BIOCHIMICA CLINICA

LEZIONE I - *introduzione*

La biochimica clinica studia gli effetti di malattia e farmaci utilizzati sui processi biochimici dell'organismo. Prende in esame materiale biologico facilmente accessibile per la quantificazione di molecole legate a stati fisiologici o patologici. Fornisce dati utilizzati per l'esito diagnostico.

- Contribuisce alla classificazione nosografica
- Fornisce reperti utili alla diagnosi ma anche statisticamente significativi
- Controllo e aggiustamento della posologia
- Controllo di fattori di rischio e variabilità individuale

La diagnosi sviluppata dal clinico viene da lui stesso confermata o smentita sulla base dei dati raccolti ed elaborati dal laboratorista. In passato, le due figure coincidevano.

Esistono diverse tipologie di laboratorio:

- Laboratorio di reparto: di piccole dimensioni e dedicato al *point-of-care testing*. E' destinato alle analisi di pz in area critica, svolge analisi semplici, veloci e con attrezzatura semplice, portatile e informatizzata.
- Laboratorio generale centrale o *core lab:* tradizionale struttura di laboratorio su scala ospedaliera, ha un pannello analitico ampio ed è totalmente informatizzato. Le attività sono codificate, le non conformità registrate e si deve avere una certificazione da enti esterni.
- Laboratorio specialistico: strutture specializzate per utenze specializzate, con caratteristiche operative differenziate.

Del laboratorio si controllano qualità, efficienza, rapporto costi/benefici e sicurezza degli impianti.

Esistono reti di riferimento regionali, nazionali ed europee che stabiliscono le metodologie unificate e raccolgono basi di dati.

Passi del processo analitico:

- Accettazione della richiesta e sua verifica (anagrafica,...)
    - Identificazione: dati demografici, dati relativi al prelievo, prestazione richiesta.
- Accettazione del campione come congruo alla richiesta
- Trattamento del campione
- Caricamento su filiera analitica
- Validazione del risultato
- Licenziamento del referto

master COPY

Esistono pannelli che raggruppano le varie tipologie d'esame, ma si utilizzano spesso i modelli orientati per problemi che consentono ridurre costi, tempi e numero di prestazioni richieste.

Nel caso di ricerca scientifica non c'è responsabilità civile del pz, non si applicano criteri d'urgenza, non si consegnano né referti né si usano valori di riferimento, ma si danno informazioni sul metodo e sulle caratteristiche di *validità, sensibilità* e *specificità.*

L'impatto del dato di laboratorio sul processo decisionale clinico è del 70% circa.

LEZIONI II – III – *il prelievo sanguigno, le variabili analitiche*

Il sangue: nel corpo ne abbiamo circa 5L, di cui il 45% è costituito da elementi figurati, il resto è plasma. Il plasma è al 93% acqua, per il resto parte solida (specialmente proteine) con fattori della coagulazione. Si ottiene per centrifugazione dopo aggiunta di anticoagulanti. Contiene prevalentemente come parte solida glucidi, lipidi, glicoproteine, ormoni. Il siero, invece, è plasma privato dei fattori della coagulazione, si ottiene lasciando coagulare il sangue.

Funzioni del sangue:

- Respiratoria
- Nutritizia ed escretrice
- Regolazione (anche emostasi , pressione osmotica ed oncotica)
- Difesa
- Termoregolazione
- Mantenimento tasso idrico

Tipologie di prelievo:
- Prelievo venoso
- Prelievo arterioso
- Prelievo capillare

Procedure di preparazione del prelievo: accettazione del pz, controllo e preparaizone materiale. Si verifica l'identità del pz, indagine sul suo stato. Disinfezione con sostanze non interferenti.

Accorgimenti per prelievo venoso: pz seduto o sdraiato. Sciogliere laccio emostatico appena inserito l'ago per evitare emoconcentrazione e far rilasciare il pugno. Non sciambrottare le provette.

Ogni provetta ha il tappo di un ddeterminato colore che identifica un processo analitico. Spesso le provette contengono anticoagulanti (litio-eparina, sodio-eparina, EDTA, floruro,...) che possono interferire con alcuni test ed essere invece indicati per altri.

Prelievo capillare: dal polpastrello, dal lobo dell'orecchio e, nel bambino, dal tallone. Disinfettare area frizionando o scaldando per avere sangue "arterializzato", pungere con lancetta a 3-4 mm di profondità, scartare la prima goccia e raccogliere le successive senza spremere.

Prelievo arterioso: più difficile. Si effettua in a. radiale, brachiale o femorale. Si ispeziona la regione e si effettua il test di Allen per la pervietà arteriosa:
- Comprimere aa. radiale e ulnare insieme, si fa aprire e chiudere la mano per svuotare il circolo (diventa bianca)
- Si fa aprire la mano e si rilascia una sola delle due arterie: se la mano si ricolora, l'a. è pervia.
- Si ripete il test rilasciando l'altra arteria e tenendo la prima obliterata. (provate perché funziona davvero ed è una figata)

Esistono diversi fattori di errore preanalitico durante il trasporto dei campioni e la loro conservazione. Le principali alterazioni dei campioni ematici sono:
- Emolisi: predisposizione biologica (anemia emolitica) o errori meccanici durante il prelievo, disinfettanti errati, centrifugazioni eccessive, erronea conservazione del campione.
- Presenza di coaguli: il campione va mescolato se nella provetta è presente anticoagulante, immediatamente dopo il prelievo e con la giusta quantità di sangue.
- Torbidità: o lattescenza, dovuta a una concentrazione di trigliceridi superiore ai 400mg/dL. Non si possono fare misurazioni spettrofotometriche o enzimatiche.
- Evaporazione: causa la concentrazione dei vari analiti e perdita delle sostanze volatili, l'evaporazione di CO_2 produce un aumento del pH che inattiva alcuni enzimi.

Inoltre esistono vari criteri di non accettabilità del campione, che possono dipendere dal campione stesso o da condizioni del pz (non era a digiuno, non era a riposo,...). Ci sono poi variabili modificabili:
- Fisiologiche (postura, esercizio fisico, ritmi circadiani)
- Stile di vita
- Dieta
- Farmaci

E variabili non modificabili:
- Fattori ambientali
- Fattori biologici
- Condizioni mediche
- Cambiamenti ciclici a lungo termine

Variabilità analitica: supponendo superate tutte le fasi precedenti, anche nella fase analitica ci sono variabili che devono essere controllate. Nei risultati che otteniamo dal campione esiste uno scarto tra il *valore reale* e la *misura* è definito *errore totale della misura.* Il margine di errore dovuto anche alla variabilità biologica esiste sempre, ma dovrà essere accettabile. Solitamente si ottiene un range di valori che si distribuiscono come una gaussiana. Estrapolando i risultati ottenuti da diversi laboratori ed operando una media delle medie di tutti i valori, si ottiene il valore più vicino possibile al valore reale. In questo modo possiamo anche capire quale laboratorio commetta errori di sottostima o di sovrastima. Inoltre, la deviazione standard diventa indicativa di come si distribuiscono i valori determinati nella curva, e dell'errore casuale che viene prodotto dal laboratorio.

Gli errori analitici sono di due tipi:

- *Scostamento* o *errore sistematico:* si presenta ogni volta che la misura viene eseguita. Se è presente influisce sempre nella stessa direzione. E' dovuto a fattori generali di impianti o apparecchi, inaccuratezza di un operatore che commette sempre lo stesso errore.
- *Scarto aleatorio* o *errore casuale:* si presenta in modo irregolare e non se ne conosce la direzione.

I fattori determinanti la variabilità analitica possono essere ambientali, tecnologici, chimici e biochimici, umani.

Per migliorare l'efficienza del laboratorio si possono operare:

- Consolidamento: riduzione del numero delle piattaforme analitiche attive, aumento del numero di analisi implementate su ciascuna piattaforma.
- Standardizzazione: uniformare i metodi analitici e le procedure adottate. Semplifica le procedure dei controlli di qualità, del programma di addestramento, collegamento informatico.
- Integrazione dei sistemi: definisce protocolli di comunicazione.
- Revisione dell'organizzazione: revisione delle apparecchiature per qualità e adattamento.

Ci sono i parametri alla base della validità di un metodo:

- *Veridicità:* accordo tra valore reale e misura, che consta di:
  - *Esattezza:* concordanza tra la media e il valore vero.
  - *Accuratezza:* concordanza tra una singola misura e il valore vero.
  - *Scarto* o *incertezza:* casuale o sistematico.
  - *Incertezza:* caratterizza la dispersione dei valori.
- *Precisione:* concordanza tra misure indipendenti ripetute sullo stesso campione (non relazionate al valore vero).
  - *Ripetibilità:* concordanza di misure successive nelle stesse condizioni sperimentali.
  - *Riproducibilità:* concordanza in condizioni diverse.
  - *Profilo di precisione:* variare della concentrazione dell'analita.

Accuratezza e precisione ci danno un indice di quanto il metodo usato sia valido, mentre la DS ci rende un'idea dell'imprecisione. Tanto più ampia è la DS, più il metodo è impreciso.

LEZIONE IV – *caratteristiche del processo analitico*

Le determinazioni eseguite possono essere:

- Precise ma poco accurate: simili tra loro, ma troppo discoste dal valore reale.
- Accurate ma poco precise: più vicine al valore reale ma tra loro difformi.
- Accurate e precise: il caso migliore.

Tuttavia si parla anche di *sensibilità analitica,* ovvero la capacità di valutare anche piccole quantità dell'analita d'interesse. Si dinstinguono:

- *Limit of detection* (LOD): quantità minima rilevabile.
- *Limit of quantification* (LOQ): minima concentrazione rilevabile in maniera affidabile.

Alla base della validità metodica esistono anche altri parametri:

- *Specificità* o *selettività analitica:* capacità di determinare soltanto l'analita d'interesse.

- *Interferenza:* la presenza di un analita può interferire con la rilevazione di un altro. Fenomeni di questo tipo si hanno con campione emolizzato o torbido.
- *Robustezza:* capacità del metodo di non essere alterato da piccole variazioni nel campione. Misura l'affidabilità del sistema nella procedura di routine. La *solidità* invece rappresenta la resistenza a variazioni ambientali od operative.
- *Linearità:* l'esistenza di una relazione lineare tra misura e valore vero, cioè la concordanza che si cerca. E' sempre costante,
- *Praticabilità:* il fatto che il metodo sia facilmente applicabile, di costi contenuti, e che non richieda una specializzazione successiva.

Una volta appurata la bontà del metodo, si procede a stabilire un range entro il quale porre i valori dell'analita, i *valori di riferimento.* Il range può essere una percentuale, una concentrazione o un tempo. Questo intervallo dipende innanzitutto dallo strumento utilizzato e dai reagenti impiegati. Non esistono intervalli di riferimento standard. In condizioni ottimali ciascun laboratorio stabilisce i propri range. I fattori che influenzano la variabilità del range sono:

- *Interazione genotipo-ambiente:* ogni individuo ha un proprio profilo genetico, delle caratteristiche individuali che dipendono dalla presenza di polimorfismi. Riflettono caratteristiche della popolazione dell'individuo.
- *Marcatori d'organo* o *di tessuto:* condizioni particolari in cui una concentrazione può variare da un individuo all'altro (es. enzima aspartato aminotransferasi più elevata nei soggetti con molta massa muscolare).
- *Età*
- *Sesso*
- *Etnia*
- *Ritmi fisiologici:* alcune concentrazioni possono variare anche nei diversi momenti della giornata.
- *Attività fisica e postura.*

Il range si stabilisce con un metodo preciso: si individuano dei soggetti di riferimento di stessa età e sesso, con caratteristiche tipiche della popolazione con la quale il laboratorio solitamente opera. Un gruppo costituirà i campioni di riferimento, si determina un analita che abbia significatività statistica. Si guardano i valori ottenuti e come cambiano.

La selezione della popolazione si può fare *a posteriori,* inserendo nel gruppo tutti i soggetti che afferiscono a quel laboratorio, solo dopo alcuni soggetti verrano esclusi perché non presentano le caratteristiche richieste; oppure *a priori,* includendo nel gruppo di riferimento soltanto i soggetti accuratamente selezionati. Il risultato è lo stesso.

I valori di riferimento, nel migliore dei casi, si distribuiscono come una gaussiana. Il 95% dei valori si concentra tra il valore medio più o meno 2DS. Quando, però, la distribuzione è asimmetrica o deviata, si opera una trasformazione logaritmica per normalizzare la distribuzione. Può essere anche irregolare. L'intervallo di riferimento non coincide sempre con l'intervallo desiderabile: la differenza è data dal significato clinico. Una popolazione con un valore di un analita alterato basalmente ci darà un intervallo detto *range alterato,* perché normale per questa popolazione ma anormale per un'altra. Non coincide comunque con quello desiderabile, perché i loro valori di analita sono comunque patologici. Se l'intervallo è stabilito sull'assunzione di farmaci, si parla di *intervallo terapeutico.*

Ci sono analiti che non hanno un range di riferimento perché normalmente assenti. Per questi esiste però un *valore soglia* o *cut-off,* un valore dal momento in cui si comincia a rilevare l'analita ed esso assume significato clinico. Altri valori ancora vanno relazionati ad altri parametri per fargli acquisire significato, altrimenti non avrebbero neanche un valore soglia.

Alcuni valori, se si rilevano a cavallo del range, possono diventare *falsi positivi* (FP) o *falsi negativi* (FN). Qui si introduce il concetto di *sensibilità* e *specificità diagnostica* del test.

La sensibilità diagnostica si determina come $\frac{VP}{(VP+FN)} * 100$, dove VP+FN rappresenta il totale della popolazione con malattia. Se il valore è positivo e il test abbastanza sensibile, il soggettoè malato.

La specificità diagnostica si determina come $\frac{VN}{(VN+FP)} * 100$, dove VN+FP rappresenta il totale dei soggetti sani.

La sensibilità elevata include una possibilità di FP, ma dà certezza di malattia in caso di valori positivi. L'elevata specificità invece include una possibilità di FN, ma esclude con certezza la malattia. Esistono casi di patologie in cui si preferisce un test ad elevata sensibilità, ed altri invece preferiscono elevata specificità.

La sensibilità del test si esalta ponendo la soglia diagnostica nel range di sovrapposizione tra positivi e negativi, ciò serve per quei test in cui è meglio avere certezza di malattia e possibilità di un FP, che comunque potrà essere smentito con altre indagini diagnostiche.

Se invece poniamo la soglia più in alto si perde in sensibilità e si guadagna in specificità, cioè si rischia di produrre dei FN, perdendo VP. Questo va bene per patologie per cui non c'è possibilità di cura, per cui perdere un malato è peggio che dire a un sano che in realtà è malato.

Un test con sensibilità e specificità al 100% l'una è rarissimo ed è detto *ideale.*

Valori predittivi:

- Valore predittivo positivo: $\frac{VP}{VP+FP}$: quanto il test è attendibile per predire la presenza di una patologia.
- Valore predittivo negativo: $\frac{VN}{VN+FN}$: consente di escludere dalla presenza di malattia quelli che realmente non hanno la malattia.

Un test è invece *inutile* se sia sensibilità che specificità sono al 50%. Il test detto *utile* è quello più comune, in cui esiste un margine di errore che si localizza nell'intersezione delle due curve di malati e sani. Più l'intersezione è piccola più il test è affidabile.

Performance analitica: quanto il test è valido dal punto di vista analitico.
Performance diagnostica: quanto un test è valido dal punto di vista diagnostico.

Valori critici: fuori dal range di riferimento comunque ci sono valori per cui non c'è preoccupazione clinica. Oltre un certo valore, però, il risultato è allarmante. Ad esempio, la glicemia superiore a 500 mg/dL, che può portare al coma diabetico.

I livelli decisionali comunque sono quelli per cui si possono prendere delle decisioni cliniche, laddove i livelli di riferimento danno un'indicazione generale. I valori critici non sono definiti statisticamente ma sulla base dell'esperienza clinica.

master COPY

LEZIONE V – *i laboratori*

I laboratori vengono sottoposti al controllo qualità. La legge 229/1999 legifera in materia, con successive modificazioni regionali.

L'accreditamento si basa sulla norma ISO 15189. Prevede l'implemento del "sistema di qualità del laboratorio" in cui sono raccolte tutte le attività, tutte definite da una serie di documenti standardizzati. L'accreditamento è un riconoscimento formale di idoneità del laboratorio, per effettuare qualsiasi prestazione diagnostica. E' richiesto anche per il SSN. Il manuale contiene la descrizione di tutte le dotazioni minime. E' obbligatorio. Facoltativa è invece la certificazione, in cui una commissione esterna ispeziona a campione il laboratorio in una modalità definita *Audit.* Esistono audit interni, esterni di seconda parte (società terze in collaborazione con il laboratorio) ed esterni di terza parte (organizzazioni autorizzate e specializzate che controllano il rispetto delle norme ISO). Una volta ottenuti accreditamento e certificazione, il laboratorio deve comunque rimanere controllato e aggiornato: si utilizza il *ciclo di deming* o *PDCA* (plan, do, check, act).

I sistemi di qualità possono essere *top-down* oppure *bottom-up.* Il sistema di qualità ISO invece prevede:

- Manuale di qualità
- Carta dei servizi