



ISTITUTO GIANNINA GASLINI

DIREZIONE SCIENTIFICA
DIREZIONE SANITARIA
CONTROLLO di GESTIONE e SERVIZIO QUALITA'

Condivisione di protocolli aziendali

Guida ragionata agli esami di laboratorio

G. Melioli

Coordinatore AAD di Medicina Sperimentale e di Laboratorio
Laboratorio Centrale di Analisi
IRCCS G. Gaslini

26 marzo 2009

LA PRESENTAZIONE PREVEDE:

1. quadro generale sull'uso ragionato degli esami di laboratorio
2. esempi specifici di protocolli degli esami di laboratorio per la diagnosi delle immunodeficienze e per la diagnostica di laboratorio delle malattie allergiche

Perchè viene richiesto un esame di laboratorio

1. Si vuole verificare un'ipotesi diagnostica
2. Si cerca un orientamento diagnostico
3. In presenza di una ipotesi diagnostica si vuole verificare che non esistano altre opzioni
4. In corso di monitoraggio
5. Per verificare un precedente risultato
6. Si vuole fare un controllo generale (?)
7. Altri motivi

Come si chiede un esame di laboratorio

1. Identificare un quesito diagnostico
2. Definire quale indagine chiedere
3. Sapere come interpretare l'indagine
4. Sapere dove l'esame viene eseguito
5. Comunicare le avvertenze (preanalitica)
6. Decidere se modificare qualche cosa (diagnosi- terapia) sulla base del risultato

Cosa ci si aspetta da un esame di laboratorio ?

**UN'INDAGINE DI LABORATORIO DEVE MIMARE *IN VITRO* NELLA
MANIERA PIU' CORRETTA POSSIBILE
QUELLO CHE SUCCEDDE *IN VIVO***

Esempio

Un test per l'allergia deve rappresentare nella provetta esattamente quello che succede nel naso del paziente allergico alle graminacee quando cammina in mezzo ad un prato in primavera !



Caratteristiche di un buon esame

Riproducibilità

Precisione

Accuratezza

Robustezza

Specificità

Sensibilità

ecc.

Storia naturale di un'indagine di laboratorio

Fase 1: identificazione sperimentale di un biomarcatore che apparentemente correla con un evento “clinico”

Fase 2: identificazione di una metodologia in vitro che possa essere validata in laboratorio

Fase 3: validazione sul campo

Principio della validazione

- Documentare che un determinato risultato possa essere riproducibile
 - Nella stessa seduta sperimentale
 - In differenti sedute sperimentali
 - Con differenti batch di materiale
 - In sedi differenti
 - Con differenti operatori
 - In differenti condizioni sperimentali (estate/inverno)
- **Definendo a priori le caratteristiche statistiche attese**

Parametri

Esami per
Urgenza/emergenza



Esami elettivi

Esami "economici"



Esami costosi

Costante di tempo
rapida



Costante di tempo
lenta

Costo di un esame di laboratorio

...è strettamente legato a:

1. Numero di esami effettuati ... nel mondo
2. Novità dell'indagine
3. Costo dei reagenti
4. Costo della ricerca e sviluppo
5. Ammortamento delle attrezzature (service)

Costo degli esami (reagenti e strumentazione)

GRANDI SERIE

Glicemia
Emocromo

Vit D 1-25 OH
Tip. leucemie

PICCOLE SERIE

BASSA
TECNOLOGIA

VES
Chimica urine

ISAC
Conta copie EBV

ALTA
TECNOLOGIA

VECCHI

Creatinina
PCR

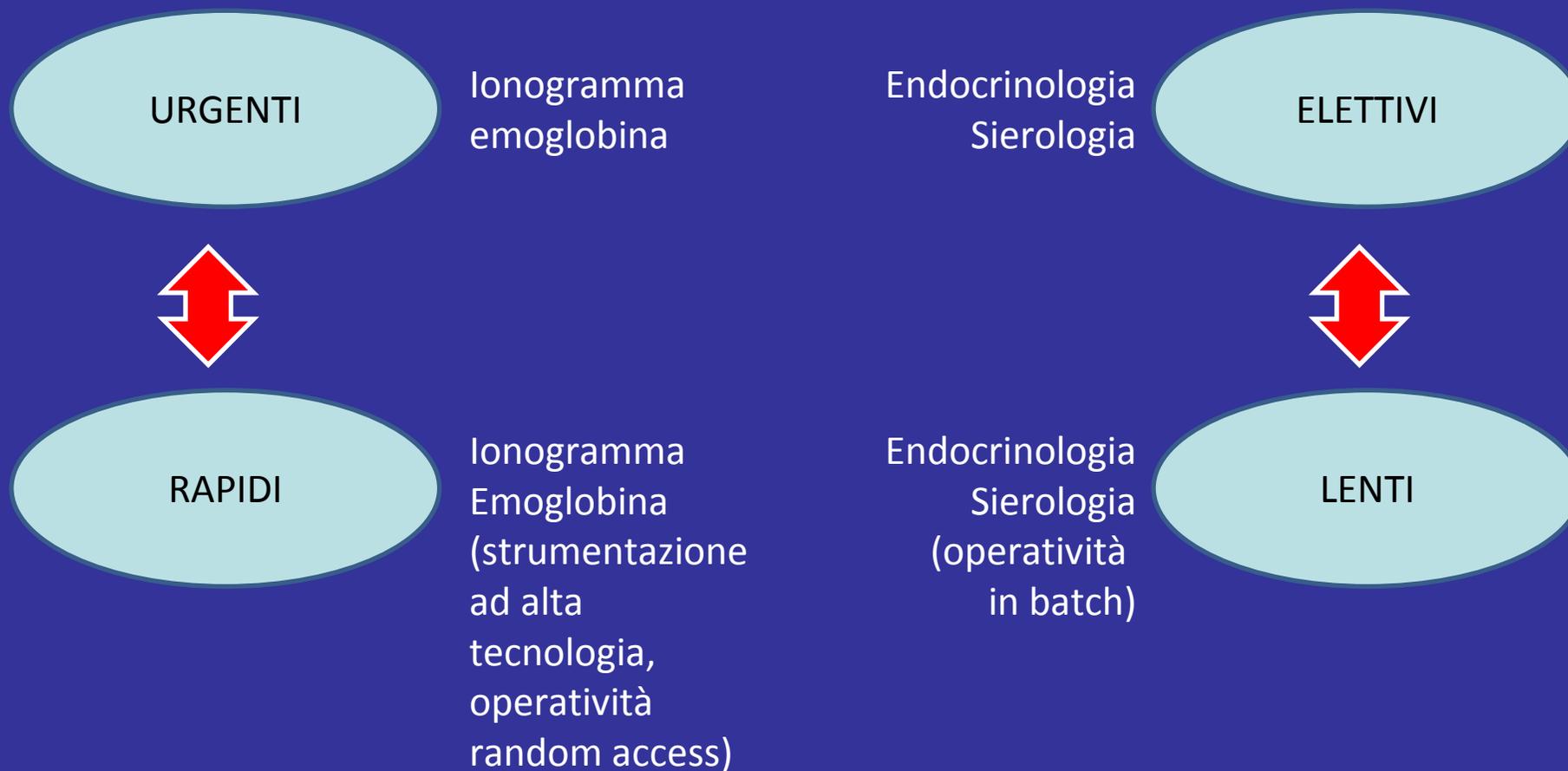
Allergeni ricomb.

NUOVI

ECONOMICI

COSTOSI

Rilevanza temporale degli esami (Urgenza/emergenza) e Tempo di risposta degli esami



Costante di tempo

E' la velocità con la quale un determinato fenomeno evolve:

Modificazione della glicemia in paziente scompensato
(minuti)

Modificazione di parametri legati al metabolismo lipidico
(giorni, settimane)

Sieroconversione
(settimane/mesi)

Linfopenia CD4 nel paziente HIV+ non trattato
(mesi/anni)

IgE specifiche anti-allergene
(lustri, decenni)

A corollario di questo, l'intervallo tra un test ed il suo controllo a distanza dovrà essere estremamente specifico.

Come richiedere gli esami...

Richieste ... a sentimento

Vantaggi: medicina personalizzata, ruolo del medico, istinto clinico, possibilità di diagnosticare qualche patologia “inattesa”, rischio di “incidentaloma” (!)

Svantaggi: rischio di “dimenticare” qualcosa di rilevante

Richieste a protocollo

Vantaggi: stesso tipo di approccio per tutti i pazienti con quello specifico quadro clinico

Svantaggi: rischio di “non rilevare” qualche patologia insospettata

Tanti esami “allargati” o pochi esami “mirati”?

Pannello allargato

1. Aumento dei costi
2. Aumento del rischio di risultati inattesi
3. Aumento delle possibilità di follow-up adeguato

Pannello mirato

1. Controllo dei costi
2. Riduzione del numero di risultati inattesi
3. Rischio di “tempi 0” mancanti

Esistono esami inutili ?

Gli esami inutili: definizione

Sono gli esami il cui risultato non può essere inserito in un modello di patologia

un esame è inutile:

- perchè dà risultati incomprensibili
- perchè il professionista non ne conosce l'interpretazione
- perchè viene effettuato senza un'adeguata preanalitica

Esami inutili ... meglio inappropriati ?

1. Ripetere il gruppo sanguigno o una tipizzazione HLA
2. Dosare le IgE (totali o specifiche) a breve distanza dal precedente dosaggio
3. Chiedere un'elettroforesi entro 7 giorni dalla precedente
4. Fenotipo linfocitario senza sospetto di ID
5. Dosaggio di citochine (e la creatinina ?)
6. Indagini microbiologiche durante trattamento antibiotico
7. Indagini allergiche (PRICK) sotto trattamento antistaminico
8. Test di screening usati come test diagnostici
9.

Esempi di protocolli “ragionati” ad uso interno

- 1. Immunodeficienze primarie**
- 2. Allergie da inalanti**

Immunodeficienze primarie

CLASSIFICAZIONE

famiglia	patologia	emocromo	Ig seriche	fenotipo	C'	fagocitosi
difetti delle cellule B e degli anticorpi	X-Linked Agammaglobulinemia (XLA)	linfopenia	ipogammaglobulinemia	linfociti B virtualmente assenti, ricerca proteina BTK in CMF	NS	NS
	Common Variable Immunodeficiency (CVID) (hypogammaglobulinemia) e Selective IgA Deficiency	apparentemente normale	ipogammaglobulinemia, deficit di IgA	B normali ma funzionalmente difettose; T con vari difetti	NS	NS
	Hyper-IgM Syndrome	neutropenia	IgM elevate, assenza di IgA	NS	NS	NS
	IgG Subclass Deficiency	apparentemente normale	IgG totali spesso normali; deficit di una o più sottoclassi (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4)	NS	NS	NS
Deficit combinati T e B						
Severe Combined Immunodeficiency (SCID)	X-linked SCID	linfopenia T ed NK (grave)	ipogammaglobulinemia	linfociti B funzionalmente danneggiati, pochi linfociti T	NS	NS
	ADA Deficiency	linfopenia grave		deplezione T, B ed NK	NS	NS
	Purine nucleoside phosphorylase (PNP) Deficiency	NS	NS	difetto selettivo e grave della funzione delle cellule T	NS	NS
	Bare Lymphocyte Syndrome (MHC-II deficiency)	NS	NS	difetto di espressione di HLA I e HLA II per deficit di TAP	NS	NS
	Omenit's syndrome	Leucocitosi, eosinofilia, linfocitopenia	Iper IgE	Deficit grave T e B	NS	NS
Partial Combined Immunodeficiencies	Wiskott-Aldrich Syndrome (WAS)	piastrinopenia	IgM basse, IgG e IgA normali, IgE alte	NS	NS	NS
	Ataxia-Telangiectasia (AT)	NS	ipogammaglobulinemia (incostante)	modesto deficit T e B	NS	NS
T cell deficiencies	DiGeorge	linfopenia	spesso normali ma sottoclassi di IgG e IgA possono essere modificate	difetto T isolato, cellule B normali	NS	NS
	Cartilage Hair Hypoplasia			difetto T		
Difetto della fagocitosi	Chronic Granulomatous Disease (CGD)	NS	NS	NBT test patologico	NS	difetto
	Leukocyte Adhesion Defect (LAD)	Neutrofilia	NS	ridotta espressione di CD18/CD15	NS	difetto
	Chediak-Higashi Syndrome (CHS)	granuli giganti nei neutrofili	NS	NBT test patologico	NS	difetto
Difetti del complemento						
altre	Hyper-IgE Syndrome	NS	forte aumento delle IgE	NS	NS	possibile
	Chronic Mucocutaneous Candidiasis	NS	NS	NS	NS	NS

Diagnostica di 1° livello

- Esame emocromocitometrico
 - percentuale e numero dei linfociti,
 - percentuale e numero dei granulociti neutrofili
 - percentuale e numero dei granulociti eosinofili
 - percentuale e numero delle piastrine
- Dosaggio delle Immunoglobuline seriche
 - IgG (ipogammaglobulinemie)
 - IgA (ipogammaglobulinemie selettive)
 - IgM (ipogammaglobulinemie)
 - IgE (sindromi da iper-IgE)

Diagnostica di 2° livello

- Fenotipo dei linfociti circolanti (mediante IFA e CMF)
 - percentuale e numero dei linfociti T, B, cellule NK
 - percentuale e numero dei linfociti “attivati”
 - Analisi di specifiche proteine espresse
 - Analisi della serie mieloide
- Dosaggio delle Immunoglobuline Specifiche
 - IgG/iGM/IgA contro patogeni (VZV, rosolia, morbillo ecc.)
 - IgG, IgA, IgM contro “vaccini” (pneumococco, tossoide tetanico)
- Dosaggio di autoanticorpi
- Dosaggio di proteine del sistema del C’

Diagnostica di 3° livello

- Test di riduzione del colorante nitro blu di tetrazolio (NBT)
 - Fagocitosi
- Test di citotossicità delle cellule natural killer (NK)
 - Attività citotossica
- Test di proliferazione linfocitaria (attivatori policlonali o stimoli specifici)
 - Analisi della risposta immune

La diagnostica di laboratorio delle immunodeficienze

Diagnostica di 4° livello

Patologia	Gene
X-Linked Agammaglobulinemia (XLA)	BTK
Common Variable Immunodeficiency (CVID) (hypogammaglobulinemia) e Selective IgA Deficiency	MHC
Hyper-IgM Syndrome	HIGM1
IgG Subclass Deficiency	IGHG1, IGKC
X-linked SCID	γC
ADA Deficiency	Adenosi-deaminasi
Bare Lymphocyte Syndrome (MHC-II deficiency)	MHC
Omenn's syndrome	RAG1, RAG2, Artemis, IL7Ra
Wiskott-Aldrich Syndrome (WAS)	Cdc42 and Rac GTPases
Ataxia-Telangiectasia (AT)	ATM
DiGeorge	UFD1L

**DIAGNOSTICA DI LABORATORIO
DELLE ALLERGIE DA INALANTI**

La diagnostica di laboratorio delle malattie allergiche

Diagnostica di 1° livello

- Anamnesi
- Test allergici cutanei (prick test)

Diagnostica di 2° livello

- Ricerca delle IgE specifiche
 - Inalanti (miscela alberi, graminacee, acari ecc.)
 - Alimenti (principali allergeni)
 - Farmaci o altre sostanze (su indicazione)

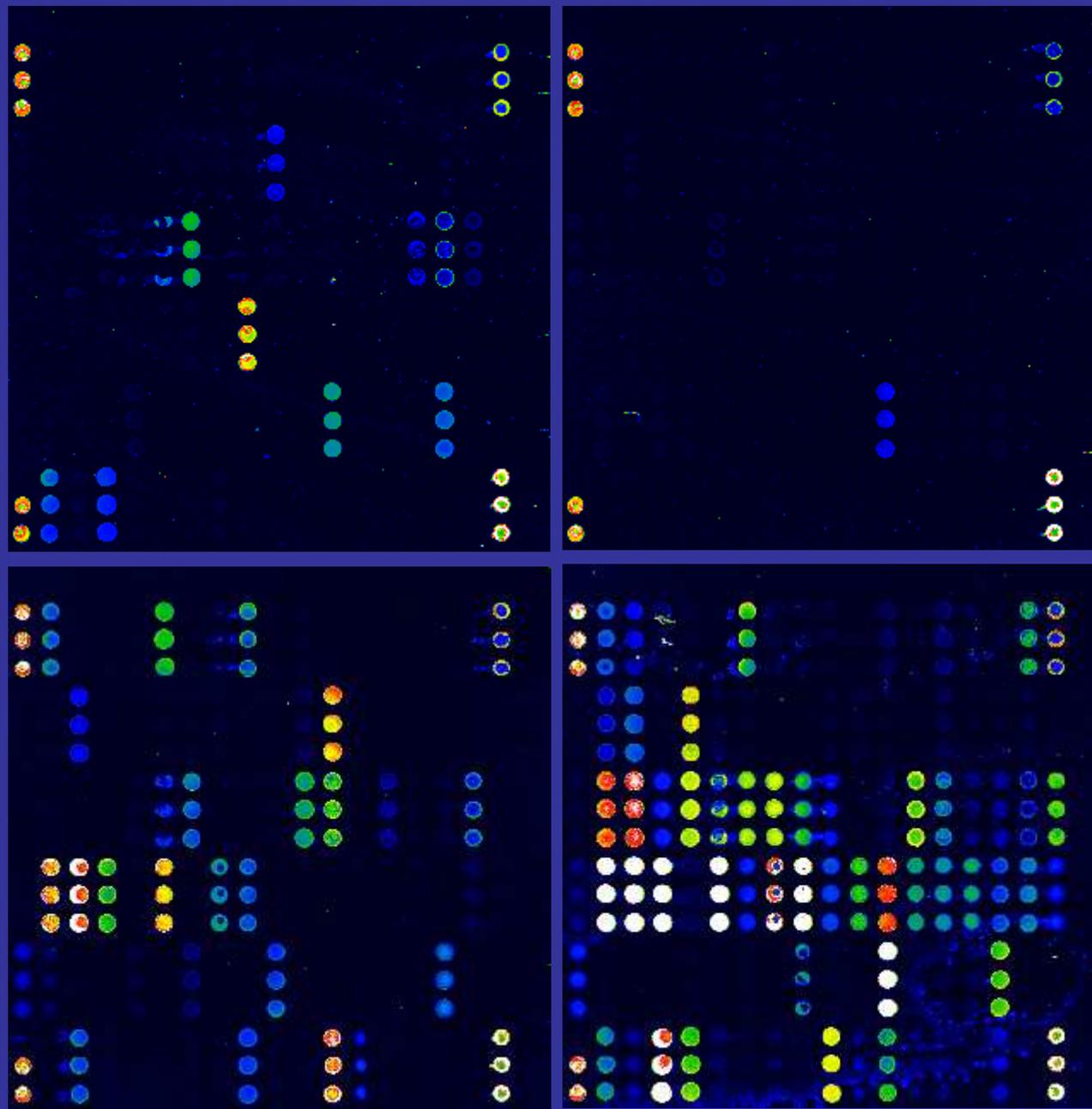
- In caso di positività a:

Graminacee	→	profiline (Phl p12, Bet v2)	
Alberi	→	Bet v1, Pru p1 e altri omologhi	★
Arachide	→	Ara h8	★
Pesca	→	Lipid transfer protein (Pru p3)	★
Crostacei	→	Tropomiosine (Pen a1; Der p10; Bla g7)	
Pesci	→	Parvalbumine (Cyp c1; Gad c1)	

★ Sindrome allergica orale !

Diagnostica di 3° livello

- ISAC
 - 103 differenti allergeni (ricombinanti e estrattivi)
- Flow-2-cast
 - Attivazione “specificata” dei basofili mediante stimolo esogeno (allergeni, farmaci, coloranti ecc.)
- Tryptase
 - Diagnostica dello shock anafilattivo
- Eosinophilic cationic protein (ECP)
 - Diagnostica di malattia allergica (proporzionale a eosinofili)



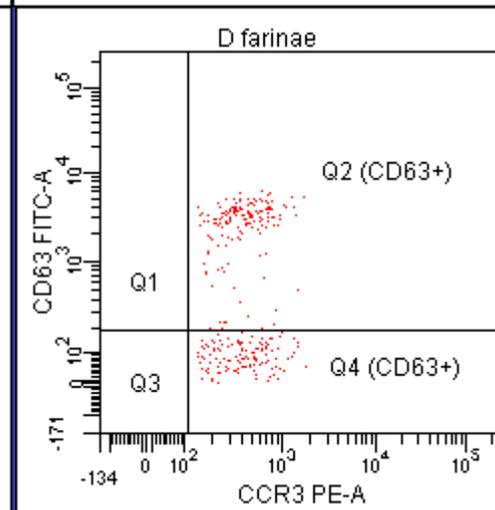
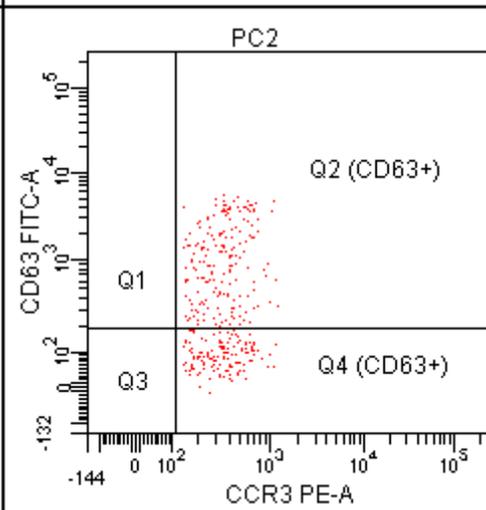
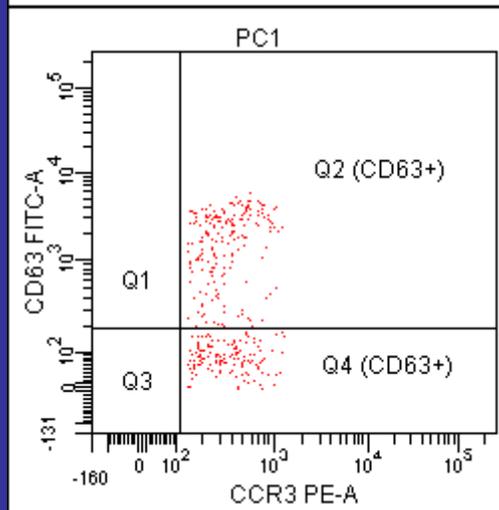
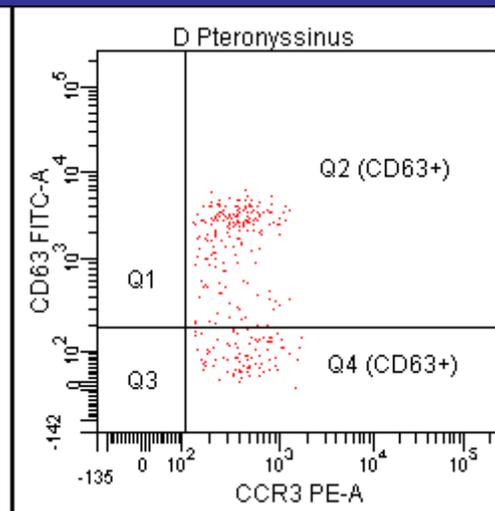
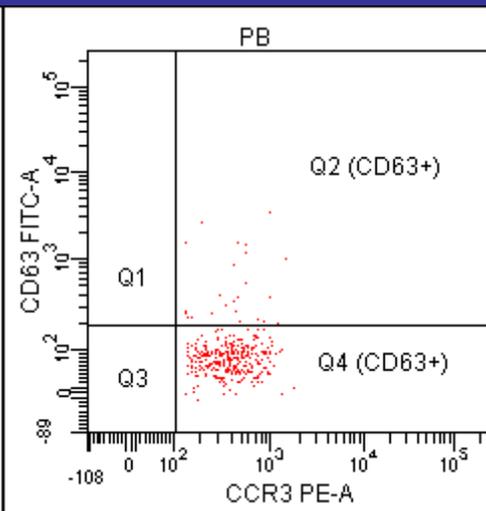
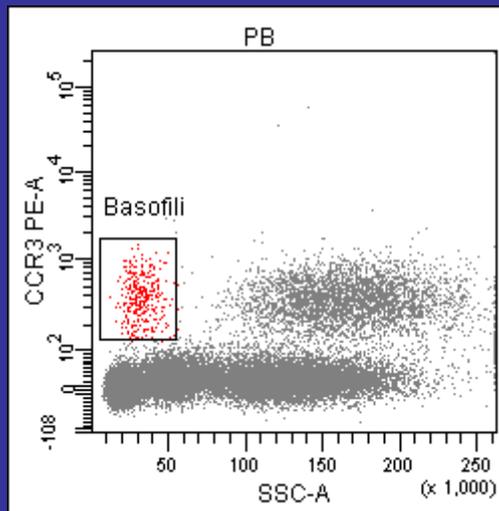
Aggiungere
una didascalia
esplicativa o
togliere

Figura 1

La diagnostica di laboratorio delle malattie allergiche

Diagnostica di 3° livello

- ISAC
 - 103 differenti allergeni (ricombinanti e estrattivi)
- Flow-2-cast
 - Attivazione “specificata” dei basofili mediante stimolo esogeno (allergeni, farmaci, coloranti ecc.)
- Tryptase
 - Diagnostica dello shock anafilattivo
- Eosinophilic cationic protein (ECP)
 - Diagnostica di malattia allergica (proporzionale a eosinofili)



La diagnostica di laboratorio delle malattie allergiche

Diagnostica di 3° livello

- ISAC
 - 103 differenti allergeni (ricombinanti e estrattivi)
- Flow-2-cast
 - Attivazione “specificata” dei basofili mediante stimolo esogeno (allergeni, farmaci, coloranti ecc.)
- Tryptase
 - Diagnostica dello shock anafilattivo
- Eosinophilic cationic protein (ECP)
 - Diagnostica di malattia allergica (proporzionale a eosinofili)

Conclusioni (1)

Per scegliere gli esami da eseguire è possibile utilizzare

1. Scelte estemporanee (?)
2. Protocolli (1)

In entrambi i casi, la scelta degli esami deve essere basata su ...

Conclusioni (2)

1. Urgenza dell'indagine (salvavita ?)
2. Costante di tempo dell'analisi (rapida modifica)
3. Ricaduta fisiopatologica dell'analisi (valore aggiunto)
4. Costo dell'analisi (impatto sociale)
5. Rapporti sinergici tra analiti (matrice diagnostica)