

Retinopatia diabetica: Overview, new imaging e prospettive future



di Amedeo Lucente

Introduzione

Il diabete mellito è una patologia conosciuta fin dall'antichità, variamente denominata e descritta nelle sue specifiche caratteristiche semeiologiche.

- Il termine diabete fu coniato da Areteo di Cappadocia (81-133 d.C.) che si accorse della eccessiva produzione di urina in questi pazienti, deriva dal greco antico “diabainein” attraversare (dià=attraverso, baino=vado).

- Galeno (129-200 dC) individuò il diabete come malattia che provocava gravi danni ai reni.

- La differenziazione tra il tipo 1 e il tipo 2 è nozione altrettanto antica dovuta ad Avicenna (980-1037) intorno all'anno 1000.

- Nel Medioevo la parola fu “latinizzata” in diabètés.

- L'aggettivo mellito (dal latino mel-mellis= miele, dolce) è stato aggiunto nel 1675 dal medico inglese Thomas Willis (1621-1675, che descrisse anche la miastenia gravis e l'asma bronchiale), a causa del sapore dolciastro che assumevano sangue e urine nei soggetti affetti, tanto che il diabete fu denominato per qualche tempo Malattia di Willis.

Queste caratteristiche erano risapute da tempo anche in India, Grecia, Cina e nell'antica Civiltà Egizia.

- La malattia dal XVIII secolo era nota anche in Giappone con il nome di Shoikachi, malattia della sete.

- Nell'Ottocento in tutta Europa la diagnosi si faceva esclusivamente assaggiando le urine dei pazienti, pratica tra l'altro confermata in una grande varietà di opere d'arte del periodo Gotico (XIII-XIV secolo), molto antecedente [1→4].

Dati epidemiologici

Il diabete mellito è una malattia molto diffusa e colpisce una larga parte della popolazione, con prospettive di ulteriore coinvolgimento negli anni avvenire.

- La World Health Organization WHO, che nel 2018 compie 70 anni e riunisce 194 Stati, stima in 422 milioni le persone adulte affette da diabete nel 2014. Questi grandi numeri sono ancora più preoccupanti se paragonati al 1980, dove la stima era di solo 108 milioni. Anche la prevalenza sopra i 18 anni è quasi raddoppiata, dal 4.7% del 1980 al 8.5% del 2014.

- La diffusione del diabete sta aumentando più rapidamente nei paesi a medio e a basso reddito, con tasso di natalità maggiore, ed è una delle principali cause di cecità, insufficienza renale, attacchi cardiaci, ictus e amputazione degli arti inferiori nella popolazione di ogni età[5].

- Nel 2012 si stima che circa 1,5 milioni di morti sono stati causati direttamente dal diabete e altri 2,2 milioni di decessi sono riconducibili ad un elevato tasso di glucosio nel sangue.

- Quasi la metà di tutte le morti per elevata glicemia interviene prima dei settanta anni. L'OMS prospetta che il diabete sarà la settima causa di morte nel 2030. La maggior parte delle persone affette da diabete è di tipo 2 non insulino-dipendente.

Questa caratteristica, prima quasi esclusiva dell'età adulta, si sta estendendo pericolosamente all'età pediatrica, per l'aumento dell'obesità in questa fascia d'età[6].

- L'incapacità di utilizzare insulina da parte delle cellule induce il pancreas ad aumentarne la produzione;

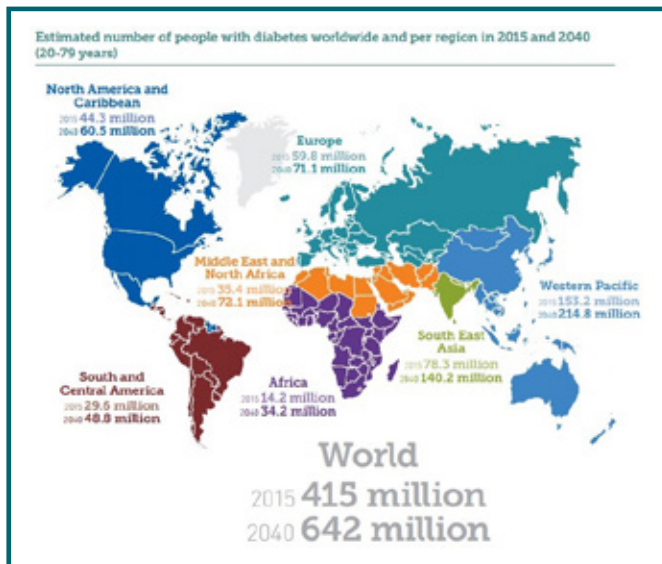


Fig. 1 - Stima del numero dei diabetici nel mondo (20-79 anni) e per continenti nel 2015, con stima per il 2040.

il risultato finale è il lento esaurimento delle cellule beta β , le più numerose (60%/80%) dei 5 tipi di cellule endocrine localizzate nelle isole pancreatiche del Langerhans (± 1 milione; dimensioni $\pm 100 \mu\text{m}$).

- Molti pazienti diabetici di tipo 2 diventano negli anni insulino-resistenti/dipendenti.

- In Europa la diffusione del diabete è intorno a 8,4% con stime in crescita al 9,2% nel 2025 (Regno Unito 4%, Francia 8,4%, Italia 8,7%, Spagna 7,5%, Germania 11,8%).

Percentuali simili si riscontrano in Medio Oriente (7%) e Nord-America (7,9%); minore diffusione è presente in Africa (2,4%), Pacifico Occidentale (3,1%), Sud Est Asiatico e America Centro-Meridionale (5,6%) (Fig. 1).

- Un diabetico ha una possibilità del 20/25 volte maggiore di diventare cieco rispetto ai soggetti normoglicemici. La retinopatia diabetica è, infatti, la causa più frequente di cecità tra i 30 e i 60 anni nelle società industrializzate.

Anche se l'invecchiamento della popolazione ha fatto aumentare a dismisura il loro numero, la causa principale di questa "epidemia" di pazienti iperglicemici è l'incremento dell'obesità.

Il numero totale degli obesi, con indice di massa corporea superiore a 30 ($\text{IMC} \geq 30 \text{ Kg/m}^2$) si è, infatti, decuplicato (Boston Scientific)[7,8].

- Dai dati del Royal College of Ophthalmologists i pazienti insulino-dipendenti più giovani hanno una prevalenza verso la retinopatia proliferante doppia rispetto ai più anziani e, dopo 10 anni, l'incidenza di edema maculare è in generale due volte maggiore nei soggetti insulino-dipendenti rispetto ai non

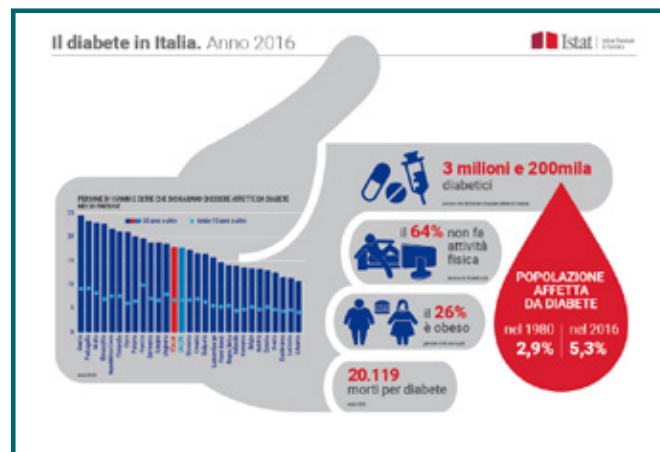


Fig. 2 - Diffusione del diabete in Italia 2016, dati ISTAT.

insulino-dipendenti[9].

- L'OMS riferisce che la retinopatia diabetica ha provocato globalmente 1,9% delle disabilità visive (moderata o grave) e, in particolare, nel 2010 il 2,6% della cecità; inoltre aggiunge che la prevalenza di ogni tipo di retinopatia in persone con diabete è del 35%, mentre la retinopatia proliferante è del 7%.

- In Italia l'Istat riporta percentuali di diabetici del 5,5% circa, oltre tre milioni di persone colpite, il 20% dopo i 75 anni (Fig. 2).

Macro e microangiopatia diabetica

Le lesioni vascolari riconducibili direttamente o indirettamente all'iperglicemia possono interessare grandi e piccoli vasi, determinando macro/microangiopatie. L'evoluzione funzionale di queste complicanze influenza non poco la qualità di vita dei pazienti.

- Le complicanze macrovascolari più frequenti sono:

- la cardiopatia ischemica
- la vasculopatia cerebrale
- l'arteriopatia periferica specie degli arti inferiori

- Le complicanze microvascolari possono coinvolgere, con diversa frequenza e contemporaneità, il tessuto renale, nervoso e retinico, provocando rispettivamente nefropatie, neuropatie e retinopatie di diversa gravità funzionale.

- Mentre nelle lesioni dei piccoli vasi l'iperglicemia è ritenuta come il più importante e quasi esclusivo fattore di rischio (Thomas Royle Dawber 1961), per le lesioni dei grandi vasi lo squilibrio glicemico viene considerato insieme a tutte le altre cause, fumo di sigaretta, ipertensione arteriosa, dislipidemie e predisposizione genetica.

- La macroangiopatia diabetica è espressione della localizzazione di un processo aterosclerotico diabetico-modulato nei vasi arteriosi di medio e grosso calibro

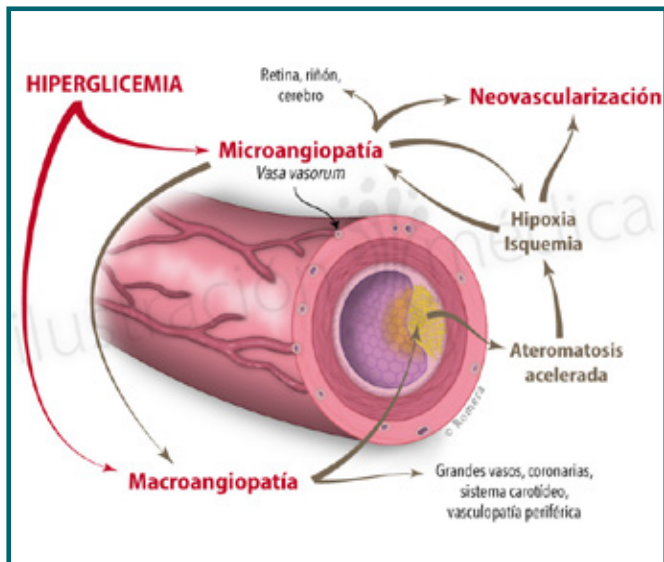


Fig. 3 - Relazione tra micro e macroangiopatía nel diabete. (<https://www.behance.net/gallery>)

dei distretti coronarico, cerebrale e degli arti inferiori. La struttura della placca aterosclerotica ha, infatti, le stesse caratteristiche istologiche nel diabetico e nel non diabetico.

- In presenza di prolungata iperglicemia, in molte ricerche, d'altra parte è stata riscontrata un'aterogenesi accelerata; il rischio di sviluppare lesioni della parete vasale nei diabetici è triplo rispetto ai soggetti normoglicemici (Fig. 3)[10].

- Studi retrospettivi hanno sempre dimostrato che un buon controllo metabolico è utile nel contrastare la progressione delle lesioni macrovascolari e l'evoluzione di quelle dei piccoli vasi.

- La presenza di alterazioni retiniche deve indurre perciò l'oftalmologo ad allargare il campo delle indagini verso patologie vascolari sistemiche concomitanti senza troppi indugi e inutili attese.

La malattia coronarica è, infatti, la principale causa di morbilità (numero casi malattia/numero persone in esame in un dato tempo) e di mortalità nei pazienti diabetici.

Il danno coronarico in particolare interessa il diabete di tipo 1 prevalentemente nella terza-quarta decade di vita e il tipo 2 nella quinta-sesta decade di vita. Nei pazienti diabetici si ha una mortalità per cardiopatia più alta rispetto ai non diabetici, la patologia cardiaca evolve più rapidamente, coinvolge con maggior frequenza contemporaneamente le tre arterie coronariche, le placche aterosclerotiche sono più estese e con aumentata possibilità di ulcerazione[11].

- Tra le microangiopatie la retinopatia diabetica è la più frequente e più importante complicanza del diabete mellito. Dopo 10 anni di malattia più del 95% dei

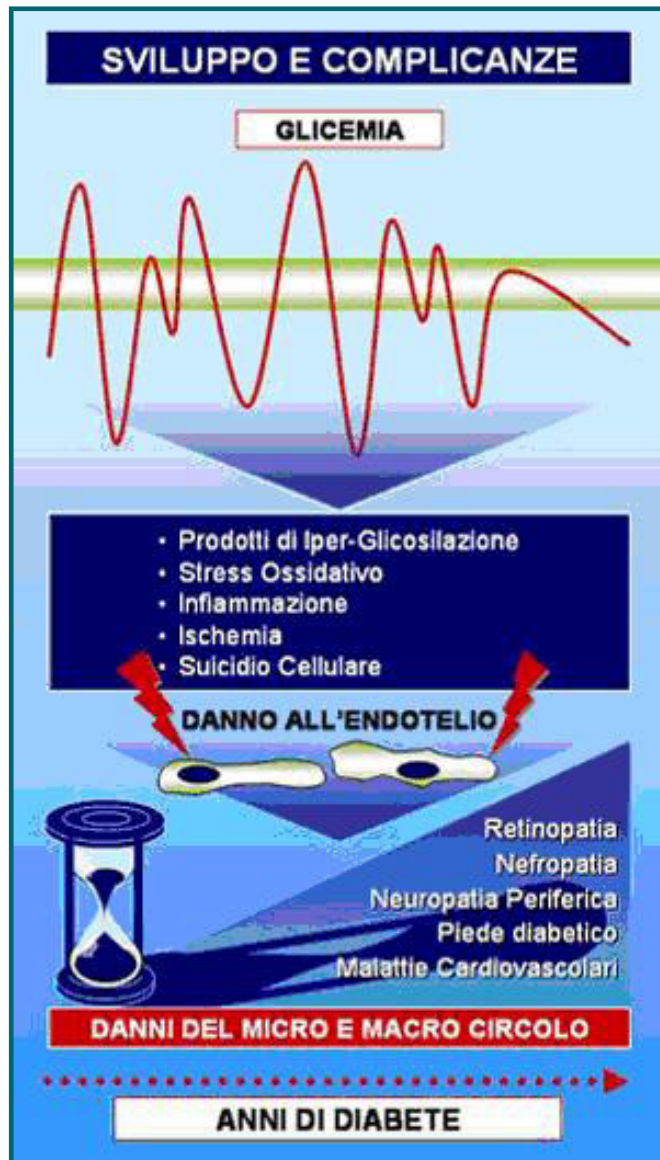


Fig. 4 - Meccanismo di insorgenza delle complicanze micro e macrovascolari nel diabete. (<http://www.retecivica.milano.it>)

diabetici di tipo 1 e il 60% dei diabetici di tipo 2 presentano segni più o meno manifesti di danno retinico. Il ruolo dell'oftalmologo è perciò necessario dal primo riscontro di un'iperglicemia, spesso misconosciuta e scoperta per caso all'esame oftalmoscopico specialmente se eseguito con ultra-widefield fundus imaging (Fig. 4).

Fisiopatologia del microcircolo retinico

Com'è noto il sangue dal letto arterioso è distribuito ad arteriole terminali con diametro di 30-100 μm e a meta-arteriole con diametro di 20 μm e lunghezza di pochi millimetri. Dalle arteriole terminali e meta-arteriole originano i vasi capillari (da 10 a 100) di diametro variabile fra 5 e 10 μm .

- Il calibro dei vasi capillari varia da organo ad organo: quelli più esili (5-7 μm) si trovano nel polmone,

nella retina, nei muscoli striati, nella sostanza grigia del sistema nervoso centrale, mentre quelli di maggior diametro (12-20 μm) si trovano soprattutto nel sistema ghiandolare e nel midollo osseo.

- La parete dei capillari è costituita da un unico strato di cellule poligonali appiattite, gli endotelociti, disposte con il loro asse maggiore nella direzione del flusso sanguigno, e poggiano su una sottile membrana basale di struttura glicoproteica.

- La membrana basale al microscopio elettronico è composta di tre lamine: lamina rara interna, lamina densa e lamina rara esterna. E' un insieme di collagene (tipo IV), alcune glicoproteine, laminina, fibronectina e proteoglicani.

- Le glicoproteine sono prodotte dalle stesse cellule endoteliali e dai periciti. Quest'ultime unità cellulari sono appiattite, dotate di sottili prolungamenti orientati secondo la lunghezza e all'esterno dei vasi capillari. La membrana basale, grazie ad un continuo scorrimento delle sue lamine, partecipa con l'endotelio a regolare la permeabilità e il passaggio di sostanze e cellule dal compartimento circolante a quello interstiziale e viceversa[12].

- Da un punto di vista morfologico possono distinguersi quattro tipi di endotelio:

- *Endotelio Continuo (capillari di tipo muscolare);*
- *Endotelio Fenestrato (capillari di tipo viscerale);*
- *Endotelio Discontinuo (fegato, milza midollo osseo);*
- *Endotelio a giunzioni strette (sistema nervoso centrale, retina e timo).*

- Le cellule endoteliali retiniche mancano di fenestrature e sono unite le une alle altre per mezzo di giunzioni strette (tight junctions), che ne limitano fortemente la permeabilità (Fig. 5).

Tale caratteristica si trova anche nell'endotelio dei vasi cerebrali, nella "barriera emato-encefalica" [13,14].

- Gli scambi tra plasma e la parete capillare possono avvenire per diffusione e/o per filtrazione:

- a) *per diffusione il passaggio di sostanze avviene in virtù del gradiente di concentrazione (O_2 , CO_2 , H_2O ed elettroliti);*
- b) *nella filtrazione, il passaggio avviene invece per differenza di pressione idrostatica, come per acqua e soluti, caratteristica presente nei glomeruli renali.*

Un altro modo di trasporto trans-capillare è legato a carriers specifici, come per l'insulina, che entra negli endotelociti attraverso un recettore insulinico specifico[15].

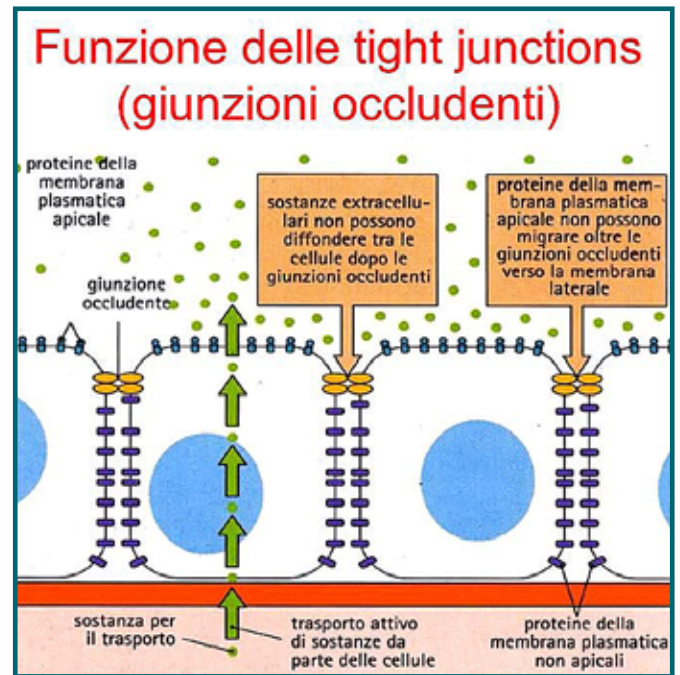


Fig. 5 - Funzione delle Tight Junctions.
(<http://www.retecivica.milano.it>)

- Secondo l'ipotesi di Starling (Ernest Henry Starling, Londra 1866/Giamaica 1927) i principali fattori che regolano il movimento di liquidi tra il compartimento vascolare e gli spazi interstiziali sono sottoposti a forze opposte, la pressione idrostatica all'interno del capillare e la pressione colloid-osmotica del plasma extracellulare (forze opposte di Starling)[16].

La pressione idrostatica intravasale favorisce la fuoriuscita di liquido all'estremità arteriolare del microcircolo, mentre la pressione colloid-osmotica plasmatica richiama liquidi nei vasi all'estremità venulare.

- In condizioni normali, al capo arteriolare del capillare la pressione idrostatica supera di 2-12 mmHg quella colloid-osmotica, per cui del liquido esce dai capillari nell'interstizio; dal lato venulare, al contrario, la pressione colloid-osmotica supera di 5-15 mmHg quella idrostatica, perciò il liquido interstiziale rientra nei capillari (Fig. 6).

Si evince che in condizioni fisiologiche la fuoriuscita di liquidi dall'estremità arteriolare dei capillari è pressoché controbilanciata dal riassorbimento all'estremità venulare; solo una piccola quantità di liquido è drenata dai vasi linfatici. Questo fine e delicato equilibrio di forze contrapposte impedisce la formazione di edema[17].

Quando la filtrazione supera l'assorbimento, il volume plasmatico si riduce, aumenta il liquido interstiziale e si forma edema; se invece l'assorbimento supera la filtrazione, si riduce il liquido interstiziale e si determina disidratazione.

- L'endotelio può essere considerato un vero e

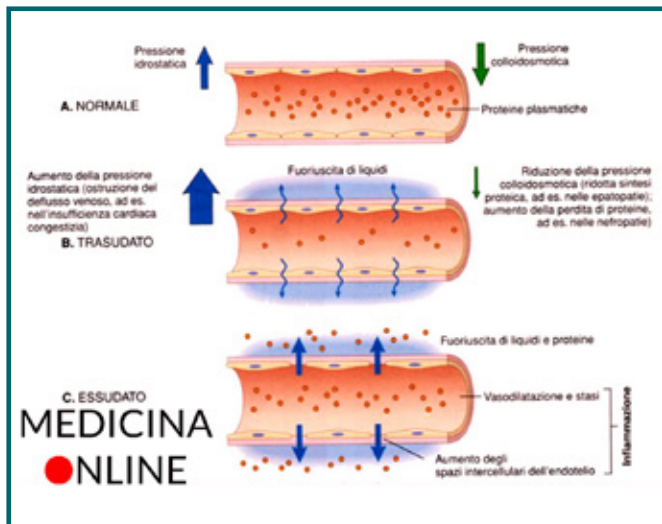


Fig. 6 - Formazione di edema nei tessuti.
(<https://medicinaonline.co/2017>)

proprio "organo endocrino diffuso", multifunzionale, il più voluminoso del corpo umano (peso totale di 1,0-1,8 Kg, superficie stimata tra 400 m² e 1000 m²), con attività autocrine (da greco auto=stesso e crino=che produce), dove le sostanze prodotte modificano il comportamento della cellula stessa, e attività paracrine (dal greco para= vicinanza e crino=che produce), per cui i messaggeri chimici secreti modificano la fisiologia delle cellule vicine[18].

- Le cellule endoteliali sono, infatti, attivamente coinvolte nella regolazione del tono vascolare, della permeabilità vasale, nel controllo dell'emeostasi, della fibrinolisi, nella modulazione dei processi flogistici, e nella neoangiogenesi fisiologica, come nel cuore degli atleti, e patologica, come nella retinopatia diabetica proliferante e nelle formazione delle membrane neovascolari.

- L'iperglicemia rappresenta la causa prima per la microangiopatia.

Tuttavia non è infrequente osservare pazienti con scadente controllo metabolico senza evidente microangiopatia, o solo con danni modesti nei differenti distretti microvascolari.

- Oltre all'iperglicemia altri fattori evidentemente intervengono e sono decisivi nello sviluppo e progressione della microangiopatia diabetica, tutti ancora da studiare e da valutare.

Sicuramente il patrimonio genetico è il più influente tra tutti i possibili fattori in causa, come chiaramente emerge da numerose ricerche e documentate sperimentazioni [19].

- Esiste una "susceptibilità individuale" più o meno spiccata all'effetto dell'iperglicemia, mediata da condizioni genetiche diverse e variabili, con espressività

differente. I geni responsabili di questa variabilità individuale sono molteplici, e una precisa correlazione non è stata ancora ben individuata.

I più studiati sono i geni per la nitrossido-sintetasi costitutiva (e-NOS), per l'endotelina-1 (ET-1), i geni che codificano per proteine coinvolte nella difesa dallo stress ossidativo, il recettore per le LDL ossidate, ORL-1, NADH/NADPH ossidasi, isoforme della glutathionil-transferasi e molti altri ancora[20].

Alterazioni vascolari retiniche nel diabete

I quadri oftalmoscopici della retinopatia diabetica sono ben noti all'iconografia oftalmoscopica. La retinopatia diabetica secondo le varie Scuole di pensiero è così classificata[17]

a) Non-Proliferativa, NPDR (Background/Preproliferative):

- *National Security Council-United Kingdom, NSCUK:*
 - Background (Level R1)
 - Proliferative (Level R2)
- *American Academy of Ophthalmology, AOO:*
 - Mild (Lieve)
 - Moderate (Moderata)
 - Severe (Severa)
- *Scottish Diabetic Retinopathy Grading Scheme, SDRGS:*
 - Mild background (Level R1)
 - Moderate background (Level R2)
 - Severe background (Level R3)

b) Proliferativa, PDR:

- Location (Localizzata)
- Severity (Severa)

La maculopatia diabetica è a sua volta classificata:

- Focal oedema, edema focale
- Diffuse oedema, edema diffuso
- Ischaemic, forma ischemica
- Mixed, forma mista

I meccanismi fisiopatologici della retinopatia non proliferativa comprendono:

- *Ispessimento della membrana basale*
- *Perdita dei periciti retinici*
- *Aumento della permeabilità dei vasi retinici*
- *Alterazioni del flusso ematico retinico*
- *Eventuale istaurarsi della neo-vascularizzazione*

- I microaneurismi della retina, le emorragie puntiformi e gli essudati cotonosi sono le manifestazioni oftalmoscopicamente più evidenti.

I microaneurismi sono le più precoci alterazioni strutturali a livello retinico, dilatazioni sacculari della parete vasale che non comportano generalmente riduzione del visus.

La perdita dei periciti è una lesione cito-istologica critica per l'integrità dei capillari che consegue all'ispessimento della membrana basale.

Fisiologicamente preposti al mantenimento dell'integrità strutturale dell'endotelio dei capillari retinici, la loro perdita, diminuzione o assenza predispone la parete del capillare alla dilatazione sacculare e alla formazione di microaneurismi.

- La dilatazione del capillare determina un aumento di permeabilità e la comparsa di essudati duri.

La rottura dei vasi o dei microaneurismi può generare emorragie retiniche negli strati più profondi con aspetto puntiforme, e/o negli strati più superficiali con aspetto a fiamma, per la particolare disposizione delle fibre nervose assonali.

I microaneurismi col tempo possono andare incontro a processi di ialinizzazione determinando micro-infarti retinici e formazione di essudati cotonosi.

- Un altro importante meccanismo biochimico innescato dall'iperglicemia è l'alterazione e/o diminuzione del glicocalice, stato di proteoglicani che riveste la superficie luminale dell'endotelio, ancora non pienamente valutato[21].

In un recente articolo del Cambridge Research Center, "The glycocalyx bedside evaluation plays a central role in diagnosing type 2 diabetes mellitus and in its primary prevention", gli autori sottolineano come la disfunzione mitocondriale, l'alterazione della barriera emato-encefalica, la valutazione degli endoteli e dei glicocalici siano le nuove e più recenti acquisizioni nella patogenesi e nella diagnosi precoce del Diabete Mellito Tipo 2[22].

- I principali meccanismi biochimici con cui l'iperglicemia favorisce lo sviluppo del danno vasale sono[21]:

- a) Glucotossicità diretta
- b) Glicosilazione non enzimatica
- c) Glicosilazione enzimatica (l'attivazione della via metabolica dell'aldoso-reduttasi o via dei polioli)
- d) Via del diacilglicerolo-protein-chinasi C
- e) Auto-ossidazione del glucosio
- f) Potenziali redox
- g) Stress ossidativo

- La microangiopatia diabetica retinica, caratterizzata da microaneurismi, aree di non perfusione capillare e/o di conclamata ischemia, determina complicazioni dannose per la funzione visiva più gravi se è coinvolta l'area maculare, per la comparsa di edema DME Diabetic

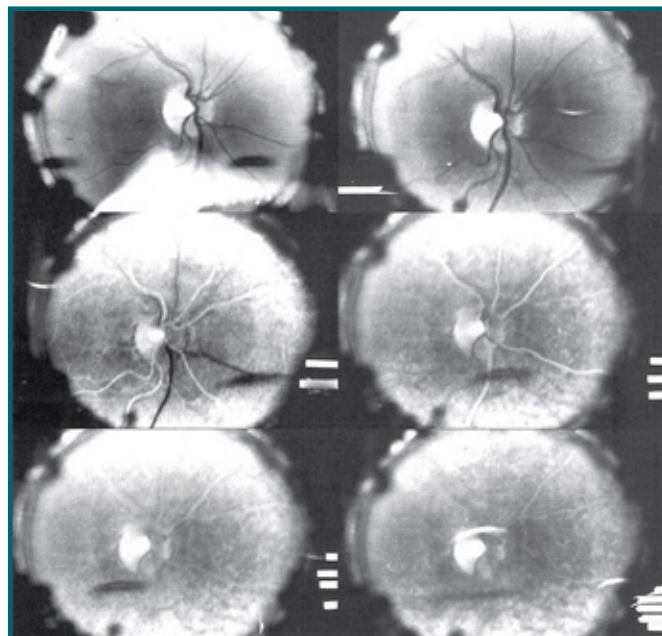


Fig. 7 - Immagine della prima fluoroangiografia dell'occhio destro di David Alvis eseguita nel 1959. (Michael F. Marmor et al.)

Macular Edema e/o d'ischemia DMI Diabetic Macular Ischemia.

- Ogni area retinica ischemica, periferica, maculare o papillare, rappresenta un potenziale stimolo per la sintesi di fattori di crescita ad azione angio-genetica (VEGF), formazione di nuovi vasi a livello retinico e/o pre-retinico o sulla superficie dell'iride, condizione che può evolvere verso la rubeosis iridis e glaucoma neo-vascolare.

Single-Field vs Ultra-Widefield

La fluorangiografia retinica si conferma ancora l'esame strumentale gold standard per le alterazioni vascolari della retina in genere e, in particolare, per la retinopatia diabetica.

- Si deve a due studenti dell'Indiana University, Harold Novotny e David Alvis l'introduzione nel 1961 della fluorangiografia, dopo i primi esperimenti iniziati nel 1959. Fu lo stesso Alvis, dopo il lancio di monetina, a sottoporsi nel novembre 1959 volontariamente all'infusione endovenosa di fluoresceina al 5% (fluorescite). Le sequenze raffigurate nella figura 7 sono le prime immagini fluorangiografiche dell'occhio destro di Alvis (Fig. 7).

- Il loro studio non fu accettato dalle più importanti riviste di oftalmologia; venne invece pubblicato nel 1961 da Circulation che, com'è noto, si interessa di problematiche cardiovascolari (Lippincott Williams & Wilkins for the American Heart Association; dal 1996 al 2004 ha ottenuto un impact factor pari a 10 e dal 2016 l'impact factor è salito al 19.309).

Da allora si sono aperte definitivamente le strade

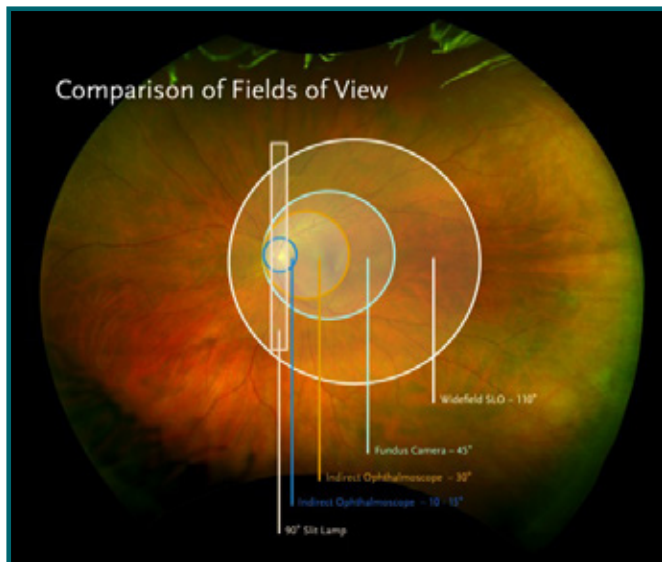


Fig. 8 - Paragone tra le ampiezze di campo nell'imaging retinico.

[https://blog.optos.com/index.php/](https://blog.optos.com/index.php/how-uwf-retinal-imaging-improves-optometric-care)

[how-uwf-retinal-imaging-improves-optometric-care\)](https://blog.optos.com/index.php/how-uwf-retinal-imaging-improves-optometric-care)

all'indagine vascolare in oftalmologia, la fluorangiografia è stata largamente utilizzata ed ha enormemente favorito la comprensione di molte malattie della neuro-corio-retina [23].

- Lo sviluppo straordinario dell'imaging retinico, con la possibilità di visionare la retina ben oltre la regione equatoriale per mezzo di device ultra-widefield, in quest'ultimo tempo sta cambiando, e non poco, l'approccio diagnostico delle alterazioni retiniche.

- L'imaging fotografico retinico è stato tradizionalmente limitato alla regione del polo posteriore, macula e nervo ottico, con copertura di 20/50 gradi.

Com'è noto l'area del polo posteriore con esame fotografico tradizionale comprende le più importanti e frequenti malattie della macula e del nervo ottico, con deficit significativi per visus e per campo visivo. L'esame fotografico tradizionale è rapido, a basso costo, comporta poca esposizione alla luce, eseguibile anche senza dilatazione pupillare, facilmente, da personale addestrato ma non necessariamente medico, ed è altamente riproducibile.

- In modo progressivo da alcuni anni l'imaging single-field nella retinopatia diabetica si è evoluto verso un'imaging ultra-widefield (Fig. 8).

Questo sviluppo d'imaging è stato di grande rilevanza diagnostica in molte patologie retiniche, specialmente vascolari, anticipato dalla pubblicazione del 2004 di Williams GA. et al. per l'American Academy of Ophthalmology, che comunque ancora attestava l'efficacia del single-field.

In questo lavoro gli autori riferirono infatti che i livelli d'evidenza restano a favore ancora per la fotografia

retinica single-field nella valutazione, screening e gestione della retinopatia diabetica.

Gli studi riportati, a conforto di questa tesi dimostravano, infatti, che la singola fotografia, interpretata da personale esperto, aveva un range di sensibilità tra 61% e 90% e specificità tra 85% e 97% rispetto ai 7 campi standard dell'EDTRS [24].

- L'imaging widefield del fundus oculi può essere ottenuta attraverso tre metodologie:

A) *Montaggio delle singole imaging*

B) *Lenti addizionali alle fundus camera*

C) *Wide-angle fundus camera*

A) Il montaggio di singole immagini retiniche di 30° è stato introdotto, auspicato e utilizzato dal gruppo di oftalmologi dell'Early Treatment Diabetic Retinopathy Study ETDRS.

Tale studio multicentrico, sponsor il NEI National Eye Institute, iniziato nel settembre 1999 e proseguito fino allo stesso mese del 1986, ha coinvolto 3711 pazienti per un periodo minimo di 4 anni, con l'obiettivo di verificare l'efficacia del laser-trattamento verso l'utilizzo dell'aspirina nel management dei pazienti affetti da retinopatia diabetica non proliferante o inizialmente proliferante.

In particolare gli obiettivi dell'ETDRS erano:

- *Determinare il tempo più idoneo per iniziare la fotocoagulazione laser*
- *Monitorare gli effetti del diabete mellito e della fotocoagulazione sulla funzione visiva*
- *Descrivere la storia naturale dei dati che possono aiutare a identificare i fattori di rischio e le ipotesi patogenetiche della retinopatia diabetica*

La somma dei 7 campi retinici permette una visione stereoscopica della retina a 75°.

Tale metodica è stata utilizzata in questo studio ed è tuttora ritenuta gold standard per una corretta classificazione della retinopatia diabetica [25].

- Il montaggio auspicato dall'ETDRS richiede però tempo, una certa abilità dell'operatore, preferibilmente oftalmologo, e la dilatazione pupillare.

Una modalità fotografica alternativa più rapida, facile, veloce, frequentemente utilizzata e comunque valida, consiste nell'assemblaggio di 2 o 3 campi retinici a 45°, centrale nasale e temporale, anche senza midriasi[26].

B) Il primo a pensare allo sviluppo nel 1975 di una wide-angle camera fu Oleg Pomerantzeff, ingegnere biofisico che lavorava allo Schepens Eye Research Institute

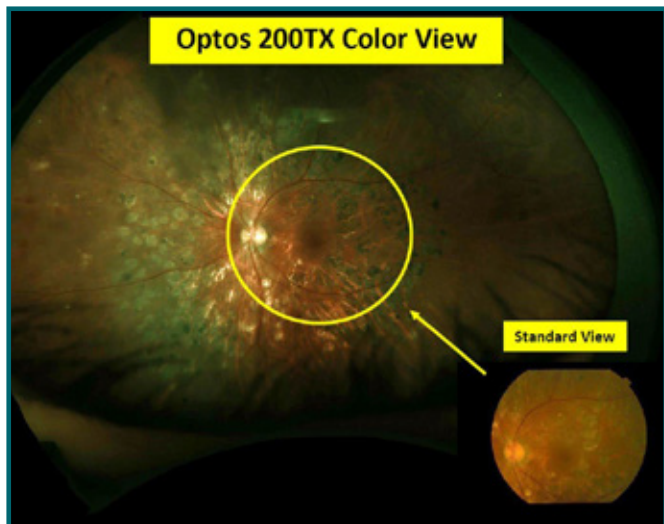


Fig. 9 - Fundus Color ottenuta con OptosTX 200 di una retinopatia diabetica apparentemente ben trattata con panfotocoagulazione retinica.
(<http://www.strathfieldretina.com.au/optos-200tx-ultra-widefield-retinal-imaging-system>)

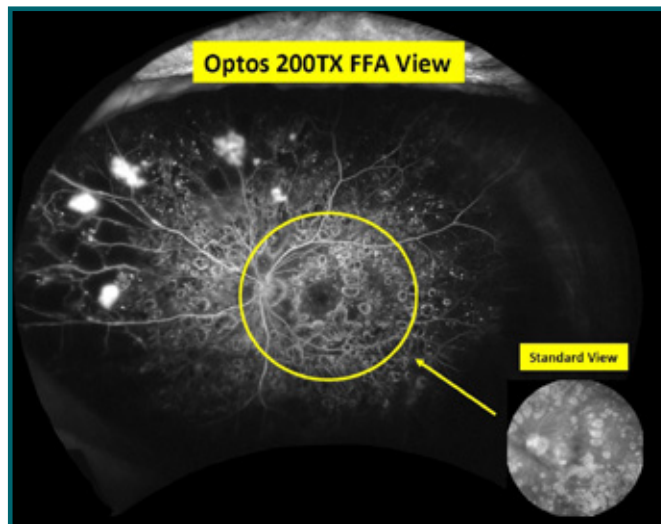


Fig. 9 bis - Immagine della stessa retina con fluoroangiografia con zone periferiche iperfluorescente ancora da trattare.
(<http://www.strathfieldretina.com.au/optos-200tx-ultra-widefield-retinal-imaging-system>).



Fig. 10 - Imaging retinico a 200 gradi con Clarus 500 Zeiss.
(<https://www.zeiss.com/mediteclus/products/ophthalmology-optometry/retinal/diagnostics/fundus-imaging/clarus-500.html>)

(Boston Massachusetts USA). La sua Equator-Plus Camera a illuminazione transclerale con fibra ottica utilizzava una lente a contatto corneale con immagini fino a 148°, limiti del tutto ragguardevoli per l'epoca[27].

- Il sistema di lenti ideata da Giovanni Staurenghi nel 2005 permette con molta efficacia e agevolmente una copertura della retina di 150°, limite difficilmente superabile con le sole lenti aggiuntive [28].

- La Clarity Medical Systems ha introdotto da qualche anno la Retcam, un sistema d'imaging a 130° con

fibre ottiche, utilizzata soprattutto in oftalmologia neonatale[29].

La Heidelberg Spectralis, con il modulo non-contact ultra-widefield, permette una visione a 120° utilizzando uno scanning laser oftalmoscopio[30].

C) La Optos (Dunfermline United Kingdom), è stata la prima ditta ad introdurre un device non-contact scanning laser che permette immagini ultra-widefield fino a 200°, 82% dell'intera area retinica, di grande effetto, rispetto alla copertura del 15% con l'imaging a 45°(Fig. 9, Fig. 9bis). Nonostante l'ampio campo, la limitazione intrinseca dell'apertura palpebrale e/o pupillare ostacola inevitabilmente l'ampiezza delle immagini, che risultano sfuocate lungo i meridiani verticali.

- La Optos ha proposto di recente un nuovo software che monta, in modo automatico, immagini standard con quelle ottenute dal movimento volontario del bulbo oculare, con risultati del tutto lusinghieri[31].

- La Zeiss, entro fine 2017, ha immesso sul mercato un sistema Ultra-WideField (Clarus 500 foto/autofluorescenza e, in seguito Clarus 700 anche con fluoro/indocianina) ad alta definizione, con visione di campo fino a 130° di apertura con un solo scatto (one shot), di 200° con due scatti e fino a 267° con 6 scatti (Fig. 10).

Ultra-Widefield e retinopatia diabetica

La strada verso un'imaging ultra-widefield in oftalmologia è ormai definitivamente tracciata e in pieno sviluppo. Presto entrerà nel management diagnostico in modo diffuso, capillare, offrendo maggiori e più

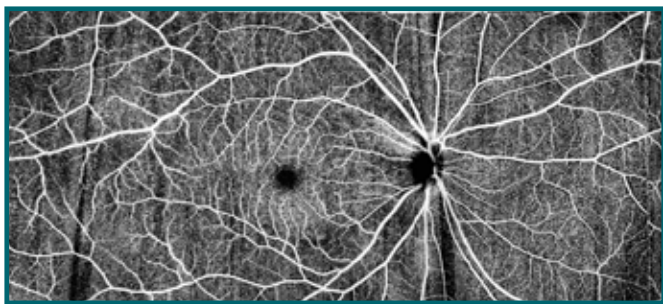


Fig. 11 - Ultra-widefield OCTA (~20-mm larghezza, 10-mm altezza, 7-mm profondità) con montaggio utilizzando un device 200-kHz swept-source OCT system. (Simon S. Gao et al.)

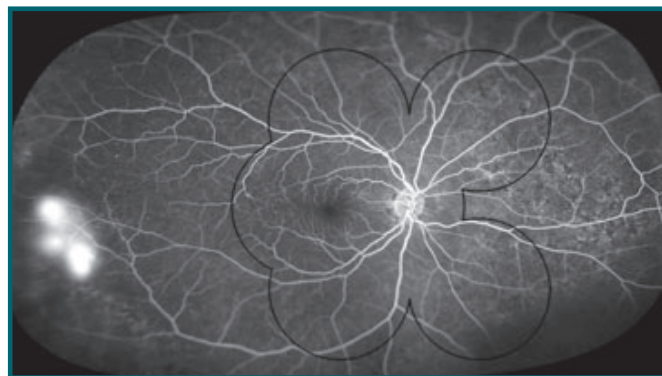


Fig. 12 - Wide-field fluoroangiografia dell'occhio destro di un paziente diabetico con Optos che evidenzia una neovascolarizzazione periferica temporale non compresa dall'apertura con i 7 campi standard EDTRS della retina. (Matthew T. Witmer et al.)

complete possibilità diagnostiche.

Numerosi studi attestano l'assoluta utilità di tale metodica nella diagnostica delle vasculopatie retiniche e, con ancor più diritto, nello screening della retinopatia diabetica (Fig. 11).

- Price et al. hanno confrontato nel 2015 nella valutazione di gravità (severity grading) l'affidabilità della mappa retinica di Optos rispetto ai 7 campi standard EDTRS effettuati con fundus camera tradizionale. La capacità di identificare la gravità della retinopatia diabetica utilizzando i 7 campi standard è stata confermata, con un valore percentuale di 85%; il 19% delle immagini retiniche è stato però possibile riclassificarle ad un livello superiore grazie all'implementazione diagnostica permessa dall'imaging ultra-widefield [32] (Fig. 12).

- Wessel et al. hanno dimostrato che l'imaging ultra-widefield permette migliori valutazioni oftalmoscopiche con valori di 3,9 nell'individuare aree non perfuse, di 1,9 nel riconoscere nuove aree di neovascolarizzazione, e di 3,8 nel distinguere cicatrici argon laser rispetto ai 7 campi standard EDTRS.

Gli autori hanno inoltre potuto rendere evidente, estendendo l'utilizzo dell'imaging ultra-widefield alla fluorangiografia FA, aree non perfuse e neovasi in più del 10% dei pazienti, non riconosciute ai 7 campi standard EDTRS [33].

- Talks et al. hanno dimostrato che Optomap ultra-widefield permette di scoprire il 30% in più circa di aree retiniche interessate da neovascolarizzazione, specialmente oltre l'equatore nei confronti dell'oftalmoscopia standard a due campi, di frequente utilizzata nello screening dal servizio sanitario nazionale nel Regno Unito[34].

- Silva et al., in un loro recente lavoro, riferiscono che il giudizio oftalmoscopico complessivo nella retinopatia diabetica diventa più severo nel 20% dei pazienti con ultra-wildfield rispetto ai 7 campi standard EDTRS, per la possibilità di evidenziare lesioni vascolari periferiche altrimenti sconosciute.

Gli autori concludono che l'imaging ultra-widefield permette una migliore valutazione complessiva nel 10% degli occhi e riesce ad identificare lesioni vascolari oltre l'area dei 7 campi standard.

La presenza, persistenza e l'incremento di lesioni periferiche sono state dagli autori inoltre strettamente associate, dopo 4 anni di controlli, alla progressione della retinopatia, indipendentemente dallo stato metabolico del paziente e all'alterazione vascolare di partenza [35].

Angio-OCT e retinopatia diabetica

L'esame fluorangiografico resta la metodica standard per valutare in vivo il circolo neuro-corio-retinico specie nella retinopatia diabetica.

L'imaging fluorangiografico ha caratteristiche bidimensionali, sovrappone i plessi vascolari corio-retinici, non permette una corretta e distinta valutazione selettiva dei singoli network vascolari strato per strato in profondità (deep resolution), è una metodica invasiva.

A vantaggio della FA resta la vasta letteratura presente sulle singole patologie, gli innumerevoli studi multicentrici, la possibilità di valutare la diffusione (leakage), l'accumulo (pooling) e/o l'impregnazione/colorazione (staining) del colorante, caratteristiche dinamiche che offrono non poche, importanti informazioni strutturali e funzionali sulla maggior parte delle patologie neuro-corio-retiniche.

L'Angio-OCT può supplire o sostituire definitivamente la fluoro? L'affiancamento semeiologico è già di fatto avvenuto; ritenere la fluoro non più utile è però,

almeno allo stato attuale delle cose, imprudente o quanto meno superficiale.

Il numero di richieste per fluoro è di fatto comunque drasticamente diminuito, anche per la retinopatia diabetica; tuttavia è proprio per questa vasculopatia che si richiedono ed eseguono ancora il maggior numero di fluoro.

L'esame Angio-OCT mette in evidenza con grande qualità iconografica e da poco tempo, con copiosi dati statistici di importanza clinica crescente, le variazioni dell'area avascolare foveale FAZ, le anomalie della struttura dei capillari intraretinici IRMA, i microaneurismi, le aree retiniche periferiche poco o non perfuse, i neovasi, offrendo dati numerici (Vessel Density e Perfusion Density) nei singoli settori indagati ancora da interpretare e pienamente valutare.

- *Di G et al.* hanno condotto recentemente uno studio su 65 pazienti con diabete mellito DM (113 occhi) e 62 controlli (85 occhi) con Angio-OCT. Hanno calcolando in area foveale in entrambi i gruppi il raggio orizzontale HR, il raggio verticale VR e l'area FAZ. Le differenze di HR, VR e dell'area FAZ tra il gruppo di controllo e il gruppo DM erano statisticamente significative ($p=0.01$, 0.00 and 0.00 , rispettivamente).

La misura della FAZ era più ampia nel gruppo DM rispetto al gruppo di controllo; nel gruppo con edema maculare clinicamente significativo CSME l'area FAZ era maggiore rispetto al gruppo non CSME ($p=0.02$). Concludono affermando che l'Angio-OCT produrrà notevoli quantità di dati precedentemente non disponibili e di grande utilità nella ricerca[36].

- *Takase et al.* hanno evidenziato con l'Angio-OCT il precoce allargamento della FAZ in presenza di costante iperglicemia. La FAZ area nell'inner vascular plexus era $0.25 \pm 0.06 \text{ mm}^2$ negli occhi sani ($n = 19$), $0.37 \pm 0.07 \text{ mm}^2$ negli occhi dei diabetici senza retinopatia in atto ($n = 24$) e $0.38 \pm 0.11 \text{ mm}^2$ negli occhi con retinopatia diabetica manifesta ($n = 20$). Gli occhi con retinopatia diabetica mostrano FAZ più ampia statisticamente rispetto ai soggetti sani ($P < 0.01$). L'area FAZ area nel deep vascular plexus era più ampia statisticamente rispetto agli occhi sani ($P < 0.01$)[37].

- *de Carlo et al.* hanno più specificamente messo a confronto le variazioni microvascolari tra pazienti diabetici e non diabetici con indagine angio-OCT. La zona avascolare FAZ misurava 0.348 mm^2 ($0.1085 - 0.671$) negli occhi diabetici e 0.288 mm^2 ($0.07 - 0.434$) nei pazienti di controllo ($P = 0.04$). Il rimodellamento della vascolarizzazione della FAZ tra diabetici e sani (36% contro 11% ; $P = 0.01$) e l'area di non perfusione

capillare (21% contro 4% ; $P=0.03$) erano statisticamente più evidenti nei pazienti diabetici.

Infine i microaneurismi e le dilatazioni venose sono presenti in meno del 10% dei diabetici e sani complessivamente; la tortuosità venosa era presente però nel 21% dei sani contro il 25% degli occhi diabetici [38].

- *Ishibazawa et al.* hanno posto la loro attenzione sull'imaging angio-OCT in presenza di retinopatia proliferante. Hanno dimostrato, con imaging en face, due tipi di neovasi: una forma attiva con neovasi di un calibro maggiore e fini proliferazioni irregolari di più piccole dimensioni definite Exuberant Vascular Proliferation (EVP +), e un secondo tipo con vasi tronchi senza neoproliferazione di fini capillari, definiti non exuberant (EVP -) [39].

- *Ploner SB, Fujimoto JG et al.* su Retina nel dicembre del 2016 hanno pubblicato lo sviluppo dell'algoritmo VISTA Variable Interscan Time Analysis, che permette un assemblaggio di mappe tomografiche a colori per la misura della velocità del flusso vascolare.

L'Angio-OCT sperimentale utilizzato è uno swept source con lunghezza d'onda di $1,050 \text{ nm}$, 400 kHz A-scan rate, protocollo di ripetizione a 5 B-scan, e tempi di interscambi di 1.5 e 3.0 millisecondi. Gli autori hanno visionato con tale metodologia 2 occhi normali, 6 con retinopatia non proliferante, 3 con retinopatia proliferante, 4 con atrofia geografica e 2 con maculopatia essudativa. Tutti gli occhi con patologia in atto hanno evidenziato alterazioni della velocità di flusso (blood flow speed) rispetto ai controlli[40].

Ultimate goal, conclusioni e considerazioni

Presso il Massachusetts Institute of Technology MIT sono in via di sviluppo nuove tecnologie angiografiche tomografiche testate al New England Eye Center di Boston. Questo nuovo tomografo ultra high-speed è un device SS-OCT a 1060nm , a 400.000 A-scan al secondo, 500×500 A-scan in 3.8 secondi, con possibilità di angiogrammi ultra-widefield $12 \times 12 \text{ mm}$, e di visualizzare la circolazione coroideale sotto all'EPR.

- All'opposto di tanta tecnologia ancora in pieno sviluppo, molti paesi industrializzati, pur avendo oculisti sufficienti per esaminare efficacemente le loro popolazioni diabetiche, per la mancata osservanza delle linee guida di screening per motivi socioeconomici, culturali e geografici, presentano un elevato e crescente numero di diabetici ipovedenti[41].

- L'epidemia globale del diabete minaccia di sovrappiattare ogni possibile risorsa messa in campo dai singoli governi e, se non contrastata adeguatamente,

provoccherà un aumento rapido della cecità nel mondo.

- Queste possibili prospettive richiedono necessariamente lo sviluppo di programmi innovativi per educare, diagnosticare e curare i pazienti in fase precoce. Spesso i soggetti diabetici non sono consapevoli dei loro rischi visivi, e i modelli di assistenza primaria sono frequentemente inadeguati nel prevenire tutte le complicazioni.

- I programmi d'istruzione rivolti sia ai medici che ai pazienti necessitano, inoltre, di miglioramenti difficili da definire per efficaci screening di massa, specie nei paesi in via di sviluppo, dove il numero di medici è insufficiente, e le lunghe distanze rendono problematiche le prestazioni specialistiche[42,43].

- La telemedicina ha il potenziale per offrire assistenza a prezzi accessibili a molte di queste popolazioni. I programmi di screening della telemedicina per la DR possono essere attuati con fotocamere non-midriatiche anche da personale paramedico, mantenendo un'alta qualità.

- Gli adattatori telefonici per cellulari appena sviluppati possono essere una valida possibilità all'indagine oftalmoscopica su larga scala in queste popolazioni. Quasi tutti gli smartphone possono essere, infatti,

trasformati in una fotocamera per un esame di base del fondo oculare [44].

- Il basso costo degli adattatori e la diffusa disponibilità di telefoni cellulari permetterebbero un campionamento più diffuso, oltre la possibilità di valutazioni on line direttamente negli ambulatori dei medici di base. Gli ambulatori di medicina generale, a loro volta, potrebbero trasmettere a un oftalmologo di riferimento i casi ritenuti patologici, per un rapido e tempestivo intervento laser o di altro genere.

La strada della prevenzione nei paesi in via di sviluppo, per essere a basso costo, dovrà per forza essere informatica.

- La possibilità di avere tecnologie sempre più evolute con database di confronto validato statisticamente, insieme ad una fruibilità più estesa permetterà, si spera, di affrontare le difficili sfide degli anni futuri con maggiore ottimismo. Anche se la retinopatia diabetica si prevede in grande e preoccupante aumento nei prossimi decenni, i progressi tecnologici descritti e in sviluppo potranno, se universalmente e adeguatamente sfruttati, essere da argine alle gravi alterazioni che tale patologia apporta alla funzione visiva. ■

REFERENCES

1. Ahmed AM., History of diabetes mellitus., in Saudi Med J., vol. 23, aprile 2002, pp. 373-378.
2. Kosaka K., History of medicine and changes in concept of diabetes mellitus in Japan, in Diabetes Res Clin Pract., s1-s5, 1994.
3. G. Restori, Il diabete mellito. Fisiopatologia, clinica e terapia. Pag 1, Piccin, 1991, ISBN 978-88-299-0915-5.
4. Eknoyan G, Nagy J., A history of diabetes mellitus or how a disease of the kidneys evolved into a kidney disease., in Adv Chronic Kidney Dis., vol. 12, aprile 2005, pp. 223-229.
5. apps.who.int/iris/bitstream/10665/.../9789241565257_eng.pdf.
6. Varma R, Bressler NM, Doan QV, Gleeson M, Danese M, Bower JK, et al. Prevalence of and risk factors for diabetic macular edema in the United States. JAMA Ophthalmol. 2014;132(11):1334-40.
7. British Heart Foundation. Estimated prevalence of diabetes by country, 2003 and 2005, Europe. 2.
8. Amedeo Lucente. Edema Maculare Diabetico. Oftalmologia domani - N. 3 - Anno 2013.
9. The Royal College of Ophthalmologists' clinical guidelines for diabetic retinopathy: a summary. Eye (2013) 27, 285-287; doi:10.1038/eye.2012.287; published online 11 January 2013.
10. http://www.ch.unich.it/med/papers/medicina%20interna%20diabete/13_testo_macroangiopatia.pdf
11. www.slidetube.com.
12. Rosati P, Colombo R- Istologia - Edi-Ermes, 2001.
13. Gerrit R.G.: Arterial endothelial structure and permeability as it relates to susceptibility to atherogenesis in: Glagov S, Newmann WP III, Shaffer SA (Eds): Pathobiology of the human atherosclerotic plaque. Springer Verlag, New York 1990 pag. 13-45.
14. Tanganelli P, Bianciardi G, Resi L, Simoes C, Weber G: "La struttura dell'endotelio arterioso" in Giornale dell'Aterosclerosi, Vol.20 pag 65-71, 1995.
15. Jialal I, King G.L., Buchwald S., Kahan C.R., Crettaz M.: "Processing of insulin by bovine endothelial cells in culture : Internalization without degradation." Diabetes 33, 794-800, 1984. in Giornale dell'aterosclerosi Vol. 20 N°2, Maggio 1995.
16. Kumar, Contran, Robbin - Anatomia Patologica, 2° Ediz. Cap. 10, Edizioni Scientifiche Internazionali- Roma 1999.
17. A. Lucente. Edema Maculare Diabetico. Oftalmologia domani - N. 3 - Anno 2013.
18. P Tanganelli, G Bianciardi, L Resi, C Simoes, G Weber: Aspetti anatomico-strutturali e adattamenti morfopatologici dell'endotelio- Giornale dell'Aterosclerosi- Vol. 20 N°2, pagg. 187-201, Maggio 1995, Editrice UTET Perodici - Milano

REFERENCES

19. Vigili de Kreutzenberg S., Trevisan R., Avogaro A., Tiengo A.: "Complicanze acute e croniche del Diabete Mellito" in Trattato di Medicina Interna - Crepaldi G., Baritussio A., vol. 2 Anno 2005.
20. Casper G. Schalkwijk and Coen D. A. Stehouwer, Department of Internal Medicine, Academic Hospital Maastricht, Maastricht, The Netherlands, and Cardiovascular Research Institute Maastricht, University of Maastricht: "Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction", *Clinical Science* (2005) 109, 143-159 (Printed in Great Britain).
21. dspace.unict.it/.../RSSCST76M52I754F-Tesi%20definitiva%20%20Dott.ssa%20Cristin... di C Russo - 2012. TESI DI DOTTORATO DI RICERCA IN FISIOPATOLOGIA DELLA SENESCENZA XXIV CICLO. La microangiopatia diabetica nel paziente anziano.
22. Simone Caramel, Marco Marchionni and Sergio Stagnaro. The Glycocalyx Bedside Evaluation Plays A Central Role in Diagnosing Type 2 Diabetes Mellitus and in its Primary Prevention. *Treatment Strategies - Diabetes - Volume 6 Issue 1*.
23. Novotny HR, Alvis DL. A method of photographing fluorescence in circulating blood in the human retina. *Circulation*. 1961;24:82-86.
24. Williams GA, Scott IU, Haller JA, Maguire AM, Marcus D, McDonald HR. Single-field fundus photography for diabetic retinopathy screening: a report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology*. 2004;111:1055e1062.
25. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Grading diabetic retinopathy from stereoscopic color fundus photographs-an extension of the modified Airle House classification. ETDRS report no 10. *Ophthalmology*. 1991;98:786e806.
26. Schoenfeld ER, Greene JM, Wu SY, O'Leary E, Forte F, Leske MC. Recruiting participants for community-based research: the diabetic retinopathy awareness program. *Ann Epidemiol*. 2000;10:432e440. Schoenfeld ER, Greene JM, Wu SY, O'Leary E, Forte F, Leske MC.
27. Pomerantzeff O. Equator-plus camera. *Invest Ophthalmol*. 1975; 14:401e406.
28. Giovanni Staurenghi, Francesco Viola, Martin A. Mainster, Raymond D. Graham, Peter G. Harrington. Scanning Laser Ophthalmoscopy and Angiography With a Wide-Field Contact Lens System. *ARCH OPHTHALMOL/VOL 123, FEB 2005. WWW.ARCHOPHTHALMOL.COM*.
29. www.retcam.com.
30. <https://business-lounge.heidelbergengineering.com/it/en/products/spectralis/ultra-widefield-angiography-module>.
31. <http://www.optos.com/no/About-us/Contact-us/United-Kingdom/>
32. Price LD, Au S, Chong NV. Optomap ultrawide field imaging identifies additional retinal abnormalities in patients with diabetic retinopathy. *Clin Ophthalmol*. 2015;9:527e531.
33. Wessel MM, Aaker GD, Parlitsis G, Cho M, D'Amico DJ, Kiss S. Ultrawide-field angiography improves the detection and classification of diabetic retinopathy. *Retina*. 2012;32:785e791.
34. Talks SJ, Manjunath V, Steel DH, Peto T, Taylor R. New vessels detected on wide-field imaging compared to two-field and seven-field imaging: implications for diabetic retinopathy screening image analysis. *Br J Ophthalmol*. 2015;99:1606e1609.
35. Silva PS, Cavallerano JD, Haddad NM, et al. Peripheral lesions identified on ultrawide field imaging predict increased risk of diabetic retinopathy progression over 4 years. *Ophthalmology*. 2015;122:949e956.
36. Di G, Weihong Y, Xiao Z, Zhikun Y, Xuan Z, Yi Q, Fangtian D. A morphological study of the foveal avascular zone in patients with diabetes mellitus using optical coherence tomography angiography. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2016 May;254(5):873-9.
37. Takase N, Nozaki M, Kato A, Ozeki H, Yoshida M, Ogura Y. Enlargement of Foveal Avascular Zone in Diabetic Eyes Evaluted by En Face Optical Coherence Tomography Angiography. *Retina*. 2015; 35:2377-83.
38. De Carlo TE, Chin AT, Bonini Filho MA, Adhi M, Branchini L, Salz DA, et al. Detection of Microvascular Changes in Eyes of Patients with Diabetes but not Clinical Diabetic Retinopathy using Optical Coherence Tomography Angiography. *Retina*. 2015;35:2364-70.
39. Ishibazawa A, Nagaoka T, Yokota H, Takahashi A, Omae T, Song YS, et al. Characteristics of Retinal Neovascularization in Proliferative Diabetic Retinopathy Imaged by Optical Coherence Tomography Angiography. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57:6247-55.
40. SB Ploner, EM Moul, W Choi, NK Waheed, B Lee, EA Novais, ED Cole, B Potsaid, L Husvogt, J Schottenhamml, A Maier, PJ Rosenfeld, JS Duker, J Hornegger, JG Fujimoto. Toward Quantitative Optical Coherence Tomography Angiography: Visualizing Blood Flow Speeds in Ocular Pathology Using Variable Interscan Time Analysis. *Retina (Philadelphia, Pa.)* 2016 Sep 28;[Epub Ahead of Print].
41. Moshfeghi DM, Singh K. Barriers to Follow-Up and Strategies to Improve Adherence to Appointments for Care of Chronic Eye Diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015; 56: 4324-4331 [PMID: 26176869 DOI: 10.1167/iops.15-16444].
42. Hipwell AE, Sturt J, Lindenmeyer A, Stratton I, Gadsby R, O'Hare P, Scanlon PH. Attitudes, access and anguish: a qualitative interview study of staff and patients' experiences of diabetic retinopathy screening. *BMJ Open* 2014; 4: e005498 [PMID: 25510885 DOI: 10.1136/bmjopen-2014-005498].
43. Palmer JJ, Chinanayi F, Gilbert A, Pillay D, Fox S, Jaggernath J, Naidoo K, Graham R, Patel D, Blanchet K. Trends and implications for achieving VISION 2020 human resources for eye health targets in 16 countries of sub-Saharan Africa by the year 2020. *Hum Resour Health* 2014; 12: 45 [PMID: 25128287 DOI: 10.1186/1478-4491-12-45].
44. Rajalakshmi R, Arulmalar S, Usha M, Prathiba V, Kareemuddin KS, Anjana RM, Mohan V. Validation of Smartphone Based Retinal Photography for Diabetic Retinopathy Screening. *PLoS One* 2015; 10: e0138285 [PMID: 26401839 DOI: 10.1371/journal.pone.0138285]