

Bioquímica Clínica y Patología Molecular

* Dr. José G. Castaño

Programa de la asignatura

- * Bloque Bioquímica Clínica
- * Bloque Genética Molecular Humana y Medicina Molecular
- * Bloque Patología Molecular

Objetivos del bloque de Bioquímica clínica

- Tener una comprensión general de
- A. Bases y Criterios de diferenciación de "normal" y "anormal" o "enfermo".
 - B. Validación y significado clínico de un test analítico
 - C. Principales analitos sanguíneos
 - D. Aplicación de los tests de laboratorio en las diferentes exploraciones funcionales.

Libros de consulta para Bioquímica Clínica y Patología Molecular

- * Química Clínica. S. C. Anderson y S. Cockayne. McGraw-Hill.
- * Bioquímica Clínica. J.M. González de Buitrago. McGraw-Hill.
- * Clinical Biochemistry. Metabolic and clinical aspects. Ed. W.J. Marshall and S.K. Bangert. Churchill Livingstone. NY. USA.

Libros de consulta para Bioquímica Clínica y Patología Molecular

- * Human Molecular Genetics. T. Strachan and A.P. Read. Garland Science. 2004
- * The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases. C.R. Scriver et al. McGraw-Hill.
- * Principles of Molecular Medicine. J.L. Jameson et al. Humana Press.

Libros en la red de acceso libre:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Books>

- * Book List
- * Cancer Medicine. 6th ed. Kufe, Donald W.; Pollock, Raphael E.; Weichselbaum, Ralph R.; Bast, Robert C., Jr.; Gansler, Ted S.; Holland, James F.; Frei III, Emil, editors. Hamilton (Canada): BC Decker Inc.; c2003.
- * The Cell - A Molecular Approach. 2nd ed. Cooper, Geoffrey M. Sunderland (MA): Sinauer Associates, Inc.; c2000.
- * Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults. Bethesda (MD): National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI); 1998.
- * Endocrinology: An Integrated Approach. Nussey, S.S. and Whitehead, S.A. Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers, Ltd; 2001.
- * Genes and Disease. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), NCBI.

Libros en la red de acceso libre:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Books>

- * **Introduction to Genetic Analysis.** 7th ed. Griffiths, Anthony J.F.; Miller, Jeffrey H.; Suzuki, David T.; Lewontin, Richard C.; Gelbart, William M. New York: W. H. Freeman & Co.; c1999.
- * **Modern Genetic Analysis.** Griffiths, Anthony J.F.; Gelbart, William M.; Miller, Jeffrey H.; Lewontin, Richard C. New York: W. H. Freeman & Co.; c1999.
- * **Molecular Biology of the Cell.** 4th ed. Alberts, Bruce; Johnson, Alexander; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter, Peter. New York: Garland Publishing; 2002.
- * **Molecular Cell Biology.** 4th ed. Lodish, Harvey; Berk, Arnold; Zipursky, S. Lawrence; Matsudaira, Paul; Baltimore, David; Darnell, James E. New York: W. H. Freeman & Co.; c1999.

Libros en la red de acceso libre:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Books>

- * **The Genetic Landscape of Diabetes [Internet].** Dean, Laura; McEntyre, J.R. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), NCBI; 2004 Jun.
- * **Genomes.** 2nd ed. Brown, T. A. Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers Ltd; 2002.
- * **The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily.** Dean, Michael. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), NCBI; 2002 Nov.
- * **Human Molecular Genetics 2.** 2nd ed. Strachan, Tom and Read, Andrew. Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers Ltd; 1999.

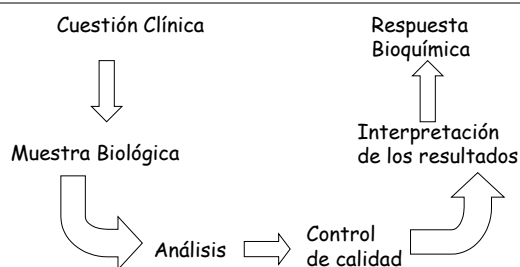
¿Qué es la Bioquímica Clínica?

- * **El uso de la Bioquímica para explicar las bases de una enfermedad**
- * **y/o**
- * **El uso de técnicas bioquímicas para ayudar en el diagnóstico y/o pronóstico de una enfermedad**

Principios de Bioquímica clínica I y II. Objetivos de aprendizaje

- * **1) Entender y valorar adecuadamente los resultados de los tests analíticos clínicos "normal" y "anormal".**
- * **2) Definir y calcular los diferentes parámetros que permiten la validación de un método analítico.**
- * **3) Definir y calcular los diferentes parámetros que permiten juzgar la validez clínica de un test analítico.**
- * **4) Criterios de actuación y resultados analíticos**

El proceso en bioquímica clínica



¿Qué podemos medir?

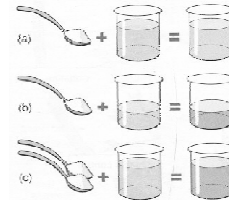
- * **Concentraciones o cantidades de metabolitos, iones o gases**
- * **Presencia y concentraciones de proteínas particulares**
- * **Actividad de enzimas**

¿Cómo se expresan los resultados bioquímicos?

- * **Mayoritariamente de forma cuantitativa**
- * **Cuando se miden metabolitos se expresa su valor en concentración**
 - molar: moles/litro
 - gramos/litro
- * **Cuando se miden enzimas su valor se expresa:**
 - Unidades /litro (μ moles /min o /hora)

¿Por qué cambian las concentraciones de un analito?

- * 1) El volumen de fluido aumenta o disminuye
- * 2) La cantidad del analito aumenta o disminuye



Metodologías analíticas clínicas

- * **Medición de un analito en una determinada muestra biológica:**
 - Sangre
 - Orina
 - Heces
 - LCR
 - Saliva
 - Semen
 - Otros líquidos: Sinovial, pleural, ascítico, pericárdico, amniótico.
 - Muestras sólidas: biopsias, tejidos

¿Para qué hacer un test de laboratorio?

- * **Detectar y cuantificar el riesgo de una futura enfermedad. Screening: Población, muy caros; selectivos (ej: neonatos); individuales en determinados casos.**
- * **Establecer y excluir diagnósticos**
- * **Evaluar la gravedad de una enfermedad y establecer criterios pronósticos**
- * **Guía para la selección de intervenciones**
- * **Monitorizar el progreso de la enfermedad**
- * **Monitorizar la eficacia del tratamiento**
- * **Investigación y docencia**

¿Por qué varían los resultados?

- * **Hay tres tipos principales de variaciones que pueden afectar los tests (y la interpretación de los resultados)**
 - **VARIACION PREANALITICA**
 - **VARIACION BIOLÓGICA**
 - **VARIACION ANALITICA**

Variaciones pre-analíticas: factores técnicos

- * **Correcta identificación del paciente.**
- * **Preparación adecuada del paciente.**
- * **Recogida de la muestra en contenedor adecuado, con preservantes si son necesarios.**
- * **Etiquetado correcto de la muestra del paciente en el contenedor.**
- * **Transporte seguro de la muestra al laboratorio de análisis.**
- * **Condiciones adecuadas de almacenamiento**

Variaciones pre-analíticas: factores biológicos

* Endógenos

- Edad
- Sexo
- Masa corporal

* Exógenos:

- hora toma de muestra: ritmos circadianos
- ejercicio
- stress
- postura
- alimentos
- medicación
- drogas
- Fiebre, trauma, shock

Muestras de Referencia Criterios para obtener muestras Individuos de referencia

Individuo de referencia:

- Subjetivamente se encuentre bien
- Tenga al menos 18 años. Masa corporal adecuada a estatura (poca influencia en la concentración, si en totales)
- No embarazada o en lactancia
- No haber estado en un hospital o gravemente enfermo en el último mes.
- No haber tomado mas de 24g de alcohol en las últimas 24h
- No haber donado sangre en los últimos 5 meses
- No haber tomado ningún medicamento en las últimas 2 semanas (excepto mujeres que estén tomando la píldora)
- No haber fumado en la hora anterior a la toma de la muestra de sangre

Toma de muestra de sangre

* Individuo de referencia

- Estar sentado al menos 15 minutos antes de tomar la muestra de sangre

* Recogida de la muestra

- Heparina-II para suero o plasma, EDTA para hematología
- Procedimiento standard
- Estasis mínimo de sangre

* Manipulación de la muestra (suero y plasma)

- Guardar en oscuridad
- Guardar a temperatura ambiente antes de centrifugar
suero: 0.5-1.5 h, plasma: max 15 min
- Centrifugación: 10 min como mínimo a 1500 g
- Distribuir a tubos secundarios en un máximo de 2h
- Guardar a -80°C en 4h

Toma de muestra de sangre

* Punción venosa: la más habitual

* Punción arterial: gases

* Punción capilar: neonatos, gases

* Líneas centrales

* Puerto implantado

Tubos de separación de muestras de sangre

Validación de un ensayo analítico

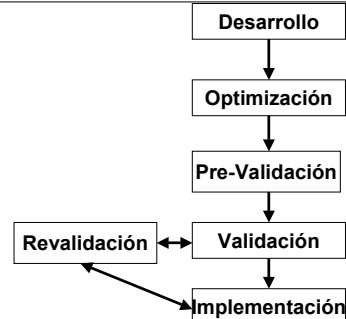
Validación de un procedimiento analítico es el proceso por el que se determina la adecuación de una determinada metodología para proporcionar datos analíticos útiles

“Un método que es valido en una situación puede ser no valido en otra.”

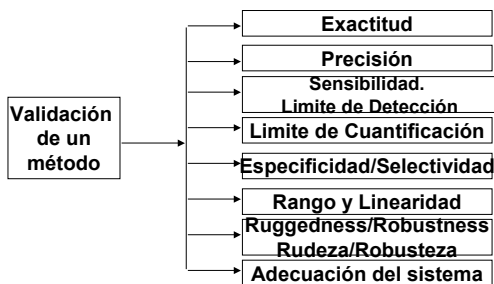
Errores comunes sobre validación de un ensayo

- * Validar un método de ensayo no es optimizar un método de ensayo.
- * Un método validado no es necesariamente un método rígido.
- * La repetición de un mismo método un número de veces no es la validación del método.

¿Cómo evoluciona el desarrollo de un método analítico?



Parámetros para la validación de un método analítico



Exactitud (Accuracy)

- * Exactitud es una medida de lo próximo que está el valor obtenido por un test respecto a un valor considerado como verdadero obtenido por otro método, o respecto a un valor de referencia.
- * La determinación de la exactitud de un método requiere un "gold standard" o un método aceptado con el cual comparamos el nuevo método

La inexactitud de un ensayo: siempre que se conozca no es un problema

- * La inexactitud es la diferencia numérica entre la media de una serie de mediciones de una misma muestra y el valor real de la muestra.
- * Es debida a errores sistemáticos.
- * Puede ser:
 - Positiva (resultado mayor que el valor real),
 - Negativa (resultado menor que el valor real),
 - Constante (igual diferencia en un rango de cantidades)
 - Proporcional (valor relativo proporcional al valor real)

Precisión

Es el grado de concordancia entre los resultados obtenidos de un determinado test cuando el procedimiento se aplica repetidamente a múltiples muestras sacadas de una espécimen único

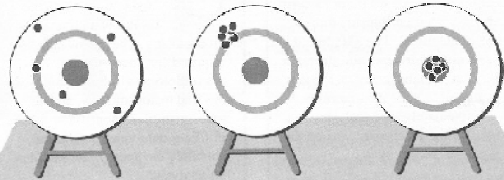
Misma muestra, mismo método, idénticas condiciones

Precisión de un método: indica la reproducibilidad del ensayo

- * En el mismo ensayo
- * En el mismo día (Repetitividad): 10 or 20 replicas por ensayo diario
 - ¿Qué tipo de errores refleja la precisión intraensayo?
- * En distintos días (Reproducibilidad): Se recomienda controles de precisión cada 20 días
 - ¿Qué tipo de errores refleja la precisión interensayo en diferentes días?

Precisión y exactitud

- * EXACTITUD: COMO DE CERCA ESTA EL VALOR MEDIDO DEL VALOR REAL DE LA MUESTRA
- * PRECISION : REPRODUCIBILIDAD DE UN METODO ANALITICO



IMPRECISO PRECISO E INEXACTO PRECISO Y EXACTO

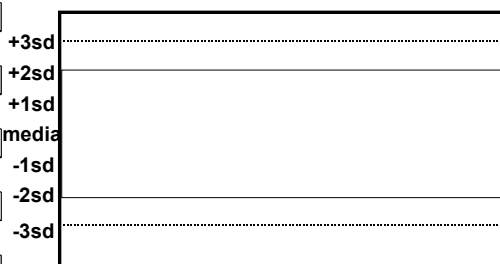
Control de variables preanalíticas (reproducibilidad)

- * Utilización de las gráficas de Levey-Jennings:
 - El laboratorio de análisis debe llevar un control de la reproducibilidad del ensayo
 - De forma visual la representación de los valores obtenidos para los patrones de análisis a lo largo de diferentes días, da una imagen visual muy clara de lo que puede estar pasando

Representación de Levey-Jennings

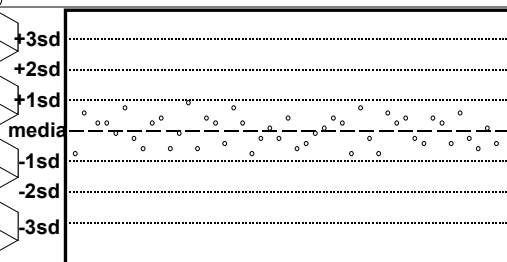
- * El laboratorio analiza durante 30 días un control o patrón y establece su media (representada por una línea y las líneas de valores correspondientes a 1, 2 y 3 SD por encima y debajo de la línea media.
- * A partir de ese momento comienza a analizar muestras y en cada análisis de cada día corre el control correspondiente y lo va poniendo en la gráfica

Representación de Levey-Jennings



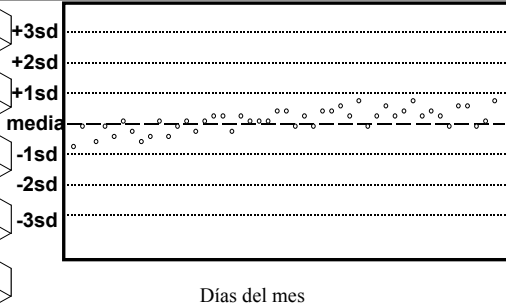
Días del mes

Ejemplo: qué nos dice este diagrama sobre la precisión?

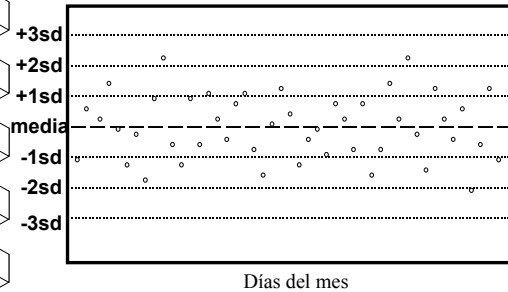


Días del mes

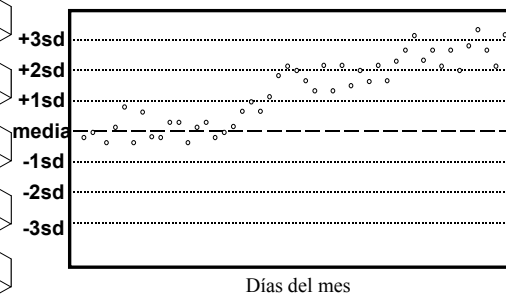
Ejemplo: qué nos dice este diagrama sobre la precisión?



Ejemplo: y este?



Ejemplos: y este?



Sistemas de reglas múltiples

- * Como los diagramas de Levey-Jennings son poco prácticos para la toma de decisiones de control de calidad preanalítica. Se han desarrollado métodos de reglas múltiples para definir los límites específicos para los valores controles.
- * Si los datos de control violan la regla, los datos obtenidos para la muestra no se suministran al médico porque son erróneos

Reglas de Westgard

- * 1_{2s} Un valor control excede la media por más de 2SD y menos de 3SD
- * 1_{3s} Un valor control excede la media por más de 3SD arriba o abajo
- * 2_{2s} Dos valores control consecutivos exceden la media por más de 2SD y menos de 3SD y en la misma dirección
- * R_{4s} La diferencia entre dos controles consecutivos es mayor de 4 SD (van en direcciones opuestas respecto a la media)
- * 4_{1s} Cuatro valores control consecutivos exceden la media en 1SD y en la misma dirección
- * 10_x Diez valores de control consecutivos exceden la media en la misma dirección

Reglas de Westgard

| | | |
|------------|-----------|---------|
| * 1_{2s} | 1 in 20 | Alerta |
| * 1_{3s} | 1 in 300 | Rechazo |
| * 2_{2s} | 1 in 400 | |
| * R_{4s} | 1 in 800 | |
| * 4_{1s} | 1 in 600 | |
| * 10_x | 1 in 1000 | |

“Do not worry about your difficulties in mathematics, I assure you that mine are greater”

* Albert Einstein (1879-1955)

Medida de la precisión de un método

- * Se puede expresar como la desviación standard de los resultados y en las unidades en que se expresen los mismos.
- * Ejemplo
- * Sodio en mmol/L imprecisión: 0,42
- * Esto quiere decir que la medida de sodio en plasma es el valor que se obtenga $\pm 0,42$ mmol/L

Medida de la precisión de un método

- * Es mas adecuado expresarlo como Coeficientes de variación CV
- * El CV= SD x100/Media (no tiene unidades)
- * Ejemplo:
- * Sodio en mmol/L CV 0.3
- * Esto quiere decir que la precisión de la medida de sodio en plasma está afectada por el valor que se obtenga de la media. Si la media es 140; $140 \times 0.3 / 100 = 0.42 = SD$

Medición de la varianza

Dos conjuntos de datos pueden tener medias similares, pero ser muy disitintos. Por ejemplo los valores basales de LH en mujeres y hombres son muy similares, pero hay variaciones mucho mayores en las mujeres que en los hombres.

¿Como expresamos esa variación en los valores?

Varianza

- * La varianaza es el promedio de las diferencias al cuadrado entre los valores individuales obtenidos y la media de dichos valores
- * o lo que es lo mismo la media de los cuadrados, menos el cuadrado de las medias (después de simplificar)

$$V = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2$$

Varianza (simplificación de la formula)

$$\begin{aligned} V &= \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 \\ &= \frac{1}{N} \sum x_i^2 - \frac{1}{N} \sum 2x_i \bar{x} + \frac{1}{N} \sum \bar{x}^2 \\ &= \frac{1}{N} \sum x_i^2 - \frac{1}{N} 2\bar{x} \sum x_i + \frac{1}{N} \bar{x}^2 \sum (1) \\ &= \overline{x^2} - 2\bar{x}^2 + \bar{x}^2 \\ &= \overline{x^2} - \bar{x}^2 \end{aligned}$$

Varianza

- * ¿En qué unidades se expresa?
- * ¿es eso un problema?

Desviación standard SD: es la raíz cuadrada de la varianza

SD no es el promedio de la diferencia entre los valores individuales y la media

$$\sigma = \sqrt{V} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$$

$$\frac{1}{N} \sum |x - \bar{x}| \neq \sqrt{\frac{1}{N} \sum (x - \bar{x})^2}$$

- * ¿En qué unidades se expresa la SD?

Coficiente de variación CV

$$CV = \frac{\sigma}{\bar{x}} \cdot 100$$

Algunas veces se denomina desviación standard relativa (RSD o %RSD)

Ejercicio

¿Cuántas medidas debemos realizar para mejorar nuestra precisión por un factor de 2?

Respuesta: hacer $\sigma = \sigma/2$

Para mejorar nuestra precisión por un factor de 2

$$\frac{1}{2} = 0.5 = \frac{1}{\sqrt{N}}$$
$$\sqrt{N} = \frac{1}{0.5} = 2$$
$$N = 2^2 = 4 \text{ (cuatriplicado)}$$

Ejercicio

¿Cuántas medidas debemos realizar para mejorar nuestra precisión por un factor de 2?

¿Cuántas medidas debemos realizar para mejorar nuestra precisión por un factor de 10?

Respuesta

Para mejorar nuestra precisión por un factor de 10

$$\frac{1}{10} = 0.1 = \frac{1}{\sqrt{N}}$$
$$\sqrt{N} = \frac{1}{0.1} = 10$$
$$N = 10^2 = 100 \text{ Veces!}$$

Ejercicio

¿Cuántas medidas debemos realizar para mejorar nuestra precisión por un factor de 2 ?

¿Cuántas medidas debemos realizar para mejorar nuestra precisión por un factor de 10 ?

* Si un ensayo tiene un CV de 7%, y decides ensayar muestras por duplicado y promediar las medidas ¿cuál será el CV de las mediciones realizadas?

Respuesta: CV duplicado tiene 2N en formula de SD

$$CV_{dup} = \frac{CV}{\sqrt{2}} = \frac{7}{1.41} = 4.9\%$$

Mejora el coeficiente de variación

Variación biológica intrínseca

* El nivel de los analitos varia en cada individuo en torno a su valor homeostático. Esta variación hay que tenerla en cuenta a la hora de la interpretación de los resultados.

* Para ello hay que analizar muestras a lo largo de un periodo de tiempo de un mismo individuo (varias semanas) de forma que otras causas de variación se minimicen

Variación biológica intrínseca

* Variación expresado en CV respecto a media

| Analito | Intraindividuo | Interindividuo |
|--------------------|----------------|----------------|
| Sodio | 0.7 | 0.6 |
| Potasio | 5.1 | 4.4 |
| Bicarbonato | 4.6 | 3.0 |
| Urea | 13.6 | 16.9 |
| Glucosa | 6.2 | 6.4 |
| Colesterol | 5.5 | 14.8 |
| Fosfatasa alcalina | 6.7 | 25.4 |

Variación biológica intrínseca

* Variación expresado en CV respecto a media

| Analito | Intraindividuo | interindividuo |
|--------------------|----------------|----------------|
| Sodio | 0.7 | 0.6 |
| Potasio | 5.1 | 4.4 |
| Bicarbonato | 4.6 | 3.0 |
| Urea | 13.6 | 16.9 |
| Glucosa | 6.2 | 6.4 |
| Colesterol | 5.5 | 14.8 |
| Fosfatasa alcalina | 6.7 | 25.4 |

Variación biológica

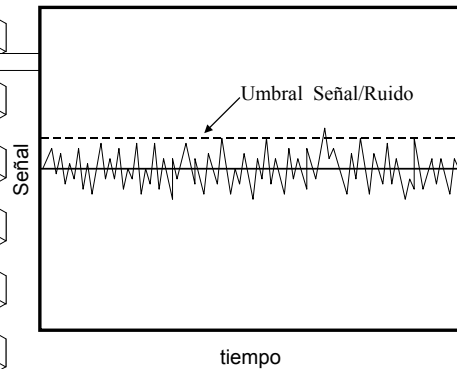
- * La variación interindividuo suele ser mayor que la intraindividual (verde). Pero no siempre es así (amarillo). Cuando no es así, indica que el grado de variación natural alrededor de los valores homeostáticos de un individuo es mayor que el rango de variación entre esos valores homeostáticos entre diferentes individuos

Objetivo analítico

- * El objetivo de un test es que la imprecisión analítica sea menor o igual a la mitad de la variabilidad biológica intrínseca.
- * Expresándolo en coeficientes de variación, el objetivo es que $CV_A < 0 = CV_i/2$. Puesto que la imprecisión total es igual a la raíz cuadrada de los cuadrados de las imprecisiones $CV_{Total} = \sqrt{(CV_A^2 + CV_i^2)}$. Esto indica que el objetivo se consigue cuando $CV_{Total} \cong 1.12 CV_i$

Sensibilidad de un método

- * La sensibilidad de un método se refiere a la menor concentración de un analito que puede detectarse con certeza.
- * La definición operativa de sensibilidad es la concentración de un analito que da lugar a una señal de dos o tres desviaciones standard por encima del fondo (control negativo o blanco).



Otras medidas de la sensibilidad

- * Límite de detección (LOD) se define como la concentración de analito que produce una relación señal/ruido $S/N > 3$.
- * Límite de Cuantificación (LOQ) se define como la concentración de analito que produce una relación señal/ruido $(S/R) S/N > 5$.

Cuestión

Con una relación S/N (S/R) de 5, ¿Cuál es el mínimo coeficiente de variación de la medida? $CV = SD/x \text{ (media)} \times 100$

Si S/N es 5, 20% de la señal medida es ruido, por tanto al azar. Como consecuencia, el CV tiene que ser por lo menos de un 20%.

¿Por qué es útil saber el límite de detección?

- * Porque aquellos valores que se obtienen próximos al límite de detección no son ni precisos, ni exactos. No sirven como datos analíticos.

Especificidad/Selectividad

La Especificidad de un método define la habilidad del método para medir un analito de interés con exclusión de otros componentes que puedan ser relevantes.

La Selectividad describe la habilidad de un método analítico para diferenciar diferentes sustancias en un misma muestra.

Evaluación de un metodo analítico

- * Precisión
- * Sensibilidad
- * Linearidad y Rango

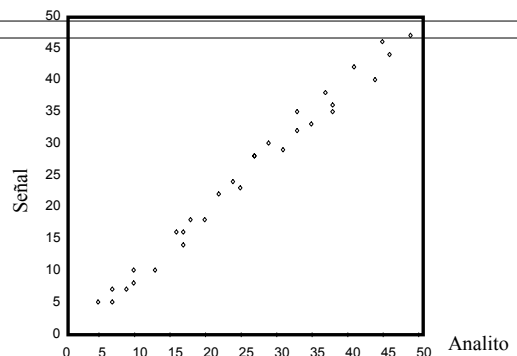
Linearidad del método

- * Una relación lineal entre concentración y señal no es requerida de forma absoluta, pero es altamente deseable. ¿ Por qué ?
- * La linearidad de los métodos analíticos hay que comprobarla periódicamente en el laboratorio

Linearidad y rango de un método

- * La linearidad de un método es la capacidad de producir resultados que son directamente, o través de un transformación matemática bien definida, proporcionales a la concentración de analito en la muestra.
- * El rango del metodo es el intervalo entre el valor más bajo y el mas alto de cauntificación en que el método es lineal.
- * Dentro del rango del método, los resultados son exactos, precisos y "lineales"

Correlación



Regresión lineal (mínimos cuadrados)

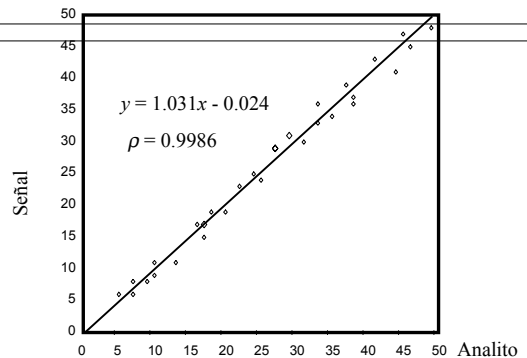
La regresión lineal genera una recta cuya ecuación es

$$y = mx + b$$

donde m es la pendiente de la línea y b es el valor de y cuando $x = 0$ (punto de corte con el eje de las y).

La ecuación calculada minimiza las diferencias entre el valor real de y , el valor obtenido en la recta de regresión.

Correlación



El coeficiente de correlación

* El coeficiente de correlación es una cantidad sin unidades que indica el grado en que X e Y varían en la misma dirección.

* ρ es útil para detectar relaciones, pero no es muy sensible como medida de dispersión.

Limitaciones del método de regresión lineal

Si el método analítico tiene una alta varianza (CV alto), es muy plausible que pequeñas desviaciones de la linealidad no se detecten como consecuencia del error standard de la estimación.

Formas de evaluar la linealidad

- * Visual/regresión lineal
- * Regresión cuadrática

Regresión cuadrática

Para datos lineales la relación puede expresarse como

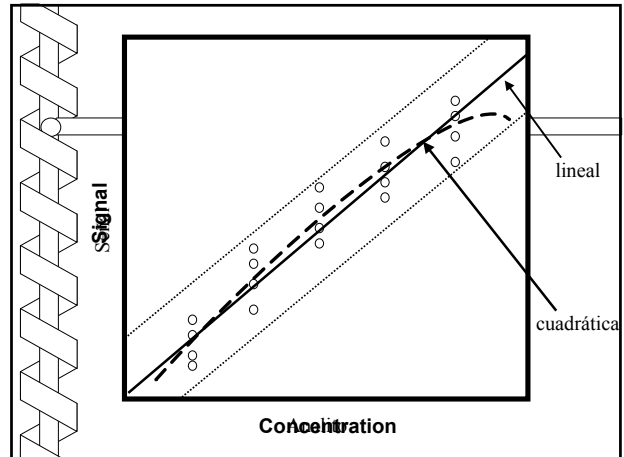
$$y = f(x) = a + bx$$

Regresión cuadrática

Una curva cuadrática se describe por la ecuación cuadrática:

$$y = f(x) = a + bx + cx^2$$

que es idéntica a la lineal más el término cx^2
y se aproxima a la lineal cuando c tiende a 0



Rudeza/Ruggedness Robustez/Robustness

* **Rudeza/Ruggedness** de un método es la reproducibilidad de los resultados de un test obtenidos para muestras idénticas en condiciones normales, pero variables.

* **Robustez/Robustness** de un procedimiento es una medida de la capacidad de permanecer no afectado por cambios pequeños, pero intencionados, en los parámetros del método. Proporciona una indicación de la confianza en el método en su uso normal.

Parámetros típicos: rudeza y robustez

* lotes de compuestos
* ajustes del equipo
* Número de pases de las células
* variabilidad entre pacientes

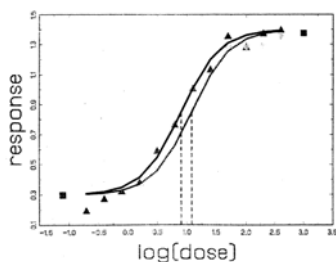
* efectos de congelación/descongelación
* tiempos de incubación
* temperaturas de incubación
* longevidad de los reactivos
* preparación de la muestra
* almacenamiento de la muestra

Rudeza/Ruggedness:
Cambios inevitables

Robustez/Robustness:
Cambios deliberados

Adecuación del sistema de ensayo

Test del paralelismo



× Cuando se representa una curva de dosis del analito de referencia y diluciones seriadas de la muestra a ensayar, se deben de obtener curvas paralelas de respuesta.

Control de calidad

* **Son los mecanismos usados para asegurar que el resultado de un test en particular es:**

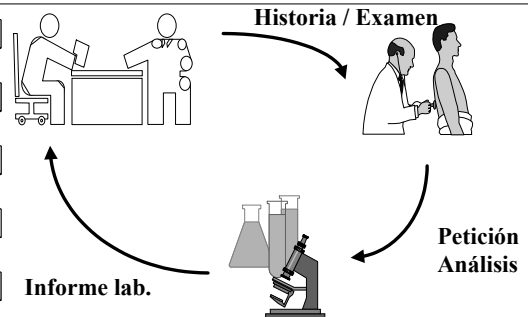
• **preciso, exacto, sensible y específico**

- USAR MUESTRAS CONTROL (CONCENTRACIONES CONOCIDAS)
- USAR ESAS MUESTRAS CONTROL EN CADA TEST, COMPARANDO RESULTADOS DIARIA O SEMANALMENTE
- CONTROL DE CALIDAD EXTERNO: MUESTRAS SUMINISTRADAS CENTRALMENTE PARA VALIDAR LOS TESTS ENTRE DIFERENTES LABORATORIOS.

"If your experiment needs statistics, you ought to have done a better experiment."

Ernest Rutherford (1871-1937)

El proceso clínico



¿Qué debe contener un informe del laboratorio?

- * **Datos demográficos del paciente obtenidos de la petición**
- * **Resultados - de los análisis del laboratorio**
- * **Rangos de los valores de referencia**
- * **Comentarios y consejos - por la experiencia previa**
 - personal
 - basados en computación

Valor clínico de un test

- * **El valor clínico de un test se mide por:**
 - Sensibilidad
 - Especificidad
 - Prevalencia
 - Valor predictivo
- * **Los resultados de un test están basados en la apreciación del rango de valores normales o de referencia**

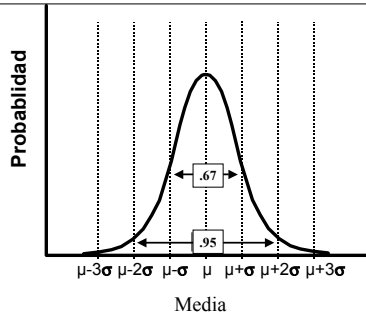
¿Cómo identificar valores anormales?

- * **El Rango Nomal**
 - Define los valores de un test bioquímico encontrados en individuos sanos, frente a los cuales pueden compararse los valores del paciente en estudio.
- * **Es un concepto artificial - no existen límites exactos de la "normalidad"**
- * **Por ello se prefiere el término "Rango de Referencia"**

¿Por qué rango y no normal?

- * **Los valores de un determinado analito en una población pueden ajustarse a una distribución de frecuencias Gaussiana, en este caso sería correcto hablar de normal= rango.**
- * **Lo anterior es excepcional. Es más típico que la distribución de frecuencias de los valores de un determinado analito no sigan una distribución Gaussiana o normal. Por ello se prefiere hablar de rango de referencia.**

Distribución gaussiana

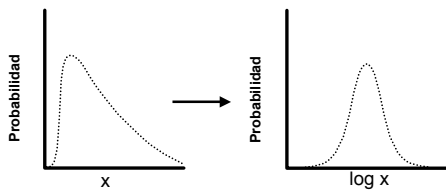


Probabilidades útiles de la distribución gaussiana

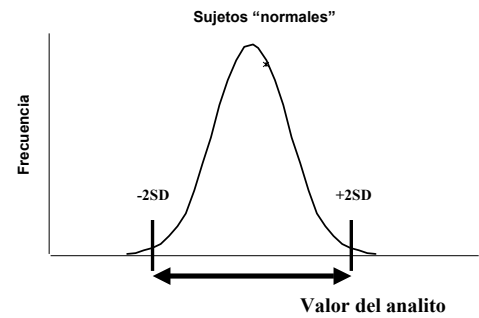
| Rango | Probabilidad | Frecuencia |
|-------------------|--------------|------------|
| +/- 1.00 σ | 68.3% | 1 de 3 |
| +/- 1.64 σ | 90.0% | 1 de 10 |
| +/- 1.96 σ | 95.0% | 1 de 20 |
| +/- 2.58 σ | 99.0% | 1 de 100 |

Individuos Fuera del rango

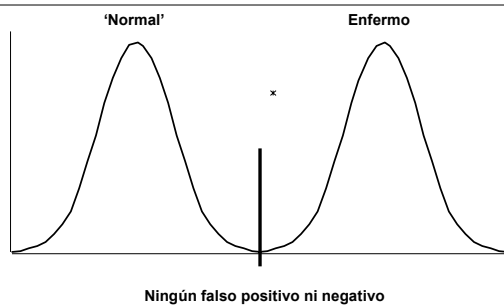
Transformación de datos para obtener distribución Gaussiana



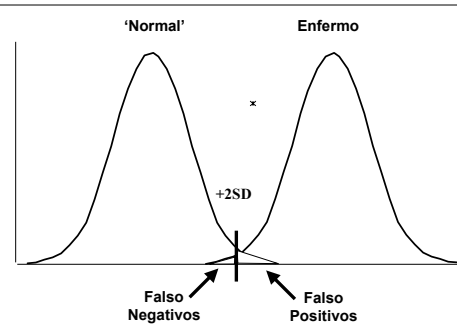
Definición del Rango de referencia



Test diagnostico ideal



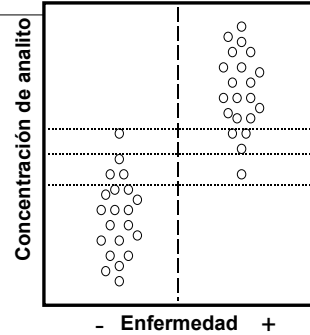
La situación habitual es



Significación de un valor respecto al rango de referencia

- * El rango de referencia de un analito nos indica el intervalo entre la media y 2 S.D. Esto es el 95% de los casos se dará un valor comprendido entre los límites del rango de analito.
- * Por tanto, para que sea significativa la diferencia esta tiene que ser 2.8 x S.D. del test.
- * Porque un valor de un analito exceda ese limite, no necesariamente se puede concluir que es clinicamente significativo.
- * Se tiene que juzgar en referencia a otros datos clínicos o analíticos

Representación directa de rangos



Evaluación clínica de un test

- * La bondad y fiabilidad de un test de laboratorio clínico indica lo bien que define la presencia de una enfermedad.
- * Esto se mide por cuatro parámetros:
 - Sensibilidad
 - Especificidad
 - Valor predictivo
 - Eficiencia

Sensibilidad clínica de un test

- * La sensibilidad de un test indica la probabilidad de que el test sea positivo ante un caso de un enfermo
- Si *TP* número de verdaderos positivos "true positives", y *FN* es el número de falsos negativos "false negative" la sensibilidad se define como:

$$\text{Sensibilidad } y = \frac{TP (VP)}{TP + FN} \cdot 100$$

Se expresa en %

La especificidad clínica de un test

- * La especificidad de un test indica la probabilidad de que sea negativo cuando la enfermedad está ausente
- Si *TN* es el número de resultados verdaderos negativos "true negative", y *FP* es el número de resultados falsos positivos, la especificidad se define como:

$$\text{Especificidad } y = \frac{TN}{TN + FP} \cdot 100$$

Se expresa en %

Análisis de la sensibilidad y especificidad clínica de un test

| Estado de enfermedad | Resultado del test | | Totales |
|----------------------|--------------------|----------|----------------------|
| | Positivo | Negativo | |
| Positivo | TP (V+) | FN (F-) | TP + FN Enfermos |
| Negativo | FP (F+) | TN (V-) | FP + TN sin Enf. |
| Totales | TP + FP | FN + TN | TP + FN + FP + TN |

Análisis de la sensibilidad clínica de un test: $(TP / TP + FN) \times 100$

| Estado de enfermedad | Resultado del test | | Totales |
|----------------------|--------------------|----------|-------------------|
| | Positivo | Negativo | |
| Positivo | TP (V+) | FN (F-) | TP + FN Enfermos |
| Negativo | FP (F+) | TN (V-) | FP + TN sin Enf. |
| Totales | TP + FP | FN + TN | TP + FN + FP + TN |

Análisis de especificidad clínica de un test = $(TN / TN + FP) \times 100$

| Estado de enfermedad | Resultado del test | | Totales |
|----------------------|--------------------|----------|-------------------|
| | Positivo | Negativo | |
| Positivo | TP (V+) | FN (F-) | TP + FN Enfermos |
| Negativo | FP (F+) | TN (V-) | FP + TN sin Enf. |
| Totales | TP + FP | FN + TN | TP + FN + FP + TN |

Ejemplo

De 25 consumidores declarados de cocaína, 23 fueron positivos en orina para benzoilecgonina y 2 dieron negativo. ¿Cuál es la sensibilidad del screening de orina para cocaína?

$$\frac{23}{25} \cdot 100 = 92\%$$

Sensibilidad del test de cocaína en orina = $(23/25) \times 100 = 92\%$

| Estado de enfermedad | Resultado del test | | Totales |
|----------------------|--------------------|----------|-------------------|
| | Positivo | Negativo | |
| Positivo | VP (V+) | VN (V-) | VP + VN sin Enf. |
| Negativo | FP (F+) | TN (V-) | FP + TN sin Enf. |
| Totales | VP + FP | VN + TN | VP + FN + FP + VN |

Ejemplo calculo de especificidad

¿Cuál será la especificidad de cualquier test clínico en uso?
Coge el que quieras

Respuesta

Puesto que los rangos de referencia se situán para incluir los valores del 95% de los individuos sin enfermedad, cabe esperar que el 5% de los valores de individuos sanos se consideren fuera del rango; es decir de cada 100, 5 serán falsos positivos
Por tanto la *especificidad* de los test clínicos no es en general mayor del 95% = 95/95+5

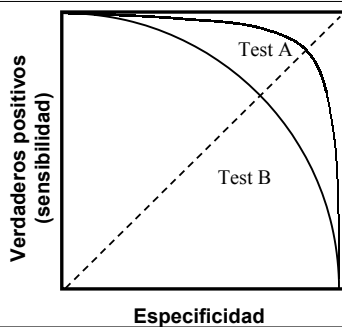
El test ideal

- * El test ideal sería aquel que tiene una
 - alta sensibilidad
 - alta especificidad
- * En la práctica es muy poco habitual:
 - un test muy sensible suele ser poco específico.
 - un test muy específico suele ser poco sensible

Sensibilidad vs. especificidad

- * Sensibilidad y especificidad están inversamente relacionadas
- * ¿Cómo determinamos el mejor compromiso entre sensibilidad y especificidad?

Receiver Operating Characteristic: Curvas ROC de varios test



Valor predictivo de un test

- * El **Valor predictivo** de un test indica la probabilidad de que el resultado de un test clasifique correctamente a un paciente bien en la categoría de enfermo o de no enfermo.

Valor predictivo clínico de un test de laboratorio

El valor predictivo de un test de laboratorio tiene en cuenta la prevalencia de una determinada enfermedad, para cuantificar la probabilidad de que un test positivo se asocie con la enfermedad en un individuo seleccionado al azar, y que un test negativo se asocie con un individuo sano (respecto a esa enfermedad)

Prevalencia de una enfermedad

- * Es el número de individuos enfermos expresado como fracción de la población total y se expresa frecuentemente en %.
- * No es lo mismo que incidencia de una enfermedad.

$$\text{Prevalencia} = \frac{TP + FN}{TP + FN + TN + FP} \times 100$$

Incidencia de una enfermedad

- * **Es el número de individuos que desarrolla de novo una determinada enfermedad respecto a la población total** durante un periodo de tiempo determinado (día, mes, año) También se expresa en % o por miles...

Ejemplo

- * **Has inventando un nuevo test para la enfermedad de Addison**
- * **El test identifica correctamente 98 de 100 pacientes con enfermedad de Addison confirmada (¿Cuál es la sensibilidad?)**
- * **El test fué solo positivo en 2 de 1000 pacientes con ausencia enfermedad de Addison (¿Cuál es la especificidad?)**

Test performance

- * **La sensibilidad es 98.0%**
- * **La especificidad es del 99.8%**
- * **Pero la enfermedad de Addison es rara--- prevalencia = 1:10,000**
- * **¿Qué pasaría si hicieramos el screening a 1.000.000 de personas?**

Análisis

- * **Con la prevalencia indicada, en 1 millón de personas habrá 100 casos de Enfermedad de Addison.**
- * **El test identificará 98 de estos casos (TP)**
- * **De los 999,900 no-Addison, el test será positivo en 0.2%, o sea cerca de 2,000 (FP).**

Para evaluar el impacto de la prevalencia en un test utilizamos: **El valor predictivo**

El valor predictivo positivo es el % de todos los positivos que son realmente enfermos.

$$PV (+) = TP / (TP + FP) \quad X100$$

El valor predictivo negativo es el % de todos los negativos que son realmente no enfermos.

$$PV (-) = TN / (TN + FN) \quad X100$$

El valor predictivo positivo del test de Addison sería:

- * **TP= 98**
- * **FP= 2000**

$$PV_+ = \frac{TP}{TP + FP} \cdot 100$$
$$= \frac{98}{98 + 2000} \cdot 100$$

El valor predictivo negativo sería:

* $TN = 999,900 - 2000 = 997,900$

* $FN = 100 \cdot 0.002 = 0 \text{ (o } 1)$

$$\begin{aligned} PV_- &= \frac{TN}{TN + FN} \cdot 100 \\ &= \frac{997,900}{997,900 + 1} \cdot 100 \\ &\cong 100\% \end{aligned}$$

Resumen del valor predictivo

El valor predictivo describe la utilidad de un test de laboratorio en el mundo real.

O no?

Leciones acerca del valor predictivo

* Incluso cuando tienes un buen test, no es generalmente efectivo por los costos hacer un screening de enfermedades que tienen baja prevalencia en la población general. ¿Excepción?

* Cuanto mas alta sea la sospecha clínica, mayor será el valor predictivo de un test ¿Por qué?

Eficiencia de un test

Se puede combinar PV_+ y PV_- para dar lugar a una cantidad que denominamos eficiencia

$$\text{Eficiencia} = \frac{TP + TN}{TP + FP + TN + FN} \cdot 100$$

La **Eficiencia** de un test es el porcentaje de pacientes que son clasificados correctamente de acuerdo al resultado del test.

Eficiencia en el screening de Addison

$$\frac{98 + 997,900}{98 + 2000 + 997,900 + 2} \cdot 100 = 99.8\%$$

"To call in the statistician after the experiment is done may be no more than asking him to perform a postmortem examination: he may be able to say what the experiment died of."

Ronald Aylmer Fisher (1890 - 1962)

Otros parámetros que ayudan a interpretar clínicamente un test

* Límites para actuación

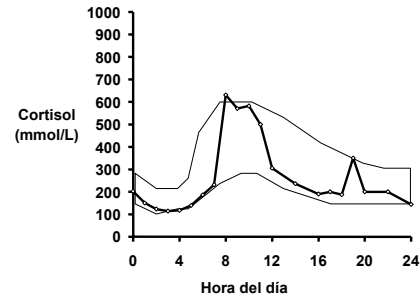
- cortisol. Ritmo de cortisol
- glucosa. Tolerancia oral a la glucosa
- colesterol. Patología coronaria
- paracetamol. Toxicidad hepática

* Rangos terapéuticos - para drogas

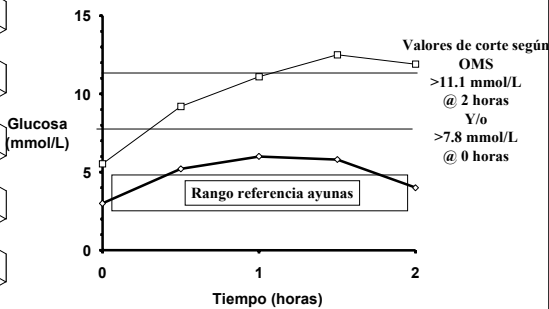
- litio: alteraciones conductuales bipolares
- barbitúricos. Tratamiento Epilepsia
- digoxina. Insuficiencia Cardíaca.

Disparan acción clínica independiente de los valores de rango por considerar otros parámetros

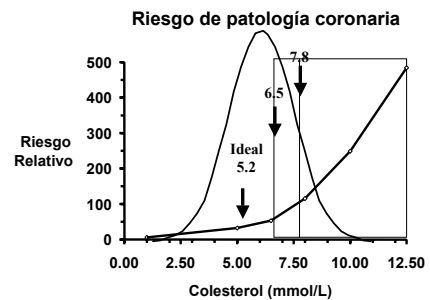
Ritmo diario de Cortisol



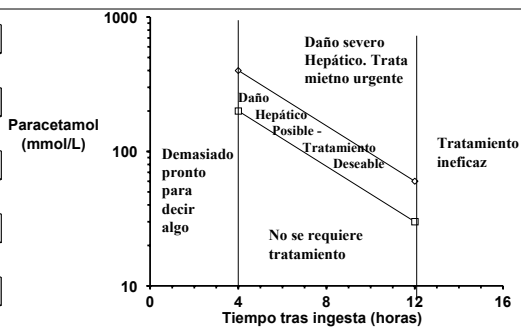
Test de tolerancia de glucosa



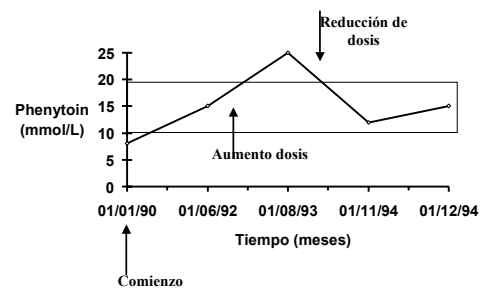
Límites acción: colesterol y riesgo de patología coronaria



Límites de acción: Paracetamol



Monitorización de drogas - Barbitúricos



Conclusión

- * **Los resultados de un test analítico por sí solos, son insuficientes para una correcta actuación.**
- * **Los resultados deben evaluarse con criterio analítico, conjuntamente todos ellos, y con una perspectiva clínica**