

# BIOCHIMICA CLINICA BIOLOGIA MOLECOLARE CLINICA

## Lezione 1

Cattedra di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica

***Proff. G. Corso – C. Paolillo***

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale

Università degli studi di Foggia

Polo biomedico "Emanuele Altomare»

Palazzina 2b

# TESTI CONSIGLIATI

Slide delle lezioni

Materiale didattico fornito dal docente durante le lezioni

- 1) SPANDRIO L. : Biochimica Clinica, ed. Sorbona, 2000
- 2) CIACCIO M., LIPPI G.: Biochimica Clinica e Medicina di Laboratorio, ed. EdiSES 2018
- 3) FEDERICI G. et Altri: Medicina di Laboratorio, ed. McGraw-Hill, 2014
- 4) SPANDRIO L. : Principi e Tecniche di Chimica Clinica, ed. Piccin, 2001

# Biochimica Clinica

- Disciplina che si occupa dello studio della variazione di parametri biologici e biochimici in campioni biologici (principalmente, ma non solo i fluidi biologici).
- La variazione di parametri biologici, in termini di variazioni della concentrazione, o anche comparsa/scomparsa di alcuni parametri (metaboliti, proteine, etc) che forniscono informazioni che consentono di fare la diagnosi.
- Lo scopo è di ottenere informazioni relative ad eventuali patologie, condizioni metaboliche o caratteristiche biochimiche-genetiche, utili al management del paziente stesso

# Biochimica Clinica e Medicina di Laboratorio

- La biochimica clinica è parte fondamentale della medicina di laboratorio. Essa studia l'effetto della malattia o dei farmaci sui processi biochimici degli organi, dei tessuti e dei fluidi biologici.
- La medicina di laboratorio è la disciplina clinica che ricerca dati relativi alla natura ed entità delle alterazioni di struttura e di funzione, su campioni ottenuti da pazienti o su pazienti stessi, con mezzi chimici, fisici e biologici. Tali dati vengono elaborati in informazioni da utilizzare accanto a sintomi e segni clinici a scopo preventivo, diagnostico, terapeutico, di monitoraggio e riabilitativo
- Si tratta di un insieme di discipline (clinical chemistry, hematology, immunology, pathology, microbiology, genetic, pharmacology, toxicology and physiology) che si intrecciano con l'obiettivo di fornire informazioni sulla salute del paziente a 360°

# Applicazioni cliniche della biochimica

- Diagnosi di malattie su base biochimica (errori del metabolismo)
- Classificazione e caratterizzazione fisiopatologica di malattie (es. diabete)
- Fornire dati per analisi statistiche e/o epidemiologiche
- Ruolo nel controllo della posologia dei farmaci
- Monitoraggio di farmaci
- Rischio lavorativo e tossicologia

# Principali finalità della biochimica clinica

## Diagnostiche

Indagini richieste come ausilio o anche indirizzo alla formulazione diagnostica

- confermare o escludere un sospetto diagnostico
- per formulare una diagnosi

Le modalità e il numero di richieste potranno variare dai profili metabolici generali o profili ad ampio raggio a uno o pochi test mirati.

Aumentando il numero di indagini aumenta la probabilità statistica di ottenere risultati anormali

- Preferenzialmente profili concordati preliminarmente tra il clinico e lo specialista di laboratorio
- la richiesta di un pannello più esteso di test a volte permette di individuare alterazioni clinicamente silenti (indagini di secondo / terzo livello)

# Principali finalità della biochimica clinica

- **Screening**

- Sono indagini che vengono chieste in assenza di un segno o sospetto clinico definito Medicina Preventiva o Sociale:

- fenilchetonuria e ipotiroidismo, screening neonatale allargato
- epatite o AIDS su sangue donato che deve essere trasfuso
- ricerca di composti tossici per malattie professionali (Pb, organofosfati, Hg)
- ricerca di droghe (anfetamine, marijuana)

- **Prognostiche**

- Un singolo test, o gruppi di test, possono essere utilizzati per fornire informazioni prognostiche. Predire lo sviluppo di una patologia.
- livelli di transaminasi in corso di epatite
- livelli dell'antigene carcino-embrionale (CEA) in corso di carcinoma

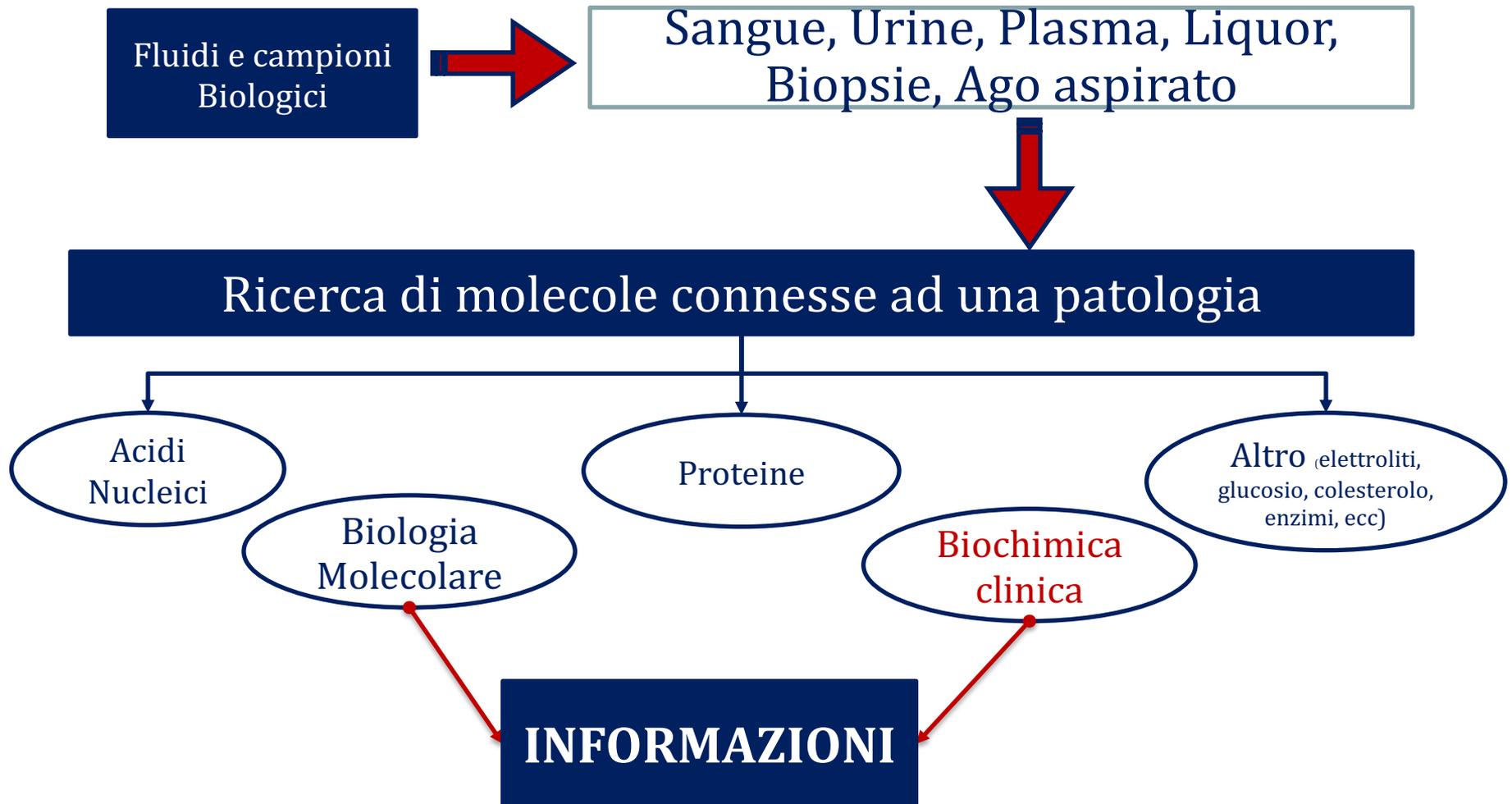
# Principali finalità della biochimica clinica

## **Follow up e monitoraggio terapeutico**

Un test può essere usato per monitorare il decorso di una malattia

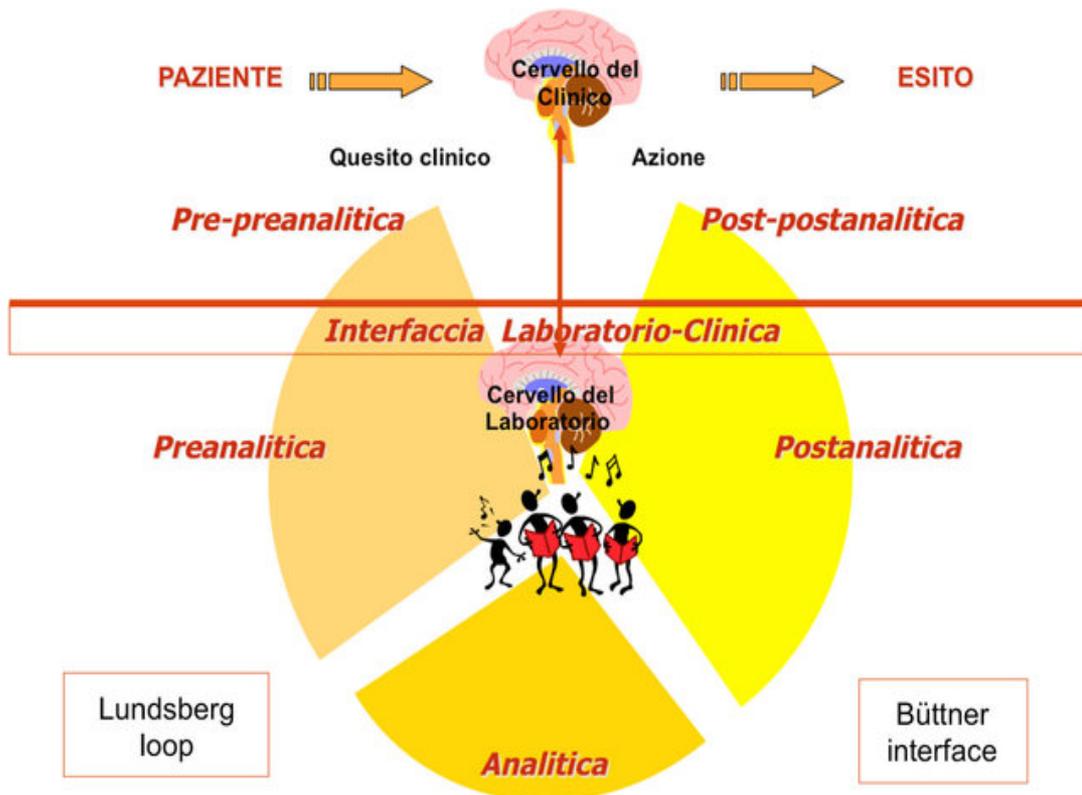
- tempo di protrombina per monitorare la terapia con anticoagulanti
- emocromo per valutare la tossicità di farmaci antitumorali o una carenza nutrizionale
- emoglobina glicata e fruttosammina per il monitoraggio del paziente diabetico
- monitoraggio terapeutico o del decorso di una malattia

# Biochimica Clinica all'interno della Medicina di Laboratorio



# Lo scambio di informazioni: Lundberg's loop

Il percorso di un esame di laboratorio dalla richiesta alla risposta e conseguente intervento medico è conosciuto con il termine americano di *Total Testing Process (TTP)*.



Questo schema proposto la prima volta negli anni 80' individua i passaggi concettuali e materiali necessari affinché il quesito clinico trovi risposta nel risultato dell'esame di laboratorio

# Il ciclo analitico

1. Raccolta ed etichetta
2. Accettazione e verifica campione (inserimento nel LIMS)
3. Preparazione del campione
4. Suddivisione
5. Analisi
6. Validazione Risultato
7. Eventuale ripetizione
8. Referto



# “Lundberg’s Loop ”

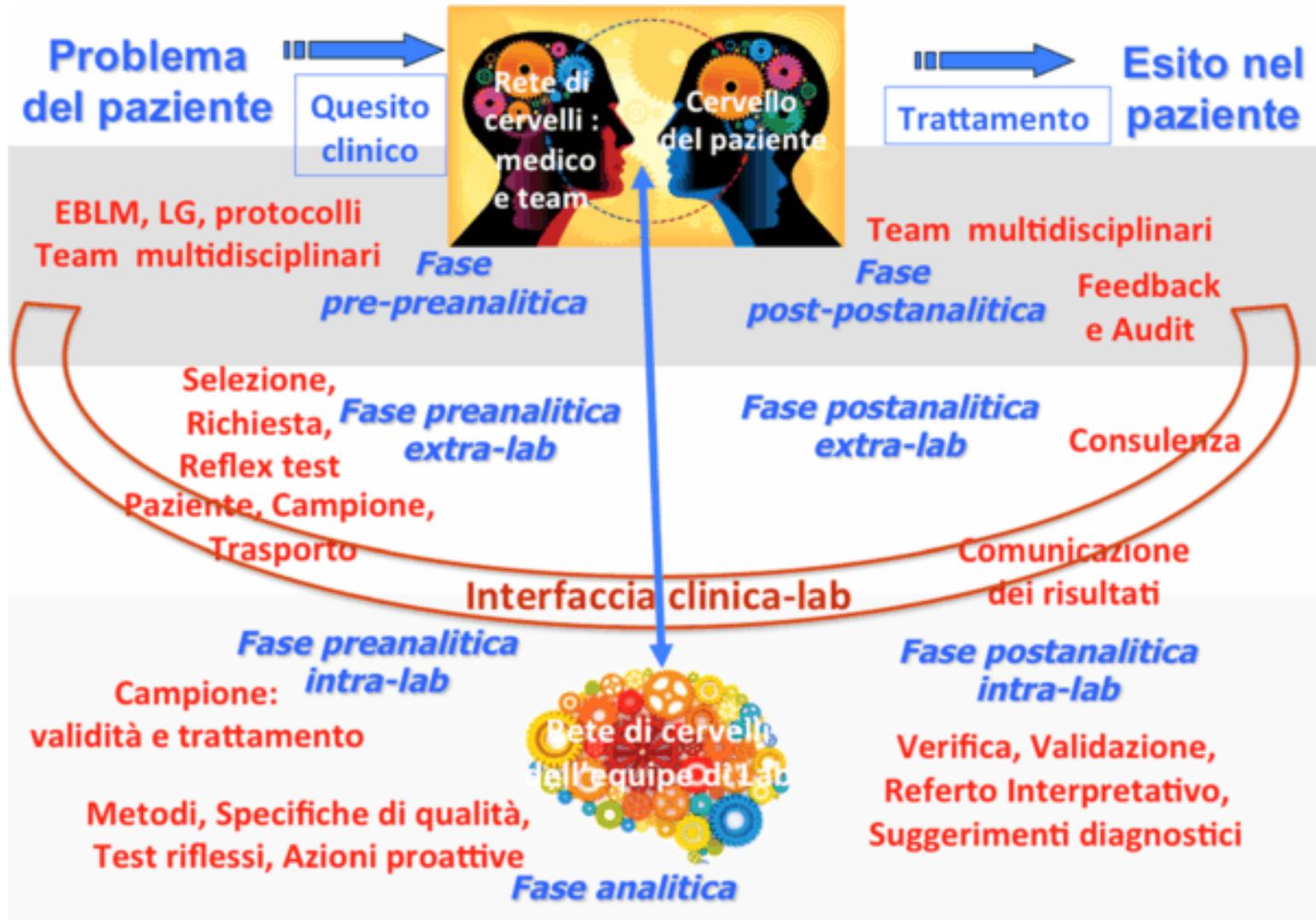
1. Quesito clinico/richiesta
2. Selezione test
3. Richiesta test
4. Raccolta campione
5. Indentificazione
6. Trasporto
7. Preparazione
8. Analisi
9. Tipologia di Risposta
10. Interpretazione
11. Azione/decisione clinica

Lo schema ha subito, nel tempo,  
numerose integrazioni e  
rivisitazioni fino a riconoscere il  
ruolo centrale del **PAZIENTE**

Il valore di un test viene misurato  
sulla base dell’impatto che ha sul  
paziente e il percorso  
assistenziale

**Nota:** Anche se il laboratorio non ha il controllo diretto di ciascuna fase, il LAB è responsabile dell'intero processo. Ogni errore viene considerato un **errore di laboratorio**

# “Reinterpretazione moderna del Lundberg’s Loop”



**Nota:** Anche se il laboratorio non ha il controllo diretto di ciascuna fase, il LAB è responsabile dell'intero processo. Ogni errore viene considerato un **errore di laboratorio**

# Medicina di laboratorio e Qualità

Qualità vuol dire che l'informazione prodotta è valida ed utile per il medico, è trasmessa in modo corretto ed opportuno (persona, luogo e tempo)

- Organizzazione generale (consolidamento, standardizzazione, integrazione)
- Organizzazione analitica (layout del laboratorio, strumentazioni e procedure)
- Organizzazione del personale (competenze, addestramento e aggiornamento)
- **Audit:** attività atte a misurare la conformità di determinati processi, strutture o procedure e a verificarne l'applicazione.

# Livelli del Sistema di Controllo di Qualità

1. Controllo di qualità (Quality Control): procedura da applicare ad ogni saggio per verificarne la validità delle prestazioni analitiche:
  1. Creazione e ricerca di qualità (scelta di strumentazioni, metodi e calibrazioni appropriate al test)
  2. Pratica di laboratorio di buona qualità (“Best practice”)
  3. Valutazione della qualità (analisi della performance del test)
  4. Miglioramento *continuo* della qualità
2. Garanzia di qualità (Quality Assurance): programma globale che assicura che include tutte le fasi procedurali
  1. Accredimento, certificazioni ed educazione continua del personale
3. Misura della qualità (Quality Assessment): programma interno ed esterno per valutare la qualità dei risultati

# Componenti della qualità globale

La qualità globale interviene quindi a 4 diversi livelli

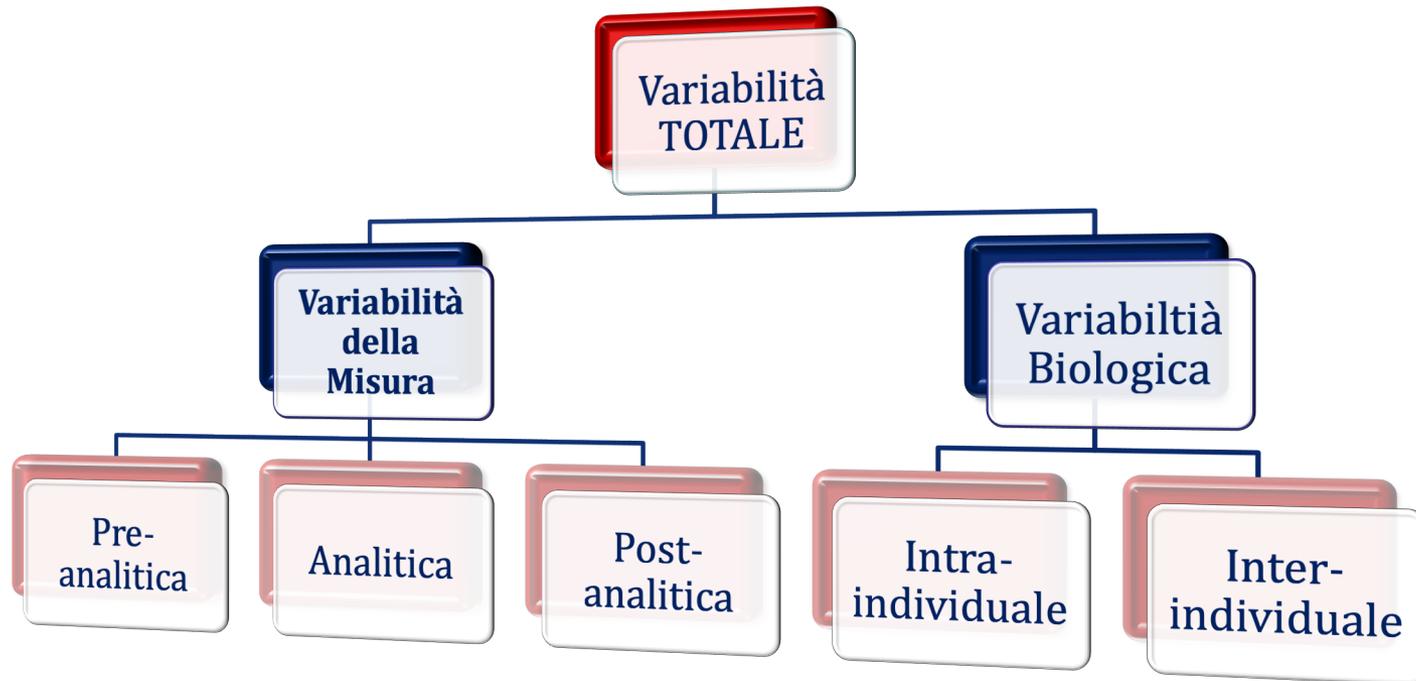
1. **Qualità tecnica del prodotto** (Analitica)
2. **Qualità del processo di comunicazione** interna ed esterna
3. **Qualità del contenuto scientifico** e della ricerca compiuta dal laboratorio
4. **Sistema di gestione della qualità**- sistema di miglioramento dei 3 punti precedenti

ACCREDIA dal 2010 è l'unico ente nazionale riconosciuto autorizzato a svolgere l'attività di accreditamento e certificazione di strutture e processi



# Variabilità e risultati di laboratorio

Il referto di laboratorio si esprime con un risultato che il clinico richiedente deve interpretare confrontandolo con i valori di riferimento (variabilità biologica).



Per catturare la variazione dei parametri biochimici bisogna isolare le variazioni correlate a una determinata patologia, da altre possibili variabili.

# Variabilità della Misura

Il dato finale che esce dal laboratorio può essere influenzato da numerosi fattori che possono essere mal controllabili o mal controllati.

Alcuni di questi sono legati al paziente, altri alla gestione dei campioni ed altri ancora ai metodi di analisi

- **variabilità pre-analitica**, paziente e gestione del campione
- **variabilità analitica**, metodo di analisi
- **variabilità post-analitica**, dati e risultati

# Variabilità Pre-analitica

Lo sviluppo tecnologico, sia in termini di strumentazione che di apparato informatico del laboratorio clinico, hanno reso più facile il lavoro del laboratorio, e minimizzato l'errore in fase analitica e post-analitica.

Si stima che il **93%** degli errori nel processo diagnostico siano attribuibili alla fase preanalitica (**campionamento**, trasporto e conservazione dei campioni)

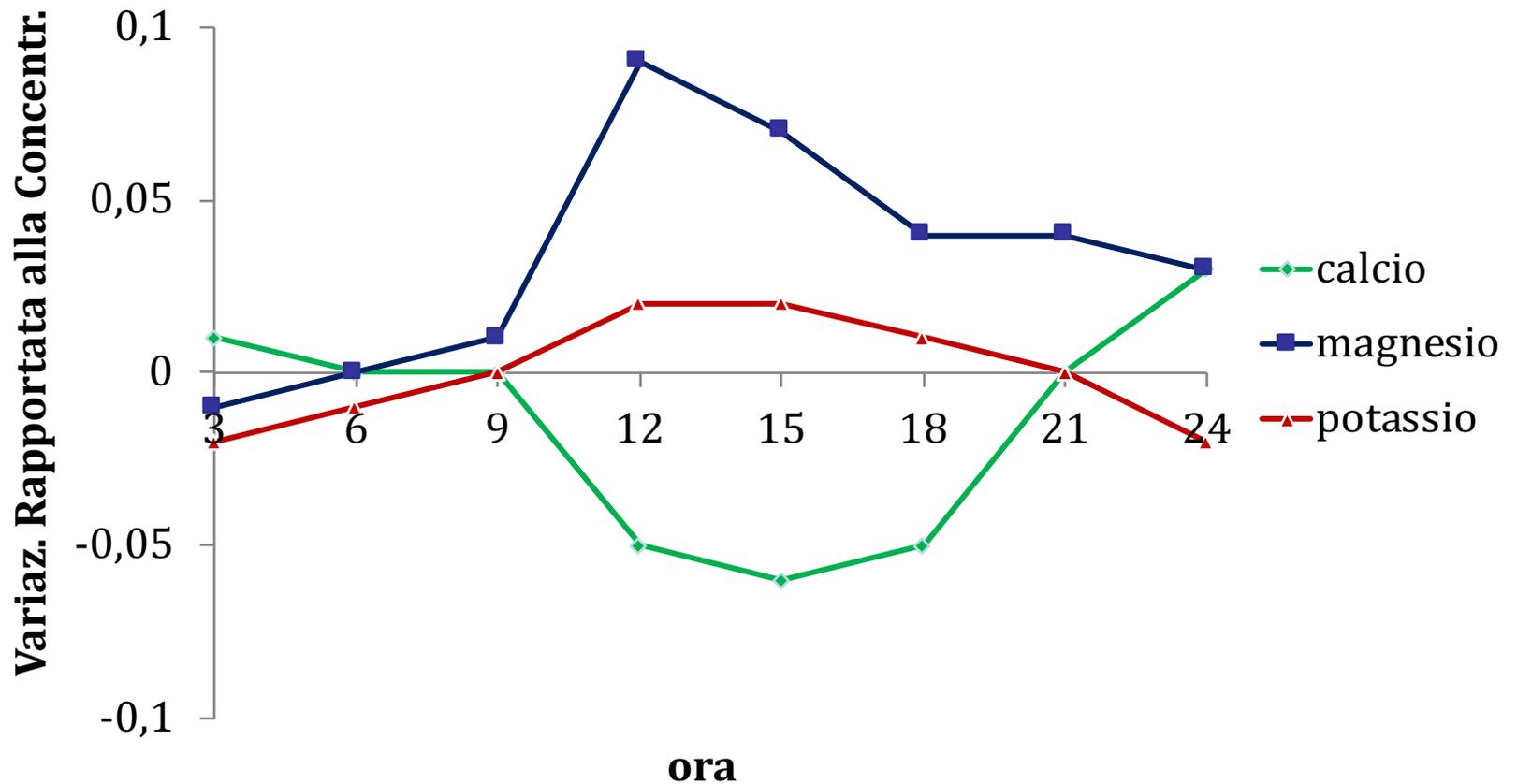
## **Principali cause di errore:**

1. Campione emolizzato (54%)
2. Campione insufficiente (21%)
3. Campione incorretto (13%)
4. Campione coagulato (5%)

# Errori e Variabilità Pre-Analitica

- Istruire il paziente
- Cibo: ultimo pasto non oltre le ore 22
- Bevande:
  - evitare di bere alcol (max un bicchiere di vino dopo il pasto)
  - non eccedere con l'assunzione di acqua
  - limitare il fumo
- Prelievo di sangue:
  - Consigliabile effettuarlo al mattino tra le ore 7 e le 10
  - Il paziente: deve essere in ortostatismo da almeno un'ora
  - Non deve camminare molto (max 500 m)
  - Deve stare seduto 10-15 minuti prima del prelievo
- Il campione deve essere inviato in laboratorio secondo modalità prestabilite
  - Identificazione dei contenitori
  - Trasporto in condizioni e tempi idonei
  - Moduli di richiesta completi di anagrafica, sospetto diagnostico, esami da eseguire
- Il laboratorio smista il campione ai settori di competenza in tempo reale per il trattamento e l'analisi dello stesso
- Monitoraggio e misura degli errori pre-analitici (n° di errori % sul totale dei campioni)

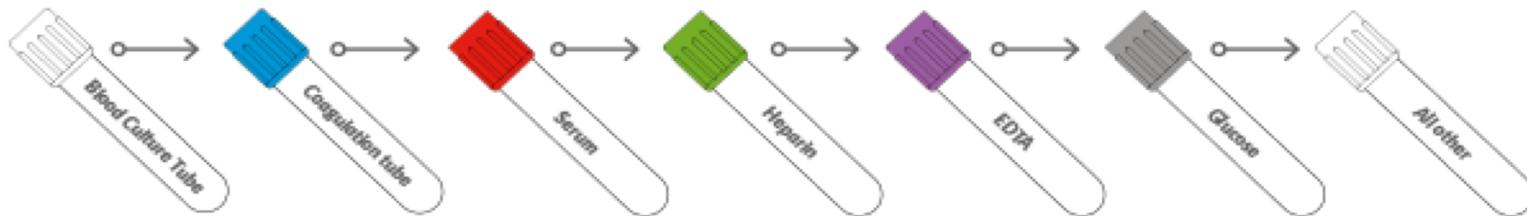
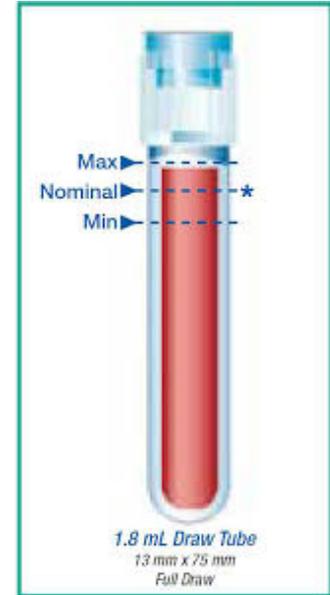
# Variazione giornaliera degli elettroliti



# Fonti di variabilità nella fase del prelievo

## Pre-analitica

- Applicazione prolungata del laccio
- Contaminazione da infusione venosa
- Non corretta preparazione del Paziente (cibo, stress, riposo, esercizio fisico, farmaci, postura, ...)
- Incompleto riempimento della provetta
- Uso di provette con anticoagulanti e conservanti non idonei
- Errata identificazione del Paziente o delle provette
- Mancata indicazione del tipo di prelievo (arterioso, ora del prelievo, ...)



# Effetto della postura

- Passaggio dalla posizione supina alla posizione **eretta** ha come conseguenza la fuoriuscita di acqua e componenti filtrabili dal compartimento vascolare a quello interstiziale;
- Componenti **non filtrabili**, (proteine, enzimi, calcio, il ferro legati alle proteine ecc.) divengono **più concentrati** nel plasma. Significative variazioni tra i **pazienti ambulatoriali** e quelli in **regime di degenza**

# Emolisi nella fase del prelievo

- 3-4% dei prelievi
- Alterazione della concentrazione degli analiti
- Cause:
  - Ago di calibro troppo piccolo (23-24 gauge)
  - Presenza di alcol sulla pelle nella zona del prelievo
  - Eccessiva forza di aspirazione in siringa
  - Mescolamento troppo violento del campione
  - Prelievo da zone emato-edematose

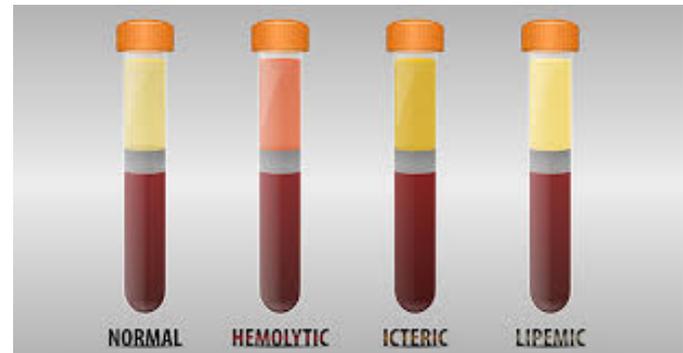
# Pre-analtica: Emolisi

Tabella 4.1 Livelli di concentrazione di alcuni analiti nei globuli rossi e nel plasma

Analiti	Globuli rossi	Plasma
Glucosio mg/dl	74,0	90,0
Azoto non proteico mg/dl	40,0	8,0
Acido urico mg/dl	2,5	4,6
Colesterolo totale mg/dl	139	194
Colesterolo esteri mg/dl	0	129
Na <sup>+</sup> mmol/l	16	140
K <sup>+</sup> mmol/l	100	4,4
Cl <sup>-</sup> mmol/l	52	104
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	19	26
LDH mU/ml	58.000	360
GOT (AST) mU/ml	500	25

# Emolisi biologica (*in vivo*)

- ✓ Anemie emolitiche
- ✓ fragilità corpuscolare
- ✓ difetti della normale morfologia eritrocitaria (sferocitosi)
- ✓ deficienze di enzimi eritrocitari (glucoso-6-fosfato deidrogenasi, piruvico chinasi)
- ✓ emoglobinopatie, anticorpi acquisiti in seguito a trasfusioni (emolisine),
- ✓ eritroblastosi fetale,
- ✓ anemie emolitiche autoimmuni;
- ✓ infezioni,
- ✓ assunzione di farmaci
- ✓ effetto di agenti fisici (ustioni, protesi intracardiache, ecc.)



# Emolisi *in vitro*

## Meccanica

Ago di piccolo calibro

aspirazione eccessiva durante il prelievo di sangue

pressione troppo elevata sullo stantuffo al momento dell'espulsione del sangue dalla siringa quando non si toglie l'ago

agitazione troppo vigorosa della provetta

## Chimica od osmotica

Disinfettanti, detergenti, H<sub>2</sub>O o altre sostanze chimiche sulla pelle al momento del prelievo,

Disinfettanti, detergenti, H<sub>2</sub>O o altre sostanze chimiche nell'ago della siringa o nei contenitori

## Fisica

Conservazione del campione in condizioni non idonee: il congelamento provoca la cristallizzazione dell'acqua endo-eritrocitaria con rottura delle membrane

# Pre-analtica: Emolisi

Lisi modesta → dosaggio emoglobina plasmatica 0.9 g/L

Lisi moderata → dosaggio emoglobina plasmatica 1.7 g/L

Lisi accentuata → dosaggio emoglobina plasmatica 3.4 g/L

**Un'emolisi modesta**, causa un aumento apparente, ma clinicamente significativo dei valori di ALT, LDH e K. Inoltre per diluizione diminuisce Na e Cl

**Un'emolisi accentuata**, determina l'aumento di molti analiti, K, Mg, P, Fe, Creatina Kinase, AST, ALT, LDH, Lipasi, creatinina, urea. Diminuisce invece, albumina, fosfatasi alcalina, Cl, Na, glucosio e GGT

# Emolisi: problematiche

- **Campioni con emolisi non identificabile.** Un'ispezione visiva difficilmente identifica un'emolisi modesta
- **Gestione dei risultati di campioni emolitici.**

. Quali sono le soluzioni che possono essere impiegate a tal proposito?

1. Refertazione dei dati con asterischi per indicare campione emolitico. Essendo il dato clinicamente e analiticamente inattendibile, è meglio non inserire per niente il dato nel referto.
2. Correzione del dato mediante formule. Soluzione molto discutibile.
3. Identificazione dei test maggiormente influenzati dall'emolisi, comunicazione al clinico del dato per escludere l'ipotesi di emolisi in vivo, non refertazione dei dati suscettibili di emolisi, e richiesta di un secondo campione. Miglior soluzione possibile.

# Emolisi: soluzioni

- Soglie per i valori emolitici
- Controllo automatico dell'idoneità dei campioni per analita
- Notifica al reparto non conformità dei campioni
- Soppressione di tutti i test influenzati

Sono state individuate tre classi di analiti considerando l'etiologia dell'interferenza:

1. Gruppo 1. Analiti con valori aumentati a causa di rilascio dell'elevata concentrazione eritrocitaria. K, LDH, AST, ALT, creatinina.
2. Gruppo 2. Analiti a bassa concentrazione che subiscono diluizione a causa della lisi eritrocitaria. Na, Cl, Albumina, glucosio.
3. Gruppo 3. Analiti che subiscono interferenza chimica o spettrofotometrica per la variazione della colorazione del siero. CK, ALP, bilirubina, GGT, Fe, Mg, P, urea, lipasi.

# Pre-analtica: Stasi Venosa

- Il laccio emostatico genera una pressione nella vena che provoca emo-concentrazione
- Emo-concentrazione dipende dalla lunghezza e dalla intensità della stasi
- Linee guida: non applicare il laccio emostatico o non protrarre la stasi.
- Per prelievi lunghi e/o difficoltosi, la stasi venosa può protrarsi ben oltre il limite consigliato (2 min) con sfavorevoli conseguenze sull'attendibilità del risultato di laboratorio.
- Il laccio emostatico non deve essere applicato troppo stretto.
- Se il laccio emostatico è applicato per tutta la durata del prelievo si può avere emolisi.

## **1 min. di stasi venosa**

Variazioni clinicamente significative di albumina, Ca e K.

Differenze statisticamente significative di ALT, albumina, Ca, Colesterolo, CK, Fe, K.

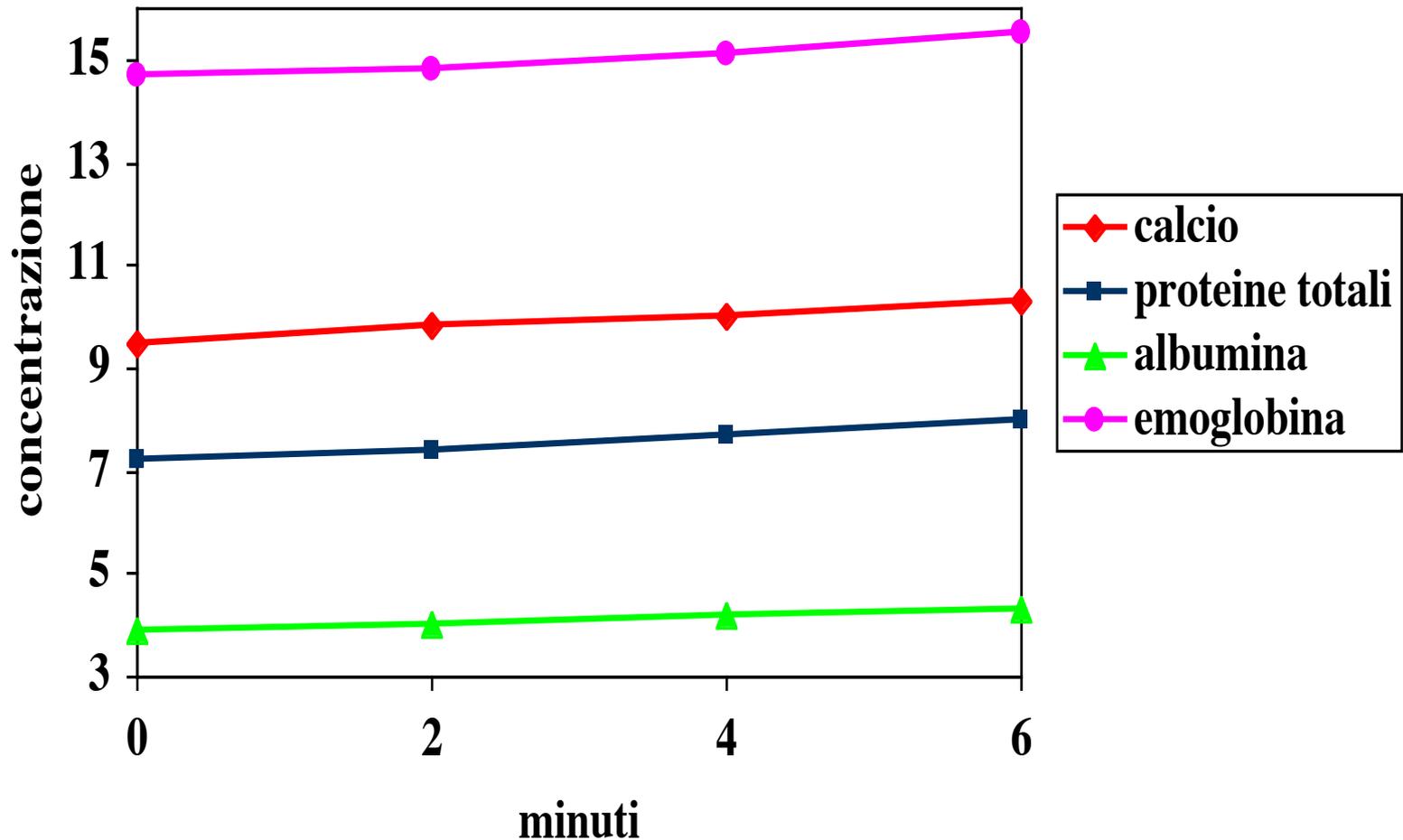
Variazioni accettabili dei parametri coagulativi.

## **3 min. di stasi venosa**

Variazioni clinicamente significative di ALT, albumina, Ca, Cl, Colesterolo, glucosio, K.

Differenze statisticamente significative di ALT, albumina, Ca, Cl, Colesterolo, CK, creatinina, glucosio, Fe, K. Variazioni clinicamente significative per Fibrinogeno

# Tempo della stasi venosa ed effetti sulla concentrazione plasmatica di alcuni analiti



# Effetto della postura

- Passaggio dalla posizione supina alla posizione **eretta** ha come conseguenza la fuoriuscita di acqua e componenti filtrabili dal compartimento vascolare a quello interstiziale;
- Componenti **non filtrabili**, (proteine, enzimi, calcio, il ferro legati alle proteine ecc.) divengono **più concentrati** nel plasma. Significative variazioni tra i **pazienti ambulatoriali** e quelli in **regime di degenza**

# Torbidità

- Percepibile quando la concentrazione dei **trigliceridi è > di 400 mg/dl**
- Interferenza di **natura spettrofotometrica**
  - assorbimento ottico aspecifico delle particelle in sospensione

# Pre-Analitica: Trasporto

- Il trasporto è il momento in cui il campione più frequentemente può trovarsi in condizioni ambientali non idonee o standardizzate
- Fattori da prendere in considerazione:
  - ✓ Esposizione ad energia meccanica (vibrazioni)
  - ✓ Esposizione alla luce (es bilirubina è fotosensibile)
  - ✓ Esposizione al calore (raffreddamento immediato dopo prelievo)
  - ✓ Esposizione all'aria (analisi del pH, emogas etc...)
  - ✓ Contaminazioni chimiche/microbiche (raramente sangue, spesso raccolta urine e feci)



# Pre-Analitica: Trasporto

- Consigliabile l'analisi entro 2 ore dalla raccolta del campione
- La stabilità è diversa per i singoli analiti.
  - Fattori della coagulazione → 5h
  - Esame emocromocitometrico → 7h
- La temperatura di conservazione è importante.
- A temperatura ambiente
  - Ormoni → una settimana
  - Na, acido urico e lipidi (colesterolo e TG) → 3 giorni
  - Glucosio → 4 h a 4-8 gradi C



Gli errori più diffusi sono dovuti a

- Tempi di consegna non rispettati
- Trasporto incongruo (Contenitori, conservazione a bassa temperatura)

# Trasporto, trattamento e distribuzione dei campioni

Fase della variazione	Meccanismi	Fattori	Rimedi
Raccolta del materiale	Contaminazione	<ul style="list-style-type: none"> <li>Provette</li> <li>Aghi</li> <li>Tappi</li> </ul>	Usare materiale controllato standardizzato
	Metabolismo	<ul style="list-style-type: none"> <li>Additivi</li> <li>Anticoagulanti</li> <li>Deproteinizzanti</li> </ul>	Aggiungere gli inibitori metabolici adatti e raffreddare a temperatura adeguata
Trasporto	Emolisi	<ul style="list-style-type: none"> <li>Vibrazioni</li> <li>Temperatura</li> </ul>	Evitare vibrazioni e congelamento
	Inattivazione	<ul style="list-style-type: none"> <li>Esposizione alla luce</li> <li>Temperatura</li> <li>Stabilizzanti</li> </ul>	Evitare riscaldamento ed esposizione alla luce. Aggiungere stabilizzanti
Separazione	Coagulazione	<ul style="list-style-type: none"> <li>Centrifugazione</li> <li>Tempo</li> <li>Temperatura</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Centrifugare 5-15 min. a 1000-1200 g</li> <li>Separare siero o plasma entro 1 h</li> <li>Evitare riscaldamento</li> </ul>
	Separazione	<ul style="list-style-type: none"> <li>Separatori</li> <li>Filtri</li> <li>Distributori di campioni</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Usare separatori controllati</li> <li>–</li> <li>Controllare l'identificazione dei campioni</li> </ul>
Distribuzione	Confusione	<ul style="list-style-type: none"> <li>Identificazione</li> <li>Volume</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Etichettare i sottocampioni</li> <li>–</li> </ul>
	Precipitazione o flottazione	<ul style="list-style-type: none"> <li>Solubilità</li> <li>Peso specifico</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mescolare il campione</li> <li>–</li> </ul>

# Pre-Analitica: conservazione dei campioni

## **Esempio**

Il Glucosio è metabolizzato dagli eritrociti, e quindi diminuisce con il tempo di permanenza a contatto con i globuli rossi.

La concentrazione del glucosio varia del 5% circa per ora a temperatura ambiente

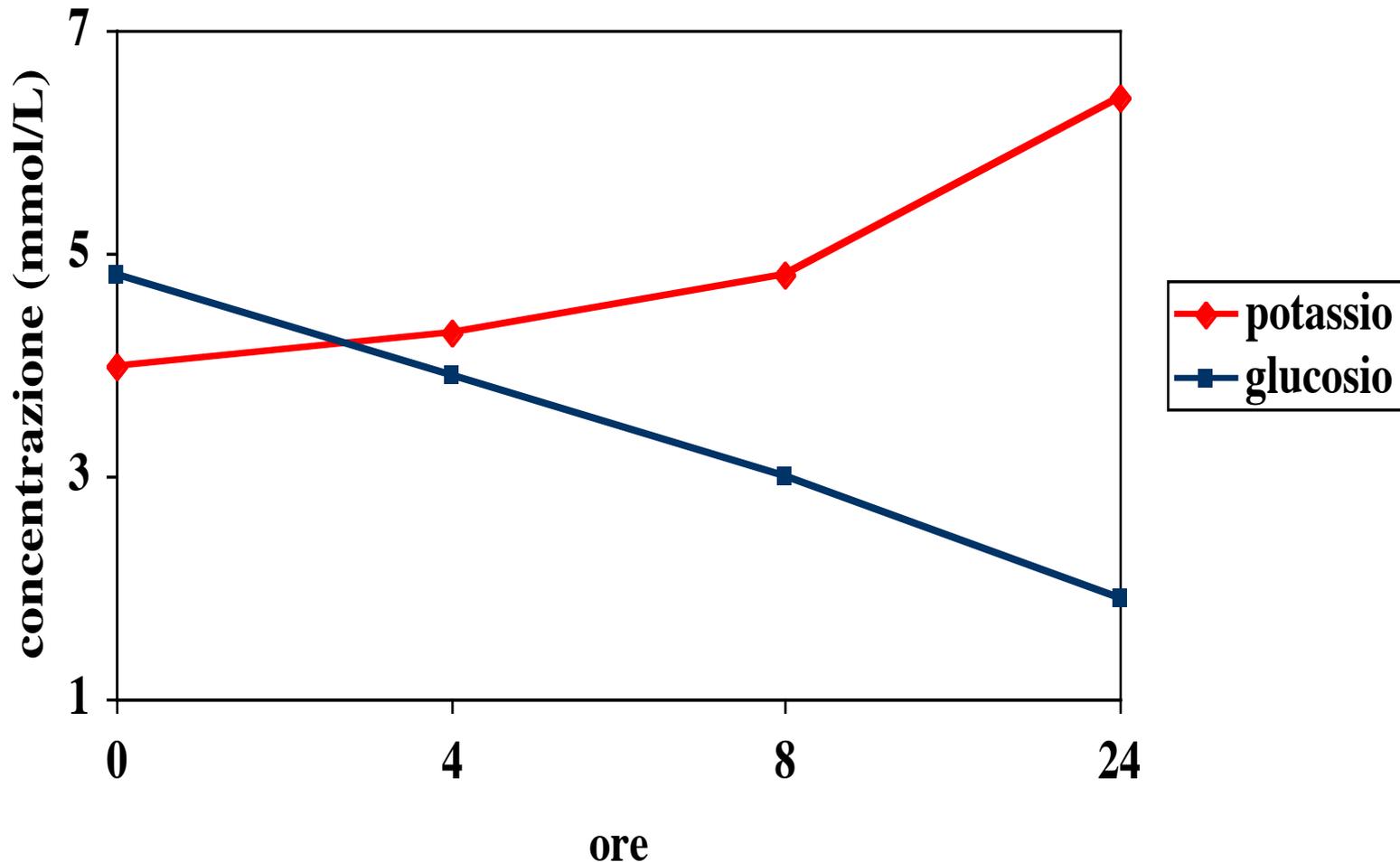
## Inibitori della glicolisi

- Il citrato inibisce la esochinasi (primo step della glicolisi)
- NaF la enolasi.

Le procedure di conservazione migliori per il Glucosio consistono nella immediata centrifugazione.

Dopo centrifugazione il glucosio è stabile per 8h a 24 gradi e 72h a 4 gradi.

# Effetti del tempo di separazione del sangue sulla concentrazione sierica di potassio e glucosio



# Conservazione e stabilizzazione dei campioni

Esempio per la preservazione di campioni di urine in relazione ai principali esami biochimici

Analita	Conservante o stabilizzante	Stabilità massima alle temperature indicate	
Sodio	4 °C o mertiolato <sup>1</sup> o acido borico <sup>2</sup> o timolo <sup>3</sup>	4 °C	7 giorni
Potassio	4 °C o mertiolato o acido borico o timolo	4 °C	7 giorni
Osmolalità	4 °C o mertiolato o timolo	4 °C	1 giorno
Urea	4 °C o mertiolato o acido borico o timolo	4 °C	2-3 giorni
Creatinina	4 °C o mertiolato o timolo	4 °C	2-3 giorni
Calcio	50 ml di HCl <sup>4</sup> 3 mol/l	4 °C	7 giorni
Fosfati	50 ml di HCl 3 mol/l	4 °C	7 giorni
Urati	15 ml da NaOH 2 mol/l	Temp. amb.	5 giorni
Proteine totali	4 °C o mertiolato o timolo	4 °C	2-3 giorni
Glucosio	4 °C o mertiolato o acido	4 °C	7 giorni
Cloruri	4 °C o mertiolato o acido borico o timolo	4 °C	7 giorni
Ossalati	50 ml HCl 3 mol/l	-20 °C	7 giorni
Acido 5-HIA	50 ml HCl 3 mol/l	-20 °C	7 giorni
Amilasi	4 °C o mertiolato o timolo	4 °C	7 giorni

<sup>1</sup> Sodio mertiolato: 150 mg per contenitore

<sup>2</sup> Acido borico: 27 g per contenitore.

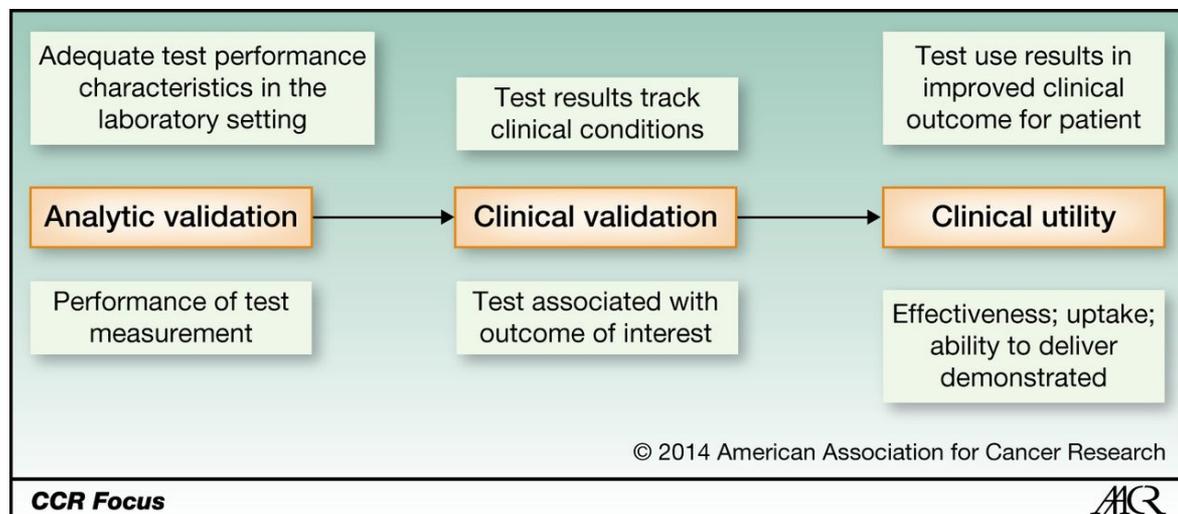
<sup>3</sup> Timolo: 1 cristallo per contenitore.

<sup>4</sup> HCl 3 mol/l: diluire l'acido cloridrico concentrato 1:4 con H<sub>2</sub>O.

# Variabilità analitica (Va)

- La misura di un analita non è altro che una stima di una grandezza (massa, concentrazione, conta....). Lo scostamento tra misura e valore reale è definito errore totale della misura
- La variabilità analitica è il risultato dell'errore totale della misura, legata quindi al metodo di analisi e all'insieme dei fattori che influenzano il metodo di misura di un analita
- Conoscere l'errore associato alla stima della misura è fondamentale per l'utilizzo di una metodica nella clinica

*Bisogna determinare le caratteristiche analitiche (Performance) di ciascun test di laboratorio per poterne valutare l'utilità clinica*



# Errori di Misura

Gli errori grossolani sono quelli che vengono commessi in seguito ad un'inappropriata applicazione del metodo analitico

Gli errori sistematici rappresentano la tendenza di un dato metodo a sovrastimare (o sottostimare) il vero valore .

Gli errori sistematici hanno cause ben determinate, inerenti o al metodo o alle condizioni di esecuzione del procedimento analitico (es:strumento non calibrato correttamente).

Gli errori casuali sommano tutte le piccole e imprevedibili variazioni nell'esecuzione delle varie operazioni analitiche.

Pertanto le misure fluttuano attorno a un valore medio  $\mu$ , che si scosta più o meno dal valore  $x_v$ , a seconda dell'entità dell'errore.

# Errore Totale e Attendibilità

Se si eseguono più misurazioni di una stessa quantità, raramente le misure coincidono: se ne trae la conclusione ovvia che i valori misurati sono in genere diversi dal vero valore della quantità oggetto di misura.

La differenza tra il valore misurato ( $x_m$ ) e quello vero ( $x_v$ ) è detta **errore totale**

**L'attendibilità** esprime la capacità della misura in esame di approssimare il valore vero ed è definita da diversi fattori: **Accuratezza, Precisione, Sensibilità e Specificità**

# Performance analitica

- **Accuratezza:** Concordanza tra  $x_m$  ed il  $x_v$ . Un metodo di analisi è tanto più accurato, quanto più si avvicina ai valori determinati mediante un metodo di riferimento.
- **Inaccuratezza o inesattezza (Bias):** Differenza percentuale tra  $x_m$  ed il  $x_v$ . E' dovuta alla presenza di un errore sistematico  
$$\text{Bias} = (x_m - x_v) / x_v * 100$$
- **Precisione:** Capacità di ottenere lo stesso valore su un campione analizzato ripetutamente (nel tempo, luogo e da diversi utenti)
- **Imprecisione:** Rappresenta la dispersione dei valori ripetuti rispetto al valore medio ( $\mu$ ). Riflette l'errore casuale.

Si misura come Coefficiente di Variazione percentuale

$$\text{CV}\% = (\text{deviazione standard (SD)} / \text{media } (\mu)) * 100$$

# Performance analitica

- **Precisione** Racchiude quelli di **ripetibilità** e **riproducibilità**.

La **ripetibilità** è la misura della deviazione dal valore medio dei risultati ottenuti da uno stesso operatore in un'unica serie analitica e senza cambiare reattivi o apparecchiature (precisione entro la serie).

La **riproducibilità** è la misura della deviazione dal valore medio dei risultati ottenuti in un arco variabile di tempo da operatori diversi che non conoscono l'identità del campione analizzato e che usano lotti di soluzioni e reagenti diversi

# Performance analitica

- **Sensibilità analitica:**
- Capacità di un metodo di valutare piccole variazioni della concentrazione dell'analita in modo attendibile (basso CV%)
- **Limite di rilevazione (LOD)**, minima quantità di analita misurabile dal metodo diversa da 0
- **Limite di quantificazione inferiore o superiore (LLOQ-ULOD)**, minima/massima misurazione di analita che può essere quantificata affidabilmente
- **Specificità analitica.** Capacità di un metodo di misurare unicamente l'analita d'interesse
- Altri parametri valutati sono:
  - **Robustezza**
  - **Interferenza**
  - **Intervallo analitico**
  - **Linearità**
  - **Range di misura**

# Tiro a segno: esempio di accuratezza ed imprecisione



POCO ACCURATO  
MA PRECISO

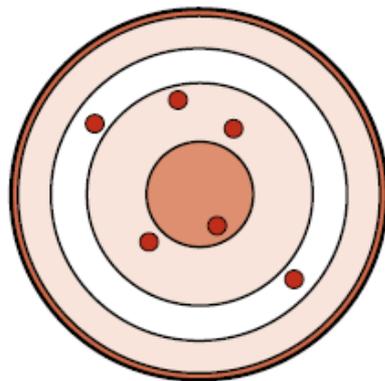


POCO PRECISO  
E POCO ACCURATO

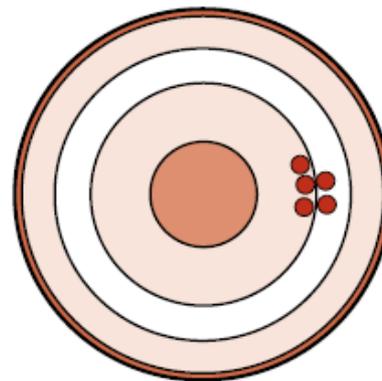


ACCURATO  
E PRECISO

Imprecision



Inaccuracy



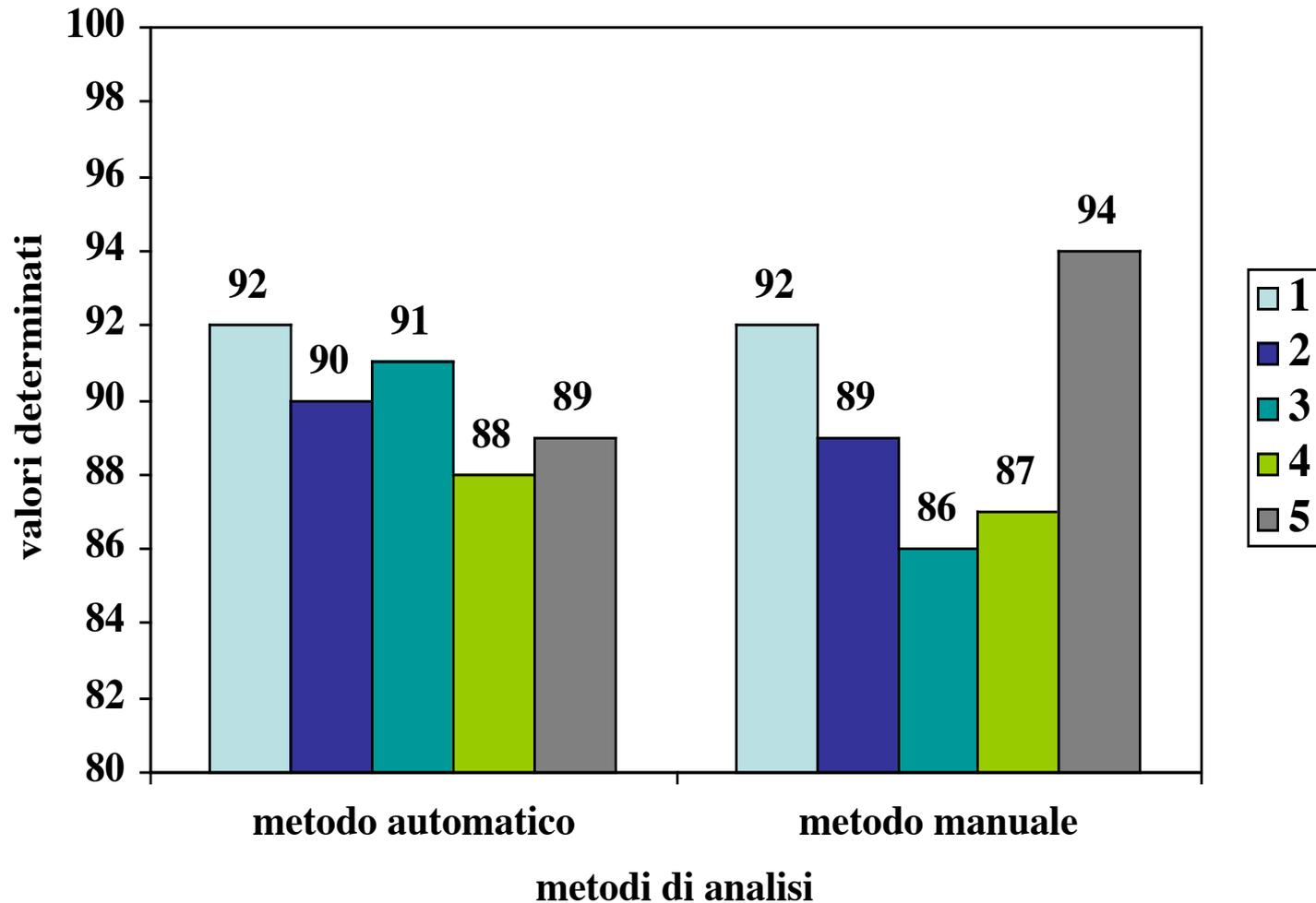
# Prevenzione degli errori

## Standardizzazione Analitica

- Impiego di metodi di analisi specifici e sensibili
- Utilizzo di strumentazioni efficienti ed aggiornate
- Determinazione della precisione ed accuratezza dei metodi impiegati
- Controllo di qualità analitico intra-laboratorio ed inter-laboratorio (VEQ)
- **Controllo interno di verifica delle procedure analitiche**
  - Sintetico artificiale oppure ottenuto da campioni reali precedentemente analizzati
- Misura degli errori analitici (coefficienti di variazione%, scostamento%)
- Analisi statistica degli errori
- Addestramento del personale tecnico e laureato
- Aggiornamento del personale tecnico e laureato (crediti ECM)
- Analisi e valutazione dei costi/benefici

# Standardizzazione Analitica

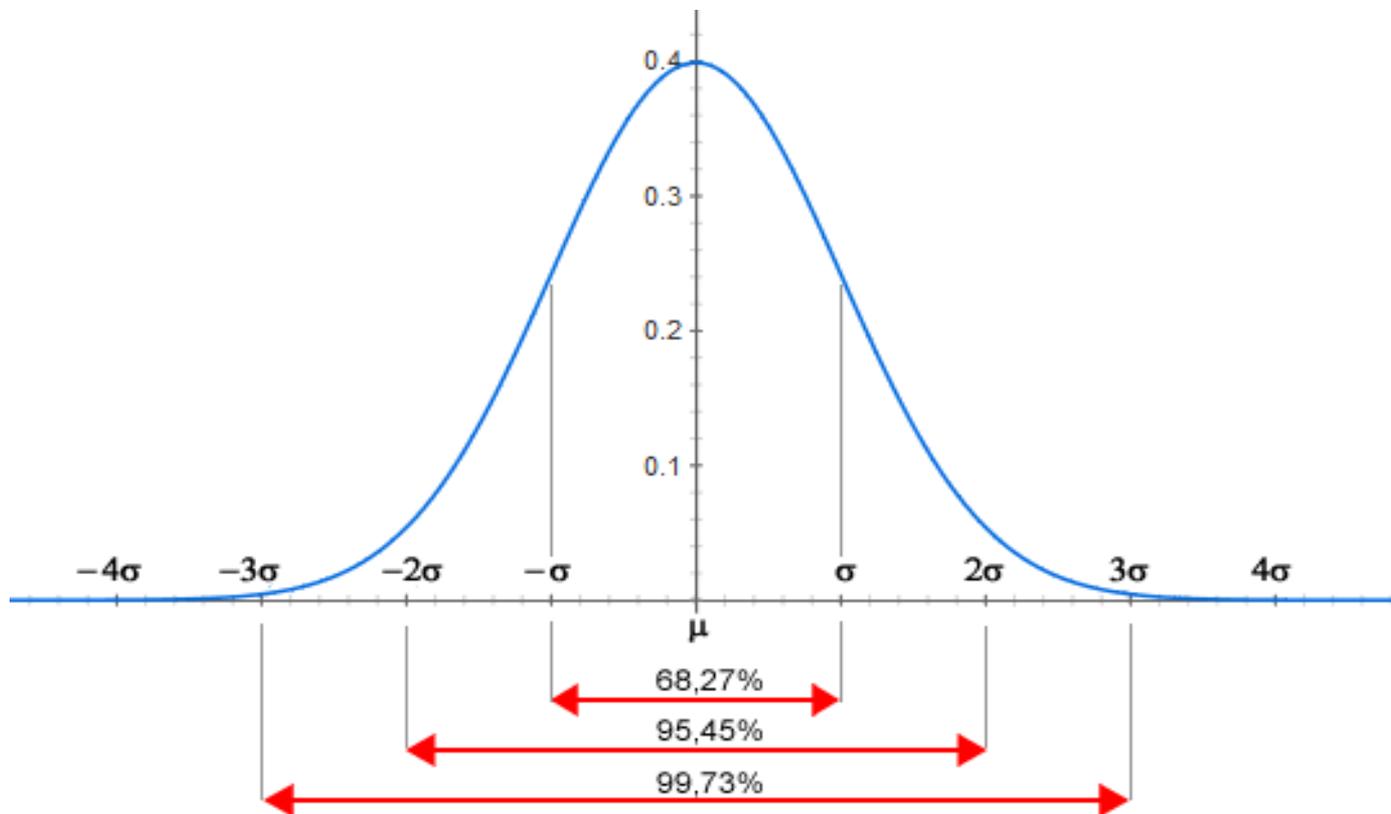
## valutazione della precisione



# Calcolo della precisione analitica CV%

Misurazione n°	Metodo Automatico	Metodo Manuale
1	92	92
2	90	89
3	91	86
4	88	87
5	89	94
Media $\mu$	90.0	89.6
SD	1.6	3.4
$CV\% = SD/\mu * 100$	1.8	3.8

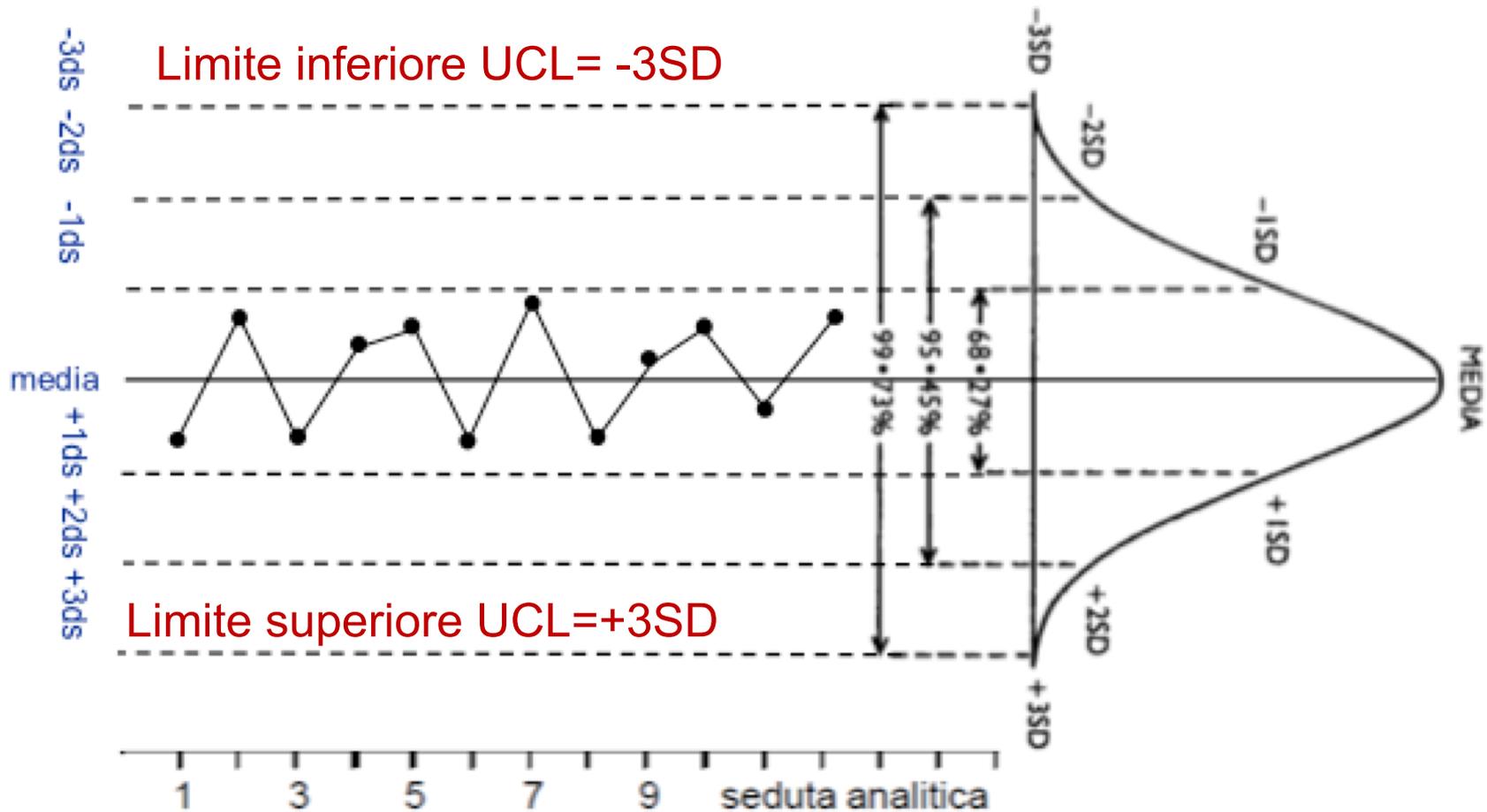
# Curva di Distribuzione Gaussiana e Qualità



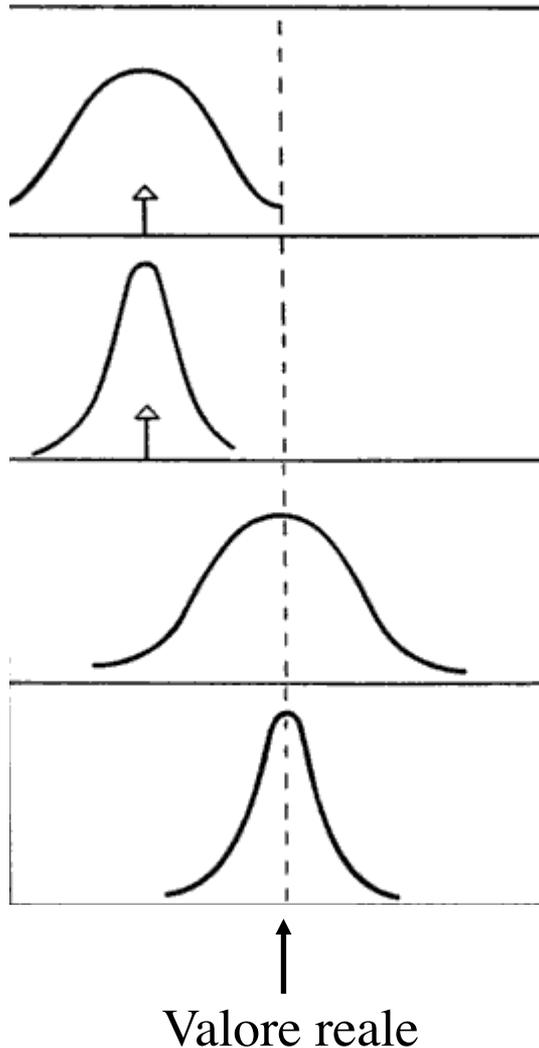
La distanza di ogni singolo punto dell'area dal centro viene detto Z score:

$$Z \text{ score} = \frac{X_m - \mu}{SD}$$

# Distribuzione Gaussiana e la Carta di Levey Jennings



# Rappresentazione gaussiana dei concetti di precisione ed accuratezza



1. Metodo impreciso e inaccurato

2. Metodo preciso ma inaccurato

3. Metodo impreciso ma accurato

4. Metodo preciso e accurato

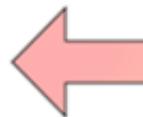
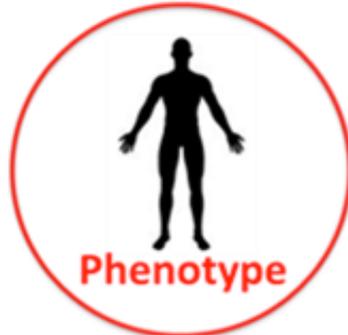
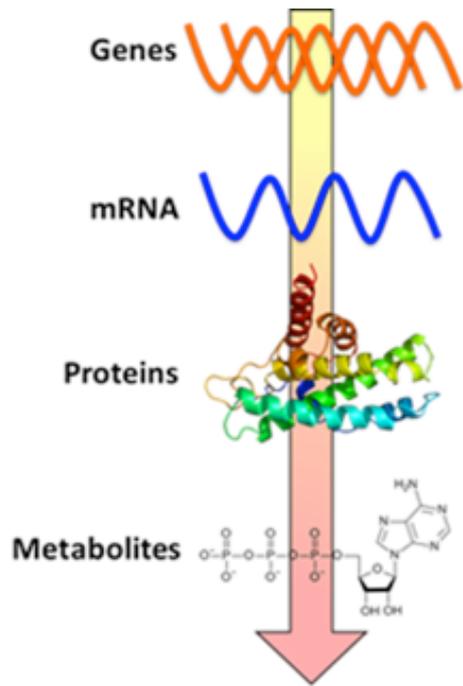
# Prevenzione degli errori

## Standardizzazione Post-Analitica

- Pianificazione ed organizzazione della refertazione
- Refertazione cartacea ed elettronica
- Modalità di invio dei referti
- Valutazione dei tempi di risposta (routine - urgenze)
- Misura degli errori post-analitici (n° di errori % sul totale dei campioni)
- Determinazione dei valori di riferimento (valori di “normalità”)
  - Valori di riferimento relativi all'età, sesso, clinostatismo, ortostatismo, ora del prelievo, etc
- Determinazione della variabilità biologica (intra- ed interindividuale)
- Attendibilità diagnostica dei test di laboratorio

# Variabilità Biologica

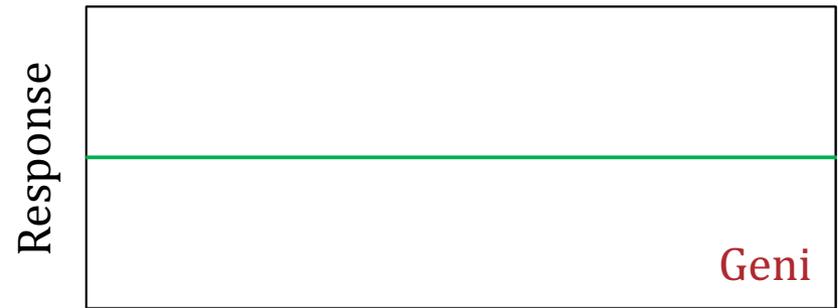
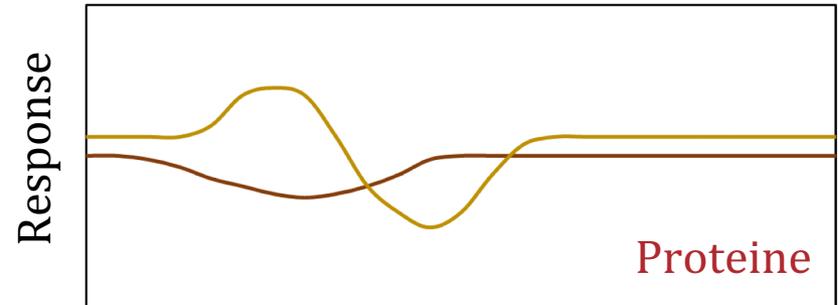
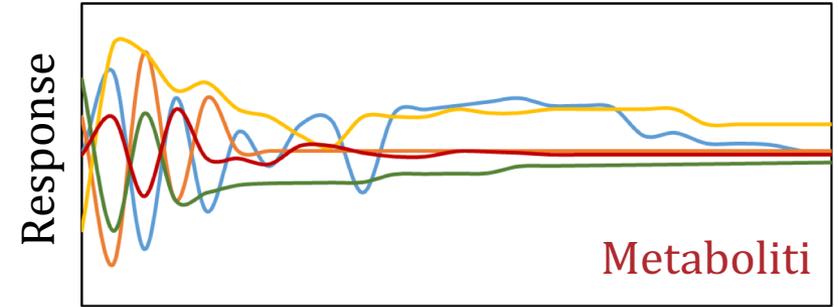
L'insieme delle caratteristiche morfologiche, biochimiche e funzionali di un organismo



**Lifestyle**  
**Diet**  
**Age**

**Drugs**  
**Environment**  
**Microbiome**

# Variabilità Biologica



Time

# Variabilità Biologica

- La variabilità biologica è influenzata da diverse componenti:
  - Individuali (età, sesso, ecc..)
  - Etniche
  - Ambientali
  - Fisiologiche (ritmi veglia-sonno, ...)
  - Patologiche
  - Farmaci e droghe
  - Alimentazione
  - Attività fisica

*I parametri ematochimici variano fisiologicamente in ciascun individuo in funzione del complesso sistema di equilibrio metabolico*

- La capacità di determinare il peso relativo di ciascuna di queste componenti costituisce un prerequisito fondamentale per l'interpretazione del dato di laboratorio (risultato)
- Possiamo distinguere:
  - Variabilità intra-individuale: variazioni nel tempo o longitudinali
  - Variabilità inter-individuale: variazioni trasversali tra diversi soggetti

# Variabilità Biologica

## Variabilità biologica inter-individuale

- Sesso
- Età
- Razza
- Massa corporea
- Fumo
- Alcool
- Farmaci

## Variabilità biologica intra-individuale

- Ritmi circadiani
- Variazioni stagionali
- Dieta
- Periodo mestruale
- Gravidanza

La prima osservazione da fare è come le variazioni fisiologiche condizionano questi valori di riferimento

# Variabilità Biologica: l'età

Ad esempio, i valori di riferimento devono essere costruiti per età nell'**anziano** alcuni parametri biochimici

## Aumento

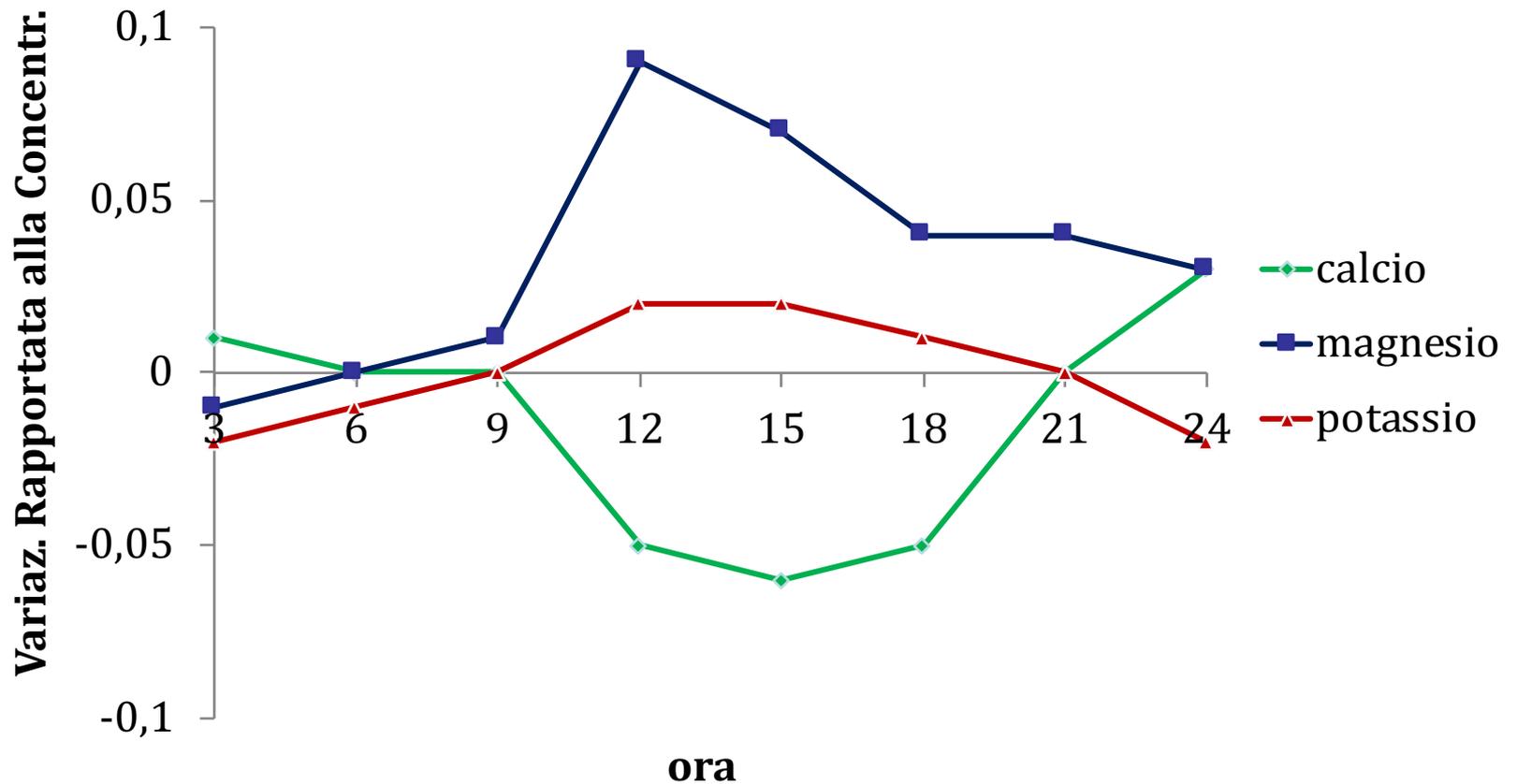
- Ca
- Glucosio
- Insulina
- LH
- FSH
- TSH
- Trigliceridi
- Urea
- LDL
- HDL

## Diminuizione

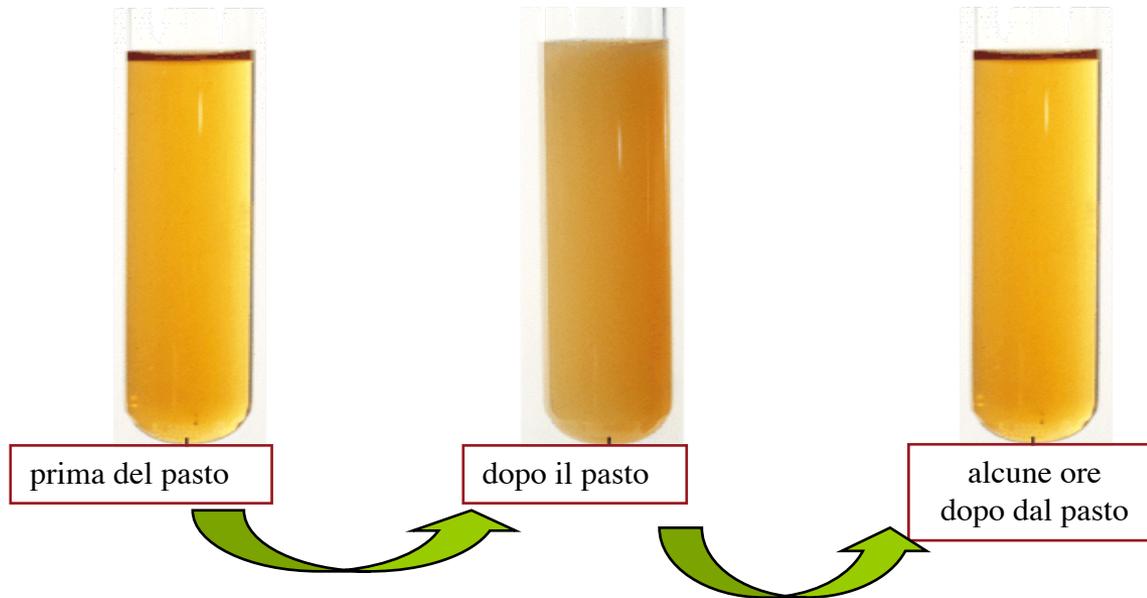
- Testosterone
- Estradiolo
- Triiodiotiroxina
- Tiroxina
- Fe
- Emoglobina
- Leucociti
- Piastrine

- Nei **neonati** si hanno livelli insolitamente alti di emoglobina nella prima settimana di vita, e anche di bilirubina, mentre l'acido urico mostra una diminuzione notevole nella prima settimana.
- Un continuo aumento del colesterolo è registrato tra i **15 e i 50 anni**.

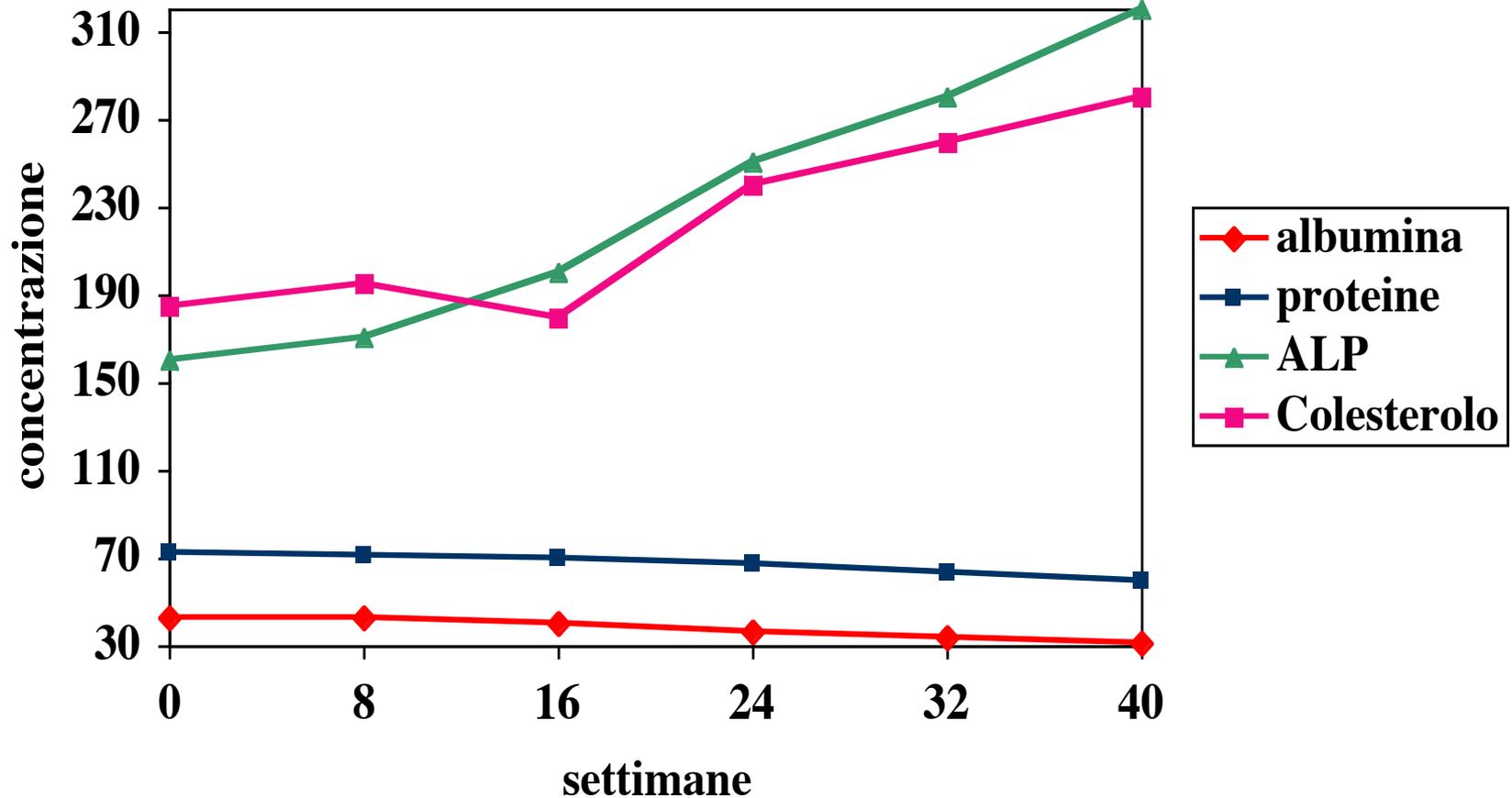
# Variazione giornaliera degli elettroliti



# Digiuno?



# Variazioni in gravidanza di alcuni costituenti del siero



# L'esercizio muscolare

Se intenso e su individui non allenati, causa modificazioni della concentrazione di molti parametri di laboratorio. Questi effetti possono essere

## Transitori

rapida diminuzione, e seguente aumento, nella concentrazione degli **acidi grassi liberi**

marcato aumento **dell'alanina e dell'acido lattico** (triplicato).

## Duraturi

variazioni a carico degli enzimi plasmatici: **CK, aldolasi, LDH, transaminasi**; l'attività della CK può risultare raddoppiata nelle 12-30 ore dopo attività sportiva intensa e ancora dopo 50 ore si può riscontrare un aumento fino al 40%.

# Calcolo della Variabilità biologica (VB)

- La VB può essere collocata nella fase pre-analitica del processo diagnostico
- **VB interindividuale:**
  - Calcolo teorico approssimato (ricomprensce anche l' errore analitico):
    - Intervallo di riferimento/4 = SD
    - $(SD/\text{valore medio dei valori di riferimento}) * 100 = C_{VBinter}$
    - Es: Cloro:  $(108-98)/4 = 2,5$
    - $C_{VBinter} = 2,5/103 * 100 = 2,4\%$
- **VB intraindividuale:**
  - Calcolo sperimentale
  - Si effettuano almeno 3 prelievi al soggetto in esame in giorni diversi
  - Si conservano i campioni fino al momento della determinazione
  - Sui valori ottenuti si calcola: media, Deviazione Standard e CV%
  - Il CV% ottenuto rappresenta la  $C_{VBintra}$

# I VALORI DI RIFERIMENTO

Il dato di laboratorio serve per poter decidere un comportamento verso un paziente. Bisogna quindi avere il mezzo per confrontare il dato ottenuto con quello della popolazione da cui il paziente stesso è tratto.

Si dovranno stabilire dei valori al di fuori dei quali si presume vi sia un'anormalità con un limite di errore accettabile.

Occorre osservare che il termine "normale" ha diversi significati:

- in senso statistico definisce un tipo di distribuzione;
- in senso epidemiologico può essere confuso con il valore tipico di una popolazione;
- in senso clinico la parola normale spesso indica l'assenza di una certa malattia.

Si preferisce quindi parlare di "VALORI DI RIFERIMENTO".

# Valori di Riferimento Normale

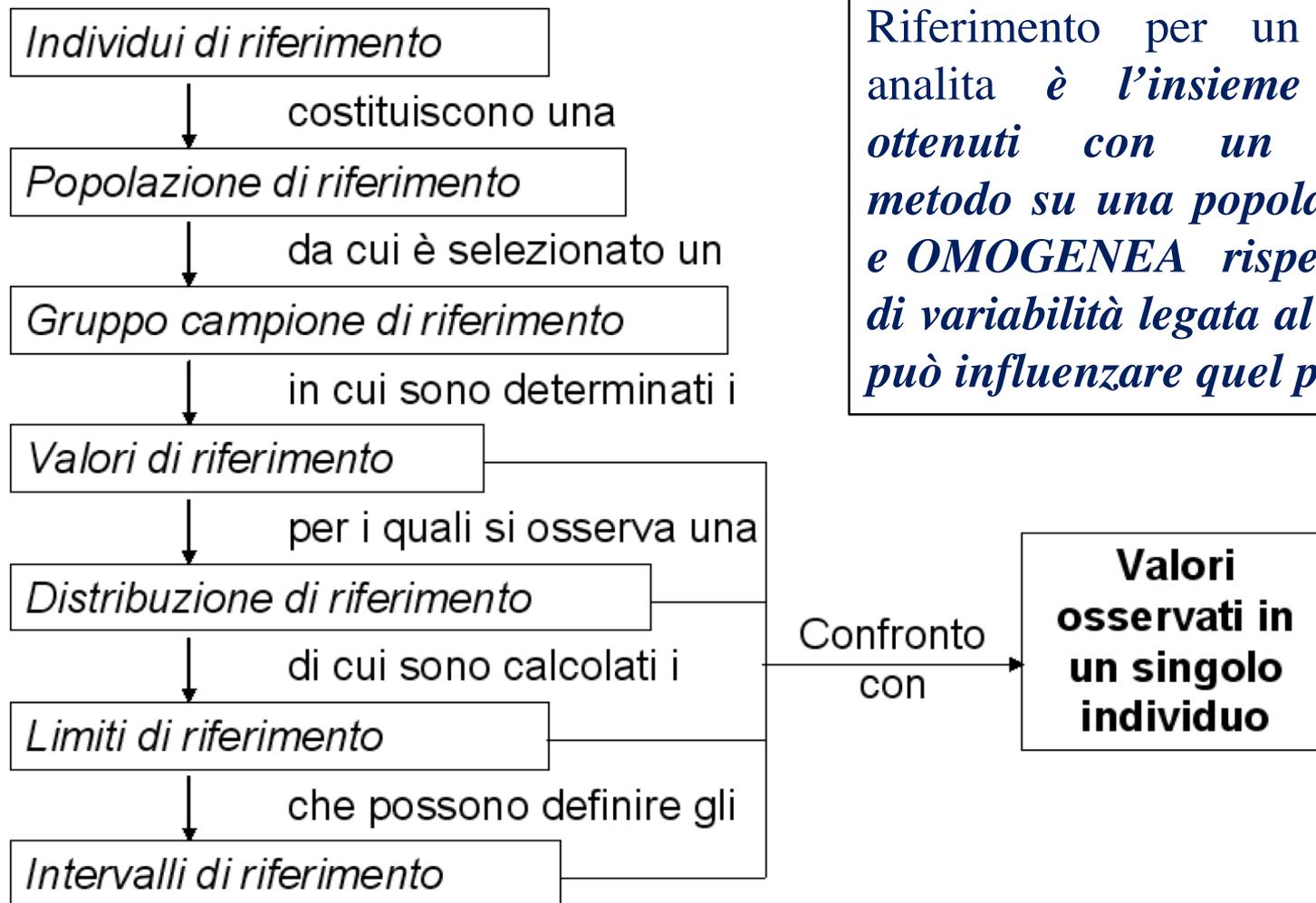
*Il livello di riferimento normale* è unicamente un'indicazione statistica, generica e variabile, che dice poco sul reale stato di salute del soggetto ed ancora meno sulla eventuale presenza di malattia in termini di:

- diagnosi precoce,
- Gravità
- stadiazione/diffusione,
- complicanze,
- efficacia terapeutica e prognosi

Da non confondere quindi con :

- intervalli di malattia,
- limiti decisionali,
- valori critici,
- algoritmi diagnostici,
- Odd ratio,
- delta check,
- trend,
- calcolatori di rischio,
- analisi multivariate

# Intervalli di Riferimento



L'intervallo dei Valori di Riferimento per un determinato analita è *l'insieme dei valori ottenuti con un determinato metodo su una popolazione SANA e OMOGENEA rispetto al fattore di variabilità legata al paziente che può influenzare quel parametro.*

# Criteria di selezione dei soggetti di riferimento

- **Partizione a priori**

- Età
- Sesso
- Fattori genetici: razza, gruppo sanguigno, HLA
- Fattori fisiopatologici: ciclo mestruale, gravidanza, condizioni fisiche
- Altro: socioeconomici, ambientali, crono-biologici

- **Criteri di esclusione**

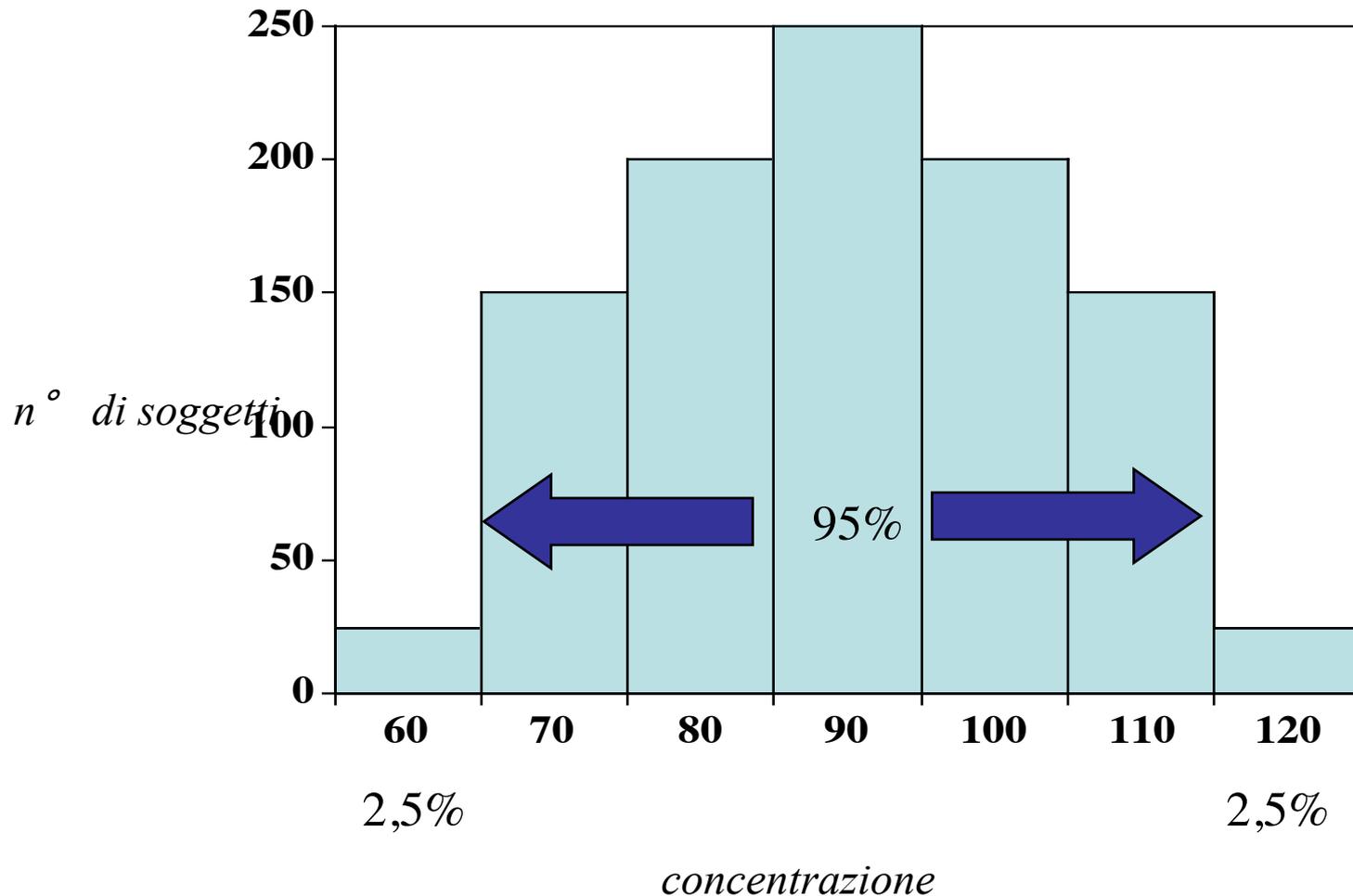
- Malattie
- Fattori di rischio: obesità, ipertensione, genetici, lavorativi
- Condizioni fisiologiche: stress, super-attività
- Farmaci, droghe, alcol, contraccettivi.....

# Intervalli di Riferimento

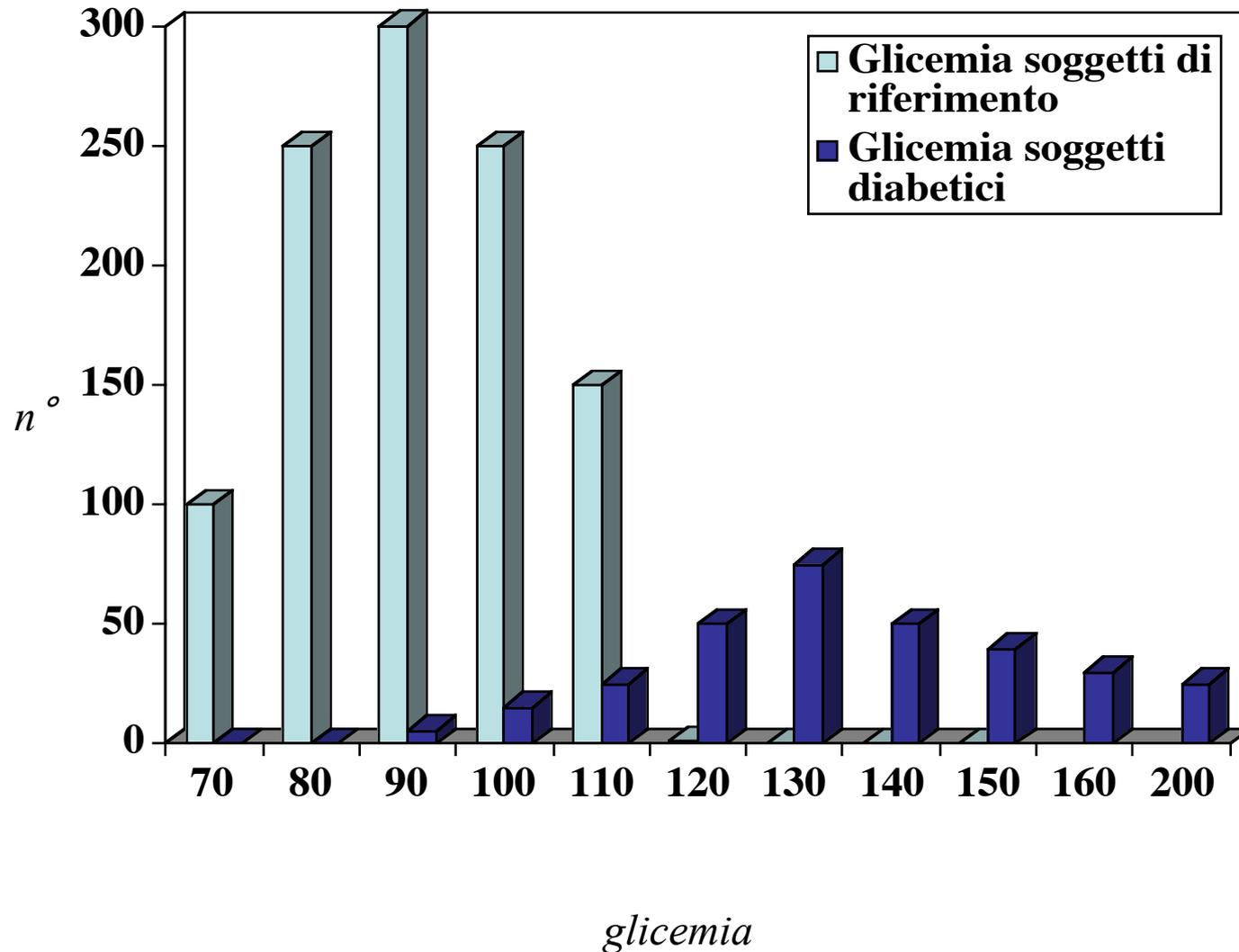
- Se la distribuzione è statisticamente normale, i valori di riferimento vengono arbitrariamente fissati come pari alla media  $\pm 1.96$  SD. Vi si include così circa il 95% della popolazione sana e si escludono le due code della curva (2.5%)
- Se la distribuzione non è statisticamente normale (cioè non è descrivibile con una gaussiana) bisogna utilizzare un approccio non parametrico:
  - Per distribuzioni log-normali si utilizza la mediana come misura di tendenza centrale e i percentili (2.5-97.5%) per definire i limiti di riferimento

# Intervalli di Riferimento

Per una popolazione di valori normo-distribuita il calcolo si esegue sommando e sottraendo alla media 1.96 Dev. Standard



# Intervalli di Riferimento



# Variabilità Totale intraindividuale ( $VT_i$ ) e differenza critica

- La  **$VT_i$**  si ricava dalla somma della variabilità analitica + la variabilità biologica:

$$CV_{Ti}\% = \sqrt{(CV_a)^2 + (CV_{B\text{intra}})^2}$$

- La *variabilità analitica* deve essere sempre inferiore a quella *biologica*

- Rapporto ottimale:  **$CV_a < 1/2 CV_{B\text{intra}}$**

- **Differenza critica  $\geq 2,77 * CV_{Ti}$**  dell'analita

- Ci permette di calcolare se due risultati sono statisticamente differenti in seguito alla terapia

- Es:  $CV_{Ti}$  del colesterolo =  $\sqrt{(3\%)^2 + (8\%)^2} = 8,5\%$

- $DC = 2,77 * 8,5 = 24\%$

- 1° Valore: 310 - 2° Valore: 260 =  $50/310 * 100 = 16\%$

- $2,77 * 8,5\% = 23,54\%$

- La riduzione del 16% non è significativa

# Attendibilità diagnostica dei tests di laboratorio

- Prima di utilizzare un qualsiasi test di laboratorio è necessario valutare la sua capacità di diagnosticare in modo corretto
- Il processo di valutazione consiste nel saggiare il test su campioni di pazienti malati (VP) e non malati (VN), in modo da ottenere 4 possibili risultati:
  - **Vero Positivo: test positivo in presenza di malattia**
  - Vero Negativo: test negativo in assenza di malattia
  - Falso Positivo: test positivo in assenza di malattia
  - **Falso Negativo: test negativo in presenza di malattia**

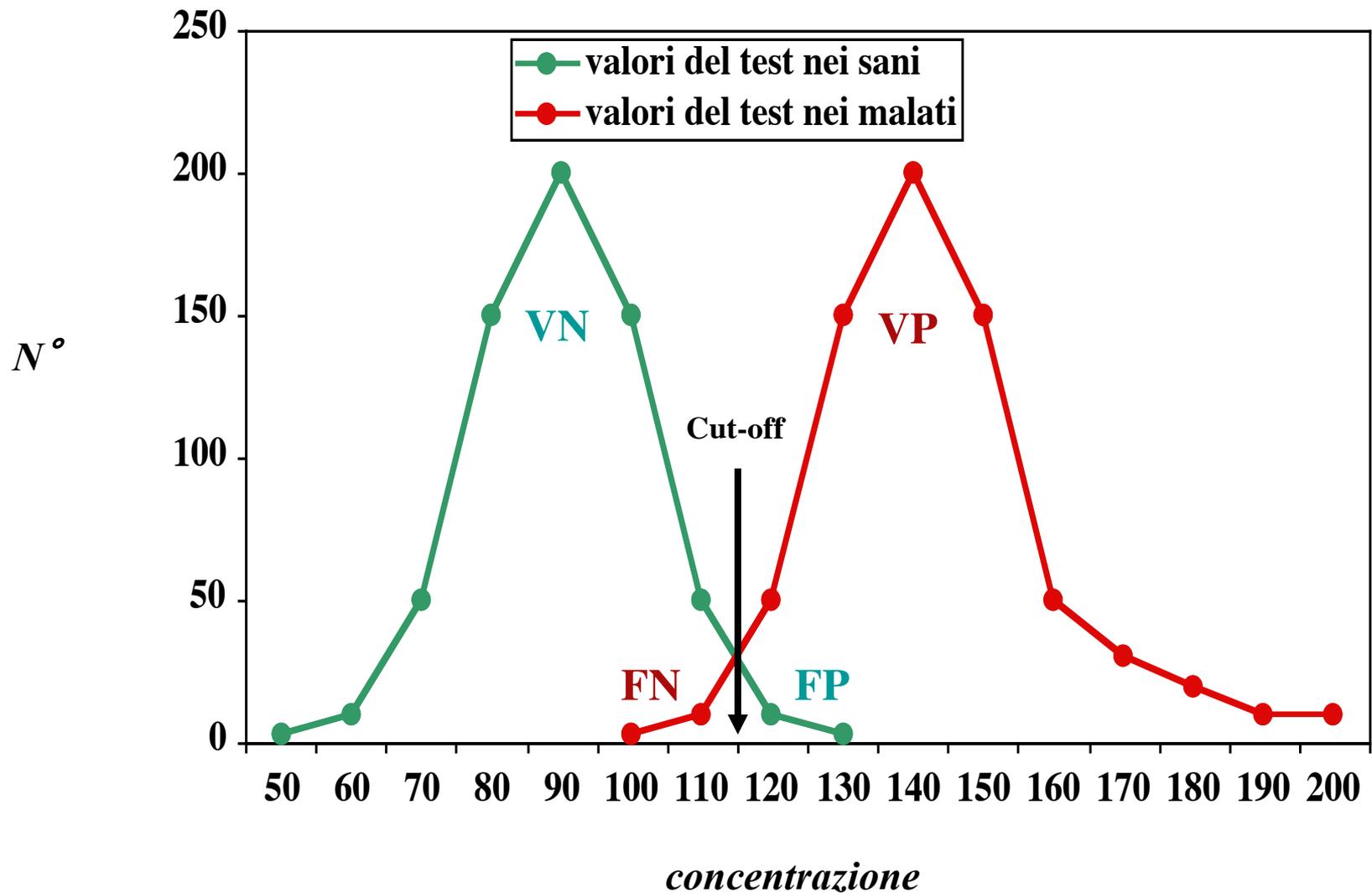
**Sensibilità Diagnostica**  $\% = VP / (VP + FN) * 100$

**Specificità Diagnostica**  $\% = VN / (VN + FP) * 100$

**Efficienza**  $\% = (VP + VN) / (VP + FP + FN + VN) * 100$

**Valore predittivo:** 
$$\frac{(Prevalenza * Sensibilità)}{(Preval * Sensibil + 1 - Preval * 1 - Specificità)}$$

# Attendibilità diagnostica: valore soglia (cut-off point)



# Affidabilità vs Validità

- **Affidabilità**: capacità del test di offrire sempre lo stesso risultato nel corso di misurazioni ripetute
- **Validità** : capacità del test di distinguere in una popolazione i soggetti sani da quelli malati

# Fattori che influenzano l'attendibilità diagnostica

- Il valore soglia (cut-off) è un valore di concentrazione che teoricamente dovrebbe separare in modo netto le due popolazioni (sani e malati)
- In genere rappresenta un compromesso tra sensibilità e specificità diagnostica
- Il compromesso deve tener conto della gravità della malattia che si vuole diagnosticare
- Tale valore può essere calcolato in modo sperimentale mediante la costruzione delle ROC curve (receiver operating characteristic)
- La ROC curve si costruisce calcolando i VP ed i FP per differenti valori soglia

# Validità del test

Situazione di presenza o assenza di malattia ed  
esito di un test

esito test ↓	i soggetti sono		TOT.
	malati (D+)	sani (D-)	
+(T+)	VP	FP	VP+FP
-(T-)	FN	VN	VN+FN
TOT.	VP+FN	VN+FP	n

totali test-positivi: VP+FP, VN+FN

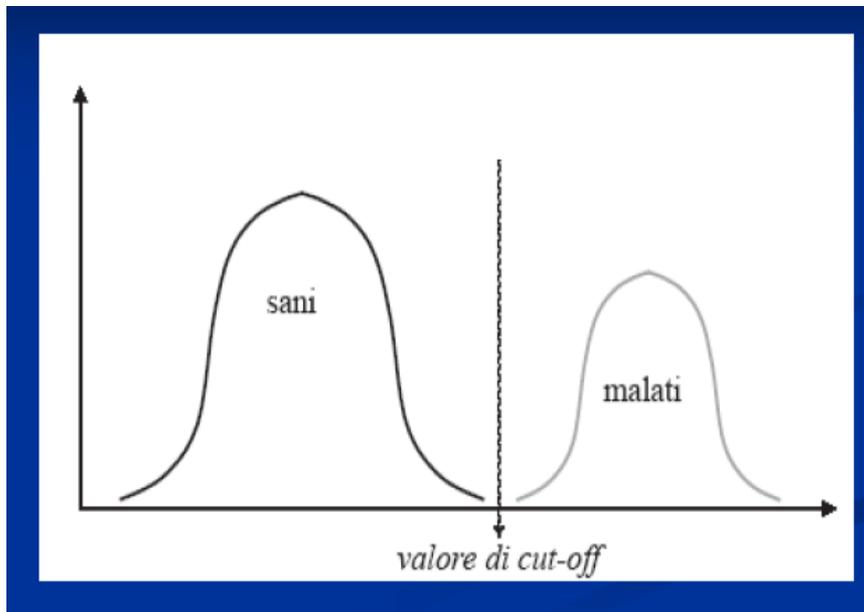
totali test-negativi: VP+FN, VN+FP

totale ammalati: VP+FN

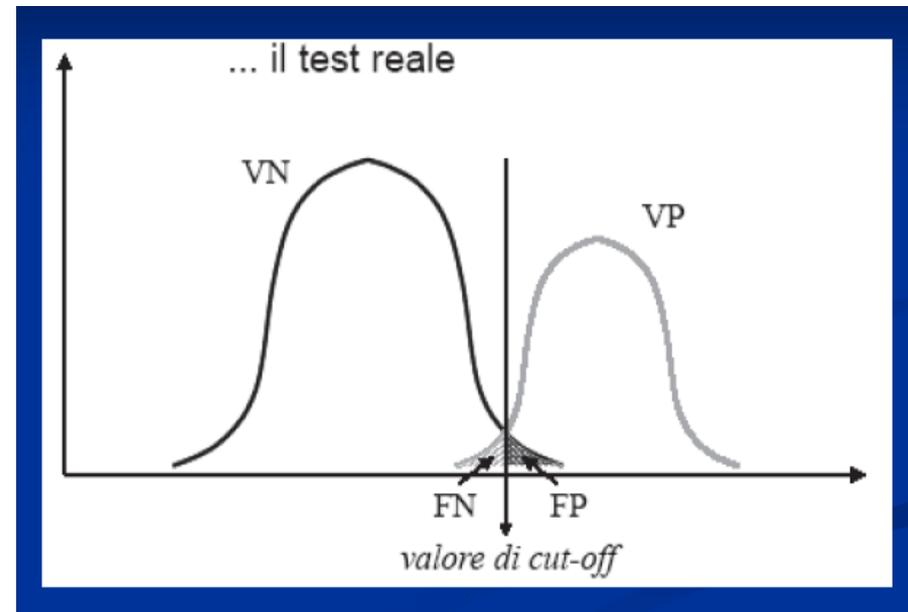
totale sani: VN+FP

# Validità del test

Il sogno.....



.....e la realtà



# Sensibilità e Specificità Diagnostica

La **sensibilità** è la capacità di identificare correttamente gli individui ammalati (veri positivi (VP) + falsi negativi (FN)).

- In termini di probabilità, la sensibilità è la probabilità che un individuo ammalato risulti positivo al test; si può anche dire che essa è la proporzione degli individui ammalati che risultano positivi al test.

$$SE = \frac{VP}{VP + FN} \times 100$$

La **specificità** è la capacità di identificare correttamente gli individui sani.

- In termini di probabilità, la specificità è la probabilità che un individuo sano risulti negativo al test; si può anche dire che essa è la proporzione degli individui sani che risultano negativi al test.

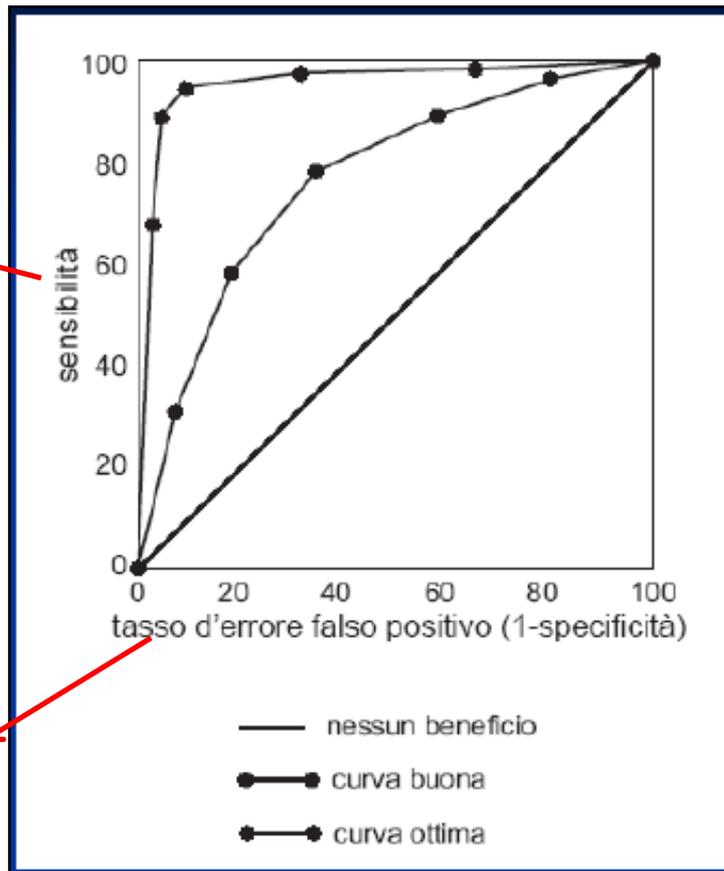
$$SP = \frac{VN}{VN + FP} \times 100$$

# Receiver Operating Characteristic (ROC curve)

Il punto di discriminazione più conveniente di un test si ricava dalle **curve ROC** (Receiver Operating Characteristics)

Riportando in ascisse  $1-SP$  che rappresenta la frazione di FP ed i ordinata  $SE$  che rappresenta la frazione VP, si può tracciare una curva i cui punti rappresentano le prestazioni del metodo di decisione (test diagnostico) per ogni possibile scelta della soglia di decisione clinica

VP



Il punto ottimo è quello in alto a sinistra (SE=1, SP=1) per il quale la regola di decisione (test diagnostico) è infallibile (nessun FP e FN)  
Pertanto più la curva ROC è arcuata verso quel punto, migliore è il test decisionale. L'area grigia sopra la curva ROC rappresenta pertanto l'errore connesso con l'uso del test stesso.

# Receiver Operating Characteristic (ROC curve)

