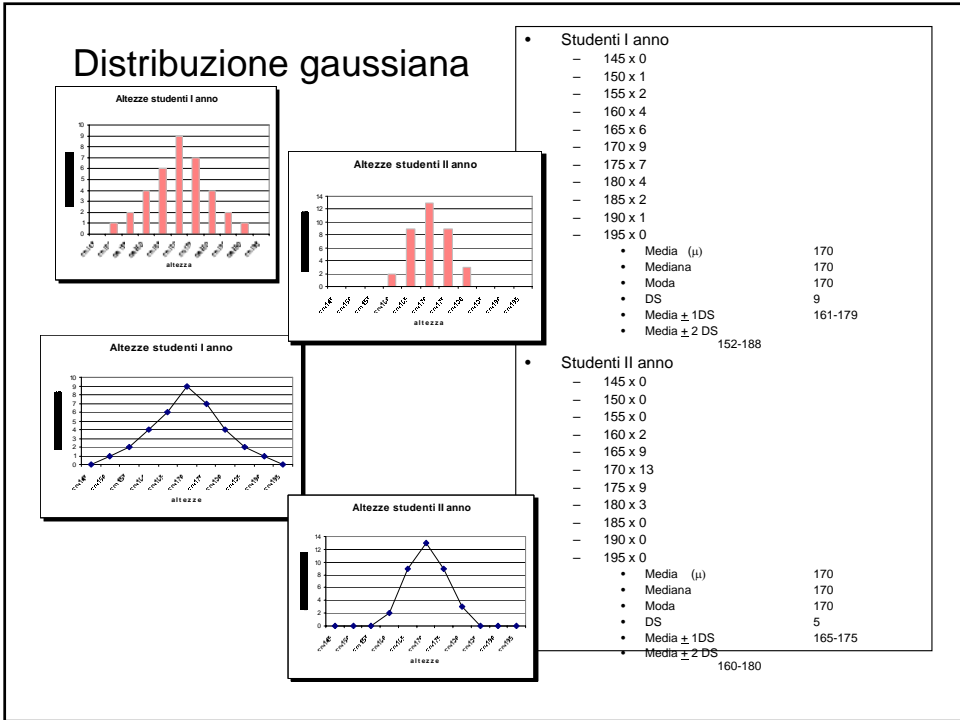
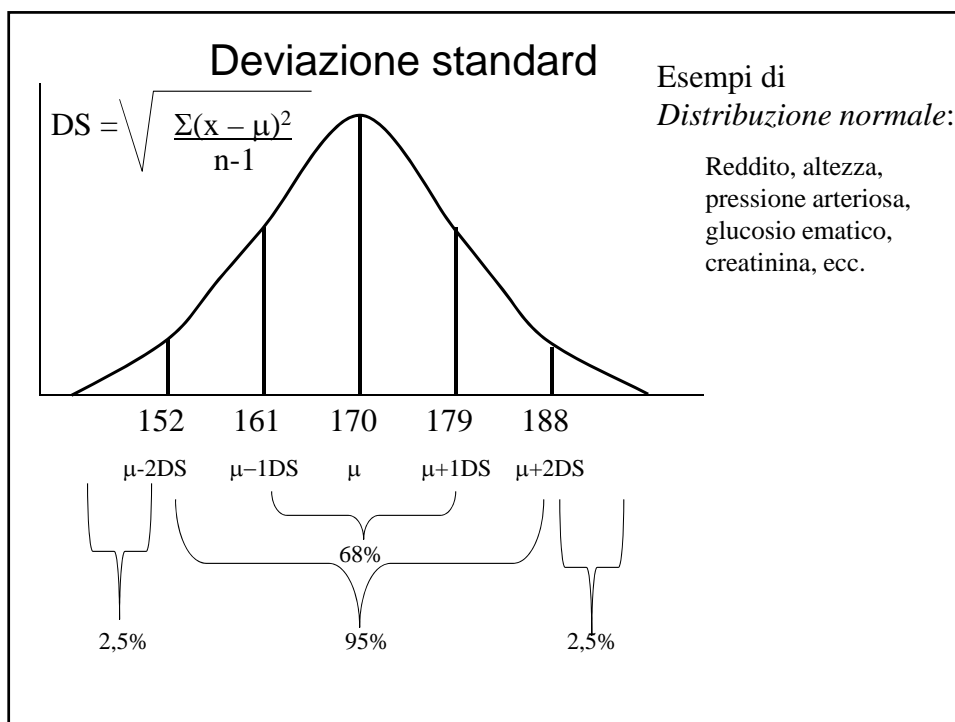


Significatività del dato di laboratorio



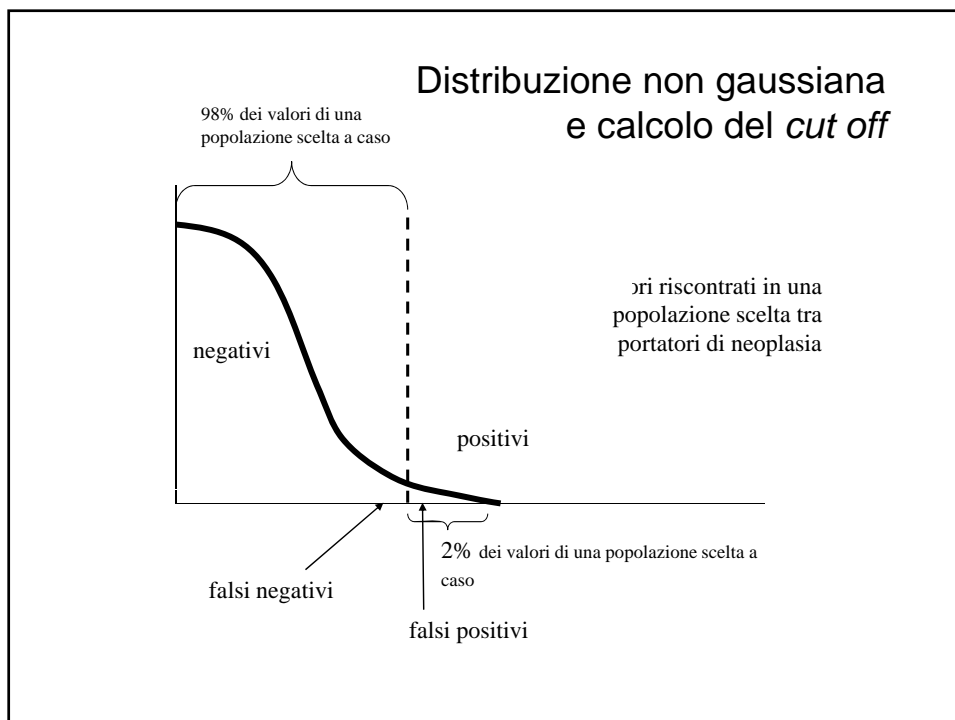
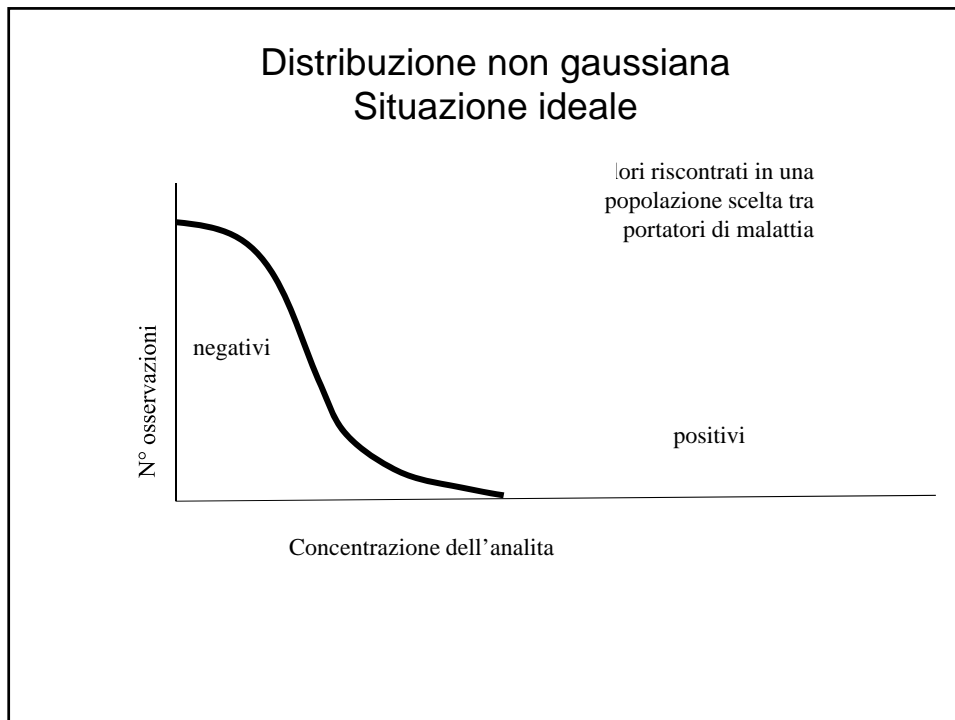


Valori di riferimento

(distribuzione normale)

1. V.R. popolazione *sezione A*
media $\pm 2 DS = 170 \pm 9 = 152 - 188$
2. V.R. popolazione *sezione B*
media $\pm 2 DS = 170 \pm 5 = 160 - 180$

- I v.r. variano col variare della popolazione osservata
- Ogni laboratorio dovrebbe elaborare i v.r. per la popolazione che osserva utilizzando un campione
 - preso a caso (random)
 - statisticamente rappresentativo della popolazione considerata



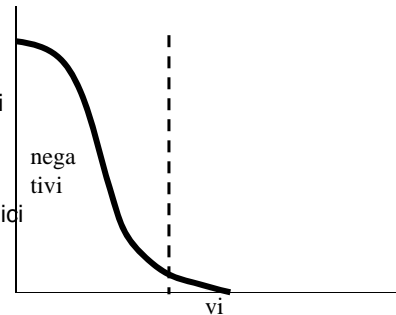
CLASSIFICAZIONE DEI RISULTATI

VERI POSITIVI [VP]
Soggetti effettivamente malati con valori patologici

FALSI POSITIVI [FP]
Soggetti sani con valori patologici

VERI NEGATIVI [VN]
Soggetti sani con valori non patologici

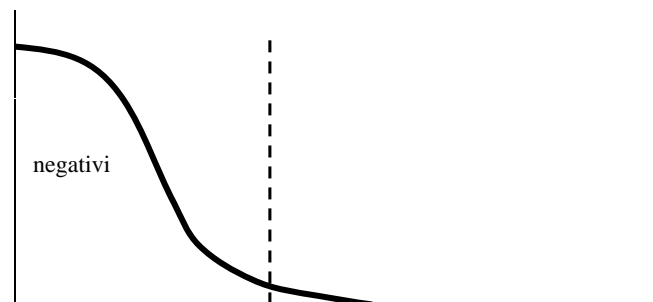
FALSI NEGATIVI [FN]
Soggetti malati con valori non patologici

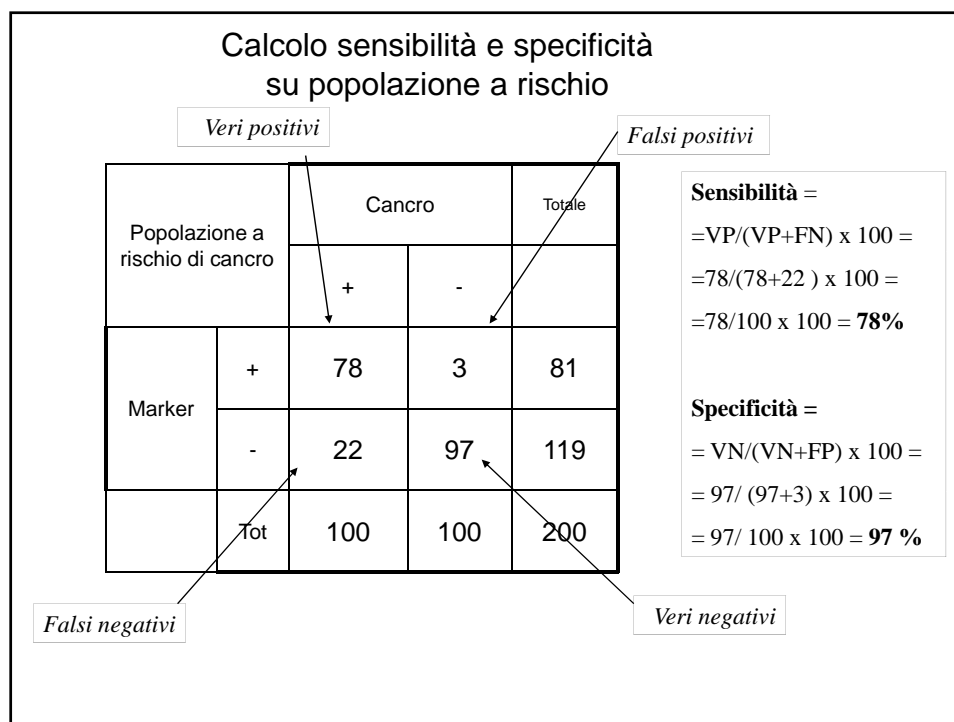
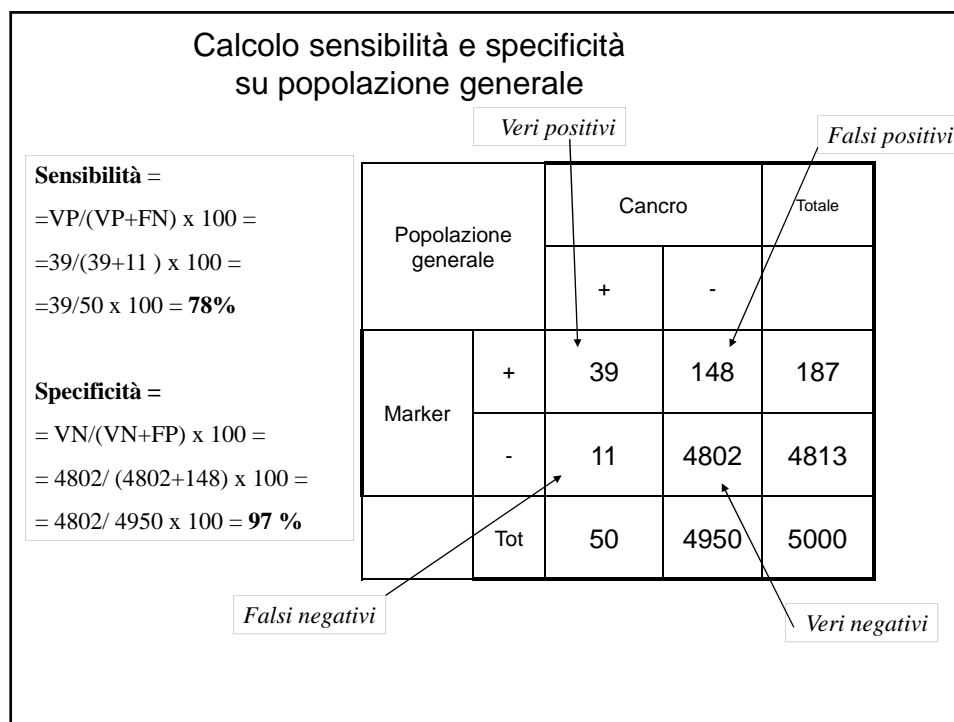


Sensibilità e specificità

$$\text{Sensibilità} = \frac{\text{Veri positivi}}{\text{Veri positivi} + \text{Falsi negativi}} \times 100 \quad \frac{\text{veri positivi}}{\text{totale positivi (malati)}}$$

$$\text{Specificità} = \frac{\text{Veri negativi}}{\text{Veri negativi} + \text{Falsi positivi}} \times 100 \quad \frac{\text{veri negativi}}{\text{totale negativi (sani)}}$$





Sensibilità

- *Capacità di un test di individuare la sostanza da ricercare in tutti i campioni che la contengono*
 - **Sensibilità analitica:**
 - la più piccola quantità di sostanza che un metodo può dosare (cioè a distinguere sicuramente dallo zero)
 - **Sensibilità diagnostica:**
 - capacità di un test di individuare i soggetti positivi per quella malattia

Specificità

- *Capacità di un test di non dare positività in campioni che non contengono l'analita da determinare (oppure capacità di dosare esclusivamente l'analita desiderato)*
 - **Specificità analitica:**
 - Capacità di un metodo di non subire interferenze da sostanze diverse da quella ricercata
 - **Specificità diagnostica:**
 - Capacità di non classificare come portatori di malattia (positivi) soggetti non affetti da malattia (negativi)

Valori predittivi

- La sensibilità e la specificità di un metodo non cambiano in funzione della popolazione analizzata
- In popolazioni diverse (generale/a rischio) cambia però la capacità di un test di rispondere alle domande:
 - Con un risultato positivo quante probabilità ho di essere veramente affetto da quella patologia? (valore predittivo positivo)
 - Con un risultato negativo quante probabilità ho di essere veramente sano? (valore predittivo negativo)

Valore predittivo positivo (di un risultato positivo)

- Indica la % di veri positivi su tutti i risultati positivi
ovvero
- la probabilità di avere effettivamente la patologia in caso di risultato positivo
- Si calcola con la formula
$$\text{VPP} = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FP}} \times 100$$

tutti i risultati positivi

Valore predittivo negativo (di un risultato negativo)

- Indica la % di veri negativi su tutti i risultati negativi
ovvero
- la probabilità di non avere effettivamente la patologia in caso di risultato negativo
- Si calcola con la formula $VPN = \frac{VN}{\underbrace{(VN+FN)}_{\text{tutti i risultati negativi}}} \times 100$

POPOLAZIONE GENERALE

VP = 39
FN = 11
VN = 4802
FP = 148

Sensibilità = 78%
Specificità = 97%

Calcolo di VPP e VPN

Popolazione generale:

$$VPP = \frac{VP}{(VP+FP)} \times 100$$

$$VPP = \frac{39}{(39 + 148)} \times 100 = 20,86\%$$

$$VPN = \frac{VN}{(VN+FN)} \times 100$$

$$VPN = \frac{4802}{(4802+11)} \times 100 = 99,77\%$$

Un VPP del 20% rende impossibile l'uso del marcatore
come screening
sulla popolazione generale

POPOLAZIONE A RISCHIO

VP = 78
 FN = 22
 VN = 97
 FP = 3

Sensibilità = 78%
Specificità = 97%

Calcolo di VPP e VPN

Popolazione a rischio:

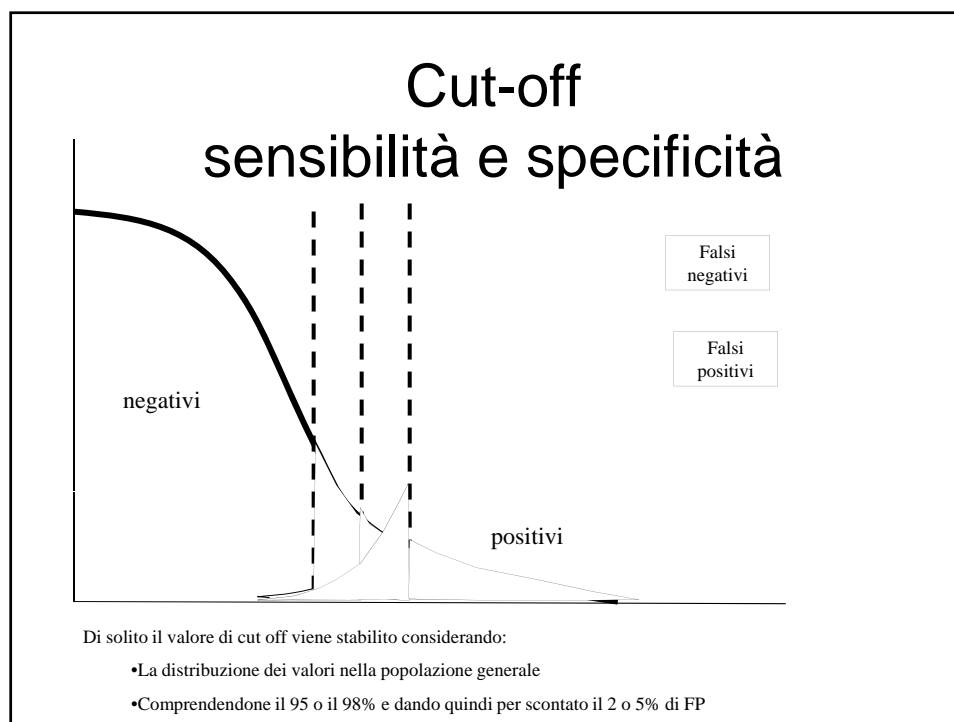
VPP = $VP / (VP+FP) \times 100$

VPP = $78 / (78 + 3) \times 100 = 96,3\%$

VPN = $VN / (VN+FN) \times 100$

VPN = $97 / (97+22) \times 100 = 81,5\%$

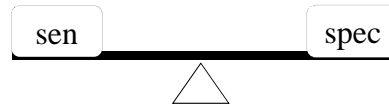
Un VPN del 81% rende pericoloso l'uso del marcatore
 come screening
 sulla popolazione a rischio





Sensibilità e specificità

$$\text{sensibilità} = \frac{1}{\text{specificità}}$$



- Sono inversamente proporzionali
- A fini di screening si debbono preferire test con massima sensibilità
 - Altrimenti i falsi negativi andrebbero persi
 - Eventuali falsi positivi verranno confermati con test di conferma con maggiore specificità
- Per conferme si sceglieranno test con massima specificità

SCOPO DEI TEST DI LABORATORIO

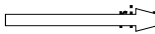
- A- screening di massa
- B- screening in pazienti asintomatici
- C- screening in sintomatici
- D- diagnosi di conferma
- E- monitoraggio

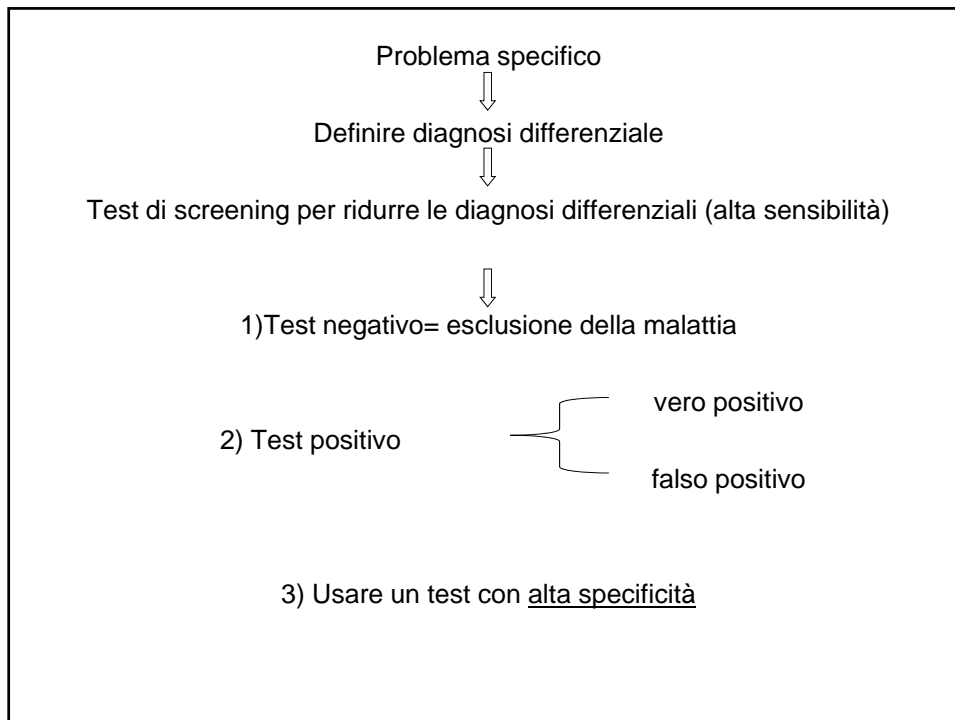
PAZIENTI SINTOMATICI

- A- SINTOMATOLOGIA ASPECIFICA (es: dolore toracico)
- B-PROBLEMI SPECIFICI GIÀ NOTI (es: gastralgia in ulcera)

SEGNI ASPECIFICI

- 1-BATTERIA DI TEST BIOCHIMICI
- 2-PROFILO EMATOLOGICO
- 3-ANALISI DELLE URINE
- Problema:

Test positivo ultati falso positivi



SEQUENZA DEI TESTS

- 1. DAI PIÙ ECONOMICI AI PIÙ DISPENDIOSI
- 2. DA MINORE A MAGGIOR RISCHIO
- 3. DAI PIÙ SEMPLICI AI PIÙ COMPLESSI
- 4. NEI LIMITI DI TEMPO, RISCHIO E COSTO, CERCARE DI FARE IL TEST PIÙ EFFICIENTE PRIMA POSSIBILE

IL PIÙ SENSIBILE, SPECIFICO E COL


 MAGGIOR VALORE PREDITTIVO

INTERVALLI DI RIFERIMENTO

Basati sulla curva Gaussiana, con limiti posti per convenzione a -2 e $+2$ DS, comportano che:

- Il 2,5% dei normali avranno risultati superiori alla norma
- Il 2,5% dei normali avranno risultati inferiori alla norma
- Il 95% delle persone normali avranno valori normali

VALORI NORMALI

QUANTO DEVE ESSERE ANORMALE UN TEST PER METTERE IN ALLARME?

IL BUON SENSO SUGGERISCE DI IGNORARE RISULTATI LEGGERMENTE ANOMALI SE LA DIAGNOSI IMPLICATA NON E' VEROSIMILE MA DI PRENDERLA IN CONSIDERAZIONE SE LA DIAGNOSI E' CLINICAMENTE VEROSIMILE

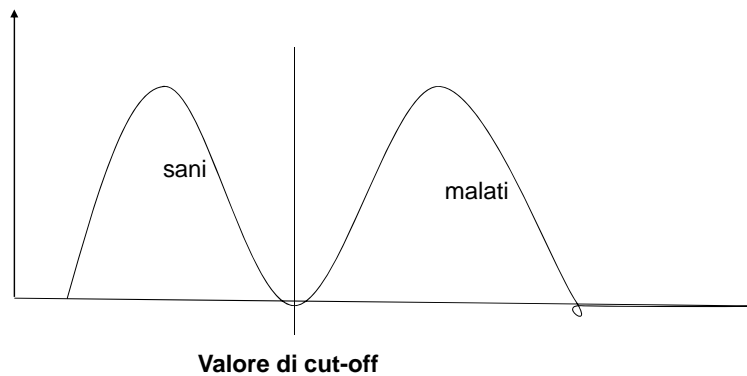
IL TEST PERFETTO

1. Accurato (concondanza tra valore trovato e valore vero)
 2. Preciso (ripetibilità del risultato)
 3. Discriminante (in grado di valutare differenze minime)
 4. Non doloroso
 5. Privo di rischi
 6. Basso costo
 7. Utile
- Se si chiede un test non si può poi ignorarlo o sottovalutarlo

Affidabilità vs Validità

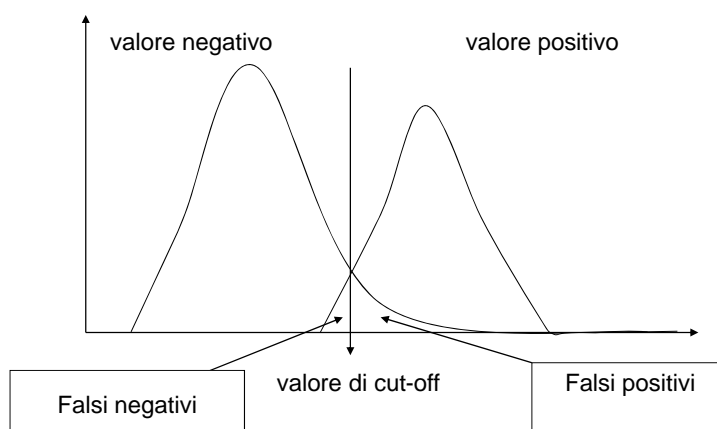
- Affidabilità: capacità del test di offrire sempre lo stesso risultato nel corso di misurazioni ripetute
- Validità di un test: capacità del test di distinguere in una popolazione i soggetti sani da quelli malati

Misure di Validità: la situazione ideale

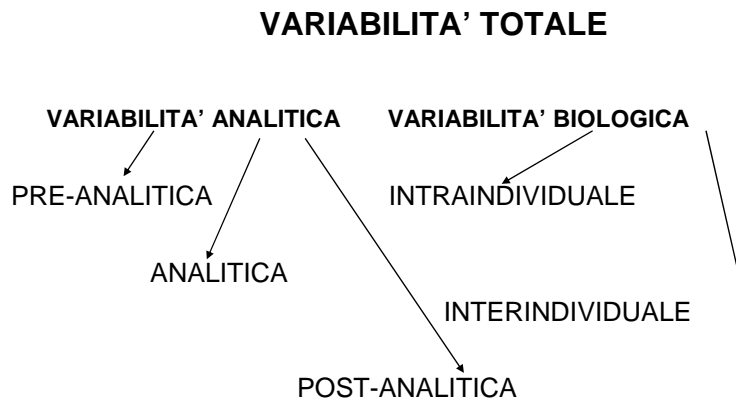


Misure di Validità: la situazione reale

...il test reale



CAUSE DELLA VARIABILITA



PRINCIPALI FONTI DELLA VARIABILITA' INTRA-INDIVIDUALE

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

PRINCIPALI FONTI DELLA VARIABILITA' INTER- INDIVIDUALE

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

VARIABILITA' NELLA FASE PRE-ANALITICA

- Modalità di raccolta e conservazione del campione
- Attribuzione del campione al paziente
- Idoneità del materiale
- Accorgimenti per stabilizzare gli analiti

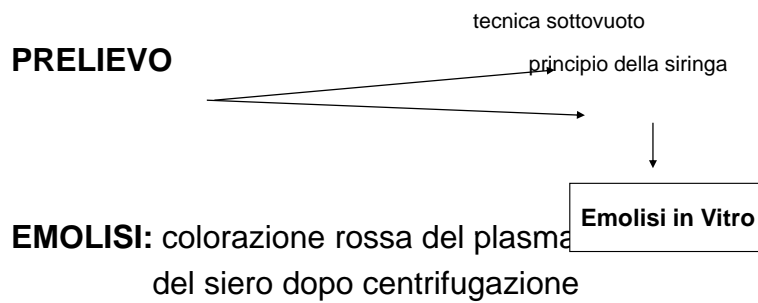
VARIABILITA' NELLA FASE ANALITICA

- Procedure standardizzate
- Controlli interni
- Verifica di risultati con valori elevati

VARIABILITA' NELLA FASE POST-ANALITICA

- Lettura comprensibile del referto
- Consegna referto in tempi brevi

VARIABILITA' ANALITICA ASSOCIATA A PRELIEVO VENOSO



MAGGIORI CAUSE DI EMOLISI

- 1) Ago di piccolo calibro
- 2) Presenza di disinfettante sul sito del prelievo
- 3) Prelievo in zone edematose
- 4) Aspirazione forzata in siringa
- 5) Forte pressione nel travasare il sangue in provetta
- 6) Violento mescolamento del campione di sangue intero
- 7) Centrifugazione del sangue non sufficientemente coagulato

- **Diagnostica malattie genetiche ed ereditarie**

- **!) Malattie da espansione di sequenze ripetute:**
- **Sindrome X Fragile**
- Malattia ereditaria, gene FMR1 (di 17 esoni), rottura del braccio lungo del cromosoma X (Xq27.3)
- **Incidenza:** 1:2600 nati maschi

- **Patogenesi:**
- Espansione di triplette CGG ripetute in 5' del 1° esone del gene FMR1 che trascrive per la **Fragile X Mental Retardation Protein**. Proteina legante l'RNA la cui trascrizione viene bloccata dalla mutilazione delle triplette espanse.
- **Sano:** da 5 a 50 triplette
- **Portatore o Pre-mutazione:** da 55 a 200 triplette
- **Malato:** oltre 200 triplette.

Sintomatologia:

Alla nascita: Macrocefalia, allargamento della fontanella anteriore;

Adulto: Alta statura, macrocefalia, macroorchidismo, dimorfismi faciali, ridotto Quoziente Intellettivo (IQ= 20-70) con progressivo ritardo in funzione dell'età..

Diagnosi di Laboratorio:

PCR per permutazioni e/o mutazioni a ridotta espansione;

Southern Blot per mutazioni complete ed espansione notevole delle triplette (con 2 enzimi di restrizione di cui uno riconosce le mutazioni del DNA)

Entrambe le tecniche consentono di individuare i malati, le donne portatrici e di effettuare la diagnosi prenatale.

Tale tipo di approccio è utile in tutte le patologie da espansione di triplette (Distrofia Miotonia; Atassia Spinocerebellare, etc.)

2) Malattie da macromutazioni:

Distrofia muscolare di Duchenne-Becker

(DMD) Miopatia degenerativa ereditaria legata al cromosoma X.

Incidenza di 1:3500 maschi nati. Donne portatrici

Distrofia muscolare di Becker (BDM) (forma meno severa):

BMD; Forma meno severa. Insorge a 5-15 anni e oltre.

Incidenza: 3:100.000 maschi

Sintomatologia:

a 2-3 anni ritardo mentale e debolezza muscolare simmetrica.

Entro i 12 anni si perde la capacità a camminare, pseudoipertrofia muscolare per accumulo di connettivo ed adipe.

Nel 20% dei casi, ritardo mentale (specialmente verbale). Morte entro i 20 anni.

Patogenesi:

Gene della DISTROFINA sul braccio corto del cromosoma X (Xp21).

DISTROFINA: 427kD, 4 domini principali -

- 1) per il legame all'actina,
- 2) ROD di 24 unità ripetute di 109 aa,
- 3) Dominio ricco di cisterne,
- 4) dominio carbossi terminale per il legame alle DAG (dystrophin-associated glycoproteins) - .

Proteina a ponte tra apparato contrattile e matrice cellulare (se alterata provoca frequenti rotture muscolari).

65% Macrodelezioni

5-10% Macroduplicazioni

25-30% Micromutazioni
(puntiformi che portano a codoni stop,
Tanto diffusi e variabili **da** rendere
difficile la diagnosi)

IDENTIFICAZIONE MUTAZIONI GENICHE:

Necessaria per conferma diagnostica, per diagnosi prenatale e per identificare donne portatrici.

Southern Blot (per delezioni e duplicazioni; uso di 8 sonde)

Multiplex PCR: amplificazione di più esoni in una unica provetta.