



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTA' DI INGEGNERIA

Corso di Laurea triennale in Ingegneria Biomedica

**MISURA DEL LIVELLO DI GLICEMIA DA SENSORISTICA
INDOSSABILE NON INVASIVA**

**MEASUREMENT OF BLOOD GLUCOSE LEVEL BY NON-INVASIVE
WEARABLE SENSORS**

Relatore:

Prof.ssa Laura Burattini

Tesi di Laurea di:

Martina Dichiarà

Correlatore:

Dott. Ing. Micaela Morettini

Correlatore:

Dott. Ilaria Marcantoni

A.A. 2020/2021

ABSTRACT

Il monitoraggio della glicemia è fondamentale per gli individui con diabete a causa del suo ruolo determinante nella regolazione dei farmaci e nell'osservazione di possibili ipoglicemie pericolose per la vita. Nonostante quasi tutti i dispositivi di successo per il monitoraggio della glicemia siano invasivi, c'è un immenso bisogno di sviluppare dispositivi non invasivi che allevino il dolore e la sofferenza dei diabetici, associati al frequente prelievo di campioni di sangue per il test del glucosio, e migliorino il controllo della glicemia. Per questo motivo è stata eseguita una revisione della letteratura in merito ai dispositivi non invasivi per la misura della glicemia fino ad ora progettati e commercializzati, prestando particolare attenzione sui dispositivi basati su tecnologia ottica.

Il glucosio è il principale nutriente del sistema nervoso e degli eritrociti, la sua regolazione fisiologica è a carico di diversi organi (tessuto muscolare, pancreas, fegato) e ormoni (insulina, glucagone).

Valori alterati di glucosio nel sangue determinano l'insorgenza del diabete, malattia cronica che deve essere adeguatamente trattata per evitare malattie cardiovascolari, neurologiche, renali, etc.

I metodi standard di misura della glicemia prevedono il prelievo di un campione di sangue e sono pertanto invasivi. Per ottenere un quadro chiaro dei livelli di glicemia nell'arco della giornata sono necessarie innumerevoli misurazioni, pertanto, sono state messe a punto varie tecnologie per la misura non invasiva. Queste tecnologie possono essere: ottiche, comprendono tutte le tecniche sviluppate per lavorare nelle bande infrarosse e ottiche dello spettro, poiché sfruttano le proprietà di riflessione, assorbimento e diffusione della luce quando passa attraverso i mezzi biologici; elettromagnetiche, sfruttano le proprietà dielettriche del glucosio a basse frequenze utilizzando piccole quantità di radiazioni elettromagnetiche e ultrasuoni; elettrochimiche, generando una piccola corrente permettono di misurare il contenuto di glucosio nei fluidi corporei e di ottenere il valore del glucosio nel sangue indirettamente, dopo la calibrazione dell'algoritmo o del modello di dati. I dispositivi non invasivi in commercio o in fase di sperimentazione utilizzano le suddette tecnologie e sono raggruppabili in tre categorie: quelli basati sull'estrazione transdermica dei fluidi, quelli che sfruttano la radiazione ottica e infine quelli basati su tecnologie non ottiche. I sensori a estrazione transdermica dei fluidi utilizzano tecniche che hanno l'effetto di aumentare la permeabilità cutanea, così da rendere possibili l'estrazione di fluido interstiziale per la misurazione del glucosio da parte di un sensore esterno, i sensori ottici sfruttano tecnologie ottiche in quanto le proprietà della luce possono essere messe in relazione alla concentrazione di glucosio nei capillari. Tra le varie tecnologie, una delle più promettenti è la spettroscopia infrarossa basata sull'assorbimento e sulla dispersione di luce infrarossa da parte delle molecole presenti all'interno

del tessuto colpito dal raggio. In uscita viene prodotto uno spettro con bande di assorbimento caratteristiche del tessuto stesso. Per massimizzare l'assorbimento da parte delle molecole di glucosio è opportuno usare specifiche finestre di lunghezze d'onda e procedere con acquisizioni multiple a diverse lunghezze d'onda; l'applicazione di algoritmi di preelaborazione delle informazioni contribuisce a generare un modello che predice accuratamente la concentrazione di glucosio, considerando l'effetto di più variabili sull'output e minimizzando l'influenza dei segnali confondenti.

Il primo dispositivo indossabile e non invasivo commercializzato è stato il GlucoWatch G2 Biographer, è basato sulla tecnica della ionoforesi inversa e permette un monitoraggio continuo fino a tredici ore fornendo letture di glicemia frequenti e automatiche. Gli studi condotti dal Diabetes Research in Children Network e dal National Institute for Health Research hanno messo a confronto le prestazioni del GlucoWatch con altri metodi usuali di misura, monitorando i valori di glicemia e di emoglobina glicata, gli eventi di ipo- o iperglicemia ed eventuali effetti avversi registrati dai glucometri e poi analizzati a intervalli predefiniti.

Da questi due studi emerge che seppur non in grado di migliorare i valori di glicemia nei pazienti diabetici o di ridurre gli eventi di ipoglicemia e iperglicemia, il GlucoWatch ha mostrato una soddisfacente accuratezza. Questo parziale successo ha incoraggiato la ricerca nello sviluppo di nuove tecnologie e di nuovi dispositivi.

Indice

Introduzione	III
---------------------	-----

Capitolo 1 – REGOLAZIONE DELLA GLICEMIA

1.1 Glicemia	1
1.2 Valori normali	1
1.3 Sistema regolazione glucosio-insulina	2
1.4 Patologie	5
1.4.1 Diabete Mellito di tipo I	5
1.4.2 Diabete Mellito di tipo II	5
1.4.3 Complicanze del diabete	6

Capitolo 2 - TECNOLOGIE

2.1 Introduzione alla misura della glicemia	8
2.1.1 Automonitoraggio	9
2.2 Misura non invasiva	10
2.3 Tecnologie ottiche	10
2.3.1 Spettroscopia nel vicino infrarosso	11
2.3.2 Spettroscopia nel medio infrarosso	12
2.3.3 Spettroscopia Raman	12
2.3.4 Spettroscopia di impedenza	13
2.3.5 Fluorescenza	13
2.3.6 Polarimetria ottica	14
2.3.7 Tomografia ottica a Radiazione Coerente	16
2.4 Microonde	17
2.5 Metodi elettrochimici	18
2.5.1 Ionoforesi transdermica inversa	18
2.6 Ultrasuoni	18

Capitolo 3 - DISPOSITIVI

3.1 Sensori	19
3.2 Accuratezza dei sensori	20
3.3 Agenzie di approvazione	21
3.4 GlucoWatch® G2 Biographer	24
3.5 Pendra®	25
3.6 GlucoTrack	27
3.7 OrSense NMB-200G	29
3.8 SpectRx	30
3.9 SugarTrac	33
3.10 Symphony	33
3.11 TensorTip Combo Glucometer	34

Capitolo 4 – MODELLI MATEMATICI PER LA DETERMINAZIONE DELLA GLICEMIA DA SPETTROSCOPIA NEL VICINO INFRAROSSO

4.1 Spettroscopia infrarossa	37
4.2 Modello matematico del TensorTip Glucometer	43
4.3 Pulse Glucometry	47
4.4 Algoritmo PLS	50

Capitolo 5 - DATASET

5.1 Studio1	52
5.1.1 Partecipanti	52
5.1.2 Protocollo	52
5.1.3 Risultati	54
5.1.4 Considerazioni finali	57
5.2 Studio2	57
5.2.1 Partecipanti	57
5.2.2 Protocollo	60
5.2.3 Risultati	63

5.2.4 Considerazioni finali

67

Conclusioni

v

Bibliografia

vi

INTRODUZIONE

Il diabete mellito rappresenta una delle principali patologie e cause di mortalità nelle società sviluppate. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha fissato a circa 171 milioni le persone con diabete in tutto il mondo nell'anno 2000 e stima che entro il 2030 saranno circa 366 milioni i soggetti diabetici. Una cura vera e propria per il diabete attualmente non esiste, solo attraverso il continuo monitoraggio dei valori di glicemia e l'iniezione di insulina nei pazienti diabetici di tipo 1 si possono evitare severe complicanze all'apparato cardiocircolatorio, al sistema nervoso, ai reni e agli occhi. Quindi alla base del trattamento della malattia c'è il monitoraggio della glicemia, che deve essere misurata più volte nell'arco della giornata per un corretto dosaggio della terapia. Il diabete è una malattia cronica, pertanto, questa procedura deve essere ripetuta dal paziente diabetico per tutta la vita. Il metodo più comune e affidabile per la misura del glucosio nel sangue prevede il prelievo di un campione ematico con degli opportuni stick. Se da un lato questa procedura consente al paziente di tenere sotto controllo la malattia e di trattare adeguatamente la stessa permettendo un significativo miglioramento della qualità di vita, dall'altro risulta essere estremamente poco confortevole per il paziente sul lungo periodo, rischiosa per eventuali infezioni e costosa. A tal proposito, prioritario nell'ambito della ricerca è lo sviluppo di dispositivi non invasivi che possano supportare il paziente e i medici nel trattamento del diabete e che siano in grado di garantire sia un netto miglioramento della vita del soggetto diabetico che la praticità della misura. L'analisi effettuata in questa tesi ha come obiettivo quello di fornire una panoramica delle principali tecnologie non invasive per la misura della glicemia e di eseguire una revisione della letteratura in merito ai dispositivi non invasivi esistenti, in particolare quelli basati su tecnologia ottica.

CAPITOLO 1 – REGOLAZIONE DELLA GLICEMIA

1.1 Glicemia

La glicemia è il valore della concentrazione di glucosio nel sangue. Il glucosio è una molecola fondamentale per l'organismo poiché è il nutriente essenziale per tutte le cellule, che lo prelevano direttamente dal sangue.

Il corpo umano possiede un sistema di regolazione intrinseco della glicemia che consente di mantenerla relativamente costante durante l'arco della giornata, questa regolazione avviene ad opera di specifici ormoni: gli ipoglicemizzanti, che abbassano la glicemia, e gli iperglicemizzanti, che la innalzano. Il principale ormone ipoglicemizzante è l'insulina, prodotta dal pancreas ed indispensabile per il metabolismo degli zuccheri; gli ormoni glucagone, adrenalina, cortisolo, GH svolgono l'azione opposta e sono anche detti ormoni "controinsulari".

Disturbi dell'omeostasi glicemica sono determinati da valori alterati di questi ormoni, l'iperglicemia è causata da carenza di insulina e da alterata secrezione/funzione insulinica; l'ipoglicemia è causata da ridotta produzione glucidica o da aumentato del consumo glucidico.

1.2 Valori

In soggetti sani, che hanno una vita regolare e un'alimentazione corretta, generalmente nell'arco della giornata i valori della glicemia si mantengono tra i 60 e i 130 mg/dl.

A digiuno, i valori glicemici possono variare dai 70 ai 110 mg/dl; tra 100 e 125 mg/dl si tratta di condizione di alterata glicemia a digiuno (IFG), una condizione che dovrebbe invitare il paziente a porre maggior attenzione al suo stile di vita.

Valori di glicemia uguali o superiori a 126 mg/dl sono da considerarsi probabili sintomi di diabete.

1.3 Sistema di regolazione glucosio-insulina

Il glucosio rappresenta l'unica fonte di energia utilizzabile per le cellule del sistema nervoso centrale e per gli eritrociti; quindi, i valori di glucosio devono essere sufficientemente elevati a garantire il fabbisogno energetico di questi organi e tessuti ma, d'altra parte, è importante che la glicemia non aumenti troppo perché ciò comporterebbe una sensibile diminuzione dei liquidi nel corpo e il danneggiamento di molti tessuti, primi tra tutti i vasi sanguigni. L'omeostasi glicemica è mantenuta da vari processi metabolici e cellulari, dipende da una adeguata introduzione di glucosio con la dieta, dalla sua utilizzazione periferica, dalla riserva epatica di glucosio (glicogeno) e da fattori ormonali. Il sistema di regolazione glucosio-insulina rientra nei meccanismi di omeostasi glicemica, dove per l'appunto l'ormone regolatore è l'insulina.

L'insulina è prodotta dalle cellule β delle Isole di Langerhans del pancreas e ha come compito quello di attivare processi metabolici e cellulari volti alla riduzione della concentrazione ematica di glucosio.

Gli organi principali che fanno parte del sistema di regolazione sono distinti in:

- glucosio-dipendenti: organi (in particolare cervello ed eritrociti) la cui sopravvivenza dipende in modo critico dal glucosio, la cui velocità di utilizzazione è pertanto costante;
- insulino-dipendenti: organi (tessuto muscolare, tessuto adiposo) che metabolizzano il glucosio in eccesso rispetto alle necessità dei tessuti glucosio-dipendenti;
- gluco-sensori: organi (β -cellule pancreatiche, fegato e ipotalamo) in grado di rilevare la concentrazione di glucosio circolante e di organizzare un'appropriata risposta secretoria. [2]

Quando si verifica una condizione di iperglicemia, a seguito di un pasto, si ha un aumento di glucosio nel sangue che viene utilizzato in parte dagli organi glucosio-dipendenti, questi come detto precedentemente utilizzano una quantità di glucosio costante necessaria al loro fabbisogno, mentre il glucosio restante, non utilizzato, va a stimolare la produzione di insulina.

Il sangue ricco di glucosio, infatti, irrorà il pancreas e stimola la produzione di insulina da parte delle cellule β di quest'ultimo. L'insulina prodotta viene immessa nel flusso sanguigno, raggiunge gli organi insulino-dipendenti, tessuto muscolare e tessuto adiposo, e va a stimolare la captazione del glucosio da parte delle cellule di questi tessuti in modo da ridurre la concentrazione ematica.

Oltre all'aumento di permeabilità al glucosio, l'insulina determina l'aumento della captazione e della sintesi degli acidi grassi, che vengono depositati sotto forma di trigliceridi nel tessuto adiposo. L'aumentato assorbimento di glucosio comporta la stimolazione della sintesi di glicogeno, della captazione degli amminoacidi e l'incremento della sintesi proteica nelle cellule muscolari. Il ruolo dell'insulina non è solo quello ipoglicemizzante ma ha anche il compito di "nutrire" i tessuti in seguito all'introduzione di altri nutrienti, quali proteine e lipidi; si occupa dell'immagazzinamento del glucosio nelle cellule e di altri processi metabolici. (Tabella 1)

L'insulina raggiunge, inoltre, il fegato dove va a stimolare tutti quei processi che degradano il glucosio, va a bloccare la produzione dello stesso e la degradazione del glicogeno. L'azione ipoglicemizzante dell'insulina viene svolta anche nel fegato che però non è un organo insulino-dipendente ma possiamo definirlo come insulino-sensibile.

Il fegato è in grado di produrre il glucosio mediante la glicogenolisi e la gluconeogenesi; infatti, durante il digiuno è proprio la funzione gluconeogenica a fornire il fabbisogno necessario di glucosio all'organismo e a mantenere la glicemia al suo normale livello basale.

Il fegato assume un ruolo molto importante nell'attenuazione dell'escursione glicemica che avviene dopo un pasto. Quando la concentrazione di glucosio ematico raggiunge un valore elevato, la secrezione di insulina aumenta e circa i due terzi del glucosio assorbito dal tubo digerente vengono quasi immediatamente immagazzinati nel fegato, sotto forma di glicogeno. Durante le ore successive, quando sia la glicemia che la secrezione di insulina si riducono, il fegato reimmette glucosio nel sangue circolante.

Quando invece si ha una diminuzione dei valori di glucosio nel sangue intervengono le cellule α del pancreas secernendo il glucagone, ormone iperglicemizzante che riporta la glicemia a valori normali. In condizioni di ipoglicemia, inoltre, per un effetto diretto della bassa concentrazione di glucosio sull'ipotalamo, viene stimolato il sistema simpatico. A sua volta, l'adrenalina immessa in circolo dalle ghiandole surrenali induce un'ulteriore liberazione di glucosio da parte del fegato. In casi di ipoglicemia prolungata, dopo un periodo di ore o giorni vengono secreti sia l'ormone della crescita che il cortisolo, che fanno entrambi ridurre l'utilizzazione del glucosio da parte delle cellule che solitamente metabolizzano quello in eccesso. [1]

Questi ormoni, principalmente l'insulina e il glucagone, regolano un importante sistema di controllo a feedback per il mantenimento della glicemia a livelli normali. (Figura 1)

Tabella 1 Effetti dell'insulina sulla concentrazione di glucosio nel sangue: assunzione del glucosio da parte delle cellule e sua trasformazione in depositi di glicogeno e trigliceridi

Effetto metabolico
↑ Assunzione di glucosio
↑ Consumo di glucosio
↑ Sintesi del glicogeno e dei trigliceridi
↓ Demolizione del glicogeno e degli acidi grassi (fegato, muscolo)

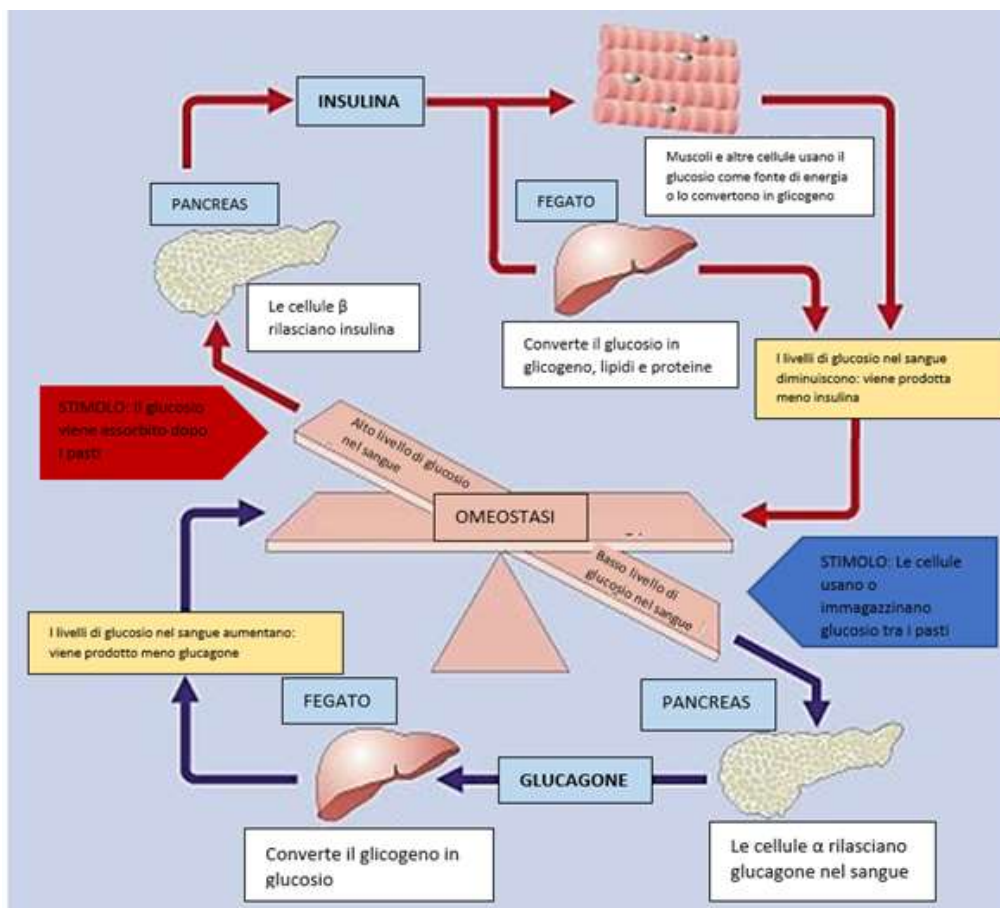


Figura 1 Meccanismo a feedback per il mantenimento dell'omeostasi glucidica

1.4 Patologie

Le principali patologie legate a valori alterati di glucosio nel sangue sono il Diabete Mellito di tipo I (DM I) e il Diabete Mellito di tipo II (DM II).

Il Diabete Mellito (DM) è una malattia cronica caratterizzata dall'instabilità del livello glicemico nel sangue, a causa della quale si passa da condizioni di iperglicemia (glicemia > 180 mg/dL) a condizioni di ipoglicemia (glicemia < 70 mg/dL). Responsabile di questo fenomeno è un difetto di funzionalità o di produzione di insulina, l'ormone secreto dalle isole di Langerhans del pancreas e che consente all'organismo di utilizzare il glucosio per i processi energetici all'interno delle cellule.

1.4.1 Diabete Mellito di tipo I

Riguarda circa il 10% delle persone con diabete e in genere insorge nell'infanzia o nell'adolescenza (quasi sempre entro i 15-18 anni). Nel diabete di tipo 1, il pancreas non produce insulina a causa della distruzione delle cellule β che producono questo ormone: è quindi necessario che essa venga iniettata ogni giorno e per tutta la vita. La velocità di distruzione delle β -cellule è, comunque, piuttosto variabile, per cui l'insorgenza della malattia può avvenire rapidamente in alcune persone, solitamente nei bambini e negli adolescenti, e più lentamente negli adulti (in questi rari casi si parla di una forma particolare, detta LADA: Late Autoimmune Diabetes in Adults). [3]

La causa del diabete tipo 1 è sconosciuta, sicuramente si tratta di un insieme di fattori che riguardano la genetica, l'ambiente e l'immunologia: ad una predisposizione genetica di base si unisce uno stimolo immunologico che, con il passare del tempo, porta alla distruzione delle cellule beta; quando la percentuale di cellule beta perse arriva all'80%, ci si ritrova di fronte al diabete mellito di forma 1. [4] Il diabete di tipo 1 viene classificato tra le malattie cosiddette "autoimmuni", cioè dovute a una reazione immunitaria diretta contro l'organismo stesso.

1.4.2 Diabete Mellito di tipo II

Il diabete mellito di tipo II è la forma più comune di diabete e rappresenta circa il 90% dei casi di questa malattia, che in generale si sviluppa dopo i 30-40 anni. La causa dell'insorgenza della malattia

è ancora ignota ma anche in questo caso possiamo ricondurla a più fattori, tra questi: la familiarità, inattività fisica, il sovrappeso, l'aumento dell'età ed elevati valori di pressione arteriosa.

Anche per il diabete di tipo 2 esistono forme rare, dette MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young), in cui il diabete di tipo 2 ha un esordio giovanile e sono stati identificati rari difetti genetici a livello dei meccanismi intracellulari di azione dell'insulina.

Il diabete di tipo 2 è dovuto sia all'insufficiente produzione d'insulina da parte delle cellule β del pancreas che all'insulino-resistenza, cioè all'incapacità di alcuni organi di rispondere all'azione dell'insulina. Nel fegato, l'insulina sopprime normalmente il rilascio di glucosio; tuttavia, nella condizione d'insulino-resistenza, il fegato rilascia impropriamente glucosio nel sangue. La percentuale delle cellule β non funzionanti differenzia la gravità della malattia.

Inizialmente il fisico reagisce all'insulino-resistenza e tiene sotto controllo la glicemia aumentando la sintesi di insulina, dopo un certo tempo però questo meccanismo cede e anche la sintesi insulinica diminuisce, ponendo le basi all'insorgenza del diabete mellito.

1.4.3 Complicanze del diabete

Tra le complicanze principali causate dal diabete mellito si distinguono le complicanze a breve termine, associate agli eventi di ipoglicemia, e le complicanze croniche o a lungo termine, associate invece agli eventi di iperglicemia. Nei pazienti diabetici gli episodi di ipoglicemia sono meno frequenti rispetto a quelli di iperglicemia, ma sono quelli che producono danni a breve termine che possono risultare fatali per il paziente stesso: la carenza, infatti, del glucosio per il sistema nervoso può portare alla perdita dei sensi, al coma e alla morte. Gli episodi di iperglicemia sono molto più frequenti e le complicanze croniche derivanti riguardano diversi organi e tessuti, tra cui gli occhi, i reni, il cuore, i vasi sanguigni e i nervi periferici.

Tra le patologie causate dal diabete ricordiamo la retinopatia diabetica, un danno a carico dei piccoli vasi sanguigni che irrorano la retina, con perdita delle facoltà visive; la nefropatia diabetica consiste in una riduzione progressiva della funzione di filtro del rene che, se non trattata, può condurre all'insufficienza renale fino alla necessità di dialisi o addirittura trapianto del rene; la neuropatia diabetica, definita dalla presenza di sintomi e segni di disfunzione dei nervi periferici in pazienti affetti da diabete mellito. Per quanto riguarda l'apparato circolatorio, il rischio di malattie cardiovascolari è da 2 a 4 volte più alto nelle persone con diabete che nel resto della popolazione causando oltre il 50% delle morti per diabete. Inoltre, le modificazioni della struttura dei

vasi sanguigni e dei nervi possono causare ulcerazioni e problemi a livello degli arti inferiori, soprattutto del piede (piede diabetico), a causa dei carichi che sopporta. Questo può rendere necessaria l'amputazione degli arti e statisticamente costituisce la prima causa di amputazione degli arti inferiori di origine non traumatica. [3]

CAPITOLO 2 - TECNOLOGIE

2.1 Introduzione alla misura della glicemia

La concentrazione di glucosio può essere determinata utilizzando campioni di sangue intero, plasma o siero, anche se questi ultimi due sono preferiti perché le letture dal sangue intero sono solitamente più basse del 15% a causa del contenuto di acqua nelle cellule del sangue. Pertanto, i metodi standard richiedono una certa quantità di sangue e sono necessariamente invasivi.

Inizialmente, la misurazione del glucosio poteva essere eseguita solo in laboratorio sfruttando le proprietà riducenti e di condensazione del glucosio, ma i problemi associati alla non specificità, alla tossicità e la reazione incrociata con altri agenti li hanno rapidamente esclusi dalla pratica clinica. Quindi, le tecniche attuali si affidano a metodi enzimatici e a metodi basati sull'esochinasi. Entrambi presentano alti gradi di accuratezza, specificità e minima reazione incrociata, ma, mentre, i laboratori li usano entrambi, il point-of-care e il monitoraggio domiciliare preferiscono il metodo enzimatico per la sua semplicità e la relativa accessibilità. Questi due metodi sono utilizzati come standard di riferimento per misurare le prestazioni di strumenti meno accurati, cioè l'automonitoraggio del glucosio ematico (self-monitoring of blood glucose, SMBG), il monitoraggio continuo della glicemia (Continuous Glucose Monitoring, CGM) e futuri dispositivi non invasivi e minimamente invasivi.

Il metodo Enzimatico-Amperometrico è basato sull'ossidazione del glucosio che avviene in presenza dello specifico enzima glucosio-ossidasi (GOx), dell'ossigeno (O_2) e dell'acqua (H_2O). Il prodotto di questa reazione è acido gluconico e perossido di idrogeno (H_2O_2). Il perossido di idrogeno viene poi ossidato elettrochimicamente all'anodo di una sonda elettrochimica, producendo un segnale amperometrico (corrente elettrica) proporzionale alla concentrazione di glucosio nel campione di sangue.

Il metodo basato sull'esochinasi, noto anche come metodo fotometrico, consiste in una serie di reazioni chimiche. Nella prima fase, il glucosio reagisce con l'enzima esochinasi, in presenza di adenosina trifosfato (ATP) e ioni di magnesio, per produrre glucosio-6-fosfato (G6P) e adenosina difosfato (ADP). Nella seconda fase, il G6P e la nicotinamide adenina dinucleotide (NAD) passano attraverso l'ossidazione con la glucosio-6-fosfato deidrogenasi fino ad essere ridotti rispettivamente a 6-fosfogluconato e nicotinammide-adenina-dinucleotide ridotto

(NADH). La quantità di NADH è proporzionale alla quantità di glucosio nel campione e ha la proprietà di assorbire la luce a 340 nm. La quantità di assorbimento è proporzionale alla quantità di NADH, ciò significa che il glucosio può essere misurato con tecniche spettrofotometriche standard. [5]

2.1.1 Automonitoraggio

Al di fuori dell'ambito clinico e di laboratorio ci sono due tipologie di dispositivi per l'automonitoraggio della glicemia: dispositivi per il monitoraggio non continuo (Non Continuous Glucose Monitoring, NCGM) e dispositivi per il monitoraggio continuo (CGM). Come suggerisce il nome i dispositivi NCGM, commercialmente noti come SMBG, sono usati per monitorare la concentrazione di glucosio nel sangue solo in determinati momenti della giornata, la frequenza delle misurazioni dipende dal tipo, dalla dieta, dal dosaggio della terapia, ecc.; tipicamente sono glucometri pungidito che sfruttano le tecniche elettrochimiche descritte in precedenza. Dall'altra parte i dispositivi CGM monitorano i livelli di glicemia automaticamente a distanza di pochi minuti, in modo tale da poter individuare rapidi cambiamenti di glucosio e il completo andamento della glicemia nell'arco della giornata; sono composti essenzialmente da tre parti: un ricevitore wireless, un trasmettitore e un sensore. Il ricevitore ha un monitor che visualizza la lettura del glucosio. Il trasmettitore è collegato al sensore e trasmette le misurazioni al ricevitore tramite radiofrequenze. Il sensore è un piccolo dispositivo di rilevamento inserito nel tessuto sottocutaneo, che si estende quanto basta per accedere al fluido interstiziale (ISF). Poi si procede con il metodo elettrochimico che genera un segnale amperometrico, che viaggia lungo un filo sottile fino al trasmettitore, situato all'esterno della pelle. Una volta che il ricevitore riceve i dati dal trasmettitore, elabora le informazioni e calcola il livello di glucosio.

Anche se l'apparente vantaggio dei dispositivi CGM è la capacità di misurare i livelli di glucosio continuamente, questi non possono essere considerati come la migliore opzione per il monitoraggio della glicemia poiché hanno ancora bisogno di essere calibrati almeno due volte al giorno con il metodo standard del pungidito. Inoltre, i dispositivi CGM misurano il glucosio dall'ISF, il che implica l'esistenza di un ritardo tra 6 e 12 minuti, ossia che le letture ISF non sono un riflesso dell'effettivo livello di glucosio nel sangue.

In conclusione, per l'automonitoraggio glicemico i dispositivi SMBG sono attualmente i più affidabili e accurati grazie alla relativa semplicità della procedura di misurazione e alla loro dipendenza dal sangue capillare. [6]

2.2 Misura non invasiva

I pazienti diabetici, sia di Tipo 1 che di Tipo 2, devono controllare i livelli di glucosio nel sangue più volte nell'arco della giornata, lo strumento più diffuso per tale scopo è il glucometro pungidito. In questo modo, i pazienti diabetici possono ottenere un quadro chiaro dei loro livelli di glucosio nel sangue per l'ottimizzazione della terapia e per la regolazione del dosaggio di insulina. Questo metodo però non è confortevole per i pazienti, i quali devono utilizzare oggetti appuntiti, provare dolore e vedere il sangue; presenta il rischio di infezione e a lungo termine può provocare danni tissutali laddove viene costantemente prelevato il sangue. Inoltre, il pungidito è un buon metodo per effettuare la misurazione del glucosio ma non permette il monitoraggio continuo della glicemia (CGM). Alcune incidenze di ipoglicemia o iperglicemia possono non essere registrate tra le misure rendendo così il monitoraggio non completo per la rappresentazione dell'andamento glicemico.

Tecnologie per la rilevazione del glucosio senza l'invasività, il dolore, il disagio e i rischi associati sono al centro di un'intensa ricerca e possiamo classificarle in due gruppi principali: minimamente invasive (MI) e non invasive (NI). Le tecnologie MI sono quelle che necessitano di estrarre un qualche fluido corporeo (es: lacrime e liquido interstiziale) per misurare la concentrazione di glucosio mediante una reazione enzimatica. Le tecnologie NI si basano esclusivamente su qualche forma di radiazione senza la necessità di accedere ad alcun fluido corporeo.

Queste tecnologie possono a loro volta essere classificate in più sottogruppi: tecnologie ottiche, termiche, elettromagnetiche e nanotecnologiche. I metodi ottici comprendono tutte le tecniche sviluppate per lavorare nelle bande infrarosse e ottiche dello spettro, poiché sfruttano le proprietà di riflessione, assorbimento e diffusione della luce quando passa attraverso mezzi biologici. I metodi termici permettono il monitoraggio del glucosio rilevando gli indici fisiologici relativi alla generazione di calore metabolico propri della molecola di glucosio, come tale, lavorano nel lontano infrarosso. Le tecniche elettromagnetiche invece sfruttano le proprietà dielettriche del glucosio alle basse frequenze utilizzando piccole quantità di radiazioni elettromagnetiche, corrente e ultrasuoni.

2.3 Tecnologie ottiche

Quando una radiazione luminosa incide su un tessuto multistrato come la pelle, una parte dell'onda viene riflessa dallo strato corneo, un'altra parte viene assorbita dal tessuto e la restante viene diffusa. (Figura 2) La tecnica della spettroscopia analizza le proprietà ottiche della luce in relazione

alla sua lunghezza d'onda e fornisce un metodo analitico per riconoscere i componenti del mezzo, poiché ogni sostanza presenta un suo spettro caratteristico che può essere visto come una "impronta digitale" di quella sostanza.

I diversi tipi di spettroscopia possono essere classificati a seconda delle proprietà ottiche della luce che vengono impiegate.

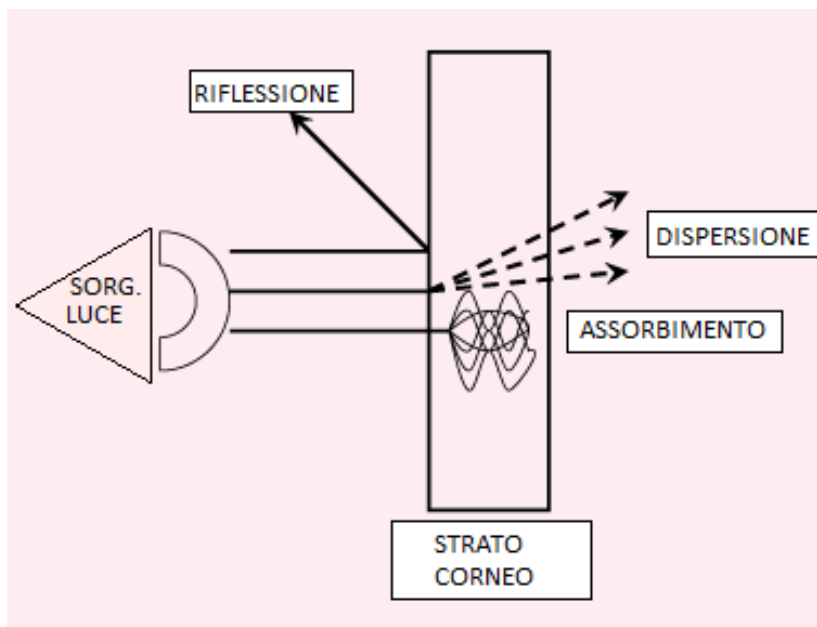


Figura 2 Interazione tra il raggio luminoso e la pelle

2.3.1 Spettroscopia nel vicino infrarosso

La spettroscopia nel vicino infrarosso (NIR) si basa sull'assorbimento e la dispersione di radiazioni con lunghezza d'onda di 780-2500 nm a causa delle vibrazioni molecolari e delle rotazioni dei legami all'interno della molecola colpita dal fascio di luce. La spettroscopia NIR permette la misura del glucosio nei tessuti a una profondità che va da 1 a 100 mm, la profondità di penetrazione diminuisce con l'aumento della lunghezza d'onda. Lo strumento che si utilizza per questa tecnologia è lo spettrometro a dispersione, costituito quindi da una sorgente luminosa, una griglia diffrattiva e un rivelatore. La luce emessa dalla sorgente incide sul campione in esame, in questo caso sul tessuto biologico, viene parzialmente assorbita e dispersa a causa della sua interazione con le componenti chimiche presenti all'interno del tessuto. Lo spettrometro rileva la radiazione

riflessa e di conseguenza le bande di assorbimento. Queste bande di assorbimento generano uno spettro specifico caratteristico del materiale stesso.

Le variazioni di concentrazioni di glucosio nel sangue modificano i coefficienti di assorbimento e di diffusione nei tessuti. Nell'infrarosso il coefficiente di assorbimento del glucosio è basso, molto minore rispetto a quello dell'acqua per via della differenza di concentrazione tra i due. Gli spettri dell'acqua, dell'emoglobina, dei lipidi e delle proteine si sovrappongono a quello "debole" del glucosio, pertanto, questa tecnica viene applicata soltanto in determinati siti anatomici quali: lobo dell'orecchio, mucosa orale interna, etc. [5]

2.3.2 Spettroscopia nel medio infrarosso

La spettroscopia nel medio infrarosso (MIR) è una tecnica di spettroscopia vibrazionale e si basa sulla luce emessa nello spettro a 2500-10,000 nm. Il principio fisico è simile a quello della spettroscopia nel NIR.

A causa delle maggiori lunghezze d'onda, rispetto alla spettroscopia NIR c'è meno dispersione della radiazione nel tessuto e un maggiore tasso di assorbimento. Inoltre, le linee di assorbimento nello spettro sono più nitide e specifiche, specialmente tra 8-10 μm . Questa caratteristica significa che le molecole hanno uno spettro unico nella regione MIR, rendendolo questa tecnica ideale per l'identificazione molecolare. D'altra parte, il forte assorbimento dell'acqua in questa regione non permette ai segnali MIR di penetrare più di alcuni micrometri nel tessuto (100 μm circa), rendendo necessario l'uso di potenti sorgenti MIR come il Quantum Cascade Laser (QCL), e l'uso di tecnologie complementari, come la spettroscopia fotoacustica, per aumentare la sensibilità al rilevamento del glucosio.

2.3.3 Spettroscopia Raman

La spettroscopia Raman è una tecnica basata sull'interazione tra radiazione e materia. Tale tecnica sfrutta una luce laser che, interagendo con i moti vibrazionali delle molecole, provoca la riemissione di luce a lunghezze d'onda che sono caratteristiche degli specifici gruppi atomici della molecola raggiunta dalla radiazione.

Uno spettro Raman è generato dallo scattering anelastico tra i fotoni di una radiazione incidente e le molecole che costituiscono il campione. Irradiando il campione con un fascio luminoso

monocromatico a una data frequenza una parte della radiazione viene diffusa elasticamente alla stessa frequenza iniziale, fenomeno definito come diffusione Rayleigh. Lo spettro della radiazione diffusa presenterà inoltre una serie di righe con frequenza maggiore o minore rispetto alla riga Rayleigh, dovute alla diffusione anelastica.

La spettroscopia Raman di solito fornisce spettri più nitidi e meno sovrapposti rispetto alla spettroscopia NIR. L'intensità delle caratteristiche spettrali è proporzionale alla concentrazione della specie particolare, e gli spettri sono meno sensibili ai cambiamenti di temperatura. Inoltre, è relativamente meno sensibile all'acqua, e l'interferenza da fenomeni di luminescenza e fluorescenza è ridotta. Le principali limitazioni sono legate all'instabilità della lunghezza d'onda e dell'intensità della luce laser, e ai tempi di acquisizione spettrale piuttosto lunghi. Inoltre, poiché la potenza della sorgente luminosa deve essere mantenuta bassa per evitare lesioni, il rapporto segnale/rumore è notevolmente ridotto. Come per la spettroscopia NIR, l'interferenza di altri composti rimane un problema. [5]

2.3.4 Spettroscopia di impedenza

La spettroscopia di impedenza, nota anche come spettroscopia dielettrica, è una tecnica basata sulla valutazione dei cambiamenti introdotti dalle variazioni di concentrazione di glucosio nel sangue sulla permittività e la conducibilità della membrana cellulare dei globuli rossi. Variazioni della concentrazione del glucosio nel plasma inducono variazioni nelle concentrazioni di ioni sodio Na^+ e di ioni potassio K^+ causando cambiamenti nella conduttività della membrana dei globuli rossi.

In sostanza viene applicata una piccola quantità di corrente alternata, di intensità nota, e si misura la resistenza opposta dal mezzo, in questo caso il tessuto biologico, e quindi la conducibilità. Pertanto, se ne deduce che la tecnica è piuttosto semplice, facile da impiegare in ambito pratico a patto di minimizzare la sensibilità alle variazioni di temperatura e al sudore. [8]

2.3.5 Fluorescenza

La tecnologia della fluorescenza si basa sul principio dell'emissione di luce fluorescente da parte di alcune sostanze, dette fluorofori. I fluorofori dopo l'assorbimento di radiazioni ad una specifica lunghezza d'onda e a un dato livello di energia sono in grado di emettere radiazioni che presentano

una diversa lunghezza d'onda e un diverso livello di energia, proporzionali alla concentrazione dell'analita in esame.

Il glucosio può essere direttamente legato con un fluoroforo, è preferibile però legare anche una molecola intermediaria, chiamata recettore, per ovviare ai problemi di bassa selettività, irreversibilità, interferenza ed esaurimento dell'analita. I recettori possono essere enzimi, derivati dell'acido boronico, proteine o sostanze sintetizzate in laboratorio.

L'utilizzo dei ricettori permette di usare diverse tecniche fluorescenti e parametri di monitoraggio in un'ampia gamma spettrale, dall'ultravioletto (UV) al vicino infrarosso.

Tra le varie tecniche esistenti vi è il trasferimento di energia per risonanza (FRET) che permette di individuare e caratterizzare con estrema precisione la distanza tra due molecole. Il meccanismo sfrutta la presenza di due molecole fluorescenti, dette donatore e accettore. Quando il glucosio si lega alla molecola accettore, il legame accettore-donatore è interrotto, portando a una diminuzione della condivisione di elettroni e a un aumento della fluorescenza; in assenza di glucosio, il trasferimento di elettroni tra donatore e accettore aumenta, portando a una minore fluorescenza. Il monitoraggio della luce fluorescente può essere misurato attraverso il rilevamento dell'intensità luminosa o del tempo di decadimento. Tuttavia, quest'ultimo è preferito in quanto il tempo di vita della fluorescenza è specifico per ogni analita, permettendo la differenziazione tra le sostanze, anche se tutte emettono luce esattamente alla stessa lunghezza d'onda.

Inoltre, il tempo di vita di fluorescenza può essere precisamente misurato nei vari mezzi di dispersione, compresi gli strati della pelle, indicando che la tecnologia della fluorescenza è adatta per i dispositivi di monitoraggio del glucosio basati sul rilevamento transdermico, comprese le lenti a contatto e impianti sottocutanei.

2.3.6 Polarimetria ottica

La polarimetria ottica (OP) è uno dei primi metodi non invasivi di rilevamento del glucosio nel sangue. Poiché il glucosio è una sostanza otticamente attiva e ha una rotazione ottica stabile, quando un fascio di luce polarizzata illumina una soluzione contenente soluti di glucosio, la presenza di glucosio causa una certa rotazione del piano polarizzato della luce incidente.[4] A questo punto, la direzione di polarizzazione formerà un angolo di deflessione con la direzione originale incidente, che è proporzionale alla quantità di glucosio, alla lunghezza del percorso ottico, alla temperatura e

alla lunghezza d'onda del raggio laser che di solito è da qualche parte tra la regione superiore del NIR e la regione inferiore della banda ottica (~780-400 nm).

Data la minima rotazione ottica associata al livello fisiologico di glucosio, la presenza di altre molecole attive e l'alto grado di dispersione della luce nella pelle e nei tessuti, rendono impraticabile l'uso della polarimetria ottica nella pelle. Tuttavia, è possibile utilizzarla sull'umore acqueo nella camera anteriore dell'occhio (Figura 3) grazie alle sue eccellenti proprietà ottiche. Il metodo consiste nel polarizzare la luce emessa da una sorgente luminosa prima che raggiunga l'occhio. La luce riflessa viene poi analizzata per determinare il suo angolo di rotazione e l'intensità.

Tale tecnica ha il potenziale di rilevare piccole quantità di glucosio, a condizione che questioni come sensibilità alla temperatura e al movimento e altri, possono essere affrontati positivamente. [5]

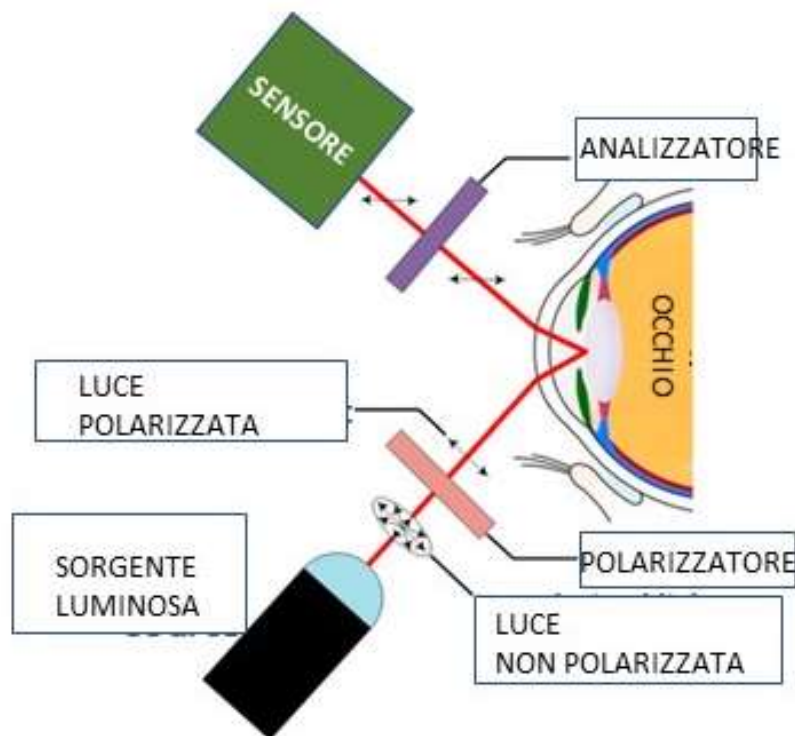


Figura 3 Principio della polarimetria ottica nell'occhio per la misura del glucosio

2.3.7 Tomografia ottica a Radiazione Coerente

La tomografia ottica a radiazione coerente è una tecnologia di imaging ad alta risoluzione, è in grado di rilevare i cambiamenti delle caratteristiche ottiche dei tessuti biologici a risoluzioni micrometriche, è quindi possibile misurare la concentrazione del glucosio ematico attraverso la pelle con una certa accuratezza.

La tomografia ottica a radiazione coerente (OCT) è basata sull'uso di una luce a bassa coerenza, come quella emessa da un diodo superluminescente, un interferometro con un braccio di riferimento e uno per il campione, uno specchio mobile sul braccio di riferimento e un fotorecettore per misurare il segnale interferometrico. (Figura 4)

La tecnologia di imaging OCT utilizza la luce infrarossa vicina alla parte visibile (near infrared) riflessa per generare un'immagine; la sorgente near infrared (di norma 800-1300 nanometri) è divisa in due percorsi: un percorso viene applicato al tessuto campione, l'altro allo specchio di riferimento.

L'interferometria viene utilizzata per un controllo coerente dei riflessi diffusi dal tessuto campione con la luce proveniente dal braccio di riferimento mentre il tessuto del braccio campione viene scansionato. Gli algoritmi di elaborazione dei segnali vengono eseguiti sulla luce controllata coerentemente per ottenere una scansione assiale a risoluzione profonda. L'OCT può di norma produrre un'immagine a una profondità di tessuto tra 3 e 5 mm con un'altissima risoluzione inferiore ai 10 micron. Un componente essenziale dei sistemi OCT è lo specchio di riferimento, impiegando uno spettrometro e potenti tecniche di elaborazione dei segnali come le trasformate di Fourier veloci, è possibile la commutazione di ampiezza e la compressione del registro per risolvere le informazioni di profondità e combinarle con i dati della scansione laterale in tempo reale. Le proprietà di dispersione del tessuto sono altamente dipendenti dal rapporto tra l'indice di rifrazione dei centri di diffusione (componenti cellulari, proteine, ecc.) e quello del fluido interstiziale. Un aumento della concentrazione di glucosio nel liquido interstiziale provoca un aumento del suo indice di rifrazione, determinando così una diminuzione del coefficiente di dispersione. Pertanto, a partire dai dati di OCT, generati dalla luce retrodiffusa, è possibile ottenere una stima della concentrazione di glucosio nel fluido interstiziale.

I vantaggi di questa tecnologia riguardano l'elevato rapporto segnale-rumore e una elevata profondità di penetrazione. I limiti riguardano la sensibilità alle variazioni di temperatura e agli artefatti da movimento. [6]

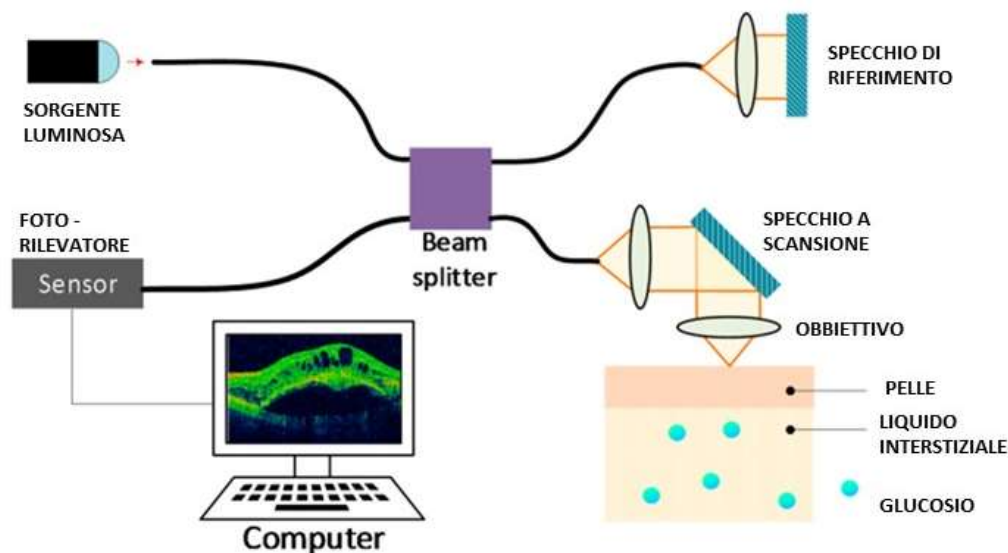


Figura 4 Principio della scansione OCT per la misura del glucosio

2.4 Microonde

Le microonde sono onde elettromagnetiche che presentano una lunghezza d'onda compresa tra 1mm e 1m, corrispondenti a frequenze nel range di $300\text{GHz} \div 300\text{MHz}$. Queste onde possono facilmente attraversare tessuti biologici dallo spessore dell'ordine del millimetro, specialmente a basse frequenze; poiché presentano minore energia per fotone e la radiazione si disperde meno nei tessuti biologici, possono andare più in profondità nel tessuto e quindi raggiungere le regioni con una maggiore concentrazione di sangue, ottenendo letture di glucosio più accurate. In generale, la progettazione di sensori a microonde si basa sul fatto che la riflessione, la trasmissione e l'assorbimento di microonde è strettamente legato alle proprietà dielettriche dei tessuti, la costante dielettrica varia al variare della concentrazione di glucosio. Le proprietà dielettriche sono descritte dalla permittività e dalla conducibilità.

La concentrazione di glucosio viene misurata con un sensore che si basa su un risonatore dielettrico accoppiato con una microstrip. I cambiamenti di permittività della soluzione di glucosio a causa della variazione di concentrazione dello stesso sono stati indagati attraverso la misurazione del coefficiente di riflessione S11 del risonatore. Il cambiamento della concentrazione di glucosio è direttamente correlato alla variazione del coefficiente di riflessione a causa dell'interazione elettromagnetica tra il risonatore dielettrico e la soluzione di glucosio. È possibile determinare la

concentrazione di glucosio con una risoluzione minima di 5mg/dl nell'intervallo di concentrazione 100-600mg/dl a frequenze di funzionamento di circa 7.65GHz (per la soluzione di acqua e glucosio) e 7.77GHz (per i campioni di sangue di maiale).

2.5 Metodi elettrochimici

2.5.1 Ionoforesi inversa

La ionoforesi inversa è una tecnica transdermica che utilizza una corrente elettrica per accedere al liquido interstiziale. Sulla superficie della pelle vengono posti due elettrodi, un anodo e un catodo, che causano la migrazione degli ioni sodio verso il catodo e degli ioni cloro verso l'anodo, generando così una corrente elettrica. Nello specifico, la migrazione degli ioni sodio genera una corrente elettrica e causa un flusso convettivo del liquido interstiziale, ossia molecole non cariche, come il glucosio, vengono trasportate con gli ioni. Questo flusso trasporta il glucosio interstiziale attraverso la pelle, fino al catodo, dove un sensore tradizionale effettua la misura diretta tramite metodi enzimatici, cioè l'ossidazione da parte di un enzima, come la glucosio-ossidasi (GOx).

Lo svantaggio principale di questa tecnica è che essa tende a causare irritazione cutanea per via del passaggio della corrente elettrica. Questo problema può essere evitato limitando l'intervallo di tempo del potenziale elettrico di applicazione, tenendo sempre conto che è necessaria una durata minima per effettuare la misurazione. Inoltre, quest'approccio non è in grado di rilevare con accuratezza rapide variazioni nella concentrazione di glucosio e non può essere utilizzato se il soggetto sta sudando in modo significativo. [6]

2.6 Ultrasuoni

Questa tecnologia misura il tempo di propagazione dell'onda ultrasonora attraverso la materia. Maggiore è la concentrazione di glucosio, più veloce è la propagazione e conseguentemente minore è il tempo con cui l'onda attraversa il mezzo. A seconda della forza dei legami che compongono la materia e della densità del mezzo, il fluido o il tessuto presentano un certo grado di comprimibilità che determina la velocità acustica delle onde a bassa frequenza. Perciò, i cambiamenti della concentrazione di glucosio nel fluido extracellulare influenzano la densità e la comprimibilità adiabatica, influenzando l'impedenza acustica in modo lineare. [7]

CAPITOLO 3 – DISPOSITIVI

3.1 Sensori

I sensori non invasivi per il monitoraggio in continuo della glicemia sviluppati, o attualmente in fase di progettazione e sperimentazione, sono numerosi e raggruppabili in tre categorie: quelli basati sull'estrazione transdermica dei fluidi, quelli che sfruttano la radiazione ottica, infine quelli basati su tecnologie non ottiche.

I sensori a estrazione transdermica dei fluidi utilizzano tecniche come la ionoforesi e gli ultrasuoni a frequenze di 20–100 KHz (minori di quelle utilizzate in clinica), hanno l'effetto di aumentare la permeabilità cutanea, così da rendere possibili l'estrazione di fluido interstiziale per la misurazione del glucosio da parte di un sensore esterno basato sulla glucosio-ossidasi. Un'altra tecnica non invasiva prevede l'estrazione del liquido interstiziale dalla cute tramite la microporazione: viene perforato lo strato corneo, senza penetrare in profondità, per creare delle vie preferenziali verso l'esterno per il fluido intradermico. Un dispositivo progettato dalla SpectRx crea questi micropori, di diametro inferiore a 100 μ m, tramite un raggio laser che produce un'abrasione termica dello strato corneo e nel fluido raccolto viene dosato il glucosio tramite le suddette tecniche elettrochimiche.

I sensori ottici sfruttano tecnologie ottiche che si fondano sulla proprietà della cute di assorbire e riflettere i raggi di luce infrarossa emessi dal sensore in funzione della concentrazione del glucosio nei capillari sottostanti. Un'altra tecnica di rilevamento a infrarossi si fonda sull'assunto che la concentrazione del glucosio nel tessuto ha un effetto quantitativo sulla microcircolazione locale. Le lievi variazioni della temperatura locale determinano una risposta vasomotoria che modifica le proprietà ottiche della cute e questa variazione viene registrata tramite una radiazione infrarossa. La polarimetria è un altro effetto ottico che è stato considerato per la misurazione del glucosio nei tessuti; il principio si basa sul fenomeno della dispersione ottica rotatoria, vale a dire che molecole chirali in soluzione acquosa ruotano il piano della luce polarizzata in misura dipendente dalla concentrazione del glucosio nel liquido interstiziale.

I dispositivi basati su tecnologie non ottiche hanno generato non poche delusioni nel passato più recente. Questi sistemi dovrebbero sfruttare il principio della spettroscopia a impedenza e il dispositivo più noto con queste caratteristiche è stato il sistema Pendra®. Tale sistema, dopo aver ricevuto l'approvazione CE, è stato ritirato dal mercato in quanto i dati presentati per ottenere tale

approvazione sono risultati falsificati. Ciò che è rimasto dell'esperienza Pendra è tuttavia l'evidenza che in qualche modo il razionale dello strumento era valido e rappresenta un punto di partenza per la progettazione di dispositivi non invasivi.[5]

3.2 Accuratezza dei sensori

Il problema dell'accuratezza di misurazione dei dispositivi per il monitoraggio in continuo del glucosio è ovviamente fondamentale per valutarne l'utilità clinica. Per poter parlare di accuratezza è tuttavia necessario definirne i parametri di misurazione:

- 1) Il Mean Absolute Relative Difference (MARD) valuta l'accuratezza paragonandola a una tecnica di misurazione di riferimento secondo la formula: $(\text{valore misurato dal sensore} - \text{valore di riferimento}) / \text{valore di riferimento} \times 100$ espressa quindi in valore-percentuale.

Il risultato ottenuto indica quanto il valore misurato si avvicina al valore reale. Un numero piccolo indica la capacità del dispositivo di effettuare misure accurate, mentre un numero grande indica considerevole inaccuratezza dello strumento.

Il valore MARD non può essere considerato come un indicatore assoluto di accuratezza, questo dipende fortemente dalle caratteristiche e dai dettagli dello studio condotto pertanto comparare il valore MARD di due dispositivi diversi può portare a interpretazioni errate;

- 2) la Griglia di errore di Clarke (Figura 5) confronta i valori misurati dal dispositivo con i valori misurati dalla tecnica di riferimento. Ogni coppia di valori viene inserita in una griglia con una retta di regressione lineare, che è suddivisa in diverse zone:
 - a) in zona A l'errore è inferiore al 20%;
 - b) in zona B l'errore di misurazione è maggiore del 20% ma non è necessario nessun intervento correttivo da parte del paziente;
 - c) in zona C l'errore induce il paziente alla correzione eccessiva di valori glicemici che non richiederebbero tale intervento;
 - d) in zona D l'errore comporta il mancato trattamento di valori che richiederebbero un intervento del paziente o la mancata rilevazione di valori glicemici pericolosi;
 - e) in zona E l'errore causa un intervento del paziente opposto a quello che sarebbe necessario.

Secondo i criteri di accuratezza che sono stati definiti recentemente, per essere clinicamente accettabile, un sensore deve presentare almeno il 95% dei valori confrontati con una tecnica di riferimento nella zona A+B, mentre non devono comparire valori nella zona E (clinicamente inaccettabile);

- 3) la norma ISO 15197:2015 stabilisce che, rispetto ad un metodo di laboratorio di riferimento, il 95% delle misure devono essere comprese entro ± 15 mg/dL per concentrazioni di glucosio inferiori a 100 mg/dL o $\pm 15\%$ per concentrazioni di glucosio superiori o uguali a 100 mg/dL.

3.3 Agenzie di approvazione

Alcune agenzie adottano delle linee guida per l'approvazione dei dispositivi medici nelle loro nazioni, mentre altre come l'Agenzia Europea della Medicina seguono le linee guida date dalla ISO 15197:2015. I dispositivi che soddisfano i requisiti ISO possono ottenere il marchio CE.

Attualmente non c'è uno standard univoco per i glucometri non invasivi (NIG) pertanto, i produttori di dispositivi NIG per progettare i loro strumenti e conformarsi ai regolamenti nazionali seguono le linee guida generali pensate per i metodi invasivi.

Nella tabella 2 sono elencate le principali agenzie di approvazione dei dispositivi per la misura non invasiva del glucosio, per ogni agenzia viene riportato innanzitutto il Paese di provenienza e le linee guida a cui fa riferimento per i diversi tipi di dispositivo (per il monitoraggio o l'automonitoraggio); infine sono specificate le percentuali di accuratezza richieste, e le relative tolleranze, ai vari dispositivi per l'intero range di misura o per diversi intervalli di misura.

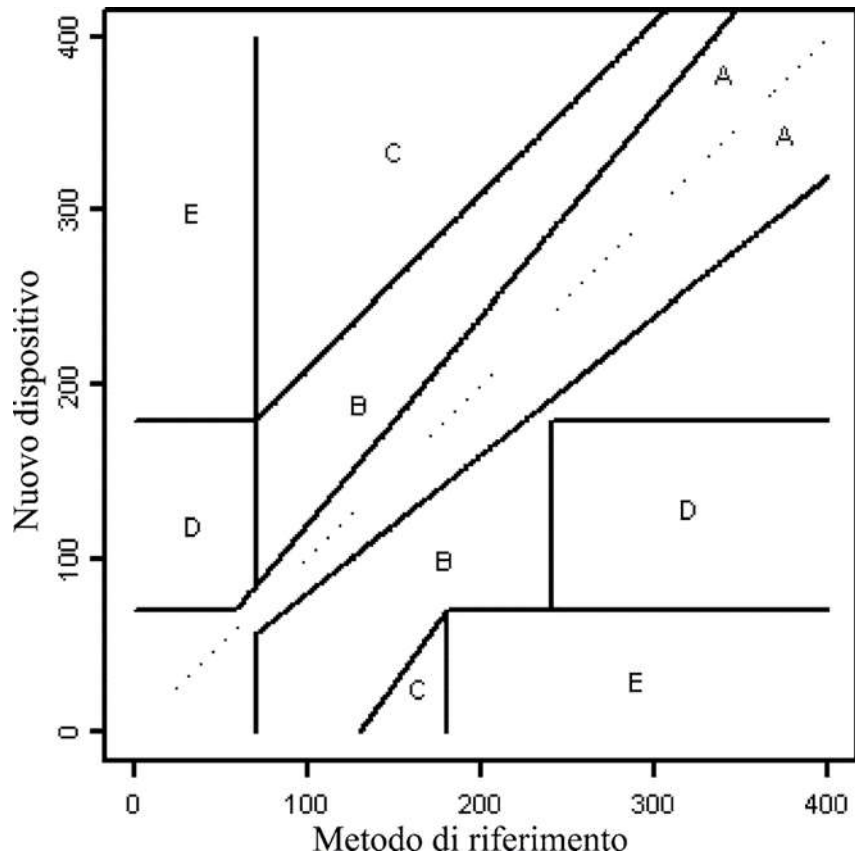


Figura 5 Griglia di errore di Clarke: Sull'asse delle ascisse sono indicati i valori di glucosio misurati dal sensore per il monitoraggio continuo, sull'asse delle ordinate i valori registrati contemporaneamente da una metodica di riferimento. Zona A+B è clinicamente accettabile, la Zona E è clinicamente inaccettabile.

Tabella 2 Nella tabella sottostante vengono riportate le linee guida per l'approvazione dei dispositivi per il monitoraggio del glucosio in alcuni Paesi.

AGENZIA	PAESE	LINEA GUIDA / STANDARD	ANNO DI RILASCIO	TIPO DI DISPOSITIVO	CONCENTR. DI GLUCOSIO	CRITERI
Food & Drug Administration (FDA)	USA	UCM 380325	2016	BGMS	≥75 mg/dL	95% ± 12% 98% ± 15%
		UCM 380327		SMBG	<75 md/dL	95% ± 12mg/dL 98% ± 15 mg/dL
European Medicines Agency (EMA)	EU	EN ISO 15197	2015	BGMS/SMBG	≥100 mg/dL	95% ± 15%
Health Canada	Canada	ISO 15197	2013	BGMS/SMBG	<100 mg/dL	95% ± 15 mg/dL
Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)	Brasile					
China Food & Drug Administration (CFDA)	Cina					
Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA)	Giappone				Intero range (diabete di tipo 1)	99% Zones A & B of Parkes Error Grid
Therapeutic Goods Administration (TGA)	Australia					

3.4 GlucoWatch® G2 Biographer

Il GlucoWatch® G2 Biographer è un dispositivo che ha l'aspetto di un orologio da polso (Figura 6), progettato per affiancare i tradizionali metodi invasivi nel monitoraggio della glicemia. Questo è in grado di misurare il glucosio attraverso la pelle utilizzando un tampone monouso posizionato nel retro del misuratore e a contatto con la pelle. La tecnica alla base di questo dispositivo è la ionoforesi transdermica inversa, viene fatta scorrere una corrente di $300\mu\text{A}$ tra due elettrodi a contatto con la pelle e questo permette di prelevare il fluido interstiziale in due dischi di raccolta che si comportano come anodo e catodo. Nei suddetti dischi è presente l'enzima glucosio ossidasi (GOx) che reagisce con il glucosio (presente nel fluido interstiziale) a formare il perossido di idrogeno (H_2O_2), un biosensore a contatto con anodo e catodo rileva il perossido di idrogeno generando così una corrente elettrica. Il dispositivo utilizza poi un valore di calibrazione inserito dal paziente per convertire il segnale in una misura di glucosio. [6]

La calibrazione viene eseguita con un glucometro standard dopo un periodo di 115 minuti (circa 2 ore), il dispositivo poi completerà una lettura ogni 10 minuti per un massimo 13 ore.

Rispetto allo stik le misure del GlucoWatch presentano un ritardo di 15 minuti, il risultato è una misura media dei livelli di glucosio nei 20 minuti precedenti. Ogni lettura viene poi confrontata con dei livelli di iperglicemia e ipoglicemia, prestabiliti e regolabili, e se la lettura supera uno di questi livelli viene emesso un allarme acustico. Il dispositivo è inoltre dotato di un allarme per cambiamenti superiori al 35% nelle letture del glucosio; di un indicatore di tendenza della glicemia per variazioni di 1 mmol L^{-1} ; di indicatori per segnalare attività come i pasti, esercizio fisico e assunzione di insulina. Il GlucoWatch è dotato di una memoria interna in grado di memorizzare fino a 8500 letture, i dati raccolti possono poi essere scaricati da un computer e analizzati da uno specifico software. [5]

Sono stati effettuati quattro studi clinici. L'accuratezza è stata valutata in un ambiente clinico controllato, in un ambiente domestico simulato e nell'ambiente domestico. Un ulteriore studio di confronto del metodo di laboratorio ha valutato l'accuratezza rispetto a un metodo standard di laboratorio (analizzatore YSI; Yellow Springs Instruments). Le letture del Biographer sono state confrontate con misurazioni della glicemia capillare eseguite con vari strumenti.

Tutti i pazienti che hanno partecipato allo studio erano adulti (età maggiore o uguale a 18 anni) con diabete di tipo 1 o di tipo 2 e che richiedevano trattamento insulinico; ogni soggetto ha indossato il dispositivo per sessioni di 15 ore (3 ore di equilibrio e 12 ore di misurazione). Nell'ambito clinico, i livelli di glucosio sono stati manipolati per produrre periodi di ipoglicemia e iperglicemia.

I principali limiti di questo strumento riguardano la necessità di utilizzare come riferimento per la calibrazione un glucometro standard; il tampone presente dietro al GlucoWatch deve essere cambiato ogni 12-13 ore; la necessità di un periodo di riscaldamento; l'inaccuratezza delle misure se il paziente si sta muovendo, sta sudando o vi sono rapidi cambiamenti di temperatura e non può essere utilizzato in acqua. L'utilizzo prolungato di questo dispositivo, inoltre, può causare delle irritazioni cutanee.

Il GlucoWatch G2 Biographer, progettato dalla Cygnus Inc., ha ricevuto l'approvazione CE nel 1999 e l'approvazione dalla FDA nel 2001, tuttavia non è più in commercio dal 2007 a causa dei limiti precedentemente elencati. Pur non essendo ancora in commercio, è uno dei primi dispositivi indossabili per la misura della glicemia ed è stato estremamente importante nello sviluppo delle tecnologie non invasive. [10]



Figura 6 GlucoWatch Biographer

3.5 Pendra®

Il Pendra, della Pendragon Medical Ltd, è un dispositivo non invasivo per la misura della glicemia basato sulla spettroscopia a impedenza, approvato dalla CE nel 2003 come strumento a supporto

dei tradizionali glucometri. È un dispositivo indossabile, la forma è simile a un orologio da polso: l'apparecchio misura come i cambiamenti nella composizione del sangue influenzano i flussi d'impedenza della cute e dei tessuti sottostanti, questo avviene grazie a un circuito risonante aperto, che si trova a contatto con la pelle. (Figura 7) Lo strumento può eseguire fino a quattro misurazioni al minuto con una sensibilità nel range di 20÷60 mg dL⁻¹ di glucosio per ohm.

Sono stati eseguiti diversi studi per la validazione dello strumento:

- i. dieci soggetti non diabetici hanno utilizzato il misuratore mentre la loro glicemia veniva aumentata da 100 a 300 mg/dL ottenendo delle misure che per il 95% rientravano nella regione A+B della griglia di errore di Clarke (52% in A e 43% in B);
- ii. quindici pazienti non diabetici hanno utilizzato lo strumento mentre i loro valori di glicemia venivano fissati prima ad alti livelli poi a livelli normali, le misure effettuate rientravano per il 99% nella regione A+B della griglia di Clarke (81% in A e il restante 18% in B);
- iii. dodici pazienti diabetici di Tipo 1 si sono sottoposti a un test di tolleranza al glucosio orale di 75g con somministrazione di insulina dopo due ore, le misure risultanti non hanno evidenziato sostanziali differenze dai risultati ottenuti con i test pungito-dito. Durante la lenta diminuzione di glucosio le misure rientravano nella regione A della griglia per l'85.1%, mentre per rapide diminuzioni di glucosio per il 73.5% in A e per il 23.3% in B;
- iv. per valutare gli effetti sul dispositivo delle variazioni di flusso sanguigno date dal movimento dell'avambraccio, quindici soggetti non diabetici hanno indossato due dispositivi fissati alle estremità superiori, con nastro e bracciale; ne è emerso che la variazione dei segnali di impedenza dovuta al movimento risulta minima quando il dispositivo è fissato con nastro e bracciale.

Il Pendra è dotato di una porta USB per il download dei dati su computer e di software per la loro analisi, ha una capacità di memoria di un mese e una batteria che dura fino a 24 ore. Sono previsti degli allarmi per eventi di ipoglicemia e per rapide variazioni di concentrazione del glucosio. Quando si verificano variazioni di impedenza dovute a variazioni di temperatura il dispositivo è in grado di auto-correggersi. A causa delle differenze nello spessore della pelle e dei tessuti sottostanti tra un individuo e l'altro, lo strumento richiede un processo di calibrazione a due punti.

Attualmente non è più in commercio poiché uno studio post-marketing ha mostrato un coefficiente di correlazione R tra le misure Pendra e le misure di un tradizionale glucometro pari solo al 35%.

[11]



Figura 7 Pendra®

3.6 GlucoTrack

È un dispositivo portatile in grado di misurare i livelli di glucosio nel sangue mediante la tecnologia ad ultrasuoni; per rendere la misura della glicemia più accurata è in grado di misurare la conduttività dei tessuti e la loro capacità termica. Il GlucoTrack è costituito da due unità: l'unità principale, contenente un display, un trasmettitore, un ricevitore e un processore, e l'unità "Earring" che contiene i sensori e l'elettronica di calibrazione, da attaccare al lobo dell'orecchio. (Figura 8) Solitamente il dispositivo misura il livello di glucosio in modo discontinuo ma può essere impostata la modalità continua per eseguire automaticamente misurazioni sequenziali, indicando così le tendenze. Valori oltre i limiti, impostati da ogni utente, determinano dei segnali di avvertimento che possono essere acustici o visivi. I dati misurati possono essere scaricati per analisi successive. Questi misuratori possono essere utilizzati da soggetti diabetici di tipo 1, di tipo 2 e da soggetti con alterata tolleranza al glucosio e la loro accuratezza permette ai pazienti di decidere il momento ottimale per assumere la loro medicina. Un'applicazione specifica è legata alle incubatrici pediatriche, per tenere

traccia del basso livello di glucosio dei bambini prematuri, fornendo avvisi quando si verifica un episodio di ipoglicemia.

Test di validazione sono stati eseguiti su 69 soggetti, sui quali sono state effettuate 174 misurazioni globali con il GlucoTrack e poi confrontate con un gold standard. Da queste 174 misurazioni è stato evidenziato un coefficiente di correlazione R pari a 0,94.

Il dispositivo è facile da utilizzare e permette agevoli letture grazie al display di cui è fornito; per di più supporta fino a tre utenti e questa sua caratteristica lo rende conveniente e comodo per quei casi in cui vi sono più soggetti diabetici in una stessa famiglia (i dati rimangono separati per ogni paziente che presenta una sua earring unit calibrata che differisce dalle altre per un diverso colore). Il GlucoTrack è alimentato a batteria e può essere facilmente agganciato alla cintura del paziente. Il misuratore richiede una calibrazione raramente (meno di una al mese) a differenza di molti altri misuratori non invasivi che richiedono una calibrazione ogni poche ore o giorni. [11]

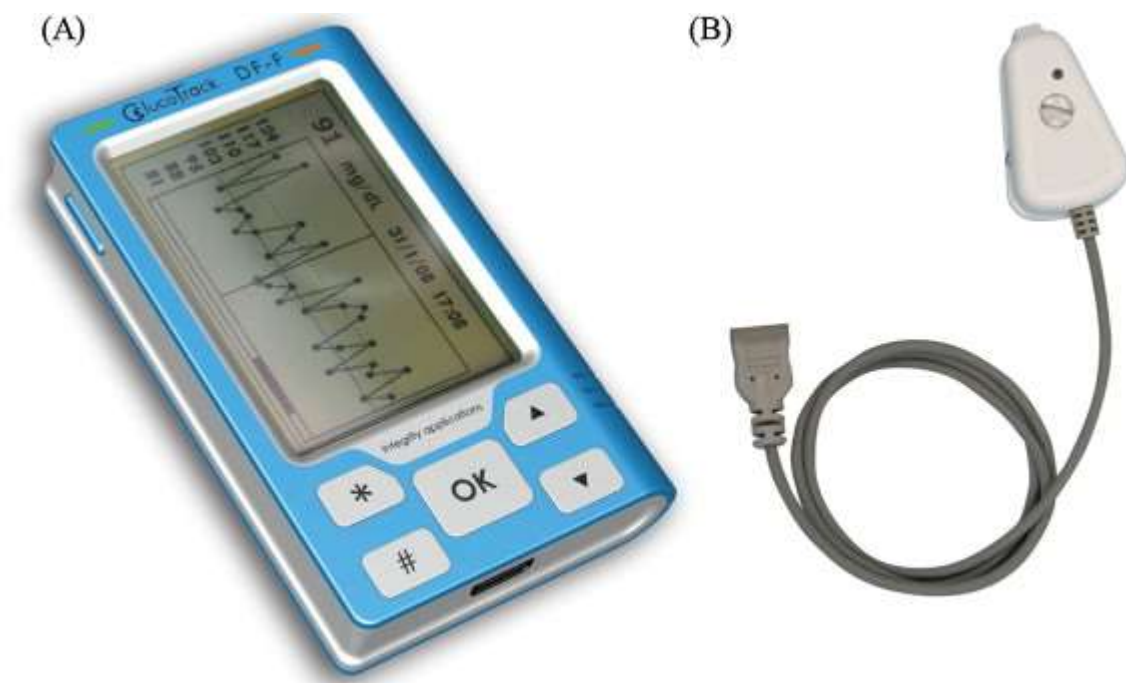


Figura 8 GlucoTrack™ (A) Unità principale. (B) Clip per l'orecchio.

3.7 OrSense NBM-200G

OrSense NBM-200G è un dispositivo della OrSense Ltd., Israele, che permette la misurazione non invasiva del glucosio, nonché dell'emoglobina e della saturazione di ossigeno con una sensibilità molto elevata. La tecnologia alla base di questo strumento è la spettroscopia nel vicino infrarosso a occlusione, basata sul rilevamento del segnale ottico rosso del sangue dovuto ai cambiamenti nella concentrazione di glucosio nei vasi sanguigni del dito.

L'occlusione temporanea del flusso sanguigno nel dito in cui viene effettuata la misura aumenta il segnale rosso NIR, migliorando così il rapporto segnale-rumore. Le proprietà ottiche del sangue sono influenzate dalla concentrazione di ogni costituente e il fenomeno è rafforzato dall'occlusione. Per ogni combinazione di concentrazioni, esiste un profilo ottico specifico ("impronta digitale"). Confrontando i dati ottenuti dal soggetto in esame con un noto profilo ottico, mediante un algoritmo è possibile conoscere la concentrazione di glucosio e degli altri costituenti del sangue (emoglobina, ossigeno, ...).

Il misuratore è pensato sia per lo screening che per scopi diagnostici e, più specificamente, per monitorare eventi post-prandiali, iperglicemia e ipoglicemia. Le misurazioni sono disponibili entro 1 minuto.

Per determinare la precisione dello strumento, la compagnia produttrice ha condotto studi clinici su centinaia di pazienti. Un primo studio è stato condotto su cinque uomini con diabete di Tipo 1, i quali sono stati sottoposti a un clamp ipoglicemico iperinsulinemico: l'insulina è stata infusa a un tasso costante e l'ipoglicemia a gradini è stata ottenuta variando l'infusione di glucosio. I valori di glucosio variavano da 40 a 270 mg/dl. Un secondo studio, più ampio, è stato eseguito su 41 soggetti (17 femmine e 24 maschi, di età compresa tra 19 e 82 anni, 7 con diabete di tipo 1, 28 con diabete di tipo 2 e 6 volontari sani). Le misurazioni sono state eseguite dopo un periodo di digiuno di 4 ore per 1 ora e per altre 3 ore dopo un pranzo leggero. I livelli di riferimento di glucosio nel sangue sono stati valutati ogni 30 minuti in concomitanza con le letture non invasive. Le misurazioni sono state eseguite in dieci giorni lavorativi consecutivi. Gli algoritmi di calibrazione sono stati formulati per ogni soggetto sulla base dei dati dei primi 2 giorni dei 10 giorni di prova.

Dal primo studio, è stato trovato un alto grado di correlazione ($R = 0,91$) con il gold standard, con un errore medio inferiore al 10%. Nel secondo studio, le misure di glucosio dello strumento hanno mostrato di nuovo una buona correlazione con il gold standard ($R = 0,71$); la differenza assoluta relativa era del 14% e l'errore assoluto medio era di 20 mg/dl (range 10-25). Inoltre, lo studio ha

indicato che il misuratore può essere utilizzato per rilevare le escursioni glicemiche. L'azienda produttrice sostiene che il livello di precisione è simile a quello dei misuratori invasivi utilizzati nell'assistenza domiciliare, poiché raggiungono un tasso di errore del 10% a causa di errori di manipolazione, assunzione di sangue impuro, ecc.

Il dispositivo è portatile e di facile utilizzo, presenta un display facilmente leggibile e una memoria interna in grado di registrare oltre 500 voci (valori di glucosio nel sangue, riferimenti diurni, ...).

Il misuratore include anche funzioni aggiuntive per una migliore fruibilità, come l'analisi dei dati di tendenza e l'avviso di allarme su valori di glucosio bassi o alti, per di più non necessita di frequenti calibrazioni.

La OrSense Ltd dichiara che il suo strumento è sicuro, non presenta materiale pericoloso che possa contaminare il paziente o il personale medico. [11]



Figura 9 OrSense NBM-200G

3.8 SpectRx Inc.

Lo SpectRx è composto principalmente da due unità: la prima unità è un laser portatile, che crea micro-pori (della dimensione di un capello) nello strato esterno e morto della pelle. (Figura 10) Il fluido interstiziale, contenente glucosio, scorre attraverso i micro-pori e viene raccolto da un cerotto. Poi, raggiunge un sensore di glucosio, che rappresenta la seconda unità. (Figura 11) Poiché il sensore è in contatto diretto con il fluido interstiziale, è possibile utilizzare un sensore tradizionale. Il misuratore comprende anche un trasmettitore che invia in modalità wireless le misure di glucosio a un display. L'azienda produttrice chiama la sua metodologia "tecnologia biofotonica".

Per la validazione di questo strumento sono stati effettuati numerosi test clinici:

- i. sono stati studiati 64 soggetti adulti (29 con diabete di Tipo 1, 31 con diabete di Tipo 2, 4 non diabetici) per conoscere per quanto tempo il liquido interstiziale può essere acquisito tramite i micro-pori. Da questo test è stato evidenziato che il fluido interstiziale può essere prelevato per 96 ore;
- ii. 30 bambini, di età compresa tra i 7 e i 18 anni (19 diabetici di Tipo 1, 11 non diabetici) sono stati studiati per valutare la portata del fluido interstiziale, ne è risultato che la portata è leggermente più alta per i bambini che per gli adulti, e quindi il sistema può essere adattabile per l'uso nei bambini;
- iii. 36 soggetti (16 diabetici di tipo 1, 9 diabetici di tipo 2, 11 non diabetici) sono stati presi in esame per studiare se la quantità di fluido interstiziale raccolto è la stessa per i diversi siti anatomici, quali il braccio e l'addome. Il test ha mostrato che le quantità di fluido interstiziale raccolto da diverse parti del corpo sono pressoché identiche;
- iv. in 20 soggetti (tutti diabetici) sono state effettuate misurazioni per 4-8 ore, e confrontate con quelle fatte con stick glicemico sul dito, al fine di valutare il coefficiente di correlazione. In totale sono state effettuate 280 misurazioni appaiate con un coefficiente di correlazione pari a 0,901;
- v. in 27 soggetti (tutti diabetici) sono state effettuate misurazioni per 4-8 ore e confrontate con quelle fatte tramite stick glicemico sul dito, al fine di valutare sia il coefficiente di correlazione che il tempo medio di ritardo, per un totale di 738 misurazioni. I risultati del test mostrano un coefficiente di correlazione R pari a 0. 894, e un ritardo medio tra le misurazioni del fluido interstiziale e del sangue di 11,5 min;
- vi. in 8 soggetti (tutti diabetici) le misurazioni sono state effettuate durante la notte (8-48 ore) e confrontate con quelle degli stick glicemici, al fine di valutare il coefficiente di correlazione. Sono state eseguite 263 misurazioni e il coefficiente di correlazione ottenuto è 0,898;
- vii. in 56 soggetti (tutti diabetici) sono state fatte misurazioni per 2 giorni consecutivamente e confrontate con le misurazioni degli stick, per valutare il coefficiente di correlazione. Le 1167 misurazioni effettuate in totale hanno riportato un coefficiente di correlazione uguale a 0,875, con il 97,7% dei punti nelle regioni A + B della griglia di errore di Clarke;
- viii. in 252 (187 diabetici, 65 non diabetici) soggetti le misure sono state effettuate consecutivamente per 2 giorni e confrontate con le misurazioni del sangue attraverso un sistema di glicemia commerciale, al fine di valutare il coefficiente di correlazione. Sono state

ottenute complessivamente 4059 misurazioni e un coefficiente di correlazione $R = 0,946$, con il 99,1% dei punti nelle regioni A + B della griglia di errore di Clarke. [12]

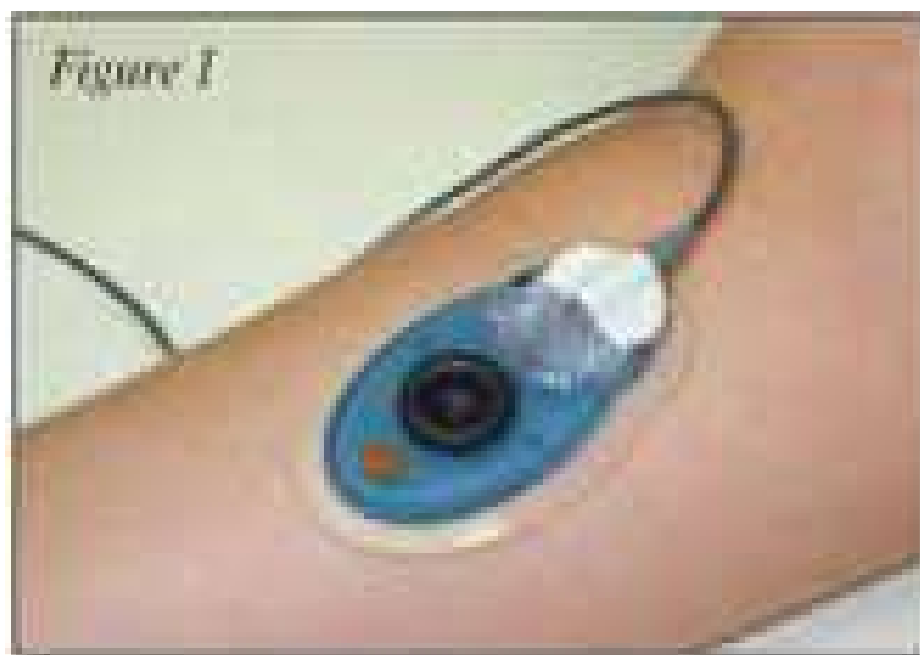


Figura 10 Unità laser a contatto con la pelle



Figura 11 Sensore di glucosio che costituisce la seconda unità

3.9 SugarTrac

Il dispositivo SugarTrac, progettato dalla LifeTrac Systems Inc., tramite un auricolare inserito nel lobo dell'orecchio fornisce un fascio di luce a bassa energia, nel vicino infrarosso, permettendo così la misura della glicemia del soggetto in esame. Questo strumento non è destinato alla misura continua del glucosio ma permette un numero illimitato di letture. L'auricolare deve essere utilizzato per meno di un minuto ed è necessario aspettare cinque minuti tra una lettura e l'altra. Lo SugarTrac include una sorgente luminosa in grado di emettere radiazioni dalla lunghezza d'onda di 940 nm per illuminare un tessuto, e dei sensori in grado di ricevere la luce e generare un segnale di trasmissione. Le sorgenti luminose sono dei LED che emettono un fascio di luce intermittente a 1kHz; poi un analizzatore di segnale determina la concentrazione di glucosio nel sangue del paziente.



Figura 12 SugarTrac

3.10 Symphony

Il Symphony, progettato dalla Sontra Medical Corporation, è composto essenzialmente da due unità: un dispositivo a ultrasuoni, a contatto con la pelle attraverso un mezzo acquoso, che ne aumenta la permeabilità, e un biosensore, che misura il glucosio nel fluido interstiziale che raggiunge il sensore attraverso i micropercorsi generati sulla pelle. Dal biosensore, alcuni dati

vengono trasmessi tramite tecnologia wireless a un glucometro che alla fine fornisce e visualizza la lettura del glucosio.

Test di validazione dello strumento sono stati eseguiti su dieci pazienti con diabete di Tipo 1 e di Tipo 2 per un periodo di 8 ore. Le misurazioni del glucosio nel sangue sono state effettuate ogni 20 minuti, mentre i sensori di glucosio collocati sopra i siti cutanei trattati (due per persona) hanno fornito letture ogni 5 s.

Il coefficiente di correlazione (R) riportato da questi studi è pari a 0,84, con il 95% delle coppie di misurazione del glucosio nella regione A + B della griglia di errore di Clarke.

L'applicazione del dispositivo ad ultrasuoni per 15s è sufficiente a rendere la pelle permeabile per diverse ore. La tecnologia è assolutamente indolore. [12]

3.11 TensorTip Combo Glucometer

Il TensorTip Combo Glucometer (CoG), prodotto dall'azienda Cnoga Medical Ltd, è un dispositivo destinato al monitoraggio sia invasivo che non invasivo del glucosio; viene prelevato un campione di sangue (circa 40-440 md/dL) dal polpastrello, dal quale viene misurata la concentrazione di glucosio nei capillari e infine in modo non invasivo è in grado di prevedere i livelli di glucosio nei tessuti. A tal proposito lo strumento è costituito da due unità principali: la prima permette la misura invasiva, del tutto simile ad un tradizionale glucometro; l'altra è destinata alla misura non invasiva del glucosio nei tessuti delle dita.

Per quanto riguarda la misura non invasiva, vengono utilizzati quattro diodi (LED) che emettono luce con una lunghezza d'onda nell'intervallo 600÷1000 nm attraverso la punta del dito. Quando l'onda luminosa attraversa i tessuti e i capillari sanguigni, la luce viene parzialmente assorbita e conseguentemente il segnale luminoso viene modificato. La radiazione non assorbita viene invece proiettata sul sensore d'immagine a colori (camera) del dispositivo. La camera fotografa in tempo reale la luce che attraversa i tessuti, le immagini a colori vengono immagazzinate in una memoria digitale per essere poi analizzate mediante uno specifico algoritmo da un processore.

I segnali presentano sei dimensioni (posizione [x, y], colore [R, G, B] e tempo [t]) e sono associati ai livelli di glucosio del tessuto per mezzo di algoritmi derivati dal meccanismo neurale.

In pratica, dopo la calibrazione del dispositivo, viene eseguita una misura non invasiva inserendo un dito del paziente nell'apposito scomparto per circa 30 secondi, ossia fino a quando non compaiono i risultati sul display. Poiché non vi è a necessità di estrarre alcun fluido corporeo, il dispositivo non richiede una sterilizzazione dopo il suo utilizzo, tuttavia, una pulizia frequente dello scomparto in cui viene posizionato il dito è consigliata per garantire l'affidabilità dei risultati. A questo scopo, si raccomanda anche di pulire le dita prima dell'uso del CoG o di riscaldarle prima con acqua calda per assicurare un corretto apporto di sangue nel sito di misura.

Il CoG è un dispositivo progettato e utilizzato per il monitoraggio della glicemia, non è quindi destinato alla diagnosi, alla determinazione delle dosi di insulina o all'assunzione dei farmaci. La terapia si deve basare sui risultati ottenuti con la componente invasiva presente nello strumento. Gli studi per la validazione dello strumento sono stati eseguiti su soggetti, con più di 18 anni, sani o diabetici. Sono stati esclusi quei soggetti che presentavano anomalie anatomiche alle dita (es: dita troppo spesse per la camera di misura, danni ai polpastrelli dovuti ai continui prelievi di sangue per il monitoraggio della glicemia), soggetti con insufficienza renale, donne in gravidanza o in fase di allattamento, pazienti con Epatite C o HIV.

Innanzitutto, il dispositivo è stato calibrato eseguendo giornalmente 8 letture non invasive subito dopo due misurazioni invasive per 7-10 giorni (56 misurazioni per calibrazione, anche se il requisito minimo è 25). Per quanto riguarda la misura invasiva, i campioni di sangue potevano essere prelevati da tutte le dita indistintamente, mentre per la misura non invasiva doveva essere preso in considerazione sempre lo stesso dito. Per una corretta calibrazione, è necessario utilizzare due letture consecutive della componente invasiva e una lettura non invasiva in parallelo per garantire una correlazione affidabile tra i valori di glucosio nel tessuto delle dita e dei livelli di glucosio nel sangue. Dopo aver completato la procedura di calibrazione, i pazienti sono stati sottoposti al secondo step, il pasto, che normalmente avveniva almeno 24 ore dopo l'ultima calibrazione. Per questo secondo test ai partecipanti è stato richiesto un digiuno di almeno sei ore. Dopo una prima misurazione di glucosio, i presenti hanno ingerito un pasto standard dato da un panino con formaggio e salsiccia, una barretta di cereali e un succo d'arancia (69 g di carboidrati, 27 g di grassi, 16 g di proteine). Prima e durante la visita del pasto (cioè negli istanti di tempo -30, 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150 e 180 minuti) è stato prelevato sangue capillare per la misurazione del glucosio con il metodo di riferimento (YSI 2300 Stat Plus, YSI Inc, Yellow Springs, OH), seguito da letture con il CoG invasivo, il componente NI CoG, il dispositivo Contour Next

(Ascensia, Wuppertal, Germania), e una seconda e ultima misurazione YSI aggiuntiva. Il coefficiente di variazione dal metodo di riferimento è risultato essere $< 1\%$. [12]



Figura 13 TensorTip Combo Glucometer

CAPITOLO 4 - MODELLI MATEMATICI PER LA DETRMINAZIONE DELLA GLICEMIA DA SPETTROSCOPIA NEL VICINO INFRAROSSO

Nel capitolo 2 è stata brevemente accennata la spettroscopia nel vicino infrarosso come metodo non invasivo per la misura del glucosio. Tra le tecniche proposte quella della spettroscopia NIR è di notevole interesse per la sua semplicità e stabilità. In questo capitolo verrà approfondito l'argomento e verranno mostrati due possibili modelli matematici per ottenere la misura del glucosio.

4.1 Spettroscopia infrarossa

Quando una molecola organica viene investita da una radiazione infrarossa la cui frequenza (espressa in termini di numero d'onda, inversamente proporzionale alla lunghezza d'onda) sia compresa fra 10.000 e 100 cm^{-1} , l'energia ceduta dalla radiazione stessa viene convertita in energia vibrazionale. Si parla quindi di spettroscopia vibrazionale. L'energia della molecola aumenta di una quantità pari ad $E = hv$ dove v è la frequenza della radiazione incidente. La molecola può assorbire solo un quanto di luce alla volta, solo quando la radiazione elettromagnetica possiede l'energia esatta per far passare la molecola allo stato energetico più alto, avviene l'assorbimento. Poiché l'energia dei livelli vibrazionali è strettamente associata alla struttura molecolare e poiché l'energia che può o non può essere assorbita è determinata dai livelli stessi, ne consegue che, osservando quale energia viene assorbita dalla molecola, è possibile dedurre quali siano i principali gruppi funzionali di una molecola e quindi determinare la sua natura chimica. La spettroscopia infrarossa è dunque una spettroscopia di assorbimento. Lo spettro infrarosso si presenta come una sequenza di bande di assorbimento registrate in funzione della lunghezza d'onda o del numero d'onda.

Il setup per la spettroscopia NIR è composto da una sorgente luminosa in grado di generare radiazioni a diverse lunghezze d'onda, comprese nel range NIR, e da un foto-rilevatore che misura l'intensità della luce che viene riflessa o trasmessa attraverso il campione a seconda della lunghezza d'onda della luce, si tratta di un dispositivo in grado di convertire la radiazione termica (IR) in un segnale elettrico, che viene poi inviato al sistema di elaborazione e di registrazione.

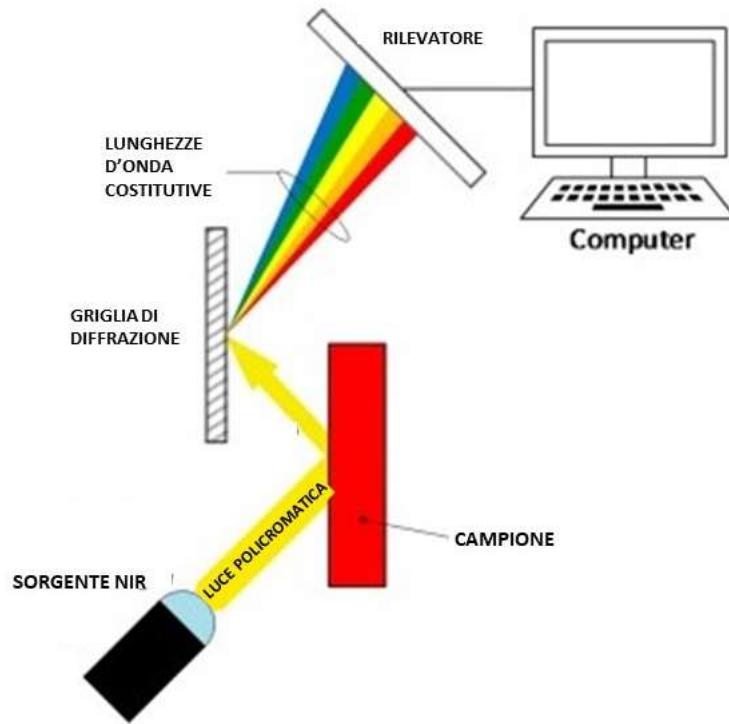


Figura 14 Setup per la spettroscopia infrarossa a riflessione

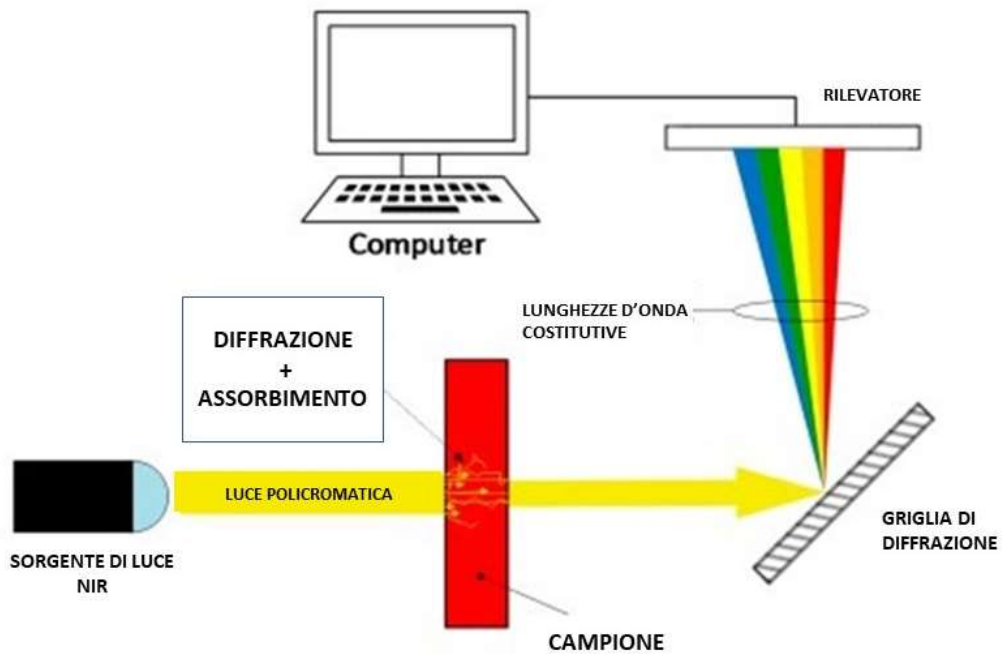


Figura 15 Setup per la spettroscopia infrarossa a trasmissione

In breve, la spettroscopia “near infrared” è basata sul fatto che nei tessuti trasparenti alla luce esiste una cosiddetta “finestra ottica” nella regione spettrale compresa fra 600 e 1300 nm. L’assorbimento dei raggi luminosi di questa banda spettrale può essere misurato dalla loro trasmissione o riflessione a livello delle estremità delle dita o della superficie della mucosa orale. Il glucosio presente nei liquidi dei tessuti esaminati a seconda delle concentrazioni può modificare l’entità del fenomeno fisico. Di conseguenza, grazie a complesse tecniche multivariate è possibile calibrare modelli che offrano buone correlazioni fra le concentrazioni glicemiche di riferimento e quelle attese nei mezzi biologici. La spettroscopia infrarossa permette di misurare la concentrazione di glucosio ad una profondità che va da 1mm a 100mm, il raggio incidente sul tessuto è parzialmente assorbito e parzialmente diffuso a causa della sua interazione con i vari componenti del tessuto.

L’attenuazione della luce è descritta dalla Legge di Beer Lambert:

$$I = I_0 e^{-\mu_{eff} d} \quad (1)$$

Dove: I è l’intensità della luce riflessa [W/cm^2];

I_0 è l’intensità della luce incidente [W/cm^2];

μ_{eff} è il coefficiente di attenuazione [cm^{-1}];

d è la lunghezza del cammino ottico nel tessuto [cm].

μ_{eff} può essere espresso anche come una funzione $\mu_{eff} = f(\mu_a, \mu_s)$, dove μ_a è il coefficiente di assorbimento e μ_s è il coefficiente di diffusione.

Cambiamenti nella concentrazione di glucosio possono influenzare il μ_a di un tessuto attraverso cambiamenti di assorbimento corrispondenti allo spostamento dell’acqua o cambiamenti nel suo assorbimento intrinseco. Le variazioni della concentrazione di glucosio influenzano anche l’intensità della luce diffusa, cioè μ_s , poiché questo coefficiente è funzione della densità dei centri di diffusione nel volume di osservazione del tessuto, del diametro medio dei centri di diffusione, del loro indice di rifrazione e dell’indice di rifrazione del fluido circostante. Nel caso del tessuto cutaneo i centri di diffusione sono le fibre del tessuto connettivo mentre quelli del sangue sono gli eritrociti. In sintesi, la concentrazione di glucosio potrebbe essere stimata dalle variazioni della luce sia trasmessa attraverso un tessuto contenente glucosio che riflessa dal tessuto stesso. La trasmissione o la riflettanza (localizzata o diffusa) della luce può essere misurata da appositi rilevatori.

A partire dalla (1) è possibile definire l’assorbanza come:

$$A = \log \frac{I_0}{I} \quad (2)$$

Assumendo che l'attenuazione della luce dovuta alla diffusione sia trascurabile rispetto alla luce assorbita possiamo dire che $\mu_{\text{eff}} \approx \mu_a$.

μ_a può essere espresso anche nel seguente modo:

$$\mu_a = \epsilon \cdot c \quad (3)$$

Dove: ϵ è l'assorbività molare o coefficiente di assorbimento molare [L/ (mmol cm)] che dipende dalla lunghezza d'onda della radiazione incidente e dalla struttura delle molecole assorbenti;
 c è la concentrazione delle molecole assorbenti [mmol/L].

Facendo le opportune sostituzioni si ottiene la seconda formulazione della Legge di Beer Lambert, ossia:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot d \quad (4)$$

Diversi materiali mostrano un picco di assorbanza all'interno di uno specifico intervallo di lunghezze d'onda a causa della dipendenza di ϵ dalla lunghezza d'onda della luce incidente e dalla struttura delle molecole assorbenti. Per la gamma NIR, il valore di ϵ per il glucosio varia tra 0 e 1 dL/ (g cm).

Le molecole più abbondanti nei fluidi biologici del corpo umano sono quelle di acqua, mentre quelle di glucosio rappresentano circa lo 0.07-0.1% del plasma sanguigno. Le molecole di acqua assorbono una percentuale significativa della luce incidente, soprattutto nel range delle lunghezze d'onda del medio infrarosso. Pertanto, è necessario identificare una finestra di lunghezza d'onda che minimizzi l'assorbimento della luce da parte dell'acqua e massimizzi l'assorbimento della luce da parte delle molecole di glucosio. Nella gamma NIR ci sono due picchi di assorbimento per l'acqua, uno è posto tra 1350 e 1520 nm, e l'altro è tra 1790 e 2000nm. Le finestre di lunghezze d'onda tra 700 e 1100

nm, tra 1500 e 1850 nm e tra 2000 e 2400 nm sono utilizzate per la misurazione del glucosio, poiché il glucosio ha un assorbimento osservabile e si verifica una quantità relativamente minima di assorbimento della luce da parte dell'acqua. L'assorbimento della luce da parte del glucosio è maggiore nell'intervallo di lunghezza d'onda tra 2000 e 2400 nm rispetto agli intervalli 1500-1850 nm e 700-1100 nm, mentre l'assorbimento della luce da parte dell'acqua è inferiore per questi ultimi due intervalli. Quindi, utilizzando lunghezze d'onda più corte si può ottenere una maggiore selettività per le molecole di glucosio, riducendo al minimo l'effetto di interferenza dell'acqua. Un'altra possibile soluzione per minimizzare l'effetto interferente dell'acqua è l'utilizzo di più lunghezze d'onda. Un esempio di dispositivo non invasivo che fa uso di più lunghezze d'onda è il TensorTip Combo Glucometer, il quale è in grado di misurare il glucosio nel range di 70-440 mg/dL. Lo strumento è composto da quattro LED che emettono radiazioni con lunghezze d'onda nel range 600-1000 nm e da un sensore ottico che fotografa la luce trasmessa che passa attraverso il polpastrello. La lettura di glucosio si basa sull'analisi di un segnale a sei dimensioni (posizione [x, y], tempo [t], colore [rosso, verde, blu]) che è correlato alla concentrazione di glucosio nel sangue.

La concentrazione delle molecole assorbenti in una soluzione viene misurata in base al cambiamento nell'intensità della radiazione luminosa mentre attraversa la soluzione secondo l'equazione (1). Questa equazione predice l'assorbimento della luce da parte di una miscela di glucosio in acqua distillata. In realtà la presenza di altri componenti nel sangue e dei componenti assorbenti dei tessuti (melanina, beta-carotene, tessuto adiposo, etc.) influenza la quantità di luce assorbita; pertanto, si ha che il coefficiente di assorbimento è dato dalla somma dei coefficienti di assorbimento di tutte le specie assorbenti.

I componenti del sangue che assorbono sono l'albumina (3,5-5 g/dl), la globulina (2,5-3 g/dL) e l'emoglobina (11,5-13,7 g/dL) che sono molto più alti in concentrazione rispetto al glucosio (0,065-0,105 g/dl), e quindi il loro contributo sull'assorbimento della luce può essere significativo.

Questi componenti agiscono come interferenti durante la misurazione del glucosio nel sangue. Per ridurre al minimo l'assorbimento dovuto a tutti i componenti indesiderati, la lunghezza d'onda della sorgente luminosa dovrebbe essere scelta in modo che la luce sia altamente assorbita dal glucosio e sia per lo più trasparente ai componenti del sangue e dei tessuti.

La diffusione della luce dovuta alle varie componenti del tessuto provoca una deviazione dalla legge di Beer-Lambert (1) e causa un errore di misurazione. Sia il tessuto che il sangue causano la

diffusione della luce e attenuano l'intensità luminosa misurata dal rilevatore. L'attenuazione totale della luce dipende dal coefficiente di attenuazione totale, μ_{totale} [cm^{-1}], che è dato dalla somma del coefficiente di assorbimento delle specie assorbenti, μ_a , e del coefficiente di diffusione ridotto, μ_s' . Il coefficiente di attenuazione totale indica quanto fortemente la luce è attenuata dalle specie molecolari per una specifica lunghezza d'onda. Il coefficiente di diffusione ridotto μ_s' è un contributo del coefficiente di diffusione μ_s e l'anisotropia della propagazione della luce nel tessuto biologico, g , che è il coseno medio dell'angolo di diffusione:

$$\mu_{totale} = \mu_a + \mu_s' = \mu_a + \mu_s(1 - g) \quad (5)$$

Se g ha un valore vicino a 1, meno luce viene retrodiffusa. Il valore di g per i tessuti biologici è compreso tra 0.65 e 0.95. Questo indica che quando la luce interagisce con i vari componenti che formano il tessuto, la luce tende a dispendersi in avanti per ogni singolo evento di diffusione. Tuttavia, dopo più eventi di scattering la diffusione complessiva della luce può risultare retrodiffusa. La diffusione della luce dovuta all'interferenza dei tessuti causa errori di misurazione del glucosio poiché varia a seconda della quantità di tessuto grasso presente in ciascuno. Inoltre, le variazioni nella diffusione della luce possono essere dovute a differenze nel collagene, nelle proteine, nel flusso sanguigno e nello stato di idratazione di una persona.

È importante ridurre la diffusione della radiazione ed è possibile farlo selezionando le lunghezze d'onda poiché l'intensità della luce diffusa dai componenti del tessuto è inversamente proporzionale alla lunghezza d'onda della luce incidente, si riduce aumentando la lunghezza d'onda della luce incidente.

L'intensità della luce diffusa dal tessuto dipende dalle proprietà ottiche del tessuto, che a loro volta dipendono dalla concentrazione di glucosio.

La relazione tra le proprietà ottiche e l'intensità della luce diffusa in un mezzo di diffusione infinito è descritta da:

$$I(\rho) = I_0 \frac{1}{4\pi\rho D} e^{(-\mu_{eff} \cdot \rho)} \quad (6)$$

Dove: $I(\rho)$ è l'intensità di luce diffusa riflessa;

I_0 è l'intensità della luce incidente;

ρ è la distanza radiale tra la sorgente luminosa e un rilevatore;

D è il coefficiente di diffusione ed è uguale a $[3(\mu_a + \mu_s')]^{-1}$.

La presenza di componenti di dispersione in un campione causa una relazione non lineare multivariata tra gli spettri di assorbimento e la concentrazione dei componenti assorbenti, per questo motivo vari metodi di calibrazione come la regressione locale, le reti neurali artificiali (ANN) e la macchina vettoriale di supporto (SVM) sono stati sviluppati per modellare questa non linearità e migliorare la precisione della lettura della glicemia. La non linearità può essere minimizzata identificando la lunghezza ottimale del percorso seguito dal fascio di luce; la combinazione di acquisizioni multiple e l'applicazione di algoritmi di preelaborazione delle informazioni spettrali come la correzione della dispersione moltiplicativa (MSC), la correzione del segnale ortogonale (OSC) e preelaborazione dell'analita netto (NAP).

Questi algoritmi aiutano a generare un modello che predice accuratamente la concentrazione di glucosio considerando l'effetto di più variabili sull'output. Più in particolare, gli algoritmi pesano l'effetto di più variabili minimizzando e/o eliminando l'influenza dei segnali confondenti sul valore reale della concentrazione di glucosio. Infine, l'efficacia degli algoritmi può essere determinata utilizzando criteri di valutazione e confrontando la concentrazione di glucosio stimata con il valore noto della concentrazione di glucosio. [11]

4.2 Modello matematico del TensorTip Glucometer

Il TensorTip Combo Glucometer è uno strumento pensato per la misura del glucosio in ambito domiciliare e come supporto alla valutazione clinica; come detto nel capitolo 3, è composto da due unità: quella invasiva e quella non invasiva.

L'unità invasiva viene utilizzata per la calibrazione della componente non invasiva.

La parte più difficile nello sviluppo di una lettura non invasiva dei biomarcatori è l'isolamento del biomarcatore da parte dell'algoritmo. Questo si ottiene associando un vettore V a un singolo livello di glucosio. I componenti del vettore si basano sulle informazioni raccolte dal sensore di immagini a colori.

Innanzitutto, due vettori non identici che rappresentano l'assorbimento temporaneo della luce che attraversa il tessuto preso in considerazione possono individuare due livelli di glucosio identici o quasi identici. In ogni caso, due vettori identici o quasi identici rappresentano sicuramente un unico livello di glucosio.

Poi la calibrazione individuale si ottiene progettando letture ottimali di glucosio personali pre-programmate. Sono necessarie almeno 25 tarature eseguite con dei riferimenti affidabili ottenuti a diverse ore del giorno. L'intervallo di calibrazione personale è progettato in modo da coprire la personale escursione di glucosio, e il dispositivo può prevedere il livello di glucosio anche al di fuori dell'intervallo di calibrazione personale. Durante il periodo di calibrazione vengono utilizzate due strisce standard per la misura della glicemia come doppio controllo di riferimento per ogni vettore campione V . Per evitare ulteriore dolore al soggetto in esame, una volta pulita l'area, il secondo campione di sangue può essere prelevato dallo stesso sito punto dall'ago al primo prelievo. Durante la calibrazione personale il dispositivo fornirà risultati non invasivi una volta che avrà raccolto un numero sufficiente di dati, di solito ciò avviene dopo tre riferimenti invasivi. Un processo di calibrazione riuscito consentirebbe di ottenere il modello di glucosio personale più accurato. Se le letture delle due strisce non sono sufficientemente vicine tra loro, il vettore campione non invasivo viene dichiarato internamente dal sistema come "cattivo riferimento". Il vantaggio della calibrazione personale rispetto alla calibrazione universale è che il modello personale prende in considerazione i fattori di interferenza individuali.

La calibrazione è un processo di raccolta di dati non invasivi prestabiliti rappresentati da un insieme di vettori confrontati con letture reali del glucosio mediante tecniche invasive.

Ogni lettura non invasiva produce un vettore campione V_k associato a due misurazioni invasive della glicemia sufficientemente vicine tra di loro (g_{k1} e g_{k2}) utilizzando strisce standard-convenzionali.

Questa associazione è considerata come il "meccanismo di isolamento" del glucosio del tessuto capillare, cioè:

$$V_k \leftrightarrow (g_{k1} \text{ e } g_{k2})$$

Un requisito fondamentale della (5) è l'indipendenza dell'insieme insieme di vettori $\{V_k\}$. Indipendenza significa che non ci sono due vettori sufficientemente vicini tra loro, cioè $V_k = V_n$ per $k \neq n$, che presentano due diversi livelli di glucosio. In termini matematici:

Se $V_k = V_n$ allora $g_k = g_n$ per ogni $k \neq n$

Vediamo ora come costruire un vettore V_k :

1. Siano $r_n(x, y, t)$, $g_n(x, y, t)$ e $b_n(x, y, t)$ tre segnali spazio-temporali a colori che rappresentano i livelli di assorbimento del tessuto capillare in esame irradiato da un set di raggi monocromatici L_{in} con livelli di emissione e_{in} (i rappresenta un indice di lunghezza d'onda ($1 \leq i \leq 4$) e n rappresenta un insieme di combinazioni di luce ($1 \leq n \leq N$)).

Per esempio:

$i = 1, 2, 3, 4; n = 1$

- $L_{11} = 625$ nm LED emette a e_{11} mA
- $L_{21} = 740$ nm LED emette a e_{21} mA
- $L_{31} = 850$ nm LED emette a e_{31} mA
- $L_{41} = 940$ nm LED emette a e_{41} mA

$i = 1, 2, 3, 4; n = 2$

- $L_{12} = 625$ nm LED emette a e_{12} mA
- $L_{22} = 740$ nm LED emette a e_{22} mA
- $L_{32} = 850$ nm LED emette a e_{32} mA
- $L_{42} = 940$ nm LED emette a e_{42} mA

Ogni insieme di combinazioni di luce n corrisponde a un insieme di immagini in tempo reale immagini $r_n(x, y, t)$, $g_n(x, y, t)$ e $b_n(x, y, t)$ dove per $n = 1$ $r_1(x, y, t)$, $g_1(x, y, t)$ e $b_1(x, y, t)$ e per $n = 2$ $r_2(x, y, t)$, $g_2(x, y, t)$ e $b_2(x, y, t)$.

2. Sia U_{kn} un vettore di caratteristiche associate con la misura invasiva di glucosio g_k e un insieme di combinazioni di luce $n=1\dots N$. k denota l'indice del k -esimo vettore di caratteristiche nel file di registro del dispositivo.
3. Sia V_k un vettore di caratteristiche composto da $\{U_{kn}\}$, cioè $V_k = (U_{k1}, U_{k2}, U_{k3}, \dots, U_{kn})$. Prendendo in considerazione l'esempio in alto, il vettore V_1 , cioè $k = 1$, è composto da due sottovettori U_{11} e U_{12} , cioè, $V_1 = (U_{11}, U_{12})$, dove il sottovettore U_{11} rappresenta la risposta di assorbimento all'insieme L_{i1} di emissione di luce e U_{12} all'insieme L_{i2} di emissione di luce.

I segnali non invasivi sono caoticamente legati al glucosio nello spazio euclideo R^n . Pertanto, viene suggerito un approccio di associazione che imita il sistema neural brain network (NBN). Introduciamo alcune delle principali regole generali del sistema NBN:

- Un vettore V_k associato a due letture invasive è un valido vettore campione se i due riferimenti sono sufficientemente vicini tra di loro e soddisfa le richieste interne al sistema;
- Il sistema NBN è creato accoppiando i vettori in un ramo e formando più rami in loop, dove due vettori sono accoppiati se hanno una somiglianza predefinita nei livelli di glucosio nel sangue che ciascuno è associato.

Ramo: Associazione di coppie di vettori. Questa associazione può avere un peso che rappresenta la forza della connessione.

Anello chiuso: Rami che terminano all'interno di uno dei precedenti vettori del loop, per esempio, $V_1 \rightarrow V_6 \rightarrow V_9 \rightarrow V_4 \rightarrow V_1$. (Figura 16)

Anello aperto: Un insieme di vettori connessi (rami) che non termina in un ciclo chiuso.

Albero: insieme di rami che hanno un'unica origine.

Gruppo: Un insieme di vettori connessi con un ciclo aperto o un anello chiuso che soddisfa determinate condizioni.

Non associati: Vettori non associati.

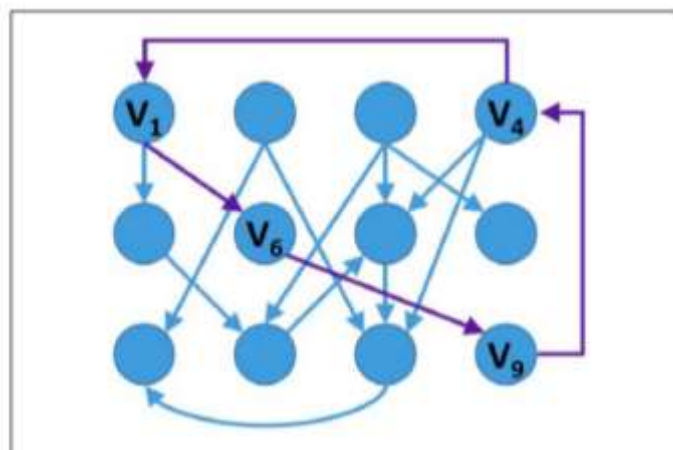


Figura 16 Esempio di associazione vettoriale ad anello chiuso.

Per la calibrazione dello strumento si utilizza un learning set composto da N misurazioni, dove $N \geq 25$ e dipende dalla gravità della malattia del paziente. Il processo di calibrazione è diviso in due parti:

1. La calibrazione include il 70% dei vettori campione validi sono usati per generare la rete neurale. Il restante 30% è usato per test interni e sono considerati un insieme di nuovi vettori $\{V^{new}\}$. Questo sottoinsieme viene testato e correlato al ciclo ottimale di vettori nell'insieme di apprendimento di base. Se il test con il restante 30% soddisfa l'accuratezza richiesta, tutto il learning set (70%+30%) viene sottoposto ad un secondo test.
2. Un sottoinsieme di vettori campioni validi $A_k = (V_1, \dots, V_{k-1}, V_{k+1}, \dots, V_n)$, escluso V_k , è temporaneamente usato per generare una rete neurale. Il vettore escluso V_k viene utilizzato per i test interni ed è considerato come un nuovo vettore V^{new} ; il vettore viene testato e correlato al ciclo ottimale di vettori appartenenti al sottoinsieme A_k . Questo processo viene ripetuto per tutti gli altri vettori campione validi.

Una volta superati con successo i due test, il dispositivo informa l'utente che la calibrazione è conclusa e le letture non invasive possono essere eseguite. Il dispositivo poi informa l'utente quando eseguire una nuova misura invasiva necessaria nel caso in cui la previsione del glucosio è al di fuori dei range di calibrazione o in maniera automatica secondo un progetto interno del dispositivo.

Ogni volta che l'utente aggiunge una nuova lettura invasiva, questa verrà aggiunta al learning set per la ricalibrazione, a meno che non venga annullata dall'utente. [12]

4.3 Pulse Glucometry

Per eliminare o minimizzare gli effetti dei segnali confondenti sono stati proposti diversi metodi, tra questi troviamo il cosiddetto "pulse glucometry".

Questo metodo raccoglie dati di tipo ottico dovuti alle variazioni pulsatili del volume di sangue che affluisce al tessuto. Questa tecnica si rifà alla pulsossimetria che consiste nel fare misurazioni fotopleletismografiche del sangue arterioso a due lunghezze d'onda, una nel rosso e l'altra nell'infrarosso, poi nel derivare il rapporto di queste due misure per determinare la proporzioni relative dell'ossiemoglobina (emoglobina legata all'ossigeno) e dell'emoglobina ridotta (emoglobina non legata all'ossigeno). Nel nostro caso si utilizzano due lunghezze d'onda, una sensibile al glucosio e l'altra non sensibile al glucosio per ottenere il segnale fotopleletismografico e quindi ricavare una concentrazione della stima del glucosio.

Nello specifico, il metodo qui proposto utilizza l'analisi spettrofotometrica in un segmento di tessuto, ad esempio su un dito. Il glucosio presenta diverse bande di assorbimento tra i 700 e i 2500

nm e all'interno di questo range è importante ricordare che ci sono forti e ampie bande di assorbimento dell'acqua a 1450 e 1920 nm. Per evitare queste bande, è teoricamente possibile utilizzare la combinazione tra la regione che va da 2000 a 2500 nm, la regione della prima armonica da 1540 a 1820 nm e la regione del vicino infrarosso da 700 a 1330 nm.

Il glucosio presenta tre bande di assorbimento in ognuna di queste regioni: 2100, 2270 e 2320 nm nella regione di combinazione; 1730, 1690 e 1610 nm nella prima regione di sovratono; 760, 920 e 1000 nm nella regione del vicino infrarosso. Di queste bande di assorbimento del glucosio l'ultima è la più debole.

Per recuperare le informazioni sul glucosio nei tessuti ad alto contenuto d'acqua, è necessario utilizzare un'analisi multivariata che copra una regione adatta dello spettro ottico.

Consideriamo un modello semplificato del tessuto in esame, esso comprende tre sezioni: tessuto arterioso, venoso e senza sangue. L'interrogazione ottica del tessuto viene effettuata con una sorgente di luce ad ampio spettro con intensità di radiazione incidente I_0 con lunghezza d'onda λ . In seguito all'assorbimento e alla dispersione in ogni sezione, abbiamo l'intensità della luce trasmessa I_λ . Il volume di sangue arterioso varia in modo pulsatile durante il ciclo cardiaco, così da produrre piccoli cambiamenti nell'intensità della luce trasmessa ΔI_λ . Se l'intensità della luce trasmessa è misurata periodicamente a distanza di un intervallo di tempo Δt durante il ciclo cardiaco, otteniamo una serie di I_λ :

$$I_\lambda(t) = [I_\lambda(t_1), I_\lambda(t_2), \dots, I_\lambda(t_n)]$$

e

$$\Delta t = t_{i+1} - t_i$$

La serie temporale rappresenterà il cambiamento di intensità pulsatile sovrapposto alla componente basale, che si riferisce al sangue venoso, al tessuto senza sangue e sangue arterioso non pulsatile. Le differenze tra le densità ottiche a intervalli di tempo successivi possono essere calcolate, poiché:

$$OD_\lambda = \log \frac{I_0}{I_\lambda(t_i)} \quad (7)$$

$$OD_{\lambda}' = \log \frac{I_0}{I_{\lambda}(t_{i+1})} \quad (8)$$

Sottraendo OD_{λ} a OD_{λ}' otteniamo la differenza tra le densità ottiche (assorbanza) nell'istante di tempo t_i , la differenza è:

$$\Delta OD_{\lambda} = \log \frac{I_{\lambda}(t_i)}{I_{\lambda}(t_{i+1})} = \log \left(1 + \frac{\Delta I_{\lambda}(t_i)}{I_{\lambda}(t_{i+1})} \right) \quad (9)$$

Dove $I_{\lambda}(t_i) = I_{\lambda}(t_{i+1}) - \Delta I_{\lambda}(t_i)$.

Questa sottrazione ha l'effetto di rimuovere i contributi venosi e i contributi del tessuto per avere in uscita solo il cambiamento di intensità dovuto al sangue arterioso pulsante. Ora, se la radiazione trasmessa è spettralmente risolta nelle sue lunghezze d'onda individuali, sarà possibile recuperare una famiglia di serie temporali, in cui ogni membro mostra l'intensità pulsatile presente a una certa lunghezza d'onda.

Per implementare questo principio generale nella pratica usiamo la grandezza da picco a picco di ogni impulso cardiaco, alle lunghezze d'onda $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_N$ sono indicate come $\Delta I_{\lambda_1}, \Delta I_{\lambda_2}, \dots, \Delta I_{\lambda_N}$. Dall'equazione (9) possiamo convertire quest'ultime in variazioni di densità ottica $\Delta OD_{\lambda_1}, \Delta OD_{\lambda_2}, \dots, \Delta OD_{\lambda_N}$. Questi dati possono anche essere visualizzati come spettri nel range dell'infrarosso con ΔOD_{λ} sull'asse delle ordinate e la lunghezza d'onda sull'asse delle ascisse. Se questo spettro è ricavato a diversi livelli di concentrazione di glucosio nel sangue, otteniamo una famiglia di spettri che possono essere usati per un'analisi multivariata.

Come è comune nell'analisi spettrofotometrica multicomponente, usiamo un modello di calibrazione ai minimi quadrati, PLS (Partial Least Squares), per ottenere i valori di glucosio nel sangue. Il modello PLS è costruito dapprima con misure dirette del glucosio insieme alle misure ottiche non invasive su una popolazione rappresentativa. Poi, per un dato soggetto, gli spettri citati prima vengono ricavati per valori di glucosio non noti da misurazioni in vivo e comparati con il modello di calibrazione PLS e i valori previsti di glucosio vengono così calcolati. [14]

4.4 Algoritmo PLS

Con la moderna strumentazione di misura, compresi gli spettrometri, le variabili X , ossia i valori misurati con un dispositivo non invasivo, tendono ad essere molte e anche fortemente correlate. Non le chiameremo quindi "indipendenti", ma piuttosto "predittori", o semplicemente variabili X , perché di solito sono correlate, rumorose e incomplete.

È un metodo di regressione basato sulla riduzione dimensionale, cioè M nuovi regressori ($M \leq p$) z_k calcolati dalla combinazione lineare degli originali X_{jN} . Questi nuovi regressori sono combinati usando un modello lineare per stimare il target y :

$$\hat{y} = Z \cdot \theta \quad (10)$$

dove Z è una matrice $N \times M$ le cui colonne contengono i regressori z_k e θ il vettore di dimensioni M dei coefficienti correlati (related), che devono essere stimati insieme ai nuovi regressori z_k .

Questa tecnica che prende il nome di Partial Least Squares (PLS) può essere implementata in diversi modi, a seconda di come le combinazioni lineari sono costruite e solitamente è adatta quando i dati nella matrice X includono un gran numero di input molto correlati.

Poiché il valore di M , che descrive quanti nuovi predittori sono usati nel problema di regressione, è fissato dall'utente, questi metodi possono permettere di regolare la complessità del modello secondo il problema. Poiché i nuovi regressori z_k sono linearmente correlati a quelli originali, il modello (10) può ancora essere espresso come funzione degli input originali X_{jN} :

$$\hat{y} = X \cdot \hat{\beta}^{PLS} \quad (11)$$

dove $\hat{\beta}^{PLS}$ è il vettore dei coefficienti stimati usando la tecnica PLS.

Una possibile implementazione per la stima diretta di $\hat{\beta}^{PLS}$ è la seguente:

$$X = Z \cdot X_1^T + E \quad (12)$$

Dove: \mathbf{X} è la matrice dei loadings;

\mathbf{Z} è la matrice (N x M) degli M vettori di punteggio estratti (PLS direzioni z_k);

\mathbf{X}_l rappresenta la matrice dei caricamenti;

\mathbf{E} la matrice dei residui;

L'approssimazione dell'obiettivo è:

$$\mathbf{y} = \mathbf{Z} \cdot \boldsymbol{\theta} + \mathbf{e} \quad (13)$$

La chiave di questo algoritmo è che stima direttamente una matrice di pesi \mathbf{W} , che rappresenta la relazione tra la direzione PLS in \mathbf{Z} con la matrice originale matrice \mathbf{X} :

$$\mathbf{X} \cdot \mathbf{W} = \mathbf{Z} \quad (14)$$

Sostituendo otteniamo:

$$\mathbf{y} = \mathbf{X} \cdot \mathbf{W} \cdot \boldsymbol{\theta} + \mathbf{e} \quad (15)$$

l'approssimazione del riferimento \mathbf{y} è direttamente correlata agli input originali \mathbf{X} . Quindi, ignorando il contributo della matrice residua \mathbf{e} , la stima di riferimento PLS stima $\hat{\mathbf{y}}$ si ottiene come:

$$\hat{\mathbf{y}} = \mathbf{X} \cdot \mathbf{W} \cdot \boldsymbol{\theta} \quad (16)$$

Comparando otteniamo:

$$\hat{\boldsymbol{\beta}}^{\text{PLS}} = \mathbf{W} \cdot \boldsymbol{\theta} \quad (17)$$

Una volta stimati i coefficienti $\hat{\boldsymbol{\beta}}^{\text{PLS}}$ dal training set questi possono essere utilizzati in un modello lineare per prevedere i dati non visti (latenti) attraverso una combinazione lineare degli input.

Capitolo 5 – DATASET

Nel capitolo 2 è stato introdotto il dispositivo GlucoWatch G2 Biographer (GW2B), uno dei primi strumenti messi in commercio per la misura non invasiva della glicemia. In questa sezione sono riportati due studi eseguiti sul GW2B per valutarne le prestazioni e le potenzialità.

5.1 Studio1

Lo studio è stato condotto dal Diabets Research in Children Network (DirecNet) fondato dal National Institutes of Health su bambini/ragazzi diabetici di tipo 1 in cui vengono messe a confronto le misurazioni eseguite con il GW2B e con metodi standard. Questo studio valuta se l'uso del GlucoWatch G2 Biographer (GW2B) in aggiunta al monitoraggio standard del glucosio abbassa l'HbA1c e riduce gli episodi di ipoglicemia rispetto al monitoraggio standard.

5.1.1 Partecipanti

Sono stati ammessi allo studio pazienti di età compresa tra i 7 e i 18 anni con diabete di tipo 1 che necessitavano di infusione di insulina da almeno un anno; livelli di HbA1c (emoglobina glicata) compresi tra il 7.0 e l'11.0%; un regime stabile di insulina (una o due infusioni al giorno) per i due mesi precedenti senza piani per cambiare la modalità di somministrazione dell'insulina durante i 6 mesi seguenti; nessuna esperienza di uso domestico del GW2B; nessun uso di corticosteroidi nei precedenti 6 mesi, e nessuna storia di fibrosi cistica o altra malattia cronica che potrebbe influenzare la partecipazione allo studio.

I soggetti idonei hanno poi dovuto completare con successo il monitoraggio del glucosio a casa utilizzando sia un UltraSmart Meter (almeno tre misurazioni al giorno per 4-14 giorni) che un sistema di monitoraggio continuo del glucosio (CGMS) (Medtronic MiniMed, Northridge, CA) (almeno 48 ore di utilizzo del CGMS) per essere ammessi allo studio.

5.1.2 Protocollo

I soggetti selezionati sono stati assegnati in modo random al gruppo GW2B o al gruppo di cura usuale. La randomizzazione è stata effettuata dal personale dello studio in ogni centro clinico

utilizzando un disegno a blocchi permutati stratificato per centro clinico e gruppo di età (da 7 a <12 e da 12 a <18 anni).

I soggetti del gruppo GW2B hanno ricevuto un GW2B e un numero illimitato di sensori. Sono stati incoraggiati a usare i sensori con la frequenza desiderata e istruiti a usare un minimo di quattro sensori durante la prima settimana e poi almeno due sensori a settimana, con almeno un uso settimanale durante la notte. Ai soggetti del gruppo di cura abituale è stato offerto un GW2B dopo il completamento del periodo di follow-up di 6 mesi. Ai soggetti di entrambi i gruppi è stato fornito un misuratore One Touch UltraSmart (Ultra; Lifescan, Milpitas, CA) e un numero illimitato di strisce reattive ed è stato chiesto di misurare i livelli di glucosio al dito almeno quattro volte al giorno (cioè, prima di ogni pasto e prima di andare a letto).

Ai soggetti di entrambi i gruppi è stato dato un personal computer per uso domestico per scaricare i dati sul glucosio Ultra e GW2B e visualizzare i risultati del glucosio su base settimanale. I soggetti sono stati compensati con 5 dollari per ogni download puntuale e 2 dollari per ogni download tardivo. Tutti i soggetti hanno usato il computer per completare un questionario settimanale sugli episodi di ipoglicemia sintomatica. Al gruppo GW2B è stato anche chiesto di riferire qualsiasi problema riscontrato nell'uso del dispositivo. A 3 e 6 mesi, un sensore CGMS è stato inserito presso il centro clinico e utilizzato dal soggetto per un minimo di 48 ore. I dati del CGMS sono stati trasmessi direttamente al centro di coordinamento e non sono stati visualizzati dal personale del centro clinico o dai soggetti.

È stato fatto uno sforzo per gestire i soggetti di entrambi i gruppi nel modo più simile possibile. Di conseguenza, il protocollo dello studio includeva per entrambi i gruppi visite di controllo a 3 e 6 mesi e contatti telefonici dopo 1, 2 e 4 settimane e poi mensilmente fino a 6 mesi per rivedere la gestione del diabete. Per il gruppo GW2B, ad ogni visita è stata fatta una valutazione della reazione cutanea utilizzando una scala Draize modificata*. Alla visita dei 6 mesi, una scala di soddisfazione composta da 37 domande (scala Likert 1-5, con un punteggio più alto che indica maggiore soddisfazione) relativa all'uso di un monitor continuo del glucosio è stata completata dai genitori dei soggetti del gruppo GW2B e dai soggetti del gruppo GW2B che avevano almeno 11 anni. La Diabetes Worry Scale, una misura dell'ansia legata al diabete tra i genitori e i giovani, il Diabetes Self Management Profile, una misura dell'aderenza al trattamento, e il PedsQL Diabetes Module, una misura della qualità della vita legata al diabete nei bambini, sono stati completati all'inizio e dopo sei mesi.

All'inizio dello studio e alle visite dopo 3 e 6 mesi, è stato prelevato un campione di sangue dal dito e poi inviato al laboratorio centrale DirecNet dell'Università del Minnesota dove l'HbA1c è stata

misurata con il metodo Tosoh A1c 2.2 Plus Glycohemoglobin Analyzer utilizzando la metodologia della cromatografia liquida ad alte prestazioni a scambio cationico.

Nella Tabella 3 sono riportate le caratteristiche dei due gruppi all'inizio dello studio.

Tabella 3 Caratteristiche iniziali dei gruppi

	Cure abituali	GW2B	Tutti i pazienti
n	101	99	200
Femmine	47 (47)	45 (45)	92 (46)
Anni	12.7 ÷ 2.9	12.3 ÷ 2.7	12.5 ÷ 2.8
Razza/etnia			
Bianchi	85 (84)	84 (85)	169 (85)
Ispanici o Latini	3 (3)	2 (2)	5 (3)
Afro-americani	7 (7)	6 (6)	13 (7)
Misti	5 (5)	4 (4)	9 (5)
Asiatici	1 (<1)	2 (2)	3 (2)
Sconosciuto/ non riportato		1 (1)	1 (<1)
Durata del diabete (anni)	5.4 ÷ 3.1	5.3 ÷ 3.4	5.4 ÷ 3.3
Somministrazione di insulina			
Pompa di insulina	47 (47)	46 (46)	93 (47)
Iniezione	54 (53)	53 (54)	107 (54)
Valori iniziali di HbA1c			
< 8.0%	54 (53)	58 (59)	112 (56)
≥ 8.0%	47 (47)	41 (41)	88 (44)
Indice di massa corporea (%)	66 ÷ 24	70 ÷ 23	68 ÷ 24

5.1.3 Risultati

Tra luglio 2003 e gennaio 2004, 200 soggetti sono entrati a far parte dello studio (40 per ciascun centro clinico) di cui 99 sono stati assegnati in modo casuale al gruppo GW2B e i restanti 101 all'altro gruppo. Le caratteristiche iniziali dei due gruppi erano simili come mostrato nella Tabella 3.

Durante il primo mese di utilizzo del GW2B, il numero di sensori utilizzati è stato in media di 2.1 ± 0.8 a settimana, mentre il numero di sensori con almeno 8 ore di utilizzo era in media di 1.2 ± 0.7 per settimana. Solo il 16% dei soggetti aveva una media di almeno 2.0 usi 8 ore/settimana mentre nessuno aveva una media di almeno 4.0 usi a settimana. Entro il terzo mese, 7 dei 99 soggetti riportati hanno interrotto l'uso del GB2W ed entro il sesto mese questi hanno raggiunto le 27 unità. Tra coloro che hanno continuato ad usare il GW2B oltre il sesto mese, il numero di sensori collocati durante l'ultimo mese di studio era in media di 1.5 ± 0.6 per settimana, mentre il numero di sensori con 8 ore di utilizzo era in media di 0.7 ± 0.5 per settimana. Non ci sono stati soggetti con una media di 3.0 usi/settimana. La frequenza di utilizzo del sensore è stata simile tra i cinque centri clinici.

Il livello medio della HbA1c all'inizio dello studio era 8.0% in entrambi i gruppi e non è cambiato significativamente durante il corso degli studi. Trascorsi sei mesi l'HbA1c è migliorata dello 0.5% o più nel 28% dei soggetti che hanno usato il GW2B e nel 21% dei soggetti monitorati con le cure usuali ($P = 0.29$). In entrambi i gruppi, la dose totale giornaliera di insulina è aumentata leggermente (0.1 ± 0.2 unità in entrambi i gruppi) Cambiamenti nel dosaggio di insulina nei sei mesi sono stati fatti con frequenza simile in entrambi i gruppi (79%).

Durante lo studio si sono verificati eventi di ipoglicemia severa in sette pazienti (un soggetto con tre eventi e sei soggetti con un solo evento) del gruppo GW2B e in due soggetti dell'altro gruppo (uno con due eventi, l'altro con un evento). Il numero di episodi di ipoglicemia sintomatica riportato nei sei mesi è leggermente maggiore nel gruppo di cura usuale. Il numero di eventi di ipoglicemia in 24 ore definito dal CGMS era simile a tre e a sei mesi.

Irritazioni cutanee dovute all'utilizzo del GW2B sono state segnalate almeno una volta da tutti i soggetti che lo hanno utilizzato; la reazione cutanea di uno dei soggetti è stata classificata come severa mentre per 48 soggetti moderata. Più della metà dei pazienti che hanno utilizzato il GW2B per tutti i sei mesi di studio hanno riportato reazioni cutanee acute mentre i restanti hanno riportato reazioni non acute come pelle secca, croste, cicatrici e iperpigmentazione. [15] La sintesi dei risultati ottenuti è riportata nella tabella 4.

Tabella 4 Sintesi dei principali risultati

	Cure abituali	GW2B	Valore P
n	101	98	
HbA1c (%)			
Iniziale	8.0 ÷ 0.9	8.0 ÷ 0.9	
3 mesi	7.9 ÷ 0.8	7.9 ÷ 1.0	
6 mesi	7.9 ÷ 0.9	8.1 ÷ 1.1	
Cambiamento tra 0 e 6 mesi	0.0 ÷ 0.8	0.1 ÷ 0.8	0.15
Livelli di glucosio misurati con CGMS (mg/dl)			
Iniziale	183 ÷ 39	183 ÷ 40	
3 mesi	178 ÷ 40	178 ÷ 43	
6 mesi	182 ÷ 33	178 ÷ 36	
Cambiamento tra 0 e 6 mesi	-1 ÷ 46	-4 ÷ 38	0.34
Ipoglicemia			
Soggetti con severi episodi di ipoglicemia (%)	2	10	0.10
Episodi di ipoglicemia sintomatica per settimana			
Questionari settimanali	2.5 ÷ 1.6	2.0 ÷ 1.6	0.03
Chiamate da protocollo	2.2 ÷ 1.0	2.0 ÷ 1.0	0.19
Visita a 3 mesi	2.2 ÷ 1.5	1.8 ÷ 1.4	0.06
Visita a 6 mesi	2.2 ÷ 1.5	2.0 ÷ 1.5	0.49
Episodi di ipoglicemia definiti dal CGMS per 24 ore			
Iniziale	1.0 ÷ 0.9	0.9 ÷ 0.7	
3 mesi	0.9 ÷ 0.9	1.1 ÷ 1.0	
6 mesi	0.9 ÷ 0.8	1.0 ÷ 0.9	
Cambiamento tra 0 e 6 mesi	-0.1 ÷ 1.0	0.1 ÷ 0.9	0.27

5.1.4 Considerazioni finali

In conclusione, possiamo dire che l'utilizzo del GW2B in aggiunta all'utilizzo di misuratori standard non comporta un miglioramento nel controllo glicemico o riduce episodi di ipoglicemia severa. Inoltre, il verificarsi di reazioni cutanee più o meno gravi e di altri problemi comportano un minore utilizzo nel tempo da parte dei pazienti.

5.2 Studio2

In questo secondo studio, condotto nel 2002 dal National Institute for Health Research (NIHR), l'obiettivo principale è quello di comparare i dati aggiuntivi che si possono ottenere da due diversi dispositivi per il monitoraggio continuo della glicemia, GlucoWatch G2 Biographer e CGMS. Entrambi i dispositivi sono in grado di fornire una grande quantità di dati in breve tempo e potenzialmente permettono di mostrare l'andamento della concentrazione di glucosio nel sangue e di migliorare il controllo glicemico.

5.2.1 Partecipanti

Sono stati ammessi allo studio pazienti con diabete da almeno sei mesi, che richiedevano due o più iniezioni di insulina al giorno e di età pari o superiore ai diciotto anni. Inoltre, sono stati richiesti due livelli di HbA1c uno $\geq 7.5\%$ nei tre mesi precedenti e un altro nei 15 mesi precedenti. Nel caso in cui il secondo livello di HbA1c rientrasse nei parametri ma risalente a oltre 15 mesi o non misurato affatto, i pazienti sono stati sottoposti a esami del sangue 3 mesi più tardi e il livello di HbA1c misurato, se $\geq 7.5\%$, è stato usato come dato di partenza. Anche nel caso in cui l'ultima misura di HbA1c risalisse a più di 3 mesi, i pazienti sono stati sottoposti ad esami del sangue come indicato sopra. In ogni caso i due livelli di HbA1c misurati dovevano essere acquisiti a distanza di minimo 12 settimane.

Il focus di questo studio riguarda quei pazienti che necessitano dell'infusione di insulina ma scarsamente controllati. Hanno partecipato alla selezione 2335 persone, di queste 710 sono state considerate non adatte allo studio. I criteri di esclusione sono cambiati a metà dello studio, inizialmente i soggetti venivano esclusi per HbA1c $< 8.0\%$ nelle sei settimane precedenti poi per livelli $< 7.5\%$ nei tre mesi precedenti. Dei 1625 soggetti rimanenti, 1221 (75%) hanno rifiutato di

entrare a far parte dello studio e 404 (25%) sono stati ammessi allo studio e distribuiti in modo random in quattro gruppi.

Dalla Tabella 5 si evince che i gruppi hanno caratteristiche pressochè simili con una percentuale di pazienti affetti da diabete di Tipo 1 maggiore rispetto al Tipo 2. In termini di etnia lo studio è stato originariamente progettato in modo da reclutare tre importanti gruppi etnici: turco, bengalese e cantonese.

Le principali informazioni mediche dei pazienti ammessi allo studio sono invece riportate nella Tabella 6.

Tabella 5 Principali caratteristiche dei partecipanti ammessi allo studio

	GlucoWatch	CGMS	Trattamento attenzionato	Trattamento standard	Totale
n	100	102	100	102	404
Età media	55	53	53	52	
Sesso, n(%)					
Maschi	56 (56)	57 (56)	54 (54)	54 (53)	221 (55)
Femmine	44 (44)	45 (44)	46 (46)	48 (47)	188 (45)
Tipo di					
diabete	53 (53)	61 (60)	57 (57)	61 (60)	232 (57)
Tipo 1	44 (44)	41 (40)	41 (41)	39 (38)	165 (41)
Tipo2	3 (3)	0 (0)	2 (2)	2 (2)	7 (2)
Altro					
Etnia, n(%)					
Bianchi	87 (87)	93 (91)	90 (90)	87 (85)	328 (92)
Asiatici	7 (7)	2 (2)	5 (5)	6 (6)	20 (5)
Neri	5 (5)	4 (4)	3 (3)	7 (7)	19 (5)
Misti	1 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	2 (0.5)
Altro	0 (0)	2 (2)	2 (2)	2 (2)	6 (1.5)
Impiego, n(%)					
Tempo pieno	33 (33)	45 (44)	40 (40)	36 (35)	154 (38)
Part-time	11 (11)	8 (8)	12 (12)	14 (14)	45 (11)
Casalingo/a	2 (2)	3 (3)	6 (6)	4 (4)	15 (4)
Disabile	16 (16)	8 (8)	10 (10)	16 (16)	50 (12)
Pensionato	31 (31)	29 (28)	25 (25)	24 (24)	109 (27)
Studente	4 (4)	2 (2)	0 (0)	3 (3)	9 (2)
Disoccupato	3 (3)	7 (7)	5 (5)	5 (5)	22 (5)

Tabella 6 Caratteristiche iniziali dei partecipanti allo studio

	GlucoWatch	CGMS	Controllo attenzionato	Controllo standard	Totale
Pazienti randomizzati	100	102	100	102	404
Durata del diabete (anni), mediana	16 (10.2-23.5)	15 (9-26)	18 (9-27)	14 (9-24)	16 (10-25)
Anni di insulina, mediana	12 (6-21)	11 (5-25)	12.5 (5.5-22.0)	11 (6-24)	11 (6-22)
Numero di iniezioni al giorno, n(%)					
Pompa	2 (2)	3 (3)	1 (1)	3 (3)	9 (2)
Due	45(45)	41 (40)	33 (33)	40 (39)	159 (39)
Tre o quattro	50 (50)	55 (54)	64 (64)	55 (54)	224 (55)
Cinque o sei	3 (3)	2 (3)	2 (2)	4 (4)	12 (3)
Numero di unità di insulina al giorno, mediana	59 (41-78)	55 (40-74)	55 (42-76)	57 (40-72)	56 (40-76)
Altre cure per diabete (%)					
Metformina	26 (26)	27 (26)	34 (34)	27(26)	114 (28)
Sulphonylureas	8 (8)	11 (11)	5 (5)	7 (7)	31 (8)
Altri antidiabetici	3 (3)	1(1)	5 (5)	1 (1)	10 (2)
Pressione sistolica (mmHg), mediana	134 (120-145)	134 (120-143)	132 (123-140)	130 (117-141)	132 (120-142)
Pressione diastolica (mmHg), mediana	75 (69-84)	77 (71-84)	78 (74-83)	80 (71-84)	78 (71-84)
Indice di massa corporea (kg/m²), mediana	29 (24-31)	29 (26-32)	29 (25-31)	28 (24-32)	28 (25-31)
Circonferenza vita (cm), mediana	96 (86-107)	98 (88-110)	95 (85-104)	94 (82-103)	96 (86-105)
Numero di diagnosi di					
Problemi respiratori	22 (9)	13 (8)	16 (9)	16 (8)	67 (34)
Infarto	8 (2)	6 (2)	3 (1)	4 (3)	21 (8)
Disturbi neurologici	5 (2)	0 (0)	3(1)	3 (3)	11 (6)
Malattie cardiologiche	18 (6)	15 (6)	15 (7)	28 (16)	76 (34)
Artrite	24 (15)	34 (16)	29 (13)	28 (20)	115 (64)
Tumore	3 (1)	8 (2)	4 (1)	4 (1)	19 (5)
Ipertensione	42 (9)	47 (7)	49 (8)	54 (10)	192 (34)
Malattie renali	5 (2)	9 (0)	5 (3)	9 (2)	28 (7)

Numero di pazienti ricoverati nei 3 mesi precedenti per					
Chetoacidosi diabetica/ acidosi iperosmolare non chetotica	1	0	0	1	2
Ipoglicemia	2	0	0	0	2
Iperglicemia	0	0	1	0	1

5.2.2 Protocollo

Al primo gruppo sono stati assegnati i pazienti con GlucoWatch G2 Biographer; al secondo gruppo è stato assegnato l'utilizzo del dispositivo di misura continuo MiniMed CGMS; il terzo gruppo ha ricevuto trattamenti standard ma con sessioni di controllo e feedback da parte di personale specializzato con la stessa frequenza dei primi due gruppi; il quarto gruppo ha ricevuto trattamenti standard senza sessioni di controllo extra ma solo ogni sei mesi come prevede il protocollo nel Regno Unito.

Tutti i partecipanti sono stati muniti di un dispositivo per l'automonitoraggio glicemico, OneTouch Ultra della Lifescan UK, ed è stato richiesto loro di sostituire il dispositivo che stavano utilizzando fino a quel momento con quest'ultimo. I dati acquisiti sono stati poi scaricati e salvati ad ogni visita di controllo, tutti i soggetti hanno ricevuto un trattamento clinico sotto forma di visite mediche semestrali con eventuali consulenze quando necessario oltre agli specifici trattamenti riservati ad ogni gruppo facenti parte dello studio.

Dopo la randomizzazione, il trattamento e il periodo di follow-up consistevano in due fasi:

- i. Fase 1 (0-3 mesi per i gruppi 1-3): parte intensiva della sperimentazione che si occupa dell'efficacia clinica a breve termine, l'accettabilità e l'impatto psicosociale. Tutti i partecipanti si sono recati nelle cliniche per le valutazioni iniziali. I gruppi 1 e 2 sono stati istruiti nell'utilizzo del GlucoWatch o del CGMS; i gruppi 1-3 hanno partecipato a tre sessioni di feedback da parte di infermieri in questa fase.
- ii. Fase 2 (3-18 mesi per tutti i partecipanti): parte dello studio messa a punto per valutare l'efficacia clinica, la qualità della vita e l'impatto psicosociale ed economico dei dispositivi a medio (6 e 12 mesi) e a lungo (18 mesi) termine. In questa fase il gruppo 1 ha usato il

GlucoWatch come richiesto e al gruppo 2 è stato installato il CGMS a 6, 12 e 18 mesi. I partecipanti dei gruppi 1-3 hanno partecipato a sessioni di feedback da parte degli infermieri a 6, 12 e 18 mesi. Tutti i gruppi hanno completato le valutazioni a 6, 12 e 18 mesi.

Nella fase 1 del gruppo 1 (GW2B) il personale clinico ha dotato i pazienti del OneTouch Ultra e del GLucoWatch. Ai partecipanti è stato chiesto di usare il GW2B per minimo quattro volte al mese e al massimo quattro volte a settimana, inoltre è stato chiesto loro di continuare a misurare qualche volta la glicemia prelevando campioni di sangue capillare. È stata richiesta una misura con il metodo pungidito ogni volta in cui veniva indossato il GlucoWatch per la calibrazione del dispositivo e ogni volta in cui eventi di ipo- o iper-glicemia venivano segnalati dall'allarme. È stato spiegato ai pazienti che il GW2B non doveva essere utilizzato per la stima della quantità di insulina da iniettare. Durante questo periodo i pazienti hanno ripetuto visite di controllo a 4, 8 e 12 settimane da quella iniziale e in queste occasioni sono stati scaricati e salvati i dati acquisiti dal OneTouch Ultra e dal GW2B; sulla base di questi risultati sono stati effettuati degli aggiustamenti al trattamento.

Nella fase 2 ai partecipanti è stato richiesto di continuare ad usare il GW2B con la frequenza desiderata ma almeno due volte a settimana, sono stati poi sottoposti a controlli dopo 6, 12 e 18 mesi dalla visita iniziale.

Nella fase 1 del gruppo 2 (CGMS) i partecipanti sono stati dotati del OneTouch Ultra e del CGMS. Il CGMS è stato posizionato dagli infermieri e ai pazienti è stato richiesto di indossarlo per 72 ore e di continuare a misurare la glicemia da campioni di sangue capillare quando volevano. Trascorse le 72 ore, i partecipanti sono ritornati in clinica per rimuovere il dispositivo o in alcuni casi lo hanno rimosso da soli e sono tornati in clinica il prima possibile entro una settimana dalla rimozione. In questa seconda visita le misure acquisite sono state scaricate e salvate dal personale per aggiustare e modificare la terapia. La stessa procedura è stata ripetuta a distanza di 6 e 12 settimane. Nella fase 2 i pazienti sono stati dotati del CGMS e hanno ricevuto feedback a 6, 12 e 18 mesi. Durante le visite per l'adattamento del trattamento ai pazienti è stato richiesto di indossare il CGMS per 72 ore e di ritornare in clinica nel caso in cui il dispositivo avesse smesso di funzionare entro le 24 ore.

Nella fase 1 del gruppo 3 alla visita iniziale i pazienti sono stati dotati del OneTouch Ultra e sono stati invitati a monitorare la glicemia con il metodo del pungidito normalmente per 3 mesi e di partecipare alle visite di controllo a 4, 8 e 12 settimane. Durante queste visite i risultati del OneTouch

sono stati scaricati e usati per dare dei feedback. Nella fase 2 ai partecipanti è stato chiesto di continuare ad usare il OneTouch Ultra con la normale frequenza, sono stati controllati dal personale e sono stati forniti loro di feedback dei loro test a 6, 12 e 18 mesi. Durante tutta la seconda fase il personale doveva essere disponibile via telefono o e-mail per discutere di qualsiasi problema eventualmente riscontrato dai pazienti.

Per quanto riguarda il gruppo 4 alla visita iniziale i partecipanti sono stati dotati del OneTouch Ultra, hanno ricevuto un trattamento standard ossia visite ogni sei mesi ed è stato richiesto loro di misurare la glicemia da campioni di sangue con la frequenza desiderata. Nelle visite a 6,12 e 18 mesi il personale non ha fornito ai pazienti alcun feedback.

Gli eventi di ipoglicemia sono stati registrati dai pazienti in dei diari, quando possibile sono stati confermati mediante l'utilizzo del OneTouch Ultra e registrati negli appositi moduli per il report delle anomalie. Per tali eventi nei gruppi 1 e 2 è stato possibile scaricare i dati dal GW2B e dal CGMS. Un episodio di ipoglicemia è stato registrato come tale quando: (i) glicemia ≤ 3.5 mmol/l per più di 20 minuti (cioè due o più letture per il GW2B e quattro o più per il CGMS); (ii) glicemia ≤ 3.5 mmol/l seguita da una o più mancate letture e seguita da una lettura ≤ 3.5 mmol/l per il GW2B; (iii) glicemia ≤ 3.5 mmol/l seguita da due o più letture mancanti dovute alla sudorazione nel GW2B.

La percentuale degli eventi di iperglicemia, considerati tali per valori di glicemia ≥ 10.0 mmol/l, è stata registrata nei moduli di report quando misurata con il pungidito e nel caso dei gruppi 1 e 2 dai dati scaricati dal GW2B e dal CGMS.

Per i primi due gruppi sono state anche valutate eventuali reazioni cutanee, riportate dai pazienti al personale durante i controlli e registrate nei loro diari usando la scala MITRE. Ulteriori moduli sono stati compilati dai pazienti quando la reazione veniva classificata come severa, cioè ≥ 6 nella scala MITRE, e in questi casi i soggetti erano tenuti a recarsi nella clinica di riferimento dove il sito anatomico di interesse veniva analizzato, fotografato e se necessario medicato.

5.2.3 Risultati

I risultati principali emersi da questo studio riguardano il cambiamento in percentuale dell'HbA1c all'inizio e dopo 18 mesi. Ad ogni controllo venivano prelevati tre campioni di sangue, uno di questi veniva analizzato nella clinica, un campione veniva mandato al Department of Diabetes and

Endocrinology dell'University College Hospital per l'analisi e la standardizzazione, infine l'ultimo è stato conservato in caso di perdita o deterioramento del campione standardizzato.

All'inizio dello studio, l'HbA1c era compresa nel range 7.0-15.5% con una media per i vari gruppi compresa tra 8.9% e 9.4%. Le condizioni dei partecipanti, suddivisi nei vari gruppi, all'inizio dello studio sono riportati nella tabella 7.

Analizzando l'impatto a lungo termine (18 mesi) è emerso che in ogni gruppo si è verificata una riduzione dell'HbA1c. Inoltre, non è emerso alcun vantaggio statisticamente rilevante nell'utilizzo di dispositivi per il monitoraggio continuo della glicemia. (Tabella 8)

Analizzando invece l'impatto a breve termine, ossia alla fine della fase 1 per i primi tre gruppi, si può notare un miglioramento nei livelli di HbA1c in ciascun gruppo senza differenze sostanziali tra i tre come mostrato in Tabella 9.

Per quanto riguarda l'impatto a breve termine (tra 6 e 12 mesi) è stato valutato studiando i cambiamenti di HbA1c a 6 e 12 mesi rispetto ai livelli iniziali; tutti i gruppi hanno mostrato una riduzione dei livelli di HbA1c anche se il gruppo GW2B sembrava lavorare peggio rispetto agli altri al controllo dopo 6 mesi. (Tabella 10) C'è stata invece una differenza statisticamente rilevante tra i gruppi nei livelli di HbA1c dopo 12 mesi, dove il minore miglioramento si è avuto per il GlucoWatch. La riduzione relativa media nei livelli di HbA1c era compresa tra 0.8% (GlucoWatch) e 5% (CGMS) e 7% (gruppo attenzionato di cura e gruppo standard). Questo si traduce in differenza assoluta media dello 0.1% nel gruppo GW2B, dello 0.5% nel gruppo CGMS e dello 0.6% negli altri gruppi. Questi risultati riflettono le prestazioni relativamente più scarse del gruppo GW2B ma, dato il numero di confronti eseguiti, potrebbe essersi verificato per caso. (Tabella 11)

Risultati secondari di questo studio riguardano gli eventi di ipoglicemia, iperglicemia, reazioni cutanee avverse e altri effetti collaterali.

Gli episodi di ipoglicemia sono stati ottenuti dai misuratori Lifescan di cui tutti i partecipanti erano provvisti, ad ogni visita di controllo sono stati scaricati i dati salvati nei 28 giorni precedenti da questo strumento. Nel caso in cui i pazienti non avessero con sé lo strumento queste informazioni sono state ricavate dai loro diari personali. Nella tabella 12 sono riportati i dati ottenuti, non sono invece riportati quelli della visita iniziale perché nei 28 giorni precedenti i pazienti non erano dotati dello strumento. A questi dati non è stato possibile estrarre un modello coerente per i vari gruppi e nel tempo. Gli episodi di ipoglicemia severa riportati sono estremamente pochi, meno dello 0.02% tra tutti gli eventi di ipoglicemia durante lo studio.

Tabella 7 Risultati iniziali di HbA1c dei quattro gruppi

Gruppo	Partecipanti	HbA1c (%)			
		Media	Mediana	Scarto Interquartile	Intervallo
GlucoWatch	100	9.2 (1.5)	8.8	8.2 – 9.8	7.3 – 15.4
CGMS	102	9.0 (1.1)	9.0	8.3 – 9.6	7.0 – 15.5
Attention care	100	8.9 (1.1)	8.6	8.3 – 9.5	7.2 – 11.6
Standard care	102	9.4 (1.3)	9.3	8.5 – 10.2	7.3 – 14.1
Totale	404	9.1 (1.3)	8.9	8.2 – 9.7	7.9 – 15.5

Tabella 8 Cambiamento relativo percentuale di HbA1c tra la visita iniziale e il follow up a 18 mesi

	n	Cambiamento relativo percentuale di HbA1c				
		HbA1c iniziale (%) Media	HbA1c a 18 mesi (%) Media	Differenza media tra i gruppi	Differenza media confrontata con controlli standard	95% dell'intervallo di fiducia
GlucoWatch	79	9.3 (1.6)	9.1 (1.4)	-1.4 (14.4)	3.5	-1.3 ÷ 8.3
CGMS	83	8.9 (1.0)	8.5 (1.2)	-4.2 (14.8)	0.7	-4.0 ÷ 5.5
Controllo attenzionato	86	8.9 (1.1)	8.4 (1.2)	-5.1 (13.0)	-0.1	-4.6 ÷ 4.3
Controllo standard	82	9.4 (1.3)	8.9 (1.6)	-4.9 (16.2)		
Totale	330	9.1 (1.3)	8.7 (1.4)	-4.0 (14.6)		

Tabella 9 Cambiamento relativo percentuale di HbA1c tra la visita iniziale e il follow up a 3 mesi

	n	HbA1c iniziale (%) Media	HbA1c a 3 mesi (%) Media	Cambiamento relativo percentuale Media
GlucoWatch	75	9.2 (1.6)	8.7 (1.3)	-5.0 (9.7)
CGMS	81	8.9 (1.0)	8.3 (0.9)	-6.7 (10.1)
Controllo attenzionato	81	8.9 (1.1)	8.4 (1.1)	-5.5 (10.8)
Totale	237	9.0 (1.2)	8.4 (1.1)	-5.8 (10.2)

Tabella 10 Cambiamento relativo percentuale di HbA1c tra la visita iniziale e il follow up a 6 mesi

	n	HbA1c iniziale (%) Media	HbA1c a 6 mesi (%) Media	Cambiamento relativo percentuale di HbA1c		
				Differenza media tra i gruppi	Differenza media confrontata con i controlli standard	95% Intervallo di fiducia comparato con controlli standard
GlucoWatch	81	9.0 (1.2)	8.7 (1.3)	-2.5 (12.9)	3.4	-0.4 ÷ 7.3
CGMS	88	9.1 (1.2)	8.4 (1.4)	-6.7 (10.6)	-0.8	-4.2 ÷ 2.6
Controllo attenzionato	86	8.9 (1.1)	8.3 (1.1)	-6.0 (13.5)	-0.1	-3.9 ÷ 3.8
Controllo standard	86	9.5 (1.4)	8.8 (1.4)	-5.9 (13.5)		
Totale	341	9.1 (1.2)	8.6 (1.3)	-5.3 (12.4)		

Tabella 11 Cambiamento relativo percentuale di HbA1c tra la visita iniziale e il follow up a 12 mesi

Cambiamento relativo percentuale di HbA1c						
	n	HbA1c iniziale (%) Media	HbA1c a 12 mesi (%) Media	Differenza media tra i gruppi	Differenza media confrontata con i controlli standard	95% Intervallo di fiducia comparato con controlli standard
GlucoWatch	84	9.1 (1.4)	9.0 (1.6)	-0.9 (14.5)	5.7	1.4 ÷ 10.0
CGMS	86	8.9 (1.0)	8.4 (1.1)	-5.1 (12.4)	1.5	-2.1 ÷ 5.5
Controllo attenzionato	89	8.9 (1.1)	8.3 (1.2)	-6.6 (13.4)	0.0	-4.0 ÷ 4.1
Controllo standard	80	9.4 (1.3)	8.7 (1.4)	-6.6 (13.4)		
Totale	339	9.1 (1.2)	8.6 (1.3)	-4.8 (13.6)		

Tabella 12 Percentuale di episodi ipoglicemici per gruppo in vari momenti dello studio

Settimana	Gruppo	n	Episodi di ipoglicemia, n	Episodi di ipoglicemia, %	Totale episodi	Totale letture n, %	Rischio relativo
0	GlucoWatch	100	56	56			
	CGMS	102	61	60			
	Attenzionato	100	65	65			
	Standard	102	66	65			
4	GlucoWatch	85	56	66	316	4536, 7.0	0.99
	Attenzionato	84	62	74	394	5683, 6.9	
8	GlucoWatch	71	48	68	330	4210, 7.8	1.02
6	CGMS	93	71	76	426	6606, 6.4	1.23
8	Attenzionato	82	59	72	451	5666, 8.0	
12	GlucoWatch	74	54	73	332	4259, 7.8	1.16
	CGMS	82	58	71	414	5749, 7.2	1.07
	Attenzionato	81	62	77	441	5268, 8.4	
26	GlucoWatch	70	42	60	344	3664, 9.4	0.70
	CGMS	79	53	67	354	5844, 6.1	1.08
	Attenzionato	83	64	77	434	5629, 7.7	0.85
	Standard	77	42	55	306	4662, 6.6	
52	GlucoWatch	69	54	78	296	3517, 8.4	0.83
	CGMS	75	54	72	342	4753, 7.2	0.97
	Attenzionato	85	62	73	453	5439, 8.3	0.84
	Standard	70	46	66	285	4086, 7.02	
78	GlucoWatch	74	50	68	331	3527, 9.4	0.83
	CGMS	77	50	65	337	3984, 8.5	0.92
	Attenzionato	81	58	72	343	5103, 6.7	1.16
	Standard	77	49	64	296	3788, 7.8	

5.2.4 Considerazioni finali

I risultati di questo studio non indicano significativi vantaggi nell'utilizzo di dispositivi per il monitoraggio continuo della glicemia per il miglioramento dei livelli di HbA1c. Maggiori cambiamenti si sono verificati nelle prime fasi dello studio (5.8%) mentre sono diminuiti nel corso dei 18 mesi (4.0%). Inoltre circa il 25% dei partecipanti ha riscontrato un miglioramento del 12.5% nei livelli di HbA1c, ciò è da considerarsi clinicamente rilevante ma non è attribuibile ad uno specifico gruppo.

Per quanto riguarda episodi ipo- e iper-glicemia non sono state riscontrate significative differenze tra i membri dei vari gruppi alla fine dello studio.

Conclusioni

Il diabete è un problema diffuso a livello mondiale e il numero di persone affette da diabete è in costante aumento, le complicazioni altamente invalidanti fanno di questa malattia un problema socioeconomico. Il monitoraggio frequente della glicemia permette di controllare i livelli di glucosio ematico e mantenerli nei range fisiologici.

A seguito di una attenta revisione della letteratura circa i dispositivi non invasivi per la misura della glicemia, in questa trattazione viene fornito un quadro dettagliato delle principali tecnologie non invasive e dei dispositivi fino ad ora commercializzati. Una delle tecnologie più promettenti è la spettroscopia nel vicino infrarosso per via della sua semplicità dal punto di vista concettuale e della strumentazione, nonché per la sua accuratezza. Come per tutte le altre tecnologie, però, ad essere misurati non sono direttamente i livelli di glucosio ma le conseguenze delle variazioni di glucosio nel sangue e nei tessuti circostanti. La presenza di innumerevoli elementi confondenti (globuli rossi, acqua, etc.) rende l'interpretazione delle misure estremamente complicata e richiede l'utilizzo di specifici algoritmi e modelli matematici che permettano di eliminare le informazioni di disturbo.

Spesso, però, non è noto come alcuni elementi interferiscano sulla misura o non è possibile eliminarli senza compromettere i segnali provenienti dal glucosio.

Alla luce di quanto studiato possiamo affermare che, per ora, non esistono dispositivi non invasivi in grado di sostituire i tradizionali strumenti di misura ma possono essere utilizzati come supporto alle altre tecnologie nel trattamento del diabete. La tecnologia non invasiva richiede ancora enormi miglioramenti per affrontare le sfide, che includono risposte rapide, maggiore precisione e migliore calibrazione, l'eliminazione delle interferenze, la diminuzione dei costi, il comfort e la sicurezza del paziente nel trattamento di questa malattia.

Bibliografia

- [1] F. Conti, Fisiologia medica (vol.2), Edi-Ermes
- [2] C. Cobelli, R. Bonadonna, Bioingegneria dei sistemi metabolici, Pàtron editore.
- [3] <http://www.epicentro.iss.it/diabet/epid.asp>
- [4] J. J. Larry, Harrison, Endocrinologia clinica, Casarile (Milano), McGraw-Hill.
- [5] W. Villena Gonzales, A.T. Mobashsher, A. Abbosh, The Progress of Glucose Monitoring-A Review of Invasive to Minimally and Non-Invasive Techniques, Devices and Sensors. Sensors (Basel).
- [6] L. Tang, S.J. Chang, C.J. Chen, J.T. Liu, Non-Invasive Blood Glucose Monitoring Technology: A Review. Sensors (Basel).
- [7] A.S. Bolla, R. Priefer, Blood glucose monitoring- an overview of current and future non-invasive devices, Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews.
- [8] S. K. Vashist, Non-invasive glucose monitoring technology in diabetes management: A review, Analytica Chimica Acta.
- [9] A. Laurenzi, P. Di Bartolo, A. Maran, E. Bosi, Le nuove tecnologie nella gestione e nel trattamento del diabete tipo 1: i sensori del glucosio.
- [10] M. Tierney, J. Tamada, R. Potts, C. Eastman, K. Pitzer, N. Ackerman, S. Fermi, The GlucoWatch® biographer: a frequent, automatic and noninvasive glucose monitor. Ann Med 2000.
- [11] M. Shokrehodaei, S. Quinones. Review of Non-Invasive Glucose Sensing Techniques: Optical, Electrical and Breath Acetone.
- [12] A. Tura, A. Maran, G. Pacini, Non-invasive glucose monitoring: Assessment of technologies and devices according to quantitative criteria, Diabetes Research and Clinical Practice.
- [13] A. Pfützne, S. Strobl, F. Demircik, et al., Evaluation of a New Noninvasive Glucose Monitoring Device by Means of Standardized Meal Experiments. J Diabetes Sci Technol.
- [14] K. Yamakoshi, Y. Yamakoshi, Pulse glucometry: A new approach for noninvasive blood glucose measurement using instantaneous differential near-infrared spectrophotometry. J Biomed.

[15] The Diabetes Research in Children Network Study Group, A Randomized Multicenter Trial Comparing the GlucoWatch Biographer With Standard Glucose Monitoring in Children With Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*.

[16] S.P. Newman, D. Cooke, A. Casbard, S. Walker, S. Meredith, A. Nunn, L. Steed, A. Manca, M. Sculpher, M. Barnard, D. Kerr, J. Weaver, J. Ahlquist, S.J. Hurel, A randomised controlled trial to compare minimally invasive glucose monitoring devices with conventional monitoring in the management of insulin-treated diabetes mellitus (MITRE). *Health Technol Assess*.