalisi della *Cochrane Collaboration* rileva un effetto positivo dell'automonitoraggio sull'HbA_{1c}. Ad analoghe conclusioni giunge la metanalisi condotta da JN Sarol, sempre nel 2005, secondo la quale l'automonitoraggio della glicemia in diabetici di tipo 2 non insulino-trattati è associato ad un modesto miglioramento del controllo glicemico solo se inserito in un programma educativo di gestione della malattia.

Per quanto riguarda il ruolo dell'automonitoraggio su morbilità correlata al diabete e mortalità, l'unica evidenza disponibile deriva da uno studio retrospettivo non randomizzato, il *Self-monitoring of blood glucose and outcome in patients with Type 2 Diabetes*, nel quale l'autocontrollo è risultato associato con una riduzione della morbilità anche nei pazienti non insulino-trattati.

Pertanto, in letteratura non vi è ancora una chiara evidenza che la sola conoscenza più o meno accurata dei valori glicemici a diverse ore della giornata e della notte sia in grado, di per sé, di incidere sulla storia naturale della malattia; d'altra parte, secondo quanto suggerito dalla studio italiano QuED (Qualità della cura ed Esito in Diabetologia), la possibilità di determinare autonomamente la glicemia può ingenerare ansia e disagio psichico nel paziente non insulino-trattato non educato all'autogestione, che quindi non può mettere in atto aggiustamenti terapeutici. Ecco perchè l'automonitoraggio in senso stretto (la possibilità e la capacità di eseguire personalmente il controllo della glicemia) va visto solo come una tappa del percorso di

autogestione del diabete, che ha come obiettivo l'accettazione attiva della malattia, attraverso l'acquisizione di conoscenze, comportamenti ed atteggiamenti consapevoli.

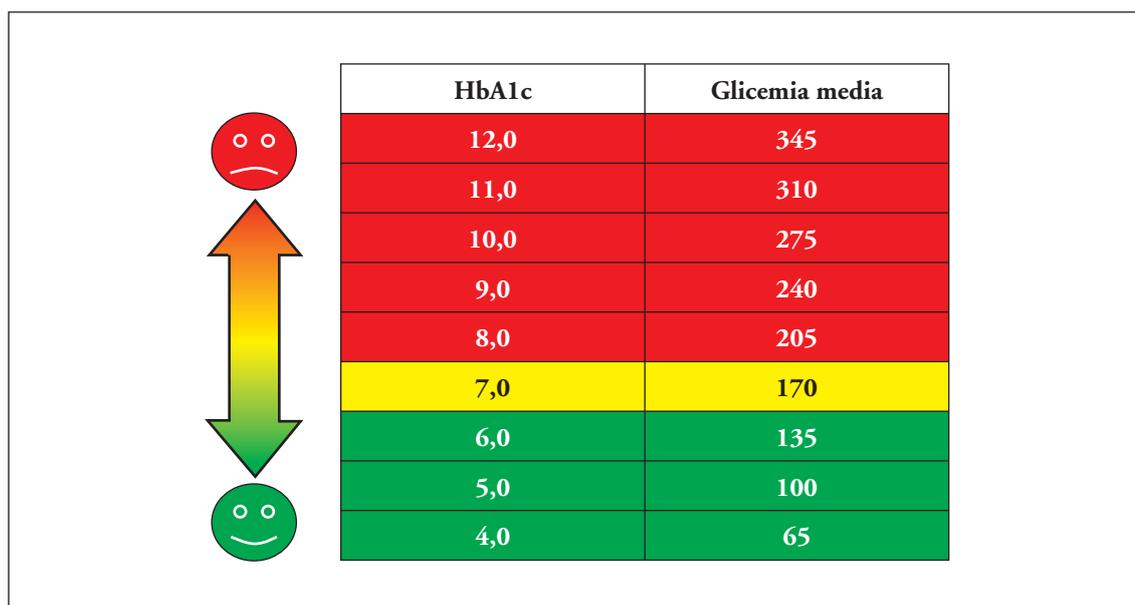
Uso clinico

L'ADA raccomanda in tutti i pazienti diabetici il **controllo periodico dell'emoglobina glicata** (HbA_{1c}) (cfr capitolo 3.c. a pag. 56) per la verifica del compenso glicemico e come parte della cura. Effettuando il test dell' HbA_{1c} è possibile stimare la media della glicemia nei 2-3 mesi precedenti e, in tal modo, valutare l'efficacia della terapia in atto. È consigliabile pertanto una misurazione all'incirca **ogni 3 mesi**.

La regolare effettuazione dell' HbA_{1c} permette di rilevare in modo tempestivo un allontanamento dall'obiettivo terapeutico. Nel singolo paziente la frequenza del dosaggio dell' HbA_{1c} dovrebbe dipendere dalla situazione clinica, dal tipo di terapia in atto e dal giudizio del curante.

La figura 20a.1 mostra la correlazione tra livelli di HbA_{1c} e glicemia media a digiuno ottenuta nello studio DCCT.

Figura 20.a.1
Correlazioni tra livelli di HbA_{1c} e glicemia plasmatica media su test multipli effettuati in un periodo di 2-3 mesi nell'ambito dello studio DCCT

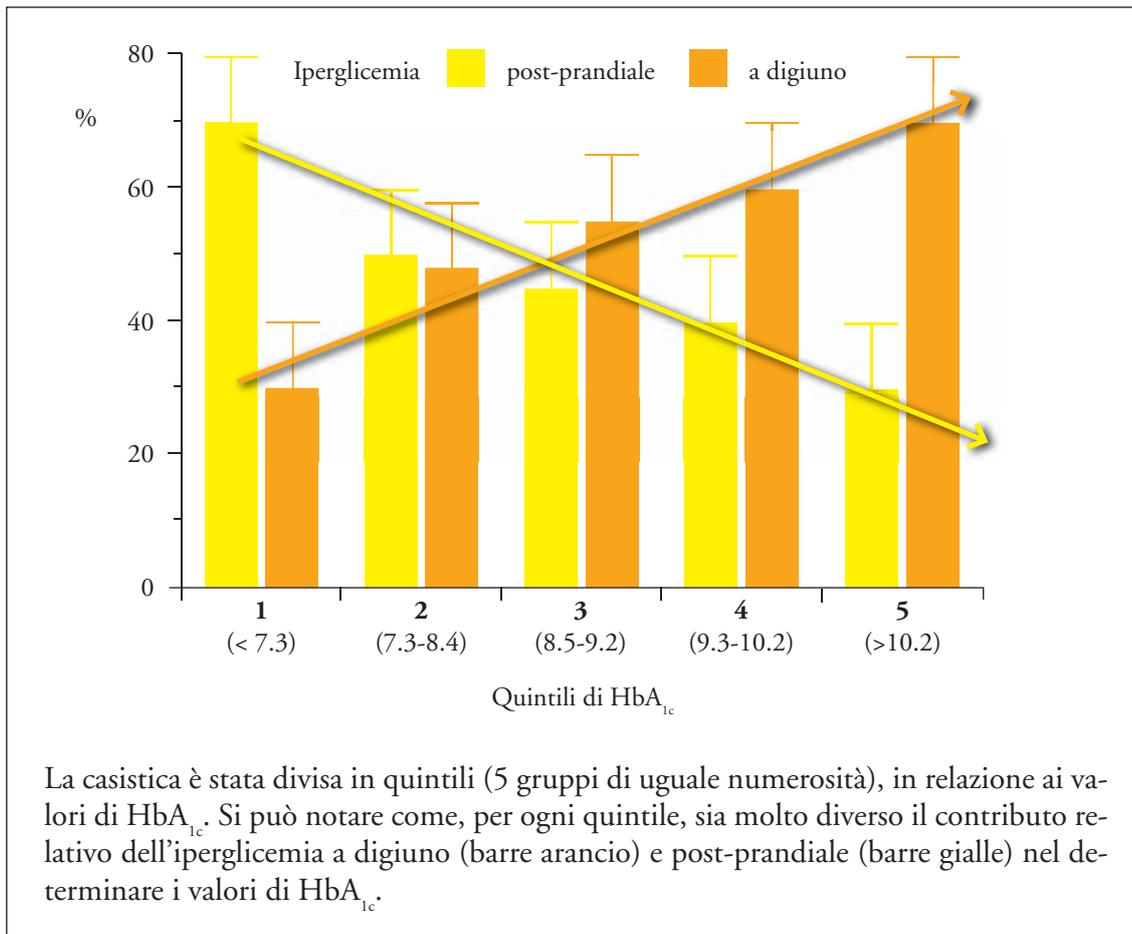


In realtà si tratta di una media ponderata, composta per il 50% dai livelli di glicemia dei giorni 0-30, per il 40% dai livelli dei giorni 30-90 e per il 10% dai livelli dei giorni 90-120 (calcolando come giorno 0 quello del prelievo).

La HbA_{1c} testimonia la permanenza in una condizione di iperglicemia, ma non è in grado di testimoniare la variabilità glicemica, ovvero l'ampiezza delle fluttuazioni caratteristiche di chi non raggiunge un equilibrio metabolico, che sono considerate fattore predittivo indipendente di mortalità nei pazienti diabetici, e non rende conto dei picchi post-prandiali (associati alla macro-angiopatia diabetica).

Inoltre, è stato dimostrato che nel paziente diabetico i valori di glicemia a digiuno e post-prandiale contribuiscono in modo differente ai livelli di HbA_{1c} (cfr fig 20a.2).

Figura 20.a.2.



Pertanto il grado di controllo glicemico è meglio valutabile se si combinano i risultati dell'automonitoraggio glicemico e dell'HbA_{1c}, come sottolineato dalle **Raccomandazioni** ADA e IDF.

Secondo l'ADA:

- nei pazienti in terapia insulinica intensiva il monitoraggio della glicemia con *stick* (SMBG) deve essere effettuato 3 o più volte al giorno (*evidenza A*);
- nei pazienti in terapia insulinica non intensiva o che utilizzano ipoglicemizzanti orali o la sola dieta, lo SMBG è utile nel raggiungimento degli obiettivi glicemici (*evidenza E*);
- per ottenere gli obiettivi glicemici post-prandiali può essere indicato l'SMBG post-prandiale (*evidenza E*);
- è utile istruire il paziente allo SMBG e valutarne periodicamente la tecnica e l'abilità nell'utilizzare i dati ottenuti per modificare la terapia (*evidenza E*).

Gli obiettivi glicemici sono diversi in relazione al tipo di paziente ed alla condizione clinica del momento (*cfr tab 20a.1, 20a.2, 20a.3*).

Tabella 20.a.1.
Obiettivi glicemici nel paziente diabetico adulto

	Sani	ADA ¹	AACE ²	JDS ³	IDF ⁴
HbA _{1c} (%)	< 6	< 7	≤ 6.5	5.8-6.4	≤ 6.5
Glicemia a digiuno mmol/L (mg/dL)	< 5.6 (< 100)	5-7.2 (90-130)	< 6 (< 110)	5.6-6.6 (100-119)	< 6 (< 110)
Glicemia post-prandiale mmol/L (mg/dL)	< 7.8 (< 140)	< 10* (< 180)	< 7.8** (< 140)	—	< 8** (< 145)

* 1-2 ore post-prandiali; **2 ore post-prandiali.
 1. American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2004, 27 (suppl 1): S15-35.
 2. American Association of Clinical Endocrinologists. *Endocr Pract* 2002, 8 (suppl 1): 43-84.
 3. Japan Diabetes Society. Available at: <http://www.jds.or.jp>
 4. International Diabetes Federation. *Diabet Med* 1999, 16: 716-30.

Tabella 20a.2.
Obiettivi glicemici nel bambino-adolescente con DM-T1

	Età pre-scolare (< 6 aa)	Età scolare (6-12 aa)	Adolescenti e giovani adulti (13-19 aa)
HbA _{1c} (%)	7.5-8.5	< 8	< 7.5*
Glicemia pre-prandiale (mg/dL)	100-180	90-180	90-130
Glicemia <i>bed-time</i> durante la notte (mg/dL)	110-200	100-180	90-150

* Un obiettivo più basso (< 7%) è proponibile se può essere raggiunto senza eccessivi episodi ipoglicemici.
 Silverstein J, et al. *American Diabetes Association. Diabetes Care* 2005, 28: 186-212.

Tabella 20.a.3.
Obiettivi glicemici nel paziente diabetico anziano

Situazione clinica	Obiettivo
Assenza di altre comorbilità rilevanti	Glicemia a digiuno: 90-130 mg/dL HbA _{1c} : 6.5-7.5%
Pazienti fragili (non autonomi, con patologia multi-sistemica)	Glicemia a digiuno: 130-160 mg/dL HbA _{1c} : 7.5-8.5%
Pazienti residenti in case di riposo (inclusi quelli con demenza)	Per ridurre al minimo il rischio di ipoglicemia e di scompenso metabolico, obiettivi glicemici meno rigidi: <ul style="list-style-type: none"> • glicemia a digiuno: 130-160 mg/dL • HbA_{1c}: 7.5-8.5% L'obiettivo è raggiungere un compenso metabolico soddisfacente per ridurre sia la letargia iperglicemica, che il rischio di ipoglicemia, conservando il massimo livello di funzione cognitiva e fisica.

Guidelines for improving the care of the older person with diabetes mellitus. J Am Geriatr Soc 2003, 51: S265-S280.

AMD e SID, nel 2003, hanno formulato **Raccomandazioni per la frequenza dell'automonitoraggio, da applicare nei diabetici con compenso glicemico soddisfacente**, diversificate per tipo di trattamento ipoglicemizzante praticato (cfr tab 20a.4).

Tabella 20.a.4.

Classe terapeutica	Numero di controlli
Classe 1: terapia insulinica intensiva	In condizioni routinarie: 4 controlli/die. In condizioni di squilibrio glicemico o malattie intercorrenti: numero illimitato (fino alla risoluzione del fatto).
Classe 2: terapia insulinica convenzionale o mista	In condizioni routinarie: numero di controlli quotidiani pari al numero di iniezioni + 20%. In condizioni di squilibrio glicemico o malattie intercorrenti: numero illimitato (fino alla risoluzione del fatto).
Classe 3: terapia ipoglicemizzante orale con farmaci secretagoghi	In condizioni routinarie: numero di controlli pari a un profilo su 4 punti ogni settimana. In presenza di rischio elevato di ipoglicemia o conseguenze potenzialmente gravi dell'ipoglicemia (coronaropatia, vasculopatia cerebrale, retinopatia proliferante): fino a 2 controlli/die.
Classe 4: terapia dietetica e/o con farmaci insulino-sensibilizzanti	In questa classe di pazienti l'efficacia dell'autocontrollo della glicemia non è a tutt'oggi dimostrata, tranne che nel Diabete Gestazionale (cfr capitolo 2.a.3 a pag. 31), in cui è indicato l'autocontrollo domiciliare della glicemia per decidere quando iniziare la terapia insulinica; la frequenza dei controlli deve essere decisa dal diabetologo in relazione alle singole situazioni cliniche.

Sempre in tale documento è stata anche sottolineata l'importanza di verificare:

- la tecnica del monitoraggio a intervalli regolari;
- l'accuratezza dei risultati;
- la capacità di utilizzo dei risultati da parte del paziente.

Nell'autocontrollo sono possibili diversi errori, alcuni legati alla non corretta esecuzione del test, altri alla non corretta raccolta o all'interpretazione dei dati.

Gli **errori di esecuzione** più frequenti sono:

- legati al glucometro (parte ottica sporca, pile scariche);
- legati alle strisce reattive (flacone scaduto, flacone rimasto aperto, mancato inserimento del codice di riconoscimento delle strisce reattive, campione ematico non adeguato);
- legati all'educatore (mancata comprensione del significato dei termini "HI" e "LO", errato inserimento unità di misura).

Più recentemente le due Società Scientifiche (AMD e SID), come Diabete Italia, hanno prodotto gli *Standard* Italiani per la Cura del Diabete Mellito, da cui vengono riportate le Raccomandazioni per l'automonitoraggio della glicemia.

Tabella 20.a.5.
Raccomandazioni per l'Automonitoraggio della glicemia
(da "Standard Italiani per la Cura del Diabete Mellito – Diabete Italia, giugno 2007")

L'autocontrollo glicemico, condiviso con il team diabetologico, è una componente indispensabile dell'auto-gestione della malattia diabetica, sia per raggiungere gli obiettivi terapeutici sia per ridurre il rischio di ipoglicemie gravi (<i>livello della prova VI, forza della raccomandazione B</i>).
L'autocontrollo quotidiano (almeno 3-4 controlli/die) è indispensabile per la persona con DM-T1 in terapia insulinica intensiva (<i>livello della prova II, forza della raccomandazione A</i>).
L'autocontrollo glicemico continuativo, con frequenza e modalità diverse, è utile per la persona con DM-T2 insulino-trattato (<i>livello della prova III, forza della raccomandazione B</i>).
L'autocontrollo glicemico non continuativo è potenzialmente utile per la persona con DM-T2 in terapia orale o dietetica, ma non sono disponibili chiare evidenze di efficacia sul controllo glicemico (<i>livello della prova VI, forza della raccomandazione C</i>).
Per ottenere un buon controllo glicemico e raggiungere gli obiettivi glicemici post-prandiali, può essere utile l'autocontrollo glicemico post-prandiale (<i>livello della prova VI, forza della raccomandazione B</i>).
La frequenza dell'autocontrollo deve essere adattata agli eventi intercorrenti e intensificata in presenza di situazioni cliniche quali patologie intercorrenti, ipoglicemie inavvertite, ipoglicemie notturne, variazione della terapia ipoglicemizante (<i>livello della prova VI, forza della raccomandazione B</i>).
È necessario istruire il paziente all'autocontrollo glicemico, valutare periodicamente la correttezza dell'utilizzo del glucometro e la capacità di modificare la terapia sulla base dei valori misurati, eventualmente facendo uso di un algoritmo condiviso (<i>livello della prova VI, forza della raccomandazione B</i>).
L'istruzione all'autocontrollo glicemico deve inserirsi in un programma educativo condotto e controllato a medio-lungo termine da personale infermieristico con esperienza in campo diabetologico (<i>livello della prova VI, forza della raccomandazione B</i>).

Bibliografia

- The Diabetes Control and Complications Trial 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.*
- 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.*
- Faas A, Schellevis FG, Van Eijk JT. The efficacy of self-monitoring of blood glucose in NIDDM subjects. A criteria-based literature review. Diabetes Care 1997, 20: 1482-6.*
- Holmes V, Griffiths P. Self-monitoring of glucose levels for people with type 2 diabetes. Br J Comm Nurs 2002, 7: 41-6.*
- Welschen LM, Bloemendal E, Nijpels G, Dekker JM, Heine RJ, Stalman WA, Bouter LM. Self-monitoring of blood glucose in patients with type 2 diabetes who are not using insulin. Cochrane Database Syst Rev 2005, 18(2).*
- Sarol JN Jr, Nicodemus NA Jr, Tan KM, Grava MB. Self-monitoring of blood glucose as part of a multi-component therapy among non-insulin requiring type 2 diabetes patients: a meta-analysis (1966-2004). Curr Med Res Opin 2005, 21: 173-84.*
- Martin S, Schneider B, Heinemann L, Lodwig V, Kurth HJ, Kolb H, Scherbaum WA. Self-monitoring of blood glucose in type 2 diabetes and long-term outcome: an epidemiological cohort study. Diabetologia 2006, 49:271-8.*
- Franciosi M, Pellegrini F, De Berardis G, et al. QuED Study Group. The impact of blood glucose self-monitoring on metabolic control and quality of life in type 2 diabetic patients: an urgent need for better educational strategies. Diabetes Care 2001, 24: 1870-7.*

- American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes 2007. Diabetes Care 2007, 30 (suppl 1): S4-S41.*
- Rohlfing CL, Wiedmeyer HM, Little RR, England JD, Tennill A, Goldstein DE. Defining the relationship between plasma glucose and HbA1c: analysis of glucose profiles and HbA1c in the Diabetes Control and Complications Trial. Diabetes Care 2002, 25: 275–8.*
- Monnier L, Lapinski H, Colette C. Contributions of fasting and postprandial plasma glucose increments to the overall diurnal hyperglycaemia of type 2 diabetic patients. Diabetes Care 2003, 26: 881-5.*
- Associazione Medici Diabetologi - Società Italiana di Diabetologia. Raccomandazioni sull'uso dell'autocontrollo domiciliare della glicemia, 2003. <http://www.aemmedi.it/linee-guida-e-raccomandazioni/>*
- International Diabetes Federation. Global Guidelines for Type 2 Diabetes. August 2005. <http://www.idf.org/home/index.cfm?unode>*
- Associazione Medici Diabetologi - Società Italiana di Diabetologia – Diabete Italia. Standard Italiani per la Cura del Diabete Mellito, 2007. <http://www.aemmedi.it>*
- Goldstein DE, Little RR, Lorenz RA, et al. Tests of Glycemia in Diabetes. Diabetes Care 2004, 27: 1761-3.*

20.b. Holter glicemico

Edoardo Guastamacchia & Vincenzo Triggiani

Definizione

Monitoraggio continuo della glicemia, mediante l'utilizzo di dispositivi analitici specifici per il glucosio.

Razionale

Il *Diabetes Control and Complication Trial* (DCCT) e l'*United Kingdom Prospective Diabetes Study* (UKPDS) hanno chiaramente dimostrato la stretta correlazione tra controllo glicemico e complicanze croniche del diabete. Nella valutazione del compenso glicemico, sia la determinazione dell'HbA_{1c} che il monitoraggio domiciliare convenzionale della glicemia con *stick* (SMBG) non forniscono informazioni complete e pienamente affidabili. L'HbA_{1c}, infatti, non consente di conoscere l'andamento effettivo delle fluttuazioni glicemiche quotidiane e può, inoltre, risultare nei limiti della norma anche in pazienti con scarso controllo con frequenti ipoglicemie; l'SMBG, d'altro canto, fornisce solo alcuni punti della curva di andamento giornaliero della glicemia, non consentendo di cogliere l'andamento effettivo delle fluttuazioni glicemiche.

Da alcuni anni, al tradizionale monitoraggio glicemico domiciliare mediante glucometro, si è affiancata una classe di strumenti, i cosiddetti sensori del glucosio, in grado di monitorare in continuo la glicemia durante le comuni attività quotidiane e durante il sonno. Questo consente, infatti, di evidenziare le oscillazioni glicemiche presenti nel paziente diabetico, fornendo informazioni molto più dettagliate rispetto all'automonitoraggio glicemico domiciliare tradizionale (*cf. capitolo 20.a. a pag. 219*); permette di identificare e prevenire episodi ipoglicemici asintomatici (in particolare notturni) e iperglicemie post-prandiali, consentendo di personalizzare gli schemi di terapia insulinica e di ottimizzare il controllo della glicemia, soprattutto in particolari condizioni come la gravidanza, l'età infantile, l'attività fisica, le emergenze metaboliche e la dialisi.

Strumenti

Gli strumenti per il monitoraggio continuo del glucosio sono rappresentati dai sensori intravascolari di lunga durata per la misurazione diretta della glicemia (**sensori invasivi**) ancora in fase sperimentale, come il LTSS-VGMS® Medtronic, e soprattutto dai **sensori semi-invasivi (o mini-invasivi)** che misurano il glucosio nei liquidi interstiziali, dove esso raggiunge concentrazioni paragonabili a quelle presenti nel sangue (con le quali devono comunque essere confrontate mediante una calibrazione). Questi dispositivi si basano su diverse metodiche.

1. Nel caso dei dispositivi basati su **sensore elettro-enzimatico ad ago**, questo viene inserito nel sottocutaneo dell'addome o della parte superiore del gluteo. L'enzima glucosio-ossidasi dà luogo, a partire da glucosio e ossigeno, alla formazione di acido gluconico e di perossido di idrogeno che viene misurato elettro-chimicamente. Il segnale, prodotto in seguito

all'ossidazione del glucosio, viene trasmesso all'esterno del corpo al cavo di collegamento per scaricare i dati, o al trasmettitore che trasmette il segnale al ricevitore-monitor per telemetria. Il sistema è in grado di effettuare una misurazione ogni 10 secondi e di registrare un valore di glucosio medio ogni 5 minuti per 72 ore. Sono necessarie 3 calibrazioni nel corso delle 24 ore. Esistono in commercio due modelli della Medtronic Minimed: il CG-MS® System Gold, che consente solo l'analisi retrospettiva dei dati, e il Guardian RT, che consente, oltre alla valutazione retrospettiva, anche la lettura dei valori in tempo reale ed è provvisto di allarmi impostabili per segnalare ipo- ed iperglicemie.

- Il dispositivo basato sulla **micro-dialisi** (Glucoday®, Menarini Diagnostics) utilizza una micro-fibra (micro-catetere), con diametro esterno di 0.2 mm, che viene inserita nel sottocutaneo addominale peri-ombelicale e perfusa mediante una micro-pompa. Il glucosio, grazie al gradiente di concentrazione, diffonde dal liquido interstiziale, dove è presente in concentrazioni simili a quelle plasmatiche, al liquido di perfusione e viene misurato con il metodo della glucosio-ossidasi. Il vantaggio è costituito dalla stabilità del segnale nel tempo. Il Glucoday® è in grado di misurare con elevata accuratezza la glicemia ogni secondo e di memorizzare la glicemia ogni 3 minuti, con un intervallo di misurazione compreso tra 10 e 500 mg/dL, permettendo di visualizzare in tempo reale le concentrazioni di glucosio sul *display*, consentendo pertanto un monitoraggio in tempo reale. Si possono ottenere profili glicemici accurati per almeno 48 ore, previa calibrazione della micro-fibra dopo 12 ore dall'inserimento. Alcuni strumenti sono corredati di allarmi programmabili per la segnalazione di ipo e iperglicemie.

Tabella 20.b.1

Caratteristiche degli attuali sistemi di monitoraggio in continuo del glucosio

Dispositivo	Tecnica	Invasività	Visualizzazione misurazione glucosio	Durata sensore	Allarmi ipo-iper	Presente in Italia
CGMS®SYSTEM GOLD MEDTRONIC	sensore elettroenzimatico sottocutaneo	mini-invasivo	retrospettiva	3 giorni	no	sì
GUARDIAN RT® MEDTRONIC	sensore elettroenzimatico sottocutaneo	mini-invasivo	in tempo reale e retrospettiva	3 giorni	sì	sì
NAVIGATOR® ABBOTT	sensore elettroenzimatico sottocutaneo	mini-invasivo	in tempo reale e retrospettiva	3 giorni	sì	no
DEXCOM™MSTSTM DEXCOM	sensore elettroenzimatico sottocutaneo	mini-invasivo	in tempo reale e retrospettiva	3 giorni	sì	no
GLUCOWATCH® CYGNUS	sensore sottocutaneo iontoforesi inversa	mini-invasivo	in tempo reale e retrospettiva	13 ore	sì	no
GLUCODAY® MENARINI DIAGNOSTICS	micro-dialisi sensore sottocutaneo	mini-invasivo	in tempo reale e retrospettiva	2 giorni	sì	sì
PENDRA® PENDRAGON MEDICAL	impedenza spettroscopica	non invasivo	<i>real time</i>	3 mesi	sì	no

I limiti dei dispositivi attualmente disponibili sono:

- l'invasività (anche se minima) della procedura, che richiede l'intervento di personale medico/infermieristico per l'applicazione;

- il limitato periodo di misurazione (2-4 giorni);
- la minore accuratezza, considerando singoli dati, rispetto alla simultanea misurazione su sangue capillare;
- i possibili effetti collaterali cutanei (irritazione, infezioni);
- la necessità di effettuare più calibrazioni al giorno con sangue capillare ottenuto pungendo i polpastrelli delle dita;
- i costi e la rimborsabilità.

In futuro saranno disponibili in commercio dispositivi basati su **sensori del glucosio non invasivi** (sensori ottici, sensori basati sulla spettroscopia o sulla dispersione della luce). Attualmente in alcuni paesi europei è già disponibile un dispositivo simile ad un orologio da polso basato sull'impedenza dielettrica spettroscopica (Pendra®, Pendragon Medical) che consente un controllo della glicemia in tempo reale e ha il vantaggio di una lunga durata del sensore. Alcuni studi hanno tuttavia rilevato uno scostamento consistente dei valori rilevati rispetto alla glicemia reale misurata su sangue capillare.

Consigli pratici sull'inserzione del sensore sottocutaneo (sensori mini-invasivi)

- Usare un disinfettante per il sito di inserzione.
- Evitare accuratamente siti che possano essere compressi da vestiti, zone lipo-distrofiche o zone soggette ad eccessivi movimenti.
- Posizionare il sensore ad almeno 5 cm dalla zona di iniezione o infusione dell'insulina.
- Dopo l'inserzione del sensore e il collegamento con il monitor, ricoprirlo con un cerotto sterile e trasparente.
- Rimuovere il sensore se si avverte dolore o si nota un eccessivo arrossamento.
- Le calibrazioni vanno effettuate a digiuno o almeno 3 ore dopo il pasto, non dopo esercizio fisico o quando è prevedibile che la glicemia aumenti o si riduca più rapidamente.

Uso clinico

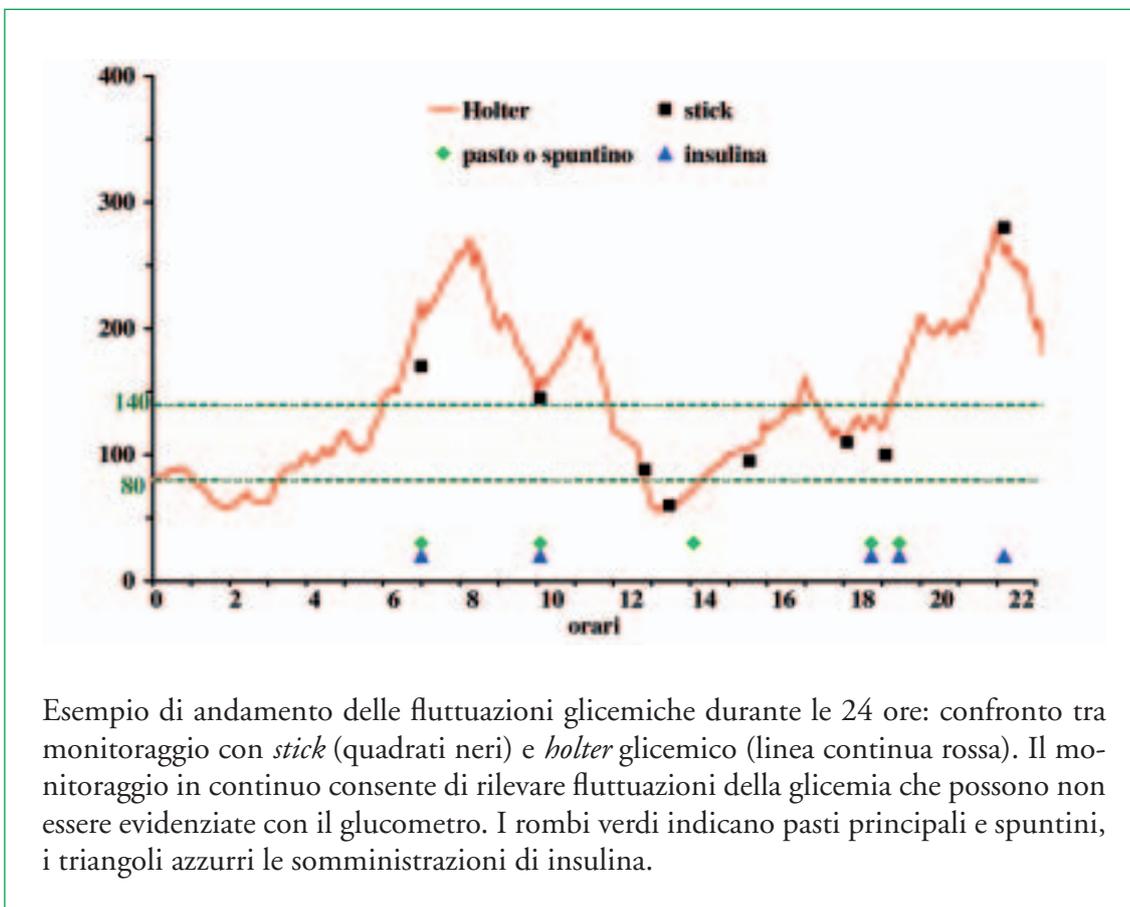
I benefici di un buon controllo glicemico sono stati ben documentati e le linee guida sottolineano la necessità di raggiungere un controllo glicemico molto stretto per la prevenzione delle complicanze sia nel DM-T1 che nel DM-T2. È indispensabile, pertanto, un accurato monitoraggio della glicemia. L'automonitoraggio convenzionale con glucometro, tuttavia, non mostra fedelmente l'andamento delle glicemie durante le 24 ore. Il perseguimento di valori di glicemia e HbA_{1c} sempre più vicini al *range* di normalità, inoltre, rende gli episodi ipoglicemici (soprattutto notturni) sempre più frequenti. Con l'aumentare degli anni di malattia e il progressivo danno neurologico, tali episodi divengono spesso inavvertiti, con possibili rischi nelle comuni attività lavorative e nella guida, la comparsa di disturbi cognitivi legati alla neuro-glucopenia ed effetti deleteri sull'andamento delle glicemie nelle ore successive. Questi episodi di ipoglicemia inavvertita, specie se notturni, possono non essere rilevati con l'automonitoraggio convenzionale.

Il monitoraggio in continuo della glicemia consente di rilevare le fluttuazioni della glicemia e quindi di identificare le ipo- e le iperglicemie anche durante il sonno, l'attività fisica, l'attività lavorativa e in altre situazioni. L'*holter* glicemico può risultare particolarmente utile in gravidanza, nei pazienti pediatrici, nei pazienti in terapia con micro-infusore e nelle emergenze metaboliche.

I dispositivi consentono sia di avere le informazioni in tempo reale, sia di registrare le glicemie rilevate, che possono essere visualizzate come valori numerici e come grafici di immediata lettura. Il diabetologo, pertanto, può valutare in ambulatorio il profilo glicemico reale del paziente, al fine di ottimizzare la terapia e, quindi, il compenso glicemico. L'utilizzo del control-

lo in continuo del glucosio, con conseguenti adeguate correzioni terapeutiche, ha come effetto, infatti, la riduzione dei livelli di HbA_{1c} di 0.3 punti percentuali rispetto alla terapia basata sul SMBG. Riduce, inoltre, la severità e la durata degli eventi ipo- ed iperglicemici, anche grazie al fatto che gli strumenti sono corredati di allarmi programmabili. Esso permette poi ai pazienti di verificare come l'alimentazione, l'esercizio fisico, i medicinali e lo stile di vita influiscano sui livelli di glicemia, divenendo anche strumento per l'educazione del diabetico. Il paziente deve essere, comunque, adeguatamente informato e formato per poter trarre vantaggio dalle informazioni ottenute, soprattutto per evitare che presti attenzione eccessiva ad ogni piccola variazione nelle determinazioni del glucosio e intervenga troppo spesso con variazioni nella terapia e nell'ingestione di alimenti.

Figura 20.b.1.



Esempio di andamento delle fluttuazioni glicemiche durante le 24 ore: confronto tra monitoraggio con *stick* (quadrati neri) e *holter* glicemico (linea continua rossa). Il monitoraggio in continuo consente di rilevare fluttuazioni della glicemia che possono non essere evidenziate con il glucometro. I rombi verdi indicano pasti principali e spuntini, i triangoli azzurri le somministrazioni di insulina.

Prospettive future

Allo stato attuale, l'utilizzo dei sensori del glucosio è complementare rispetto all'automonitoraggio tradizionale (SMBG). La disponibilità di sensori non invasivi e di lunga durata per il controllo in continuo della glicemia anche per periodi di tempo più lunghi, senza la necessità di dover effettuare multiple calibrazioni con sangue capillare, con migliore accettazione da parte del paziente e, verosimilmente, costi più contenuti, potrebbe portare in futuro al pieno superamento del glucometro.

In futuro, grazie all'abbinamento del sensore del glucosio con micro-pompe programmabili per l'infusione di insulina, provviste di *software* in grado di adattare l'infusione di insulina ai valori glicemici rilevati in tempo reale, sarà possibile la chiusura dell'ansa, che porterà alla disponibilità di un vero e proprio pancreas artificiale miniaturizzato.

Bibliografia

- Klonoff DC. Continuous glucose monitoring. Roadmap for 21st century diabetes therapy. *Diabetes Care*, 2005, 28: 1231-9.
- Deiss D, et al. Improved glycemic control in poorly-controlled patients with type 1 diabetes using real-time continuous glucose monitoring. *Diabetes Care* 2006, 29: 2730-2.
- Maran A et al. Continuous subcutaneous glucose monitoring in diabetic patients. A multicenter analysis. *Diabetes Care* 2002, 25: 347-52.
- Boland E et al. Limitations of conventional methods of self-monitoring of blood glucose. Lessons learned from 3 days of continuous glucose sensing in pediatric patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2001, 24: 1858-62.
- Garg SK et al. Relationship of fasting and hourly blood glucose levels to HbA1c values. Safety, accuracy, and improvements in glucose profiles obtained using a 7-day continuous glucose sensors. *Diabetes Care* 2006, 29: 2644-9.
- Chico A et al. The continuous glucose monitoring system is useful for detecting unrecognized hypoglycemia in patients with type 1 and type 2 diabetes but is not better than frequent capillary glucose measurements for improving metabolic control. *Diabetes Care* 2003, 26: 1153-7.
- Garg S K et al. Improvement in glycemic excursions with a transcutaneous, real-time continuous sensor. A randomized controlled trial. *Diabetes Care* 2006, 29: 44-50.
- Deiss D et al. Results of a randomised controlled cross-over trial on the effect of continuous subcutaneous glucose monitoring (CGMS) on glycaemic control in children and adolescents with type 1 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2006, 114: 63-7.
- Rossetti P et al. Evaluation of the accuracy of a microdialysis-based glucose sensor during insulin-induced hypoglycemia, its recovery, and post-hypoglycemic hyperglycemia in humans. *Diab Technol Ther* 2006, 8: 326-37.
- Weinzimer SA. PENDRA: the once and future noninvasive continuous glucose monitoring device? *Diab Technol Ther* 2004, 6: 442-4.

21. Test batteriologici nel “piede diabetico”

Antimo Aiello

Premessa

L'infezione del piede nel paziente diabetico è sempre potenzialmente pericolosa per l'arto e richiede una terapia adeguata e non dilazionabile, basata su una diagnosi eziologica precisa. Posta la diagnosi clinica, la microbiologia riveste un ruolo fondamentale per identificare con esattezza il o i germi patogeni interessati.

Flora microbica interessata

Ulcere

Lo *Stafilococco Aureo* è il germe più virulento e più frequentemente isolato nelle infezioni del piede.

Anche gli *Streptococchi* rivestono un ruolo importante nelle infezioni delle estremità inferiori.

Pseudomonas viene frequentemente isolato da lesioni trattate localmente con medicazioni umide.

Le infezioni profonde tendono ad avere una flora più complessa, polimicrobica, composta da germi aerobi e anaerobi (*Peptococchi* e *Bacteroides* spp).

Il numero di germi è generalmente più basso nelle ulcere stabilmente cronicizzate. Nelle lesioni cronicizzate crescono gram-negativi (spesso *Enterobacteriacee*): è controversa la necessità di un esame colturale e di una conseguente terapia antibiotica, che dovrebbero essere riservate ad ulcere complicate da estesa cellulite circostante, linfangite o segni sistemici di infezione.

Nelle ulcere con o senza segni di infezione possono essere presenti funghi, che raramente richiedono interventi terapeutici.

Nel tempo la flora predominante tende a subire variazioni in relazione a fattori ambientali: nel corso della terapia antibiotica è possibile la sostituzione di germi sensibili con specie resistenti.

Fistole

Più comunemente le infezioni fistolose sono causate da *Stafilococco Aureo*, Coliformi e *Pseudomonas*, che causano osteomieliti, linfadeniti ed ascessi.

Spesso l'infezione è polimicrobica ed i germi che colonizzano la porzione cutanea della fistola sono differenti da quelli annidati nella profondità dei tessuti. Per tale motivo, le colture da prelievi effettuati all'orifizio o nella porzione esterna del tragitto fistoloso possono dare risultati fuorvianti.

Nel caso venga effettuata un'esplorazione chirurgica, è opportuno fare un prelievo per coltura nel punto più profondo che è possibile raggiungere.

Onicomicosi

L'infezione dei tessuti dell'unghia e peri-ungueali del letto dell'unghia è favorita dalle immersioni frequenti delle mani nell'acqua. Colpisce più frequentemente le unghie dei piedi che quelle delle mani. Si presenta sotto due quadri clinici: la perionissi (o paronichia) e l'onissi. La perionissi candidosica è una tumefazione rossa dolorosa, che compare alla base dell'unghia. La diagnosi eziologica può essere confermata prelevando il pus che fuoriesce spontaneamente o per pressione. Può essere associata una sovra-infezione da stafilococchi o da *Pseudomonas* spp.

Le infezioni delle unghie da dermatofiti hanno patogenesi, evoluzione e terapia particolari e vengono indicate con il termine di *tinea unguium*.

Il resto delle infezioni sono causate da un gruppo eterogeneo di lieviti e funghi filamentosi.

I principali lieviti implicati sono *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Trichosporon beigelii*.

Le unghie distrofiche possono contenere un'abbondante flora di funghi e batteri saprofiti da contaminazione secondaria.

Raccolta del campione

Un'appropriata raccolta del campione per l'allestimento della coltura rappresenta il più importante passaggio per la conferma definitiva del ruolo di un dato micro-organismo nell'eziologia del processo infettivo.

Un campione raccolto in modo inadeguato può fare fallire l'isolamento del micro-organismo responsabile, ed il ritrovamento di contaminanti può condurre ad una terapia errata o persino dannosa.

Concetti fondamentali

*Ogniquale sia possibile, si devono **effettuare i prelievi prima della somministrazione di antibiotici.***

La somministrazione di antibiotici non preclude tuttavia l'isolamento di altre specie batteriche dai campioni clinici, che non dovrebbero quindi venire respinti soltanto per questo motivo.

L'azione di molti antibiotici può essere batteriostatica e non battericida, e spesso i micro-organismi possono essere isolati quando vengono trasferiti in un ambiente privo di antibiotici (terreno di coltura fresco). Inoltre, la concentrazione dell'antibiotico nel focolaio d'infezione può essere inferiore alla minima concentrazione inibente per il micro-organismo in questione (in questo caso l'isolamento in coltura non costituisce un problema). Per questo motivo, si dovrebbe sempre effettuare un tentativo di isolamento da questi focolai, sebbene se ne debba tener conto nell'interpretazione dei risultati che devono essere accettati con riserva nel referto scritto.

*Il **campione** per la coltura deve provenire **dalla zona dove è in atto l'infezione** e deve essere raccolto con il **minimo di contaminazione** da parte di tessuti, organi o secrezioni adiacenti.*

Un problema nella raccolta dei campioni è la difficoltà nell'effettuare isolamenti dalla parte profonda delle ferite o dal drenaggio delle fistole senza toccare la pelle adiacente. Vanno sempre privilegiati i campioni di tessuto ottenuti con tecnica asettica ed in profondità nella lesione, visto che spesso contengono solo i veri patogeni: per ottenere frustoli di tessuto da analizzare, utilizzare un accurato *curettage* con bisturi della lesione.

Nella diagnosi eziologica dell'osteomielite va obbligatoriamente utilizzato un campione di osso. Nel caso che per questioni contingenti debbano essere adoperati i tamponi, occorre effettuare preliminarmente uno sbrigliamento ed una detersione della lesione.

*Si deve **prelevare una quantità di materiale sufficiente** per permettere l'esecuzione delle tecniche di coltura richieste.*

*Si devono impiegare **dispositivi di raccolta idonei**, onde garantire un isolamento ottimale dei micro-organismi.*

Per la raccolta di campioni per coltura vengono frequentemente usati i tamponi, che sono soddisfacenti in molti casi, a patto che vengano prese determinate precauzioni:

- poiché i residui di acidi grassi sulle fibre di cotone possono inibire alcuni ceppi di batteri molto esigenti, si raccomanda di impiegare tamponi con punta di alginato di calcio, Dacron, o poliestere;
- i campioni non dovrebbero rimanere a contatto con il tampone per un tempo più lungo di quello strettamente necessario.

Per la raccolta di campioni in cui si debbano ricercare batteri anaerobi, l'uso dei tamponi è scon-

sigliato. Si raccomanda, piuttosto, di effettuare il prelievo mediante aspirazione con ago e siringa. In entrambi i casi, i campioni, una volta prelevati, debbono essere protetti dall'ossigeno atmosferico e dall'essiccamento fino a quando possono essere trattati in laboratorio (*vedi oltre*).

Norme da seguire per una corretta esecuzione del prelievo per le lesioni nelle quali sono imputati miceti.

- Assicurarsi che prima del prelievo non sia stato effettuato un trattamento antifungino locale.
- Il prelievo deve essere eseguito nella zona della lesione dove ci sono filamenti vivi. I materiali più idonei sono:
 - pezzi di unghia tagliati nella zona di contatto con la parte sana;
 - materiale ottenuto grattando sotto l'unghia nella stessa zona;
 - il materiale ottenuto nelle leuconichie superficiali grattando tutto il tessuto bianco opaco e scartando la parte più superficiale.
- Nei casi difficili, utilizzare una *curette* di Skele, strumento chirurgico formato da un cucchiaino affilato all'estremità.
- Pulire la cute con etanolo al 70%.
- Prelevare il campione dal centro e dalla periferia della lesione.
- Raccogliere il materiale in una piastra di Petri, evitando l'umidità e non confondendo i materiali originati da due diversi punti di prelievo (soprattutto le unghie di mani e piedi).
- Il materiale si ottiene grattando la lesione dal centro alla periferia, particolarmente ai margini, con un bisturi sterile o uno strumento simile.
- Il materiale da lesioni umide e pustole può essere prelevato con un tampone, eventualmente dopo lavaggio con una soluzione acquosa sterile in caso di sovra-infezione batterica.

Trasporto del campione

A prescindere dal sistema di trasporto usato, il principio basilare è quello di **ridurre al minimo il tempo tra la raccolta del materiale e l'inoculo nel terreno**, onde mantenere il campione in condizioni il più possibile simili a quelle originarie, riducendone al minimo il deterioramento. Pertanto, i campioni devono essere inviati al laboratorio il più presto possibile. In ambiente ospedaliero si raccomanda di non superare il limite di 2 ore tra il prelievo del campione e la consegna al laboratorio. Questo limite di tempo diventa un problema per i campioni raccolti negli ambulatori medici, e spesso si rende necessario impiegare un terreno di trasporto: i più frequentemente usati sono quelli di Stuart, di Amies e di Carey-Blair. Il terreno di trasporto di Stuart è costituito essenzialmente da una soluzione tampone priva di carboidrati, peptoni ed altre sostanze nutritive, che ha il compito di preservare la vitalità dei batteri durante il trasporto, senza che vi sia una significativa moltiplicazione dei micro-organismi. È necessario inoltre evitare condizioni ambientali sfavorevoli durante il trasporto, come l'esposizione a caldo o freddo eccessivi o l'eccessivo essiccamento.

Caratteristiche generali dei contenitori

Per la raccolta di tutti i campioni si devono usare contenitori **sterili**.

I contenitori dei prelievi dono essere **adeguatamente etichettati**.

Per consentire ai microbiologi del laboratorio di impiegare le tecniche di coltura più idonee e per fornire ai medici un'informazione completa e accurata, ogni contenitore di prelievi deve avere un'etichetta leggibile con le seguenti informazioni essenziali:

NOME – COGNOME _____
 ID # _____
 ORIGINE _____
 MEDICO _____
 DATA/ORA _____

Vi deve essere riportato il nome completo del paziente, evitando l'uso delle iniziali. A seconda delle circostanze, il numero di identificazione può essere quello dell'ospedale, della clinica, del reparto, o l'indirizzo di casa, o il numero della tessera sanitaria.

Il nome del medico, o la denominazione del reparto, sono necessari nel caso di un consulto, o quando sia richiesta una risposta urgente. L'origine del campione dovrebbe essere riportata nell'eventualità che siano necessari particolari terreni di coltura.

Infine, sull'etichetta devono comparire la data e l'ora del prelievo, in modo da poter controllare che il campione sia seminato entro un limite di tempo accettabile.

Altre informazioni potenzialmente utili sono la diagnosi clinica e le eventuali somministrazioni di antibiotici.

Contenitori per biopsie

I campioni di tessuto per la coltura dovrebbero essere inviati sollecitamente al laboratorio avvolti in garza sterile o in un contenitore sterile adeguatamente tappato. Campioni in formalina non sono utilizzabili per le colture, a meno che il tempo di esposizione sia stato breve e la coltura possa essere effettuata partendo da una porzione di tessuto non esposta alla formalina.

Contenitori per il trasporto di campioni in anaerobiosi**Provette o bottiglie con tappo per campioni liquidi**

Recipienti riempiti con CO₂ e privi di ossigeno.

Bottiglie asciutte per campioni liquidi, recipienti contenenti agar non nutritivo, o terreno liquido addizionati con una sostanza riducente e l'indicatore resazurina.

Ago e siringa per aspirati

Si possono inviare al laboratorio campioni liquidi o essudato fresco, dopo aver attentamente espulso le bolle d'aria e piantato l'ago in un tappo di gomma. Questo metodo dovrebbe essere usato solo se si può portare immediatamente il campione al laboratorio.

Recipienti per trasporto di tessuti

Si possono mettere i tessuti su una garza inumidita dentro una capsula di Petri, oppure dentro un recipiente con tappo a vite allentato e trasportarli entro un "biobag" di tipo A (sistema per coltura anaerobica), un recipiente di plastica contenente un generatore di gas privo di ossigeno, un catalizzatore ed un indicatore di ossido-riduzione.

Sistema "a due provette" per tamponi

La prima provetta contiene un tampone sterile in CO₂ o N₂ privi di ossigeno; la seconda può

contenere alcune gocce di soluzione di sali ridotti e un gas privo di ossigeno, oppure agar molle contenente un agente riducente ed un indicatore del potenziale di ossido-riduzione.

Terreno con riducente

Si può utilizzare una provetta che abbia uno strato abbastanza profondo di terreno di Stuart, di Amies o di terreno modificato di Cary-Blair, dal momento che negli strati più profondi il potenziale di ossido-riduzione è sufficientemente basso da conservare la vitalità della maggior parte degli anaerobi che si incontrano nella pratica clinica.

La provetta Port-A-Cul della BBL è un esempio di questo sistema: anche se la superficie del terreno viene ossidata, come risulta dal viraggio del colore dell'indicatore, l'azione della sostanza riducente contenuta nel terreno la riporta in condizioni di anaerobiosi subito dopo aver rimesso il tappo.

Contenitore per miceti

Raccogliere il materiale in una piastra di Petri, evitando l'umidità e non confondendo i materiali originati da due diversi punti di prelievo (soprattutto le unghie di mani e piedi).

Bibliografia

- Koneman EW. Testo Atlante di Microbiologia Diagnostica. 1995 Antonio Delfino Editore.*
- Giacoli G, Manzo E. Infezioni batteriche e micotiche della cute. 1995 Mascia Brunelli Edizioni Scientifiche.*
- Gruppo di Studio Internazionale sul Piede Diabetico. Documento di consenso internazionale sul piede diabetico Ed. 2006.*
- Pellizzer G, Strazzabosco M, et al. Deep tissue biopsy vs. superficial swab culture monitoring in the microbiological assessment of limb-threatening diabetic foot infection. Diabet Med 2001, 18: 822-7.*
- Lipsky BA, Pecoraro RE, Wheat JL. The diabetic foot: soft tissue and bone infection. Infect Dis Clin North Am 1990, 4: 409-32.*

22. Test per la valutazione della funzionalità renale nel paziente diabetico

Anna Pia, Andrea Guarnieri

La Nefropatia Diabetica

La compromissione della funzione renale è una delle principali complicanze a lungo termine del diabete mellito ed attualmente è la causa più importante di insufficienza renale terminale (*end stage renal disease* - ESRD) nel mondo occidentale. La nefropatia diabetica si manifesta nel **20-40% dei pazienti con DM-T1 o DM-T2** entro 20-25 anni dall'esordio della malattia. Mentre nel DM-T1 (*cf. capitolo 2.a.1. a pag. 23*) il danno renale è pressoché sempre conseguenza di un quadro di nefropatia diabetica, nel DM-T2 (*cf. capitolo 2.a.2. a pag. 27*) possono essere presenti altri tipi di nefropatia, in una percentuale variabile dal 10 al 50% a seconda delle diverse casistiche.

La **patogenesi** della malattia è complessa e, pur essendo indiscusso il ruolo delle alterazioni metaboliche, numerosi studi suggeriscono l'esistenza di una "predisposizione genetica". Schematicamente si possono distinguere **5 stadi nell'evoluzione** della nefropatia diabetica (*cf. tabella 22.1.*), in relazione alla durata della malattia.

Tabella 22.1.
Stadi evolutivi della nefropatia diabetica

Stadio	Caratteristica	Filtrato glomerulare	Pressione arteriosa	Esordio
I	Iper-filtrazione	↑	Normale	Alla diagnosi
II	Alterazioni strutturali	↑ o normale	Normale / lieve ↑	Pochi anni
III	Microalbuminuria (nefropatia incipiente)	Variabile	↑	5-10 anni
IV	Macroalbuminuria (nefropatia conclamata)	↓	↑↑	10-20 anni
V	Insufficienza renale	↓↓ (< 15 mL/min)	↑↑	25-30 anni

Nel DM-T2 la **storia naturale** della malattia renale è meno definita rispetto al DM-T1, poiché spesso non è noto il momento d'insorgenza del diabete: talvolta, già alla diagnosi può essere presente micro- o macro-albuminuria.

Oltre a progredire fino allo stadio di ESRD, la nefropatia diabetica è spesso associata ad ipertensione e ad elevata morbilità e mortalità cardiovascolare, con notevoli ripercussioni sul piano sociale ed economico. Una diagnosi precoce ed interventi mirati e tempestivi sono in grado di ridurre l'insorgenza, modificando significativamente la progressione della malattia.

Diagnosi della nefropatia diabetica

Determinazione dell'albuminuria: l'aumentata escrezione urinaria di albumina è spesso il primo segno di nefropatia diabetica (*cf. capitolo 3.d. a pag. 59*).

Determinazione del filtrato glomerulare (*glomerular filtration rate* – GFR). È il parametro fondamentale per valutare l'entità della compromissione renale. Tale dato deve essere valutato almeno annualmente nei pazienti normo-albuminurici e più frequentemente in presenza di nefropatia incipiente o conclamata.

Imaging renale. L'ecografia è l'esame di *screening*: è necessaria alla prima diagnosi di micro-

macroalbuminuria o in caso di alterazioni del filtrato glomerulare. È utile per rilevare alterazioni morfologiche potenzialmente correggibili o in grado di influenzare la progressione del danno renale (es. malformazioni delle vie urinarie, rene “piccolo”, cisti renali, litiasi renale, idronefrosi, ecc.).

La velocità di filtrazione glomerulare (GFR)

Definizione

Le malattie renali croniche possono presentarsi con vari quadri clinici, ma sono in genere caratterizzate da un progressivo declino della funzione renale, al quale corrisponde una riduzione del filtrato glomerulare. Il GFR equivale alla somma della funzione dei singoli nefroni; pertanto, la sua misura è un indice indiretto della massa renale funzionante.

Il valore normale per una superficie corporea di 1.73 m² è, approssimativamente, di 120 mL/min e dipende da:

- età: dopo i 40 anni c'è una riduzione fisiologica del GFR di 1 mL/min/anno
- peso corporeo: riduzione in presenza di ridotta massa muscolare
- sesso: maggiore nel maschio.

La misura del GFR individua i diversi livelli di compromissione funzionale renale, che vengono normalmente classificati secondo gli stadi K/DOQI proposti dalla *National Kidney Foundation*.

Tabella 22.2.
Stadi dell'Insufficienza Renale Cronica (IRC)

Stadio	Descrizione	GFR (mL/min)
1	*Danno renale con GFR normale o ↑	≥ 90
2	*Danno renale con lieve ↓ del GFR	60 - 89
3	Moderata ↓ GFR	30 - 59
4	Grave ↓ GFR	15 - 29
5	Insufficienza renale terminale	≤ 15 (o dialisi)

* Il danno renale è definito come anomalità su urine, sangue o documentazione iconografica patologica.

Il GFR nei pazienti diabetici va valutato indipendentemente dalla presenza o meno di albuminuria. Infatti, in una notevole percentuale di adulti con DM-T1 e DM-T2 se ne può osservare un significativo declino in assenza di un'aumentata escrezione urinaria di albumina: la diagnosi di IRC potrebbe quindi essere ritardata in un considerevole numero di pazienti diabetici se fossero valutati solo per l'albuminuria.

Misura del GFR

Il GFR non è misurabile direttamente, ma può essere stimato con la *clearance* di un marcatore, che deve essere una sostanza (endogena o esogena) liberamente filtrata dal glomerulo (la concentrazione nell'ultrafiltrato non differisce cioè da quella plasmatica), senza subire successivi processi di escrezione, riassorbimento o metabolizzazione nel tubulo renale. Dati questi presupposti, la quantità di tale sostanza eliminata nelle urine nell'unità di tempo (Concentra-

zione urinaria [U] x Volume urinario [V]) è pari a quella contenuta nell'ultrafiltrato glomerulare prodottosi nello stesso tempo (Concentrazione plasmatica [P] x GFR).

Se
allora

$$U \text{ (mg/dL)} * V \text{ (mL/min)} = P \text{ (mg/dL)} * \text{GFR}$$

$$\text{GFR} = (U * V) / P$$

Il valore individuato da questa formula prende il nome di “*clearance*” ed **esprime** in mL/min **il volume di plasma che viene totalmente depurato dalla sostanza nell'unità di tempo.**

Clearance dell'inulina. Lo *standard* ottimale per la determinazione del GFR è la *clearance* dell'inulina, un polimero del fruttosio, fisiologicamente inerte, che ben risponde ai presupposti del marcatore ideale di filtrazione glomerulare. Il suo utilizzo non è tuttavia mai entrato nella pratica clinica quotidiana, poiché la metodica è invasiva, tecnicamente impegnativa e costosa: richiede infatti un'infusione endovenosa continua per mantenere costante la concentrazione plasmatica, numerosi prelievi ematici e la cateterizzazione vescicale per assicurare una raccolta corretta delle urine.

Clearance di radionuclidi. Il GFR calcolato con metodica radioisotopica prevede la somministrazione di alcune molecole, marcate con radionuclidi, il cui comportamento, in termini di manipolazione renale, è sovrapponibile a quello dell'inulina. I traccianti più comunemente usati sono ⁵¹Cr-EDTA, ¹³¹I-iotalamato e ^{99m}Tc-DTPA. Possono essere utilizzati con una metodica analoga a quella dell'inulina, anche se la tecnica più diffusa è quella a “singola dose”, che prevede la somministrazione endovenosa del tracciante ed il successivo calcolo del GFR in base alle curve di decadimento della radioattività plasmatica ottenute con prelievi ematici seriati. È un metodo semplice, accurato e con un'ottima riproducibilità nel singolo paziente, ma è utilizzabile solo dove esiste una Medicina Nucleare.

Clearance della creatinina. La creatinina endogena, di gran lunga il marcatore di GFR più diffuso in clinica, è una molecola derivata dal metabolismo della creatina del muscolo scheletrico e dall'introito dietetico di carne; è rilasciata nella circolazione con un ritmo relativamente costante ed ha una concentrazione plasmatica stabile; è filtrata dal glomerulo e non è riassorbita né metabolizzata dal rene. La *clearance* della creatinina è usualmente determinata con una raccolta delle urine delle 24 ore, poiché una raccolta più breve potrebbe dare risultati meno accurati.

Il *range* di normalità, riferito ad un soggetto di 70 Kg alto 1.70 m, è compreso tra 90 e 120 mL/min.

Limiti della misura del GFR con la *clearance* della creatinina

- Raccolta inaccurata della diuresi: poiché la formula della *clearance* (creatininuria * volume urinario/creatininemia) ha il volume urinario al numeratore, una raccolta incompleta delle urine delle 24 ore sottostimerà il GFR, mentre, al contrario, una raccolta prolungata oltre le 24 ore sovrastimerà il dato.
- Secrezione dal tubulo renale di parte della creatinina plasmatica: in condizioni di normale funzione renale questa quota è trascurabile, ma in presenza di insufficienza renale cronica può aumentare in modo significativo, portando ad una sovrastima della concentrazione urinaria e, conseguentemente, del GFR (aumenta uno dei fattori del numeratore).
- La formula della *clearance* prevede una concentrazione della molecola costante nel tempo della raccolta urinaria (normalmente 24 ore): non è pertanto utilizzabile in presenza di modificazioni acute del GFR (insufficienza renale acuta).

Creatininemia. Viene usata come misura indiretta del GFR ed ha il notevole vantaggio di

non richiedere la raccolta urinaria delle 24 ore: in condizioni di stabilità della funzione renale, la produzione e l'escrezione della creatinina sono costanti; pertanto, la concentrazione plasmatica è fissa e varia inversamente al GFR. Di conseguenza, un aumento della creatinemia riflette una riduzione del GFR, ossia la progressione dell'insufficienza renale.

I valori normali sono 0.8 – 1.3 mg/dL nell'uomo e 0.6 – 1.2 mg/dL nella donna, anche se sono possibili piccole differenze legate al metodo di determinazione. L'intervallo di normalità risente della massa muscolare: persone di piccola corporatura o con masse muscolari ridotte (ad esempio per la fisiologica involuzione senile) hanno valori di creatinemia ai limiti inferiori di norma.

☞ La concentrazione sierica della creatinina potrà rimanere nei limiti di riferimento anche con una riduzione significativa del GFR (ad esempio una donna anziana di 50 Kg con una creatinemia di 1.2 mg/dL ha una IRC di grado III).

Limiti della misura del GFR con la creatinemia

- Variazioni della produzione di creatinina in relazione alla dieta: riduzione con dieta vegetariana, incremento dopo pasto proteico o assunzione di integratori contenenti creatina.
- Variazioni per modifiche della massa muscolare: malnutrizione, calo ponderale, amputazioni.
- Interferenze farmacologiche: cimetidina e cotrimoxazolo riducono la secrezione tubulare di creatinina, con conseguente incremento della concentrazione plasmatica non legato ad una reale riduzione del GFR.
- Variazioni della secrezione tubulare: in presenza di una lieve riduzione del GFR, la concentrazione plasmatica della creatinina può aumentare solo di poco per la saturazione dei siti di legame tubulare, con conseguente incremento della quota di secrezione tubulare. L'effetto finale potrà essere pertanto una creatinemia ancora nei limiti della norma con un GFR già sensibilmente ridotto.
- Interferenze nella metodica: usando la metodica colorimetrica, altri cromogeni, come l'acido aceto-acetico prodotto nella chetoacidosi diabetica, possono essere falsamente letti come creatinina. In queste condizioni, la creatinemia può apparentemente aumentare da 0.5 ad oltre 2 mg/dL con rapida reversibilità con il trattamento insulinico.

Equazioni di stima del GFR

Queste equazioni migliorano il valore predittivo della misura della creatinemia, poiché tengono conto di variabili cliniche e demografiche che ne variano il valore in presenza di un GFR immutato.

Un ulteriore vantaggio è la loro relativa accuratezza nella misura del GFR senza la necessità di una raccolta delle urine delle 24 ore.

Non bisogna inoltre dimenticare che per una corretta gestione del paziente nefropatico spesso non è indispensabile la conoscenza del valore esatto del GFR: ad esempio, se stimiamo il GFR 40 mL/min, uno scostamento del 10 – 15% (in più o in meno) dal valore reale aggiungerà ben poco alle scelte terapeutiche.

Equazione di Cockcroft – Gault (C-G). La formula (*cf* capitolo 17 a pag. 202) consente di stimare la *clearance* della creatinemia tenendo conto dei seguenti parametri: creatinemia, peso, età, sesso; tiene quindi conto del fatto che la produzione di creatinina aumenta con l'incremento della massa muscolare e si riduce con l'età.

Equazione di Levey. La formula (*cf* capitolo 17 a pag. 206) è stata elaborata dai dati dello studio MDRD (*Modification of Diet in Renal Disease*) e tiene conto dei seguenti parametri: creatinemia, età, sesso, razza.

Le formule per il calcolo del GFR sono disponibili anche su siti *web*:

- http://www.kidney.org/professionals/KLS/gfr_calculator.cfm
- <http://www.nephron.com/mdrd/default.html>

Limiti delle equazioni

- Le equazioni basate sulla determinazione della creatinemia non sono attendibili in presenza di condizioni in grado di modificare la concentrazione della creatinemia (*vedi sopra*).
- Nella formula C-G è necessaria una valutazione della massa magra: l'eventuale presenza di edemi può dare valori falsamente elevati di GFR.
- La formula C-G tende a sovrastimare il GFR nelle persone obese e a sottostimarlo in quelle sottopeso e nell'età avanzata.
- La formula MDRD tende a sottostimare il valore del GFR nei soggetti di sesso femminile ed in presenza di una funzione renale normale.

Raccomandazioni ADA

1. In tutti i pazienti con diabete, indipendentemente dal grado di escrezione urinaria di albumina, si deve misurare la creatinemia almeno una volta all'anno per la stima del GFR. *Livello di evidenza: E (Consenso di esperti o esperienza clinica).*
2. La creatinemia non deve essere utilizzata come unica misura di funzionalità renale, ma deve invece essere utilizzata per stimare il GFR e stadiare il livello di malattia renale cronica. *Livello di evidenza: E (Consenso di esperti o esperienza clinica).*
3. L'ottimizzazione del compenso glicemico ($HbA_{1c} < 7\%$) e del controllo pressorio (PA < 130/80 mm Hg) possono ridurre il rischio e/o rallentare la progressione della nefropatia diabetica. *Livello di evidenza: A (evidenze chiare provenienti da studi clinici controllati randomizzati ben condotti, generalizzabili e di alta qualità).*

Bibliografia

- National Kidney Foundation: K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification. Am J Kidney Dis 2002, 39: S1.*
- Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. Nephron 1976, 16: 31-41.*
- Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, et al. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Ann Intern Med 1999, 130: 461-70.*
- ADA. Standards of medical care in diabetes - 2007. Diabetes Care 2007, 30: S19-21*

23. Test per l'inquadramento della dislipidemia secondaria al diabete mellito di tipo 1 e 2

Alessandro Scorsone

Premessa

I grassi (lipidi) assunti con il cibo sono assorbiti a livello intestinale e trasportati nel circolo ematico (via esogena), con successivo ricircolo e rimaneggiamento continui (via endogena). I lipidi plasmatici sono trasportati in associazione a proteine, dette apo-lipoproteine, formando le **lipoproteine**, all'interno delle quali vi sono sia elementi strutturali, sia recettori di membrana, sia attivatori o inibitori di sistemi enzimatici. Nella porzione più interna delle lipoproteine si trovano trigliceridi e colesterolo esterificato, mentre all'esterno sono maggiormente rappresentati fosfolipidi e colesterolo libero. In relazione alla loro densità, diametro, composizione lipidica e comportamento all'elettroforesi, si possono identificare alcune classi principali di lipoproteine (cfr tab 23.1):

- i **chilomicroni**, le lipoproteine più grandi, sono costituiti soprattutto da trigliceridi e compaiono nel plasma in fase post-prandiale, perché provengono dall'assorbimento intestinale dei grassi;
- le **VLDL**, insieme alle IDL, sono ricche in trigliceridi, ma anche in colesterolo;
- le **LDL** sono più piccole delle VLDL, hanno una maggiore quantità di proteine all'interno, sono ricche in colesterolo, classicamente aterogene e di conseguenza correlate al rischio vascolare;
- le **HDL** sono le più piccole e pesanti, costituite per il 45% da proteine; un loro valore basso si associa ad un rischio vascolare più alto.

Tabella 23.1.

	DENSITÀ (Kg/L)	Lipidi interni	Diametro (nm)	Mobilità elettroforetica	Apo- lipoproteine
Chilomicroni	< 0.95	TG	80-500	Nessuna	B-48, C, E, A
VLDL	0.96-1.006	TG, CE	30-80	Pre-β	B-100, C, E
IDL	1.006-1.019	CE, TG	25-30	Lenta pre-β	B-100, C
LDL	1.019-1.063	CE	19-25	β	B-100
HDL	1.063-1.210	CE	6-11	α	A-1, A-II, C, E
Lp(a)	1.055-1.085	CE	25-30	Pre-β	B-100, Lp(a)

CE: colesterolo esterificato; TG: trigliceridi; VLDL: *Very Low Density Lipoproteins*; LDL: *Low Density Lipoproteins*; IDL: *Intermediate Density Lipoproteins*; HDL: *High Density Lipoproteins*; Lp(a): Lipoproteina a.

Da un punto di vista dinamico, la formazione e il ricircolo dei lipidi è un continuo susseguirsi di diverse **fasi metaboliche**.

- Nel periodo immediatamente post-prandiale, l'assorbimento dei lipidi comporta il passaggio di chilomicroni nel circolo ematico attraverso l'intestino. Un enzima, la lipoprotein-lipasi (LPL), scinde i trigliceridi in glicerolo e acidi grassi liberi (FFA), che vengono captati dai muscoli e dal tessuto adiposo. I chilomicroni residui sono catturati dal fegato attraverso sistemi di riconoscimento recettoriale e vie non recettoriali.
- Nella via endogena post-assorbitiva, le VLDL secrete dal fegato sono depauperate del loro contenuto in trigliceridi ad opera delle LPL tissutali, con incremento del contenuto relativo in colesterolo. L'insulina è un potente stimolatore della LPL. Quest'ultima trasforma le VLDL in IDL, che a loro volta all'interno del fegato vengono convertite (lipolisi) in LDL, più ricche in colesterolo.

- Le LDL circolanti, legandosi ad un recettore specifico, entrano all'interno di varie cellule, ma soprattutto negli epatociti. L'entrata delle LDL all'interno del fegato favorisce l'accumulo di colesterolo, con riduzione della sua sintesi (riduzione dell'attività dell'idrossimetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasi, enzima inibito dai farmaci ipocolesterolemizzanti come le statine).
- Esiste infine un trasporto inverso del colesterolo, mediante il quale le HDL si caricano di fosfolipidi e colesterolo nelle cellule periferiche e successivamente di trigliceridi provenienti dalle altre lipoproteine, ritornano al fegato e si convertono da ricche (HDL-2) a povere (HDL-3) per quanto riguarda il contenuto lipidico.

Le **dislipidemie** costituiscono un gruppo di alterazioni del metabolismo dei lipidi, che comprendono sia l'aumento (iperlipoproteinemie) che la riduzione (ipolipoproteinemie). Da un punto di vista classificativo, possono essere:

- **primitive**, causate da un'alterazione monogenica o poligenica, che interessa i geni che regolano il metabolismo delle lipoproteine;
- **secondarie**, che dipendono, invece, da una condizione morbosa primitiva sottostante o dall'assunzione di farmaci.

Nell'ambito dell'inquadramento diagnostico delle dislipidemie, la determinazione dell'assetto lipidico quantitativo non rende conto della componente lipoproteica alterata, ma fornisce solo un inquadramento fenotipico, che è riscontrabile tuttavia in diverse condizioni cliniche. Nella tabella 23.2 è riportata la classificazione fenotipica di Fredrickson, ripresa poi dall'OMS.

Tabella 23.2.
Classificazione fenotipica delle iperlipemie

		I	IIa	IIb	III	IV	V
Fenotipo	Siero	Creoso con infranatante limpido	Limpido	Limpido o legg. torbido	Torbido con piccolo strato cremoso	Torbido	Creoso con infranatante torbido
Lipidi	Coolest	N o ↑	↑ o ↑↑	↑	↑	N o ↑	N o ↑
	TG	↑↑	N	↑	↑	↑ o ↑↑	↑↑
Rapporto CT/TG		< 0.1	< 1.5	1.0-2.7	0.3-1.0	0.2-1.0	< 0.4
Lipoproteine	KM	++	Assenti	Assenti	++	Assenti	++
	VLDL	N o ↑↑	N	↑	β-VLDL	↑ o ↑↑	↑↑
	LDL	N o ↑	↑ o ↑↑	↑	N o ↑	N o ↑	N o ↑
	HDL	↓	N o ↓	N o ↓	N o ↓	N o ↓	↓

CT: colesterolo totale; TG: trigliceridi; KM: chilomicroni; N: normale

La tabella 23.3 riporta la classificazione genetica, che, quando possibile, consente un inquadramento eziologico più corretto.

Tab. 23.3.
Classificazione genetica delle iperlipemie

Genetica	Fenotipo	Ereditarietà	Prevalenza
Iperchilomicronemia	I o V		
Deficit omozigote LPL		AR	1:1.000.000
Deficit apo C-II		AR	Molto rara
Inibitore familiare LPL		AD	Molto rara
Iper-β-lipoproteinemia	IV (o V)		
Ipertrigliceridemia familiare		AD	Comune
Iperlipidemia familiare combinata (o a fenotipi multipli)	IIa, IIb, o IV	AD? Oligogenica	1-2:100 Comune (?)
Iper-apo β -lipoproteinemia		?	1:500
Deficit eterozigote LPL		---	
Dis-β-lipoproteinemia	IIa o IIb	AR	1-5:5000
		AD	Rara
Iper-β-lipoproteinemia	IIa o IIb		
Ipercolesterolemia familiare		AD	
Ipercolesterolemia familiare recessiva		AR	
Ipercolesterolemia poligenica		Poligenica	5:100
Iperlipidemia familiare combinata (o a fenotipi multipli)		AD? Oligogenica	1-2:100 1:500
Apo-B difettiva familiare			Variabile
β -sitosterolemia			Molto rara
Iper- Lp(a) lipoproteinemia	---	AD	Comune
Iper-α-lipoproteinemia	---	?	1:100

Apo: apo-lipoproteina; AD: autosomico dominante; AR: Autosomico recessivo; LPL: lipoprotein-lipasi.

Dislipidemie e diabete

Tra le dislipidemie secondarie, quella del paziente diabetico, soprattutto di tipo 2, riveste un ruolo importante per il suo impatto sulla mortalità cardiovascolare.

Le alterazioni lipidiche in corso di diabete mellito sono variabili, in relazione al tipo di diabete mellito.

Nel **DM-T1** le alterazioni lipidiche sono in relazione al grado di compenso glicemico:

- in fase di scompenso glicemico severo, è tipico il riscontro di ipertrigliceridemia (aumento di VLDL e a volte chilomicroni), con aumento di LDL e decremento del colesterolo HDL;
- il quadro lipidico torna alla normalità con il ripristino del compenso glicemico.

Nel **DM-T2** il quadro lipidico predominante è quello dell'ipertrigliceridemia, per aumentata produzione epatica di VLDL e ridotta rimozione da parte della lipoprotein-lipasi, con riduzione dei livelli di HDL e spesso elevati valori di colesterolo non HDL (LDL + VLDL). Nei

soggetti con DM-T2, in maniera del tutto indipendente dai livelli circolanti, le LDL sono piccole e dense con un profilo aterogeno di notevole impatto sull'endotelio. Le loro piccole dimensioni e l'aumentata permanenza in circolo, a causa del loro ridotto legame con il recettore per le LDL, favoriscono inoltre la loro penetrazione nella parete arteriosa. L'alterata composizione lipidica è responsabile della loro maggiore suscettibilità all'ossidazione, processo che favorisce la loro captazione da parte dei recettori dei macrofagi e la loro deposizione all'interno della placca ateromastica.

L'ipercolesterolemia è scarsamente influenzata dall'iperglicemia e va considerata come alterazione primaria, escludendo l'ipercolesterolemia familiare (eterozigote), la poligenica (rappresenta una forma frequente di ipercolesterolemia isolata) e la combinata (con ipertrigliceridemia). Nella maggior parte (85-90%) dei casi di DM-T2 i livelli di trigliceridemia sono < 400 mg/dL, con valori in genere < 200 mg/dL. Questo *pattern* lipidico può essere alterato, come nei soggetti non diabetici, dalla presenza di nefropatie e ipotiroidismo.

A conferma del ruolo dei lipidi, e del colesterolo LDL in particolare, nel rischio cardiovascolare del paziente diabetico vi sono i risultati degli studi di intervento con farmaci del tipo dei fibrati o delle statine in prevenzione primaria o in prevenzione secondaria (la maggior parte), cioè rispettivamente nei soggetti senza o con pregressi eventi cardiovascolari maggiori. Nella quasi totalità questi studi non sono nati inizialmente per studiare la popolazione diabetica, ma i dati ottenuti nei sottogruppi di soggetti con DM-T2 sono stati sottoposti a valutazione successiva ("analisi *post-hoc*"). L'*Helsinki Heart Study* ha utilizzato un fibrato, il gemfibrozil, in prevenzione primaria, in 135 soggetti diabetici, ottenendo una notevole riduzione del numero di eventi nei soggetti trattati (3.4 vs. 10.5% nel gruppo placebo), anche se la differenza non raggiungeva la significatività per le ridotte dimensioni del campione. Il VA-HIT ha invece dimostrato una significativa riduzione del rischio relativo di eventi (-32%) nei soggetti diabetici trattati con lo stesso farmaco in prevenzione secondaria. Nello studio FIELD (*Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes*), che paragonava fenofibrato 200 mg/die vs. placebo in soggetti con DM-T2 con o senza precedente malattia cardiovascolare, si osservava a cinque anni una riduzione relativa del rischio dell'11 per cento (non significativa) nel gruppo trattato, mentre era significativa la sola diminuzione di infarto miocardico non fatale. Vi sono state molte discussioni sui risultati discordanti dello studio FIELD e alla fine le statine rimangono il trattamento di scelta nella maggior parte dei pazienti diabetici. Rimane quindi controversa la correlazione indipendente tra elevati livelli di trigliceridemia e malattia cardiovascolare.

Dal punto di vista del profilo di rischio cardiovascolare, il soggetto con DM-T2 va considerato come un soggetto non diabetico in prevenzione secondaria in cui si è già verificato un evento cardiovascolare maggiore. Va anche ricordato che la dislipidemia (come parte della sindrome metabolica) è spesso presente al momento della diagnosi di DM-T2, persiste nonostante la terapia ipoglicemizzante e richiede approcci specifici (dietetici, di stile di vita e farmacologici).

In generale le linee guida prevedono di raggiungere gli stessi obiettivi di livelli lipidici sia in prevenzione primaria, sia in prevenzione secondaria e vanno inclusi i soggetti con DM-T1 e proteinuria. Non esistono evidenze sul ruolo delle statine in prevenzione primaria nei pazienti con DM-T1, esposti al rischio cardiovascolare per tutta la vita.

La valutazione della dislipidemia nel soggetto con DM-T2, oltre alla determinazione di colesterolemia totale, trigliceridemia e colesterolo HDL, va sempre completata con la valutazione aggiuntiva dei livelli di colesterolo LDL, calcolabile mediante formula di Friedewald (*cf. capitolo 17 a pag. 203*).

Da un punto di vista terapeutico le strategie di intervento sulla dislipidemia nel soggetto con DM-T2 si articolano attraverso la riduzione del colesterolo LDL (primaria), l'incremento del colesterolo HDL e la riduzione delle trigliceridemia (secondaria). Gli **obiettivi terapeutici** sono pertanto:

- trigliceridemia < 200 mg/dL;
- in assenza di complicanze vascolari evidenti, LDL < 130 mg/dL;
- se un evento vascolare è già presente, LDL < 100 mg/dL;
- HDL > 40 mg/dL.

Dopo effettiva correzione delle abitudini alimentari e dello stile di vita, l'intervento sarà di tipo **farmacologico**, con statine o fibrati. Nelle condizioni di iperlipemia combinata (ipertrigliceridemia + aumento del colesterolo LDL) le statine sono la terapia farmacologica di prima scelta, in quanto sono capaci di ridurre anche i trigliceridi.

Bibliografia

- Havel R, Kane J. *Introduction: structure and metabolism of plasma lipoproteins*. In "The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease", 8th ed. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al, Eds. McGraw-Hill Book Co, New York, 2001.
- Brunzell JD, Chait A, Bierman EL. *Pathophysiology of lipoprotein transport*. *Metabolism* 1978, 27: 1109.
- Tall A, Breslow J, Rubin E. *Genetic disorders affecting plasma high-density lipoproteins*. In "The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease", 8th ed. Scriver CS, Beaudet AL, Sly WS, et al, Eds. McGraw-Hill Book Co, New York, 2001.
- Carr MC, Brunzell JD. *Abdominal obesity and dyslipidemia in the metabolic syndrome: importance of type 2 diabetes and familial combined hyperlipidemia in coronary artery disease risk*. *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89: 2601-7.
- Alexander CM, Landsman PB, Teutsch SM, et al. *NCEP-defined metabolic syndrome, diabetes, and prevalence of coronary heart disease among NHANES III participants age 50 years and older*. *Diabetes* 2003, 52: 1210-4.
- Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH, et al. *Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes*. *N Engl J Med* 2004, 350: 1495-504.
- D'Agostino RB, Grundy S, Sullivan LM, et al. *Validation of the Framingham coronary heart disease prediction scores: results of a multiple ethnic groups investigation*. *JAMA* 2001, 286: 180-7.
- Medical Guidelines for Clinical Practice for the Diagnosis and Treatment of Dyslipidemia and Prevention of Atherogenesis 2002*. The American Association of Clinical Endocrinologists. *Endocr Pract* 2000, 6: 164-213.
- Medical guidelines for clinical practice for the management of diabetes mellitus*. AACE Diabetes Mellitus Clinical Practice Guidelines Task Force of The American Association of Clinical Endocrinologists. *Endocr Pract* 2007, 13 Suppl 1: 3-68.
- National Cholesterol Education Panel. *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) Final Report*. *Circulation* 2002, 106: 3413-21.
- Grundy SM, Cleeman JI, Merz CNB, et al. *Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines*. *Circulation* 2004, 110: 227-39.

Stampato nel novembre 2007
da Cierre Grafica
via Ciro Ferrari, 5 - Caselle di Sommacampagna (VR)
tel. 045 8580900 - fax 045 8580907
grafica@cierrenet.it - www.cierrenet.it

