

## **Il caso degli anticorpi anti-HCV**

Un paziente effettua nel nostro laboratorio la ricerca degli anticorpi diretti contro il virus dell'epatite C (anticorpi anti-HCV) nel siero. Riceve un referto nel quale è riportata la risposta “*Anticorpi anti-HCV: presenti*”. Alla risposta è stata aggiunta una nota, che recita testualmente “*Nota: sono possibili rarissimi casi di reattività aspecifica, che possono essere individuati mediante test di secondo livello (ad esempio HCV-RNA qualitativo)*”.

Il paziente ripete la ricerca degli anticorpi anti-HCV, questa volta in un altro laboratorio, dal quale riceve un referto nel quale è riportata la risposta “*Anticorpi anti-HCV: assenti*”. A questo punto si rivolge nuovamente al nostro laboratorio, chiedendo una spiegazione di quanto accaduto.

Il caso è particolarmente interessante in quanto consente di discutere in modo articolato un po' tutti gli aspetti delle analisi di laboratorio, sia quelli legati al tema della qualità e dell'organizzazione, sia quelli legati al tema della sensibilità, della specificità e del valore predittivo, sia quelli legati al tema dei test di laboratorio di primo e di secondo livello.

### **1. Qualità e organizzazione**

In tema di qualità in generale il laboratorio che dirigo ([http://www.bayes.it/html/chi\\_sono.html](http://www.bayes.it/html/chi_sono.html)) ha adottato un Sistema di Gestione per la Qualità certificato UNI EN ISO 9001:2008, e questo garantisce il controllo del processo analitico in tutte le sue fasi.

In tema di qualità del processo analitico i controlli di qualità del giorno in cui il paziente ha effettuato nel nostro laboratorio la ricerca degli anticorpi anti-HCV indicavano una situazione perfettamente sotto controllo. Inoltre nel caso di risultati positivi, a scopo di ulteriore conferma, l'analisi viene ripetuta automaticamente dallo strumento, e nel caso specifico questo è stato fatto e i risultati della prima determinazione sono stati confermati con una seconda determinazione (evidenza di questo fatto riportata nell'allegato 1: risultato 1,40 nella prima determinazione e 1,36 nella seconda determinazione).

Dal punto di vista organizzativo nel nostro laboratorio:

- le provette sono identificate al momento del prelievo con una etichetta che oltre alle informazioni per identificare il paziente contiene un codice a barre;
- il codice a barre delle provette è riconosciuto automaticamente dallo strumento sul quale sono eseguite le analisi;
- lo strumento che segue le analisi trasmette automaticamente il risultato al referto.

È pertanto possibile escludere la possibilità di scambi di campione e/o di errori di trascrizione.

### **2. Sensibilità specificità e valore predittivo degli anticorpi anti-HCV**

Chi fosse interessato può trovare le premesse necessarie per la comprensione di quanto andrà dicendo nella trattazione del teorema di Bayes applicato alla diagnostica di laboratorio, che trovate nella pagina [http://www.bayes.it/html/teorema\\_di\\_bayes.html](http://www.bayes.it/html/teorema_di_bayes.html) e nelle pagine a questa collegate.

Data una specifica malattia, un test di laboratorio “ideale” per la diagnosi di detta malattia ha una sensibilità del 100% (è positivo nel 100% dei malati) e ha una specificità del 100% (è negativo nel 100% dei soggetti sani). Un test di laboratorio “reale” ha valori di sensibilità e specificità che non riescono praticamente mai a coniugare il massimo valore di sensibilità con il massimo valore di

specificità. Questo accade in quanto all'aumentare della sensibilità di un test di laboratorio la sua specificità tende a diminuire. Per questo concetto, fondamentale per garantire una corretta interpretazione del risultato delle analisi di laboratorio, si rimanda in particolare alla pagina <http://www.bayes.it/html/informazione.html> e ai documenti ad essa collegati.

Il test che utilizziamo nel nostro laboratorio per la ricerca degli anticorpi anti-HCV ha una sensibilità del 100% e una specificità del 99,17%: in altre parole si tratta di uno dei pochi test reali che è vicinissimo ad avere le caratteristiche di un test ideale. Considerati i valori di sensibilità e specificità sopra riportati, e il fatto che la prevalenza della positività agli anticorpi anti-HCV nella fascia di età del paziente è di circa l'1%, possiamo calcolare con il teorema di Bayes mediante la formula 6.4 riportata nell'allegato 2 il valore predittivo di un test positivo, cioè la probabilità di essere malato per una paziente con il test positivo, che risulta essere uguale a 0,549 ovvero, in percentuale, al 54,9%. Questo significa che un soggetto che risulta positivo al test ha una probabilità del 54,9% di essere un vero positivo, o, in altre parole, che una volta identificati 100 soggetti positivi al test, solamente 55 di questi si riveleranno poi essere veri positivi. Poi quando? Quando verrà eseguito, ai soli soggetti risultati positivi al test di primo livello, un test di secondo livello.

### 3. Test di laboratorio di primo livello e di secondo livello

Gli agenti eziologici di infezioni posso essere ricercati indirettamente, ricercando nel sangue gli anticorpi diretti contro l'agente eziologico dell'infezione che l'ospite produce allo scopo di difendersi dall'infezione, o, meglio, direttamente, isolandoli dal materiale biologico e coltivandoli in vitro, o ricercando il loro materiale genetico, DNA o RNA, direttamente nell'ospite, per esempio laddove possibile nel sangue. Nel caso dell'epatite C è disponibile sia la ricerca (indiretta) degli anticorpi anti-virus dell'epatite C nel sangue, sia la ricerca (diretta) dell'RNA del virus dell'epatite C nel sangue.

La ricerca degli anticorpi viene eseguita per prima in quanto si tratta di un test poco costoso e comunque utile come test da eseguire in prima istanza (test di primo livello). Questo consente di escludere da ulteriori indagini i pazienti che risultano negativi al test. Utilizzando sempre il teorema di Bayes (formula 6.6 riportata nell'allegato 2) possiamo infatti dimostrare che la ricerca degli anticorpi anti-virus dell'epatite C il valore predittivo del test negativo, cioè la probabilità di essere sano per un paziente che con il test negativo, è pari al 100% ovvero che, di 100 soggetti che risultano negativi al test, tutti e 100 sono soggetti sani. Questo significa che un soggetto che risulta negativo al test ha una probabilità del 100% di essere un vero negativo, o, in altre parole, che su 100 soggetti che risultano negativi al test 100 sono veri negativi.

Questa osservazione sta alla base delle strategie diagnostiche (vedere ad esempio anche <http://www.bayes.it/html/strategie .html>) che prevedono, per l'epatite C, di:

- effettuare la prima indagine determinando gli anticorpi anti-epatite C (test di primo livello o test di screening);
- escludere da ulteriori interventi diagnostici i pazienti che risultano negativi al test (senza timore di sbagliare);
- riservare i test di secondo livello solamente ai pazienti con positività degli anticorpi anti-virus dell'epatite C.

Poiché, data una prevalenza della malattia dell'1% e una specificità del 99,17%, su 100 soggetti presi a caso dalla popolazione generale 98 risulteranno negativi al test, potremo escludere da ulteriori indagini 98 pazienti su 100 e dovremo sottoporre ad un test di secondo livello solamente 2 pazienti su 100. Questo modo di impostare la strategia diagnostica consente un evidente e

intelligente risparmio di risorse senza minimamente danneggiare il paziente.

Per l’epatite C sono disponibili due test di secondo livello. Il primo test è il saggio di conferma mediante immunoblotting che ricerca sempre gli anticorpi anti-HCV, ma con un metodo particolarmente sofisticato che fornisce risultati molto accurati. Anche se viene considerato un test di secondo livello, si tratta comunque sempre un metodo di ricerca indiretto. Il secondo test è la ricerca dell’RNA del virus dell’epatite C con metodo qualitativo (HCV RNA qualitativo), che ricerca direttamente nel sangue l’RNA del virus, che è un indice di replicazione attiva del virus. Si tratta quindi un metodo diretto, che ha una specificità migliore rispetto alla ricerca degli anticorpi (con qualsiasi metodo essi siano ricercati), ed è addirittura meno costoso del test di immunoblotting.

Proprio per consentire al clinico che ha in cura il/la paziente la scelta tra questi due test di secondo livello noi preferiamo non eseguire direttamente il test di immunoblotting come “potrebbe” essere fatto in base per esempio alle linee guida della Regione Lombardia (vedere Allegato 3). Ma riportiamo in calce al risultato della ricerca degli anticorpi anti-epatite C, ovviamente nei soli casi in cui essi risultano presenti, la nota “*Nota: sono possibili rarissimi casi di reattività aspecifica (meno del 3 per mille), che possono essere individuati mediante test di secondo livello*”. Questo per lasciare al clinico che ha in cura il paziente la possibilità di decidere se eseguire un test di secondo livello (che potrebbe anche non eseguire se il paziente è al lui noto essere positivo, mentre questo fatto potrebbe non essere noto al laboratorio che non dispone dell’anamnesi e dei dati clinici del paziente) o quale test di secondo livello eseguire.

#### **4. Dato di laboratorio e diagnosi clinica**

Il modo di ragionare probabilistico riportato ai punti 2 e 3, tipico del pensiero scientifico moderno nel quale rientrano ovviamente a pieno diritto le scienze mediche, non è esclusivo del laboratorio ma è ben noto anche ai clinici, tanto che il British Medical Journal (BMJ), la prestigiosa rivista medica molto seguita anche dai medici italiani, ha recentemente riportato un articolo che dal titolo “*Why clinicians are natural bayesians*” (<http://www.bmjjournals.org/content/330/7499/1080.extract>) nel quale si tratta come interpretare i test diagnostici da una prospettiva bayesiana. L’argomento può essere riassunto dicendo che il clinico avveduto tende naturalmente a pensare, e a interpretare i risultati delle indagini effettuate, in modo probabilistico, e a rifuggire da una interpretazione dogmatica e meccanicistica dei risultati delle proprie indagini, sia anamnestiche, sia cliniche, sia di diagnostica di laboratorio o per immagini. Questa flessibilità interpretativa, metodologicamente molto complessa da descrivere, è il fattore chiave per arrivare alla diagnosi.

#### **5. Conclusioni**

In base alle serie di argomenti riportati sopra è possibile concludere che:

- il sistema organizzativo e il processo analitico del laboratorio (punto 1) consentono di escludere nel caso specifico (e in generale in un moderno laboratorio clinico) un mero sbaglio (errore di identificazione, errore di trascrizione, errore analitico);
- il fatto che il paziente abbia avuto in un altro laboratorio un risultato negativo non è significativo. Nessuno dei test attuali per la ricerca degli anticorpi anti-virus dell’epatite C ha una specificità del 100%, e soprattutto i diversi metodi danno risultati falsamente positivi in persone diverse. Quindi a fronte del risultato positivo presso di noi e negativo altrove, vi saranno casi positivi altrove e negativi presso di noi. La strategia corretta in questi casi non è quella di ripetere la stessa analisi in un altro laboratorio, bensì quella di eseguire un test di secondo livello (nello stesso o in un altro laboratorio) nei rari casi di positività del test (1-2% nella popolazione generale);
- la nota al risultato riportata nel nostro referto (vedi punto 3) consente al clinico di attivare le

azioni a seguire in libertà, scegliendo il test di secondo livello più opportuno, magari propendendo per quello più accurato e meno costoso (HCV RNA qualitativo), o addirittura escludendo di eseguirlo se ne sussistono le ragioni, e comunque gestendo, come solo lui con il paziente davanti e con la sua storia e con la sua clinica, e con le ipotesi diagnostiche che ha in mente, può fare, il percorso diagnostico dello specifico paziente.

La conoscenza degli argomenti relativi a sensibilità, specificità, valore predittivo, test di primo livello e test di secondo livello, fa parte del curriculum formativo medico e fa parte integrante della metodologia medica e della buona pratica clinica (vedere ad esempio G. Federspil: “*Logica Clinica. I principi del metodo in medicina.*” Mc Graw-Hill. Milano. 2004) e della medicina basata sull’evidenza (EBM, vedere ad esempio <http://www.gimbe.org/>). Documenti utili per comprendere il teorema di Bayes sono oggi ampiamente reperibili sul web e sulle riviste mediche (vedasi ad esempio punto 4), e sono disponibili a medici e pazienti. Una maggiore conoscenza degli aspetti organizzativi di un moderno laboratorio clinico e del teorema di Bayes può aiutare a comprendere meglio l’informazione fornita dalle analisi di laboratorio, che deve essere interpretata utilizzando il più possibile metodi quantitativi, e in modo articolato e alla luce del contesto clinico.

## **Allegato 1**

Sie/Pl N 00200-2 1234567890 XXXXXX XXXXXX  
20/05/10 HBSAGII HIVCOM A-HCV CMVIGM CMVIGG  
12:21:01 n-reac. n-reac. reac. n-reac. 0.150  
bmserv >Rept <Test  
0.421 0.144 1.40 0.194

Sie/Pl NR 00200-2 1234567890 XXXXXX XXXXXX  
20/05/10 A-HCV  
12:21:01 reac.  
bmserv >Rept  
1.36

## Allegato 2

Per modellizzare il teorema di Bayes nel campo della diagnostica di laboratorio, dobbiamo innanzitutto costruirsi una tabella nella quale riassumere i risultati di un test quantitativo, considerando una classificazione dicotomica tra soggetto malato (indicato con M+) e soggetto sano (indicato con M-) e tra risultato positivo del test (indicato con T+) e risultato negativo del test (indicato con T-).

	T+	T-
M+	T+M+	T-M+
M-	T+M-	T-M-

L'obiezione che in una classificazione dicotomica si perde il senso del risultato numerico viene superata dal fatto che il valore soglia tra T+ e T- può essere variato in continuo "ad-hoc" (lo vedremo successivamente nella parte riservata a teorema di Bayes e strategie diagnostiche).

Definiamo come *sensibilità* la positività del test nei malati (una sensibilità del 100% significa che il test è positivo nel 100% dei malati, una sensibilità del 90% significa che il test è positivo nel 90% dei malati, e così via).

Definiamo come *specificità* la negatività del test nei sani (una specificità del 100% significa che il test è negativo nel 100% dei sani, una specificità del 90% significa che il test è negativo nel 90% dei sani, e così via).

Definiamo infine come *prevalenza* della malattia il numero dei soggetti malati presenti, in un dato istante, nella popolazione (una prevalenza del 5 per mille significa che il 5 per mille delle persone è affetto dalla malattia, e così via).

Esprimendo queste grandezze in termini di probabilità abbiamo le definizioni

	T+	T-	
M+	$P(T+M+)$ [sensibilità]	$P(T-M+)$ [1 – sensibilità]	(6.1)
M-	$P(T+M-)$ [1 – specificità]	$P(T-M-)$ [specificità]	

Alle due principali grandezze, la sensibilità e la specificità, ne va aggiunta un terza, la prevalenza  $P(M+)$ , cioè il numero di soggetti che hanno la specifica malattia presenti, in un dato istante, nella popolazione (in base alla (5.7) sarà  $P(M-) = 1 - P(M+)$  il numero di soggetti che non hanno la specifica malattia presenti, in un dato istante, nella popolazione).

Nel caso di due situazioni mutuamente esclusive (affetto o non affetto dalla malattia A) il teorema di Bayes (5.13) può essere espresso anche nella forma

$$P(A/B) = \frac{P(B/A) \cdot P(A)}{P(B/A) \cdot P(A) + P(B/nonA) \cdot P(nonA)} \quad (6.2)$$

che, sostituendo A con M+ e sostituendo B con T+, può essere riscritta come

$$P(T+/M+) \cdot P(M+)$$

$$P(M+/T+) = \frac{sensibilità \cdot prevalenza}{P(T+/M+) \cdot P(M+) + P(T+/M-) \cdot P(M-)} \quad (6.3)$$

e, decodificando le grandezze mediante la (6.1), letta come

$$P(M+/T+) = \frac{sensibilità \cdot prevalenza}{sensibilità \cdot prevalenza + (1 - specificità) \cdot (1 - prevalenza)} \quad (6.4)$$

La probabilità che un test sia positivo data la malattia,  $P(T+/M+)$  che si trova sulla destra dell'espressione (6.3) deve essere letta come la probabilità dell'effetto (risultato positivo del test) data la causa (la malattia).

La probabilità che la malattia sia presente in un soggetto con un test positivo,  $P(M+/T+)$ , che si trova sulla sinistra dell'espressione (6.3) e della (6.4), deve essere letta come la probabilità della causa (la malattia) dato l'effetto (risultato positivo del test), ed è definita come il valore predittivo del test positivo.

La patologia medica insegna come si comportano i segni data la malattia (l'effetto data la causa). Ci insegna ad esempio che nell'epatite virale di tipo A è presente un aumento moderato delle transaminasi.

La clinica medica, insegna a diagnosticare la malattia dati i segni (la causa dato l'effetto). Un soggetto con aumento moderato delle transaminasi, che probabilità ha di essere affetto da una epatite A?

Il teorema di Bayes consente, conoscendo la prevalenza di una malattia, e la sensibilità e la specificità di un test per la sua diagnosi, di calcolare la probabilità di malattia in caso di test positivo (o la probabilità di assenza della malattia in caso di test negativo). Consente, in altre parole, il passaggio dalla patologia medica alla clinica medica, e fornisce le basi della razionalità della diagnostica di laboratorio e, a un livello superiore, della decisione medica.

Reciprocamente in questa forma del teorema di Bayes

$$P(M-/T-) = \frac{P(T-/M-) \cdot P(M-)}{P(T-/M-) \cdot P(M-) + P(T-/M+) \cdot P(M+)} \quad (6.5)$$

che, decodificando le grandezze mediante la (6.1), può essere letta come

$$P(M-/T-) = \frac{specificità \cdot (1 - prevalenza)}{specificità \cdot (1 - prevalenza) + (1 - sensibilità) \cdot prevalenza} \quad (6.6)$$

la probabilità che la malattia sia assente in un soggetto con un test negativo,  $P(M-/T-)$ , che si trova sulla sinistra dell'espressione, è definita come il valore predittivo del test negativo.

### **Allegato 3**

Nel D.G.R. 23 APRILE 1999 – N. VI/42606 “LINEE GUIDA PER LA CORRETTA APPLICAZIONE DEL NOMENCLATORE TARIFFARIO” della Regione Lombardia alla pagina 17 si legge testualmente “*Nel caso in cui la ricerca di Anticorpi anti Epatite C (91.19.5) fosse positiva, in un paziente non noto come sieropositivo per HCV alla struttura cui si è rivolto, e fosse necessario, per dirimere il quesito diagnostico, eseguire eventualmente il saggio di conferma (91.20.1), quest’ultima prestazione **può** essere eseguita direttamente dallo specialista di laboratorio anche se non espressamente specificato nella ricetta ed è codificata in aggiunta al test di screening (91.19.5).*”. Ho sottolineato io il “può” in quanto non si tratta di un “deve”.