

Diagnosi e sorveglianza del Diabete Mellito: aggiornamento sul ruolo del laboratorio^o

A. Mosca¹, L. Benzi², R. Navalesi², C. Franzini³

¹Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, L.I.T.A., Università degli Studi di Milano

²U.O. Malattie Metaboliche e Diabetologia, Università degli Studi di Pisa

³Istituto di Scienze Biomediche Ospedale L. Sacco, Università degli Studi di Milano

^o Documento approvato dal Gruppo di Studio Diabete Mellito (Società Italiana di Biochimica e Biologia Molecolare Clinica e dal Gruppo di Studio Standardizzazione delle Metodologie di Laboratorio (Società Italiana di Diabetologia)

DIAGNOSI DEL DIABETE MELLITO E DELLE INTOLLERANZE GLUCIDICHE

Alcune recenti osservazioni epidemiologiche dimostrano che in Italia ci sono circa 2 milioni di soggetti diabetici. Di loro, circa 500.000 stanno "incubando" la malattia, ma non hanno ancora ricevuto la diagnosi (1). Questi dati, che non si distanziano molto da quelli raccolti negli Stati Uniti (16 milioni di diabetici, dei quali solo la metà con diagnosi, rif. 2), sono inquietanti e viene subito da chiedersi cosa si può fare per cercare di rivelare lo stato di malattia quanto prima. E' stato infatti dimostrato che una diagnosi precoce, se accompagnata da adeguato trattamento curativo, limita i danni della malattia riducendo significativamente lo sviluppo delle complicanze diabetiche, e serve quindi a contenere i costi di una patologia molto grave e diffusa.

Come viene quindi diagnosticato il diabete mellito? Fino a poco tempo fa, la maggior parte delle diagnosi veniva posta sulla base dei seguenti criteri (3-4): (a) presenza di sintomi classici di diabete (poliuria, polidipsia, calo ponderale), accompagnati da un aumento franco della glicemia a digiuno (FPG*) o post-prandiale; (b) glicemia a digiuno ≥ 140 mg/dL (11.1 mmol/L); (c) glicemia a 2 ore dopo carico orale di glucosio (OGTT) ≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L). Tali criteri, anche se adottati universalmente, erano imperfetti. Se infatti da un lato tutti i soggetti con glicemia a digiuno ≥ 140 mg/dL mostravano successivamente glicemia a 2 ore dopo OGTT ≥ 200 mg/dL, per il 75% dei soggetti studiati (soggetti senza alcuna precedente diagnosi di diabete) non era altrettanto vero il contrario. Si è poi anche dimostrato che l'OGTT è più sensibile della FPG nel riconoscere i diabetici di tipo 2, poiché la diminuzione della risposta insulinica all'aumentare della glicemia si sviluppa più precocemente rispetto all'aumento della glicemia a digiuno.

Poiché a partire dal 1993 si è provato inequivocabilmente che l'iperglicemia contribuisce allo sviluppo delle complicanze microvascolari del diabete e che una terapia intensiva riduce l'insorgenza a lungo termine delle complicanze (5-6), è sembrato logico definire un nuovo approccio razionale per la diagnosi che potesse essere fondato sulla base di una correlazione tra i valori di glicemia ed il rischio di successive complicanze.

Un comitato internazionale di esperti, costituito sotto il patrocinio dell'ADA nel 1995, ha rivisitato la letteratura scientifica prodotta a partire dalle precedenti raccomandazioni (3-4), ed ha elaborato un documento (7) nel quale sono stati affrontati i seguenti temi:

* Abbreviazioni non standard: ADA, American Diabetes Association; FDA, Food and Drug Administration; FPG, glicemia a digiuno; IFG, alterata glicemia a digiuno; IGT, alterata tolleranza glucidica; NGSP, National Glycohemoglobin Standardization Program; OGTT, test di tolleranza orale al glucosio; WHO, Organizzazione Mondiale della Sanità

definizione e descrizione del diabete, classificazione della malattia, criteri diagnostici e metodi per evidenziare il diabete in soggetti presumibilmente sani. Riportiamo qui di seguito alcuni punti essenziali del documento citato.

Premesso che il diabete mellito viene definito come un gruppo di malattie metaboliche caratterizzate da iperglicemia, derivante da difetti della secrezione insulinica, del suo meccanismo di azione o di entrambi, la Tab. I riporta la nuova classificazione di questo gruppo di malattie. Rispetto alla vecchia classificazione si nota l'abolizione delle denominazioni IDDM e NIDDM, ed anche delle denominazioni tipo I e tipo II (numeri in carattere romano). Fondamentalmente la base della nuova classificazione è l'eziologia della malattia, piuttosto che il suo trattamento, e resta il fatto che il diabete di tipo 2 include la forma più comune di diabete mellito, risultante da una combinazione di insulino-resistenza ed insulino-carenza. Al di là del gruppo del diabete mellito sono state individuate due altre categorie di patologie: la IFG e la IGT (quest'ultima già presente nella classificazione precedente), che rappresentano stadi caratterizzati da elevata glicemia che non possono ancora essere inquadrati come diabete mellito.

Tabella I

Classificazione eziologica dei disordini iperglicemici (da rif. 3, modificata)

Diabete mellito

- I. Diabete di tipo 1 (caratterizzato da distruzione delle β -cellule, solitamente comportante un deficit assoluto di insulina)
 - A. Immuno-mediato
 - B. Idiopatico
- II. Diabete di tipo 2 (può variare da predominantemente insulino-resistente e relativamente insulino-deficiente, a predominantemente insulino-deficiente e relativamente poco insulino-resistente)
- III. Altri tipi specifici
 - A. Difetti genetici della funzionalità β -cellulare
 - B. Difetti genetici dell'azione insulinica
 - C. Malattie del pancreas esocrino
 - D. Endocrinopatie
 - E. Malattie indotte da farmaci o sostanze chimiche
 - F. Infezioni
 - G. Rare forme di diabete immuno-mediato
 - H. Altre sindromi genetiche a volte associate al diabete
- IV. Diabete mellito gestazionale

Categorie nondiabetiche di disordini del controllo glicometabolico

- I. Alterata glicemia a digiuno (IFG)
- II. Alterata tolleranza glucidica (IGT)

Per quanto riguarda i criteri diagnostici si osservi la Tab. II. Rispetto alle precedenti raccomandazioni (3, 4) sono stati fatti i seguenti cambiamenti: (a) la misura della glicemia ha ora un ruolo di maggior rilievo rispetto all'OGTT (non più raccomandato per uso clinico, tranne che in gravidanza); (b) la precedente soglia di iperglicemia a digiuno di 140 mg/dL è stata abbassata a 126 mg/dL; (c) compare la nuova categoria di soggetti IFG; (d) i criteri diagnostici per il diabete gestazionale sono praticamente rimasti uguali a prima, e lo screening è raccomandato tra la 24^a e la 28^a settimana di gravidanza, ad eccezione di un gruppo ben definito di donne (Tab. II, nota g). Parte dei dati della Tab. II sono stati messi in forma grafica nella Fig. 1, dalla quale emerge forse più chiaramente che il metodo diagnostico preferito è la misura della glicemia a digiuno.

Per quanto concerne infine lo screening del diabete mellito in soggetti adulti presumibilmente sani, le nuove raccomandazioni danno precise indicazioni che sono riportate nella Tab. III. Vale la pena di sottolineare il fatto che le precedenti raccomandazioni scoraggiavano lo screening del diabete nei soggetti apparentemente sani, principalmente per il basso valore predittivo dell'analisi. Tuttavia, alcuni dati accumulati in questi anni hanno fatto cambiare opinione, e questi sono: (a) il brusco incremento dell'incidenza della malattia diabetica al di sopra dei 45 anni di età; (b) la dimostrazione che la retinopatia diabetica comincia a svilupparsi almeno 7 anni prima che compaiano i sintomi clinici, per i diabetici di tipo 2 (8); (c) i pazienti con diabete di tipo 2 non ancora diagnosticato sono a rischio più elevato, rispetto a quelli con diagnosi, per malattie cardiovascolari, ictus, e malattie vascolari periferiche; essi inoltre hanno maggiore probabilità di sviluppare

Tabella II
Criteri diagnostici

Diabete mellito

1. Classici sintomi^a del diabete accompagnati da una glicemia casuale^b ≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L).
oppure
2. Glicemia a digiuno^c ≥ 126 mg/dL (7.0 mmol/L).
oppure
3. Glicemia a 2 ore durante OGTT^{d,e} ≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L).

N.B.: in assenza di franca iperglicemia accompagnata da scompenso metabolico acuto, questi criteri devono essere confermati in un giorno successivo.

Diabete mellito gestazionale^f

Momento del prelievo	Glicemia	
	Esame di screening, 50 g	Esame diagnostico ^g , 100 g
Digiuno	-	105 mg/dL
1-h	140 mg/dL	190 mg/dL
2-h	-	165 mg/dL
3-h	-	145 mg/dL

Categorie non diabetiche di disordini del controllo glicometabolico

1. Alterata glicemia a digiuno (IFG)
Glicemia a digiuno: ≥ 110 mg/dL e < 126 mg/dL
 ≥ 6.1 mmol/L e < 7.0 mmol/L
2. Alterata tolleranza glucidica (IGT)
Glicemia a 2 ore durante OGTT^d: ≥ 140 mg/dL e < 200 mg/dL
 ≥ 7.8 mmol/L e < 11.1 mmol/L

^a Poliuria, polidipsia e calo ponderale inatteso.

^b Prelievo effettuato in qualsiasi momento della giornata senza far caso al digiuno od all'ultimo pasto.

^c Senza assunzione calorica da almeno 8 ore.

^d OGTT con carico di 75 g di glucosio, effettuato secondo le raccomandazioni della WHO⁴.

^e Si sconsiglia l'utilizzo dell'OGTT nella pratica clinica.

^f Non necessario in donne gravide che soddisfino tutti i seguenti criteri: età < 25 anni, peso corporeo normale, non parenti di primo grado di soggetti diabetici, non di razza ispanica, nativa americana, asio- o afro-americana. Il test diagnostico con carico orale di 100 g si effettua solo su pazienti positive al test di screening.

^g La diagnosi di diabete mellito gestazionale si pone quando almeno due delle quattro glicemie misurate sono uguali od eccedono i valori sotto tabulati.

Tabella III
Screening del diabete mellito in soggetti presumibilmente sani

Secondo le nuove raccomandazioni dell'ADA tutti gli adulti al di sopra dei 45 anni di età devono misurarsi la glicemia a digiuno ogni 3 anni, a meno che il soggetto abbia già una diagnosi di diabete mellito. La misura della glicemia a digiuno si deve fare in età inferiore e con cadenza più ravvicinata nei soggetti che presentano:

- Obesità ($\geq 120\%$ del peso corporeo desiderabile o indice di massa corporeo ≥ 27 kg/m²)
- Parentela di primo grado con un paziente diabetico
- Appartenenza ad un gruppo etnico ad alto rischio^a
- Precedente esperienza di diabete gestazionale o parto di neonato sovrappeso (< 4.1 kg)
- Ipertensione ($\geq 140/90$)
- Bassa concentrazione del colesterolo-HDL nel siero (> 35 mg/dL)
- Elevata concentrazione di trigliceridi nel siero (> 200 mg/dL)
- Precedente storia di IFG od IGT

^a Afro-americani, ispano-americani, nativi americani, asio-americani

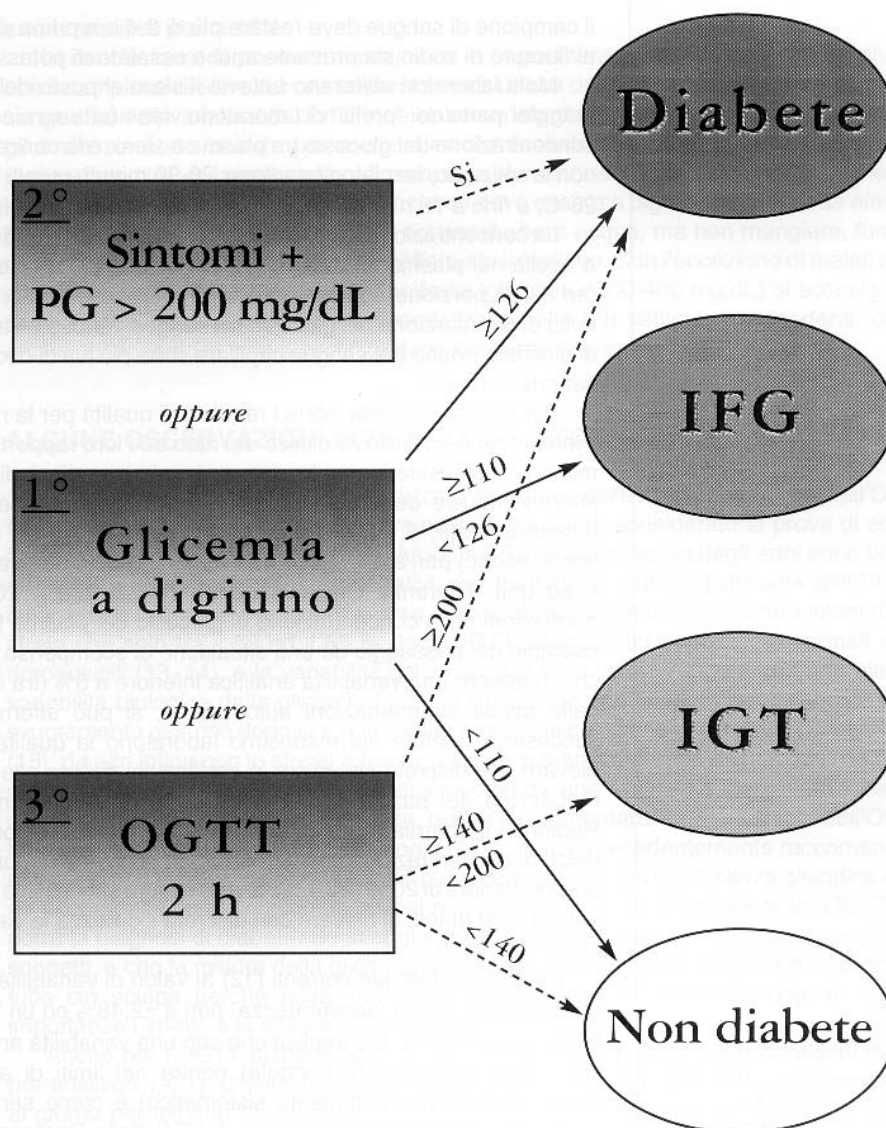


Figura 1
Schematizzazione dei nuovi criteri diagnostici proposti dall'ADA. I numeri giustapposti alle frecce rappresentano le soglie di glicemia, in mg/dL; IFG: alterata glicemia a digiuno; IGT: alterata tolleranza ai carboidrati; OGTT: test di tolleranza orale al glucosio; PG: glicemia casuale

d

islipidemie, ipertensione ed obesità (9). Se le considerazioni sulla efficacia della nuova classificazione sono valide, considerando che negli Stati Uniti si stima che altri 2 milioni di persone (pari ad un quarto dei diabetici senza diagnosi) si troveranno a dovere far fronte alla malattia diabetica neo-diagnosticata (10), possiamo stimare che in Italia, se le nuove raccomandazioni dell'ADA verranno accolte in tempi brevi, il numero di soggetti ai quali potrà essere comunicato di soffrire di diabete mellito sarà attorno alle 125.000.

PRECAUZIONI DI LABORATORIO PER LA MISURA DELLA GLICEMIA

Ci sono alcune considerazioni che vale la pena di tenere ben presenti. A meno che il campione di sangue non venga analizzato rapidamente (separazione plasma-eritrociti ed analisi su sangue intero entro 60 min dal prelievo) per il prelievo bisogna utilizzare provette con NaF (4 mg/mL di sangue; tappo grigio). Il fluoruro di sodio inibisce la glicolisi e previene quindi il calo che si avrebbe come conseguenza del catabolismo cellulare del glucosio, responsabile di un eventuale abbassamento della concentrazione del glucosio *in vitro* (5-7 % per ora). Lo NaF svolge anche una debole azione anticoagulante, ma se

il campione di sangue deve restare più di 2-4 ore prima dell'analisi è opportuno che oltre al fluoruro di sodio sia presente anche ossalato di potassio ($K_2C_2O_4$, 2 mg/mL).

Molti laboratori utilizzano tuttavia il siero al posto del plasma per l'analisi, perché la maggior parte dei "profili" di laboratorio viene fatta su siero. Non ci sono differenze nella concentrazione del glucosio tra plasma e siero, e la concentrazione del glucosio nel siero non emolizzato, lasciato sierare per 20-30 minuti, quindi centrifugato, è stabile per 8 h a 25°C, e fino a 72 h a 4°C purché il siero non sia contaminato da batteri.

La concentrazione del glucosio nel sangue intero è più bassa di circa 20 mg/dL rispetto a quella nel plasma, a causa della presenza nel sangue di elementi corpuscolati solidi (ad es. la porzione non-acquosa negli eritrociti). Inoltre, non vi è differenza, a digiuno, nella concentrazione del glucosio tra sangue venoso e sangue capillare, ma dopo carico di glucosio i valori nel sangue capillare sono più alti di circa 20 mg/dL rispetto a quelli del sangue venoso.

Per quanto riguarda infine i requisiti di qualità per la misura del glucosio del plasma, il loro impatto sull'utilizzo clinico del dato ed i loro rapporti con lo stato dell'arte di questa misura, si consideri quanto segue. I valori mediani di variabilità biologica intra- ed inter-individuale del glucosio del plasma possono essere considerati come eguali a, rispettivamente, 6,1% e 7,8% (11). Questo comporta un traguardo analitico (per la imprecisione) pari a 3,0%, che una volta raggiunto porta ad una variabilità totale di 6,8% e ad una differenza critica leggermente inferiore a 20% (18,8%). Date le marcate oscillazioni della concentrazione di glucosio del plasma frequentemente osservate (per esempio nel passaggio da una situazione di scompenso al compenso), e considerando che in genere una variabilità analitica inferiore a 3% (tra i giorni) è facilmente assicurata dalle attuali strumentazioni automatiche, si può affermare che, almeno per misure successive ripetute nel medesimo laboratorio la qualità analitica attuale consente di rilevare con discreta sicurezza le oscillazioni dovute alle effettive variazioni di controllo metabolico del paziente. Dal programma di Valutazione Esterna della Qualità della Regione Lombardia si ricava una variabilità interlaboratori (come CV %) pari a 4,15% a valori di concentrazione pari a 126 mg/dL, il che corrisponde ad una differenza critica di poco superiore al 20% (20,4%): anche misure successive effettuate in laboratori differenti consentono quindi di rilevare con discreta sicurezza le variazioni importanti del controllo glicometabolico.

Applicando formule correnti (12) ai valori di variabilità biologica su riportati si ricava un "traguardo per la inaccuratezza" pari a $\pm 2,48\%$ ed un "errore totale analitico accettabile" pari a $\pm 7,51\%$. Ciò implica che con una variabilità analitica interlaboratori del 4%, il 90% circa delle misure (singole) rientra nei limiti di accettabilità. Il problema della inaccuratezza (o scostamento sistematico) è come sempre un poco più complesso. Comunque, dal citato programma di VEQ della Regione Lombardia, i valori forniti dai metodi maggiormente utilizzati (*glucosio ossidasi/perossidasi/Trinder*, circa il 65% dei partecipanti ed *esochinasi/glucosio-6-fosfato deidrogenasi*, circa il 27% dei partecipanti) forniscono valori sostanzialmente sovrapponibili nell'intervallo di valori di concentrazione compreso tra 54 e 214 mg/dL. Dal medesimo programma le misure in "chimica secca" (circa il 7% dei partecipanti) appaiono mediamente più basse di circa il 5%, ma non si può naturalmente escludere che si tratti di un effetto di non-commutabilità dei materiali di controllo.

Per valutare l'impatto dell'errore analitico nello "screening" del diabete, o comunque nel riconoscimento della malattia diabetica mediante una singola misura di concentrazione di glucosio del plasma, abbiamo rilevato la distribuzione di frequenza di 7745 valori consecutivi ottenuti in un laboratorio ospedaliero. Abbiamo quindi verificato, al livello decisionale di 126 mg/dL, la variazione di classificazione [(inferiore a 126)/(maggiore o uguale a 126)] indotta da un errore analitico pari a $\pm 5\%$. Si è calcolato che una sottostima del -5% provoca una variazione di classificazione pari a $-2,0\%$, mentre una sovrastima del $+5\%$ provoca una variazione di classificazione pari a $+2,5\%$. Sembra possibile ritenere che tali variazioni (e quindi un *errore totale della misura singola* compreso entro $\pm 5\%$) siano compatibili con una corretta pratica medica, e con una corretta applicazione delle raccomandazioni ADA. Considerando a titolo di confronto il caso del colesterolo, e fissando il valore decisionale a 200 mg/dL come raccomandato, le percentuali di variazione di classificazione raggiungono valori di $-8,1\%$ e di $8,3\%$ rispettivamente per un

errore analitico pari a $\pm 5\%$.

In conclusione, si possono riassumere le seguenti raccomandazioni: ogniqualvolta che il campione di siero non sia separato entro un'ora dal prelievo, o che un campione di sangue non sia analizzato comunque entro un'ora dal prelievo, e che la misura della glicemia sia stata chiesta per eventualmente escludere o diagnosticare il diabete, il plasma con NaF è il migliore tipo di campione da utilizzare. Infine, da ricordare che per la misura della glicemia a digiuno, il paziente deve essere a digiuno overnight da almeno 8 ore, massimo 16 ore. Al paziente è consentito bere acqua, ma non mangiare, fumare o prendere medicine finché non viene effettuato il prelievo. Con l'eccezione di malati acuti con chiari sintomi ed iperglicemia manifesta (glicemia $>300-400$ mg/dL) si sconsiglia la misura della glicemia su pazienti ospedalizzati nelle 6-8 settimane precedenti, come anche sui soggetti in convalescenza dopo interventi chirurgici.

ALCUNE OSSERVAZIONI IN MERITO ALL'OGTT

Questo esame, una volta standardizzato sulla base delle raccomandazioni dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, era precedentemente considerato la prova di eccellenza per la diagnosi di intolleranze glucidiche. Tuttavia nel corso degli anni sono venuti alla luce una serie di elementi negativi che mettono in dubbio l'efficacia dell'OGTT, innanzitutto criticabile per la sua scarsa riproducibilità. Diversi autori hanno infatti dimostrato che solo tra il 50 ed il 65 % degli OGTT effettuati su popolazioni normali sono riproducibili (13, 14), e la variabilità della risposta è da taluni spiegata con una elevata variabilità biologica della glicemia (15), da altri con la non linearità della risposta dello svuotamento gastrico dopo la somministrazione della soluzione di glucosio iperosmolare (16), da altri infine con lo stress adrenergico che si manifesterebbe al momento dell'esecuzione dell'esame in diversi soggetti provocando una artificiosa iperglicemia basale all'inizio dell'OGTT (17). Per cercare quindi di aumentare l'utilità clinica dell'OGTT l'Associazione Americana di Diabetologia (ADA) aveva precedentemente raccomandato che sono necessari almeno due OGTT per diagnosticare una intolleranza glucidica (18), ed anche nelle nuove raccomandazioni non basta il risultato anormale di un OGTT per porre la diagnosi di diabete. Se si aggiunge il fatto che l'OGTT è mal tollerato in diversi soggetti, e che la misura della glicemia è più facilmente standardizzabile ed economica, tutto ciò spiega perché nella nuova classificazione l'OGTT ha un ruolo di minore importanza rispetto alla misura della glicemia.

Anche per l'OGTT bisogna tenere presenti alcune importanti considerazioni di tipo pre-analitico: (a) il paziente deve assumere una dieta regolare di 100-150 g di carboidrati al giorno per almeno tre giorni prima del test; (b) deve essere generalmente in buona salute (un raffreddore non è una controindicazione ma un'influenza con vomito sì); (c) non deve essere stato ospedalizzato recentemente; (d) non deve essere stato posto in regime di attività fisica limitata, appositamente prima del test. Tranne che in gravidanza, gli adulti devono ricevere una dose di 75 g di glucosio anidro disciolto in acqua, e nei bambini la dose è di 1.75 g/kg, fino ad un massimo di 75 g. Il tempo zero è quando il paziente comincia ad ingerire la bevanda, che deve essere deglutita in meno di 5 min. In gravidanza la dose per lo screening è di 50 g, e la dose di 100 g è riservata per il test diagnostico a 3 ore. Si osservi che la prova da carico orale con 50 g è quella caratterizzata da migliore riproducibilità (19).

IL RUOLO DELL'EMOGLOBINA GLICATA ED ALCUNE CONSIDERAZIONI SULLO STATO ATTUALE DELLA STANDARDIZZAZIONE DELL'Hb A_{1c}

Le nuove raccomandazioni della ADA confermano il ruolo estremamente importante dell'Hb A_{1c} nel monitoraggio dei pazienti diabetici sia di tipo 1 (5) che di tipo 2 (6, 20), ma escludono per ora il suo utilizzo a fini diagnostici. Vari autori comunque concordano che, una volta che la misura dell'emoglobina glicata sarà completamente standardizzata, l'Hb A_{1c} avrà presto un suo preciso ruolo diagnostico. Da menzionare anche che negli Stati Uniti, da quando la maggior parte dei laboratori sta cominciando ad ottenere la certificazione NGSP, cominciano a comparire elaborazioni che servono a predire il rischio di

sviluppo delle complicanze in funzione dei valori di Hb A_{1c} (D.E. Goldstein, comunicazione personale).

Vale qui la pena ricordare che il processo di standardizzazione dell'emoglobina glicata sta procedendo a livello internazionale sotto il controllo di un gruppo di lavoro della Federazione Internazionale di Chimica Clinica (IFCC), recentemente allargatosi con l'inclusione di due laboratori giapponesi e del *Center for Disease Control* (CDC) statunitense. Si è costituita una rete di laboratori che hanno implementato le due metodiche di riferimento (HPLC-elettroforesi capillare, ed HPLC-spettrometria di massa) rese pubbliche lo scorso anno (21), e sono stati effettuati due esercizi inter-laboratorio. Sono in fase di svolgimento gli studi per l'allineamento della maggior parte delle metodiche attuali al nuovo sistema metrologico, e sono in via di definizione i nuovi intervalli di riferimento ed i valori decisionali. Poiché difficilmente questo processo sarà completato in tempi brevi (l'obiettivo è quello di riuscire a presentare la standardizzazione al nuovo sistema metrologico per il 17° congresso mondiale di Chimica Clinica, IFCC - WordLab, Firenze, Giugno 1999), si ritiene utile in questa fase di transizione ricordare alcuni punti essenziali.

1. *Qualità delle analisi.* La riproducibilità totale della metodica che si utilizza per la misura della Hb A_{1c} su sangue intero deve essere, in termini di coefficiente di variazione, migliore del 3% (CV_{tot} <3%). Alcune metodiche attuali non soddisfano tale criterio e devono essere abbandonate. Facendo riferimento ai dati disponibili di variabilità biologica (22) e considerando desiderabile poter rilevare in maniera significativa una variazione, tra due misure successive sullo stesso paziente, almeno pari ad 1 punto % (come cambiamento assoluto di Hb A_{1c}), sarebbe in realtà meglio non utilizzare metodiche con CV_{tot} >2%. La migliore documentazione della qualità delle proprie misure di Hb A_{1c} si ottiene partecipando ai programmi di valutazione esterna di qualità organizzati regolarmente dal gruppo di studio SID-AMD-SIBioC-SIMeL.

2. *Calibrazione.* E' stato dimostrato che diverse metodiche commerciali non forniscono risposte perfettamente lineari nell'intervallo fisio-patologico. E' quindi consigliabile effettuare calibrazioni a due punti, utilizzando materiali con titolo di Hb A_{1c} assegnato con metodica certificata DCCT. Le recenti raccomandazioni della *American Diabetes Association* (23) consigliano di usare solo metodiche certificate e sono disponibili dati recenti di letteratura per guidare la scelta dei materiali di controllo (24).

3. *Unità di misura ed intervalli di riferimento.* I risultati delle analisi devono essere espressi in Hb A_{1c} % (equivalenti DCCT). Si devono abbandonare le altre unità (GHb %, Hb A₁ %). Per quanto riguarda gli intervalli di riferimento, fermo restando il fatto che sarebbe opportuno che ogni laboratorio si fosse già costruito negli scorsi anni intervalli di riferimento per la propria metodica, anche se già tracciabile al DCCT, riportiamo qui per comodità gli intervalli di riferimento del metodo DCCT, testati nel 1992 su 185 soggetti non-diabetici, (rapporto M:F=1:1, età 13-40 anni, senza storia familiare di diabete mellito, non obesi, con glicemia a digiuno inferiore a 120 mg/dL): Hb A_{1c}, 5.06 ± 0.40 % (media ±DS), intervallo fid. 95 %: 4.3 - 5.9 %.

4. *Controllo esterno di qualità.* Anche nel 1998 è intenzione del gruppo di studio SID-AMD-SIBioC-SIMeL effettuare uno studio multicentrico, anzi si desidera varare un servizio permanente accessibile direttamente da Internet, sulla base dell'esperienza maturata con i precedenti studi (25, 26, 27). La partecipazione a programmi di valutazione esterna di qualità per la Hb A_{1c}, pur non essendo obbligatoria, è fortemente consigliata anche da altre società scientifiche (ad. es. dalle Soc. Svedese, Tedesca, Francese) ed è generalmente accettato che, se si partecipa regolarmente a questi esercizi, la qualità delle proprie analisi migliora progressivamente.

5. *Frequenza delle misure.* In condizioni normali (soprattutto in assenza di anemia emolitica) la singola determinazione dell'Hb A_{1c} rappresenta un indice integrato della glicemia degli ultimi 2-3 mesi e pertanto, in linea di principio, dovrebbe essere misurata circa 4 volte all'anno. E' tuttavia accettato che, se il controllo glicometabolico è soddisfacente (Hb A_{1c} % <7 %, in equivalenti DCCT), essa venga misurata con frequenza minore. E' consigliata la misura almeno due volte all'anno.

IL RUOLO DEGLI AUTOANTICORPI NELLA PRATICA CLINICA

La misura del titolo anticorpale anti-insule può essere utilizzata nei pazienti con

diabete neo-diagnosticato per chiarire l'eziologia del diabete (autoimmune vs. non-autoimmune) ed anche per differenziare tra diabete di tipo 1 e di tipo 2. L'assenza di autoanticorpi anti-insule non esclude il diabete di tipo 1, ma la loro presenza ha valore diagnostico.

L'ADA sconsiglia di misurare il titolo degli anticorpi anti-insule al di fuori della ricerca clinica, e ricorda che nessuno dei vari test attualmente disponibili (anti-insule: ICA; anti-insulina: IAA; anti-decarbossilasi dell'acido glutammico: GADA; anti-tirosina fosfatasi: IA-2A, IA-2^βA) risulta tuttora essere approvato dalla FDA. Si riconosce tuttavia che tra questi gli ICA sono considerati lo standard di riferimento. Va tuttavia rammentato che gli intervalli di riferimento non sono stati ancora definiti rigorosamente e che un risultato negativo non esclude la malattia perché gli anticorpi sono presenti solo in maniera transiente (28).

IL LABORATORIO NELLA SORVEGLIANZA DELLE COMPLICANZE

Le principali complicanze nella cui sorveglianza il laboratorio ha un ruolo di primaria importanza sono: nefropatia diabetica; (cheto)acidosi; aterosclerosi (29).

La sorveglianza dello sviluppo di nefropatia diabetica mediante misura di quello che impropriamente ma universalmente viene denominato "*microalbuminuria*", ossia delle concentrazioni di albumina urinaria più basse di quelle (superiori a 200-300 mg/L) associate a glomerulopatia franca, è un procedimento assai noto ed ormai "standard" nella sorveglianza del paziente diabetico. La misura della microalbuminuria si prefigge lo scopo di evidenziare abbastanza precocemente lo sviluppo della nefropatia in fase ancora reversibile (30). Si richiama qui l'attenzione su tre punti: il tipo di campione e la modalità di espressione dei risultati; la metodologia analitica; la frequenza raccomandata.

Le conoscenze di base sono state costruite su dati relativi alla quantità di albumina eliminata nel tempo, denominata *Albumin Excretion Rate (AER)*, in $\mu\text{g}/\text{min}$. La misura di tale grandezza comporta la raccolta di urine temporizzate, il che oltre a rappresentare un motivo di difficoltà soprattutto per i pazienti ambulatoriali introduce l'errore della raccolta. Per compensare il differente grado di diluizione del campione estemporaneo è stato suggerito di misurare la creatinina urinaria, rapportando a questa la concentrazione di albumina. Tuttavia, anche sulla base di precise valutazioni, è oggi ritenuto adeguato, e sicuramente più pratico, misurare semplicemente la concentrazione di albumina in campioni estemporanei (il primo della mattina), esprimendola come concentrazione di massa, in mg/L (31, 32, 33). Nella Tab. IV sono riassunti i differenti tipi di campione, le misure necessarie per le differenti modalità di espressione dei risultati, ed i relativi "valori soglia", al di sopra dei quali il valore trovato deve indicare l'intervento medico.

Si ritiene che la eventuale relativamente minore accuratezza di valutazione dell'ultimo approccio (misura della concentrazione di massa della albumina in campione estemporaneo) sia compensata dal fatto che la maggiore semplicità ne favorisce un uso più allargato. In effetti sembra che la microalbuminuria venga attualmente misurata nella popolazione dei pazienti diabetici con frequenza assai minore del raccomandato. Si deve anche considerare che tale misura è raccomandata nei diabetici sia di tipo 1 che di tipo 2. Questi ultimi hanno infatti un rischio di sviluppare nefropatia franca (30 - 35 %) non molto inferiore ai primi (45 %) (34).

Tabella IV
Caratteristiche
dell'esame-tipo per la
ricerca della
microalbuminuria

Tipo di campione (urine)	Misure necessarie	Espressione dei risultati	Valore soglia
Campione temporizzato (24 ore)	1) concentrazione di albumina 2) volume	$\mu\text{g}/\text{minuto}$ (AER)	20
Campione estemporaneo (primo del mattino)	1) concentrazione di albumina 2) concentrazione di creatinina	mg/g di creatinina	30
Campione estemporaneo (primo del mattino)	1) concentrazione di albumina	mg/L	20

Per quanto concerne la metodologia, i dati originali erano basati sulla misura della albumina urinaria con metodo radioimmunologico. Oggi è ampiamente riconosciuto che i metodi immunonefelometrici ed immunoturbidimetrici automatizzati consentono una precisione di misura e sono caratterizzati da un sensibilità più che sufficiente allo scopo (35). Sono anche in commercio dispositivi monouso (sotto forma di strisce reattive con indicatore colorato) che permettono la autoanalisi da parte del paziente.

Per quanto concerne infine la frequenza della misura si raccomanda che (36):

- la presenza di microalbuminuria superiore ai valori soglia sia confermata mediante tre misure successive nell'arco di 6 mesi;
- in singoli pazienti diabetici, sia di tipo 1 che di tipo 2, la concentrazione di albumina urinaria (microalbuminuria) sia misurata almeno una/due volte l'anno.

La chetoacidosi diabetica deriva dalla abnorme produzione ed accumulo di chetoacidi, rappresentati da β -idrossibutirrato e da acetoacetato, che si decarbossila ad acetone. La misura specifica del β -idrossibutirrato nel siero rappresenta l'approccio di gran lunga il migliore per sorvegliare la chetoacidosi, sia perché la concentrazione ematica di tale composto è più elevata di quella dell'acetoacetato, sia perché la concentrazione di acetocetato non rispecchia fedelmente il grado di acidosi metabolica, potendo rimanere elevata nelle fasi di remissione (37).

Si deve rammentare che la rivelazione dei cosiddetti "*corpi chetonici*" o più semplicemente dell'"acetone" nelle urine con le cartine reattive, basata su una reazione al nitroprussiato, non sono affidabili, in quanto relativamente poco sensibili e non in grado di rivelare la presenza del β -idrossibutirrato. Sono disponibili invece, anche se non largamente usati, metodi spettrofotometrici eseguibili su analizzatori automatici multiparametrici, per la misura diretta e specifica del β -idrossibutirrato del sangue come mezzo sensibile e fedele per sorvegliare lo sviluppo di chetoacidosi (37). Il limite superiore dell'intervallo di riferimento è di circa 290 $\mu\text{mol/L}$. Per inciso si rammenta che la misura del β -idrossibutirrato del siero è un ottimo metodo per differenziare le ipoglicemie spontanee da insulinoma, dove esso è diminuito, da quelle non da insulinoma, dove è invece aumentato (38).

Per quanto riguarda la malattia aterosclerotica, sono ormai concetti affermati la maggiore tendenza del diabetico a sviluppare complicanze cardiache e cerebrali su base arteriosclerotica mediate da anomali quadri lipidemici del sangue (39, 40). Gli esami di laboratorio indicati comprendono la misura del colesterolo totale e delle sue frazioni HDL ed LDL, e dei trigliceridi del siero. E' ancora incerto se le misure del colesterolo HDL ed LDL possano essere utilmente affiancate, o forse meglio sostituite, dalla misura delle apolipoproteine A-I e B rispettivamente.

La valutazione della categoria di rischio per malattia cardiovascolare è basata sui dati riportati nella Tabella V. Per la scelta dell'approccio terapeutico correttivo (dietologico/farmacologico) e per la valutazione dell'efficacia viene suggerito di basarsi sulla concentrazione di colesterolo LDL, con valori decisionali a 100 e 130 mg/dL. Si raccomanda comunque che il quadro lipidico del paziente diabetico sia controllato mediante almeno una determinazione della colesterolemia all'anno (41).

Per maggiori dettagli vedi anche il documento redatto da M.S. Graziani, F. Ceriotti ed E. Manzato, pubblicato sul fascicolo di *Biochimica Clinica* 1998; 22(9): 523-32.

Tabella V
Valutazione del rischio di malattia cardiovascolare dai dati di laboratorio di colesterolo frazionato e trigliceridi nel siero (dal riferimento n. 39)

Rischio	Colesterolo-LDL mg/dL	Colesterolo-HDL mg/dL	Trigliceridi mg/dL
Alto	≥ 130	< 35	≥ 400
Bordeline	100 - 129	35 - 45	200 - 399
Basso	< 100	> 45	< 200

LA MISURA DELL'INSULINA NEL SIERO

Tradizionalmente la misura dell'insulina nel siero ha avuto applicazioni solo per la diagnosi dell'insulinoma, ma alcuni recenti studi hanno tuttavia fatto intravedere ulteriori possibilità cliniche di impiego per questo esame. Varie ricerche epidemiologiche hanno infatti dimostrato che l'iperinsulinemia è un fattore di rischio per lo sviluppo del diabete, ed inoltre esistono alcune segnalazioni che legano l'insulina, indipendentemente dai livelli

lipidici e pressori, alla patogenesi dell'aterosclerosi. Negli ultimi anni è stato anche osservato che nella popolazione generale elevati livelli di insulinemia sono frequentemente associati a più elevate concentrazioni ematiche di glucosio, trigliceridi, fibrinogeno ed inibitore dell'attivatore del plasminogeno (PAI), a più bassi livelli di colesterolo-HDL ed a più elevati valori di pressione arteriosa, configurando così un quadro denominato "sindrome plurimetabolica" considerato ad alto rischio cardiovascolare (42).

Attualmente tuttavia i ricercatori si trovano a confrontarsi con dati ottenuti con una varietà di metodi che utilizzano diversi principi e diversi traccianti, e che non forniscono risultati confrontabili tra loro. Come conseguenza, in letteratura esiste una sconcertante amplissima differenza nei valori di insulina plasmatica sia a digiuno, che dopo carico orale di glucosio, anche quando siano studiati gruppi di soggetti con caratteristiche paragonabili.

Le possibili cause di questa osservazione sono varie, e le più frequenti possono essere le seguenti: (a) la possibile competizione tra insulina e sostanze strutturalmente simili per i siti anticorpali; (b) le possibili diversità di identità tra tracciante ed analita rispetto alle caratteristiche di immunoreattività; (c) l'eterogeneità dei siti anticorpali degli antisieri policlonali; (d) l'effetto matrice dei campioni di plasma o siero, dovuto solitamente ad emolisi, iperlipemia e tipo di anticoagulante usato.

Per quanto riguarda il punto (a) è importante tenere presente che sebbene il clivaggio della proinsulina ad insulina e C-peptide sia molto efficiente, circa il 2-4% della immunoreattività secreta dal pancreas è costituita da proinsulina o prodotti intermedi. Tuttavia, poiché la *clearance* di questi peptidi è minore di quella dell'insulina, questi prodotti rappresentano il 10 - 40 % dell'immunoreattività circolante (1/3 proinsulina, 2/3 32-33 *split* proinsulina) (43). E' quindi possibile che il mancato riconoscimento di questo contributo abbia portato a sovrastimare i livelli insulinemici nelle condizioni quali diabete di tipo 2 ed intolleranze ai carboidrati, nelle quali la secrezione pancreatica di proinsulina ed intermedi può essere particolarmente elevata (44-45). I kit più recenti dovrebbero essere in grado di distinguere l'insulina dalla proinsulina, sebbene vi siano segnalazioni che indicano che il problema della specificità non sia stato ancora del tutto superato (46).

Per quanto riguarda infine la confrontabilità dei risultati ottenuti da diversi laboratori, un recente studio promosso dall'ADA ha chiaramente dimostrato che i risultati sono molto differenti tra loro anche quando viene utilizzato un calibratore comune, e che la riproducibilità delle misure oscilla (in termini di CV) dal 2 al 30% (46). Altre caratteristiche delle metodiche, quali la linearità, erano molto variabili tra i diversi laboratori.

Per tutta questa serie di motivi la misura del C-peptide ha assunto negli ultimi anni un ruolo abbastanza importante in sostituzione dell'insulina, laddove i dati di accuratezza e specificità analitiche di quest'ultima metodica non siano ben documentati. Ciò non toglie che il problema della standardizzazione delle misure dell'insulina nel siero sia ancora da risolvere, e ci si riserva di fornire ulteriori dati su questo aspetto in una prossima comunicazione.

CONCLUSIONI

Una critica ragionata alle implicazioni che le nuove raccomandazioni dell'ADA potranno avere nel prossimo futuro è già stata presentata da taluni (10, 28), e ci limitiamo pertanto ad aggiungere alcune considerazioni conclusive.

Nell'immediato si può prevedere che si assisterà ad un aumento di richieste per le glicemie, ed ad una diminuzione del numero di OGTT, e riteniamo che questo sia un avanzamento perché l'affidabilità analitica della misura della glicemia è superiore. Resta la limitazione che tuttora, a causa delle scarse conoscenze che si hanno sulla patogenesi della malattia (soprattutto per quello che riguarda la complessità del sistema poligenico coinvolto nel diabete di tipo 2 e la sua possibile interazione con agenti virali e vari fattori ambientali) la diagnosi è ancora basata su sistemi indiretti.

Infine gli scarsi dati attualmente disponibili documentano che solo pochi diabetologi e pochi laboratoristi hanno implementato le nuove raccomandazioni. Un Gruppo di Lavoro interassociativo italiano ha recentemente preso posizione (48) concludendo che si ritiene opportuna una pausa di riflessione, in attesa che l'Organizzazione Mondiale della Sanità

faccia propri la nuova classificazione ed i nuovi criteri diagnostici. Ci si auspica che questo avvenga entro breve tempo, anche in considerazione del fatto che le proiezioni della WHO indicano una tendenza all'aumento della prevalenza del Diabete Mellito all'inizio del prossimo millennio (49).

BIBLIOGRAFIA

1. Garancini MP, Calori G, Ruotolo G, Manara E, Izzo A, Ebbli E, Bozzetti AM, Boari L, Lazzari P, Gallus G. Prevalence of NIDDM and impaired glucose tolerance in Italy: an OGTT-based population study. *Diabetologia* 1995;38:306-13.
2. American Diabetes Association, www.ada.com
3. National Diabetes Data Group. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 1979;28:1039-57.
4. World Health Organization. Diabetes Mellitus. Report of a WHO Study Group. Technical Report Series 727. Geneva: WHO, 1985.
5. 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.
6. Ohkubo Y, Kishikawa H, Araki E, Miyata T, Isami S, Motoyoshi S, Kojima Y, Furuyoshi N, Shichiri M. Intensive insulin therapy prevents the progression of diabetic microvascular complications in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: a randomized prospective 6-year study. *Diabetes Res Clin Pract* 1995;28:103-17.
7. American Diabetes Association. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1997;20:1183-201.
8. Harris MI. Undiagnosed NIDDM: a clinical and public health issue. *Diabetes Care* 1993;16:642-52.
9. Klein R. Hyperglycemia and microvascular and macrovascular disease in diabetes. *Diabetes Care* 1995;18:258-68.
10. Sainato D. The new ADA guidelines for diabetes testing. Labs slowly adopt recommended changes. *Clinical Laboratory News*, 1998;24:1,6.
11. Sebastián Gámbaro MA, Lirón-Hernández FJ, Fuentes-Arderiu X. Intra- and inter-individual biological variability data bank. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997; 35:845-852.
12. Franzini C. Requisiti qualitativi auspicabili per le prestazioni rese dal laboratorio di Biochimica Clinica. *Biochim Clin* 1998;22:42-7.
13. Ganda OP, Day JL, Soeldner JS, Connon JJ, Gleason RE. Reproducibility and comparative analysis of repeated intravenous and oral glucose tolerance tests. *Diabetes* 1978;27:715-25.
14. Ko GTC, Chan JCN, Woo J, Lau E, Yeung VTF, Chow CC, Cockram CS. The reproducibility and usefulness of the oral glucose tolerance test in screening for diabetes and other cardiovascular risk factors. *Ann Clin Biochem* 1998;35:62-7.
15. Kobberling J, Kerlin A, Creutzfeld W. The reproducibility of the oral glucose tolerance test over long (5 years) and short periods (1 week). *Klin Wochenschr* 1980;58:527-30.
16. Phillips WT, Schwartz JG, Blunhardt R, McMahan CA. Linear gastric emptying of hyperosmolar glucose solutions. *J Nucl Med* 1991;32:377-81.
17. Bijlani R, Narain JP, Shukla K, Kochhar KP. Poor reliability of the first meal tolerance test. *Indian J Physiol Pharmacol* 1992;36:267-9.
18. American Diabetes Association. Office guide to diagnosis and classification of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes Care* 1996;19:S4.
19. Phillipov G. Short- and long-term reproducibility of the 1-h 50-g glucose challenge test. *Clin Chem* 1996; 42:255-257.
20. Guillausseau PJ, Massin P, Charles MA, Allaguy H, Guvenli Z, Virally M, Tielmans D, Assayag M, Warnet A, Lubetzki J. Glycemic control and development of retinopathy in type 2 diabetes mellitus: a longitudinal study. *Diabetic Medicine* 1998;15:151-5.
21. Kobold U, Jeppsson JO, Duffer T, Finke A, Hoelzel W, Miedema K. Candidate reference methods for hemoglobin A_{1c} based on peptide mapping. *Clin Chem* 1997;43:1944-51.
22. Phillipou G, Phillips PJ. Intraindividual variation of glycohemoglobin: implications for interpretation and analytical goals. *Clin Chem* 1993;39:2305-8.
23. American Diabetes Association. Tests of glycemia in diabetes. *Diabetes Care* 1998;21s1:S69-71.
24. Mosca A, Paleari R, Madè A, Ferrero C, Locatelli M, Ceriotti F. Commutability of control materials in glycohemoglobin determinations. *Clin Chem* 1998;44:632-8.
25. Mosca A, Paleari R, Trapolino A, Plebani M, Capani F, Pagano G. Risultati del programma 1995 "Valutazione esterna di qualità per la determinazione della emoglobina glicata". *Biochimica clinica* 1996;20:241-6.

26. Mosca A, Paleari R, Trapolino A, Madè A, Plebani M, Cavallo-Perin P, Pagano G. Risultati del programma 1996 "Valutazione esterna di qualità per la determinazione della emoglobina glicata". *Biochimica clinica* 1997;21:91-3.
27. Mosca A, Paleari R, Trapolino A, Capani F, Pagano G, Plebani M. A re-evaluation of glycohemoglobin standardization: the Italian experience with 119 laboratories and 12 methods. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997;35:243-8.
28. Sacks DB. Implications of the revised criteria for diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Clin Chem* 1997;43:2230-2.
29. Santiago JV. Overview of the complications of diabetes. *Clin Chem* 1985;32(10B):B48-B53.
30. Alzaid AA. Microalbuminuria in patients with NIDDM: an overview. *Diabetes Care* 1996;19:79-89.
31. Howey JEA, Browning MCK, Fraser CG. Selecting the optimum specimen for assessing slight albuminuria, and a strategy for clinical investigations: novel uses of data on biological variation. *Clin Chem* 1987;33:2034-2038.
32. Mogensen CF, Keane WF, Bennet PH, et al. Prevention of diabetic renal disease with special reference to microalbuminuria. *Lancet* 1995;346:1080-1086.
33. Zelmanowitz T, Gross JL, Oliveira JR, et al. The receiver operating characteristic curve in the evaluation of a random urine specimen as a screening test for diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 1997;20:516-519.
34. Kronz JD, Kroll MH. Microalbuminuria testing for the prevention of renal disease in diabetes mellitus. *Clin Lab News* 1998; 24:12-13.
35. Dati F, Lammers M. Immunochemical methods for determination of urinary proteins (albumin and α_1 microglobulin) in kidney disease. *J Int Fed Clin Chem* 1989;1:68-77.
36. American Diabetes Association. Diagnosis and management of nephropathy in patients with diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1996;19(s1):S103-6.
37. Pearse AG, Williams CM, Marks V. The measurement and clinical significance of b-hydroxybutyrate. *Ann Clin Biochem* 1987;24(s1):S1214-S1215.
38. Teale JD, Pearse AG, Hampton S, Marks V. The significance of insulin, proinsulin, C-peptide and b-hydroxybutyrate measurements in spontaneous hypoglycaemia. *Ann Clin Biochem* 1987; 24(s1):S1212-S1214.
39. American Diabetes Association. Management of dyslipidemia in adults with diabetes. *Diabetes Care* 1998;21(s1): S36-S39.
40. Graziani M, Ceriotti F, Manzato E. L'ipercolesterolemia in prevenzione secondaria. II. I pazienti diabetici. Linee guida dell'American Diabetes Association. *Biochim Clin* 1998 (in stampa)
41. Auxter S.M. Gli esami di laboratorio sono sottoutilizzati nella sorveglianza del diabete? *Biochim Clin* 1997;21:645-8.
42. Stern MP. Do non-insulin-dependent diabetes mellitus and cardiovascular disease share common antecedents? *Ann Intern Med* 1996;124:110-6.
43. Rudeski AS, Crowther NJ, Hales CN. Assay for measuring proinsulin, insulin and related peptides. *Research Methodologies in Human Diabetes*. Walter de Gruyter, Berlin-New York, 1994.
44. Davies M, Rayman G, Gray IP, Day JL, Hales CN. Insulin deficiency and increased plasma concentrations of intact and 32/33 split proinsulin in subjects with impaired glucose tolerance. *Diabetic Med* 1993;10:313-20.
45. Mykkanen L, Kuusisto J, Hales CN, Pyorala K, Laakso M, Haffner SM. Serum proinsulin levels are disproportionately increased in elderly prediabetic subjects. *Diabetologia* 1994;37(s1):A74.
46. Robbison DC, Anderson L, Bowsher R, Chance R, Dinesen B, Frank B, et al. Report of the American Diabetes Association's task force on standardization of the insulin assay. *Diabetes* 1996;45:242-55.
47. Gruppi di lavoro. Relazione del gruppo di lavoro SID-AMD sulle nuove proposte dell'ADA per la classificazione del diabete. *Il Diabete* 1998;marzo:1-4.
48. The World Health Report 1998: Life in the 21st century, a vision for all. WHO, Ginevra 1998, ISBN 92 4 1561890.