

Linee guida: interferenze nei tests in chimica clinica secondo il documento NCCLS EP/-P

L. Mancini, E. Dolce, M. Tonarini, M. Patrizi

Laboratorio Analisi, Azienda Ospedaliera "San Giovanni Addolorata", Roma

Introduzione

Il National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) è una organizzazione educativa non a scopo di lucro che offre un forum comunicativo per lo sviluppo, la promozione e l'impegno di standards nazionali e internazionali. Fondato nel 1968 e accreditato dall'American National Standards Institute, il NCCLS è basato sul principio che gli standard consensuali volontari sono essenziali per poter eseguire test di laboratorio ad alto livello e poter così garantire la qualità del servizio al paziente. NCCLS rappresenta la comunità dei laboratori di analisi cliniche che vi partecipano sia a titolo individuale che come associazioni di laboratori professionali, di industrie e di enti governativi.

I documenti NCCLS descrivono le procedure di laboratorio, i metodi da banco e di riferimento, ed i protocolli di valutazione applicabili alle principali discipline di laboratorio. Il processo di consenso, in base al quale i documenti vengono rivisti e corretti, consiste di procedure formali che descrivono lo sviluppo di un documento NCCLS ed i criteri per la sua accettazione come standard di laboratorio clinico.

Un documento NCCLS viene pubblicato o come uno standard, o come linee guida o come un rapporto.

Standard. Si tratta di un documento sviluppato per mezzo del processo di consenso e che identifica chiaramente specifici ed essenziali requisiti per materiali, metodi o pratiche da usarsi in forma non modificabile. Inoltre uno standard può contenere elementi a discrezione, che vengono chiaramente identificati come tali.

Linee guida. Documento sviluppato attraverso il processo di consenso e che chiaramente identifica i criteri per una pratica o procedura operativa di carattere generale, o materiali per la comunità del laboratorio clinico. Inoltre le linee guida possono contenere elementi a discrezione, che vengono chiaramente identificati come tali.

Rapporto. Un documento che non è soggetto a revisione di consenso e che viene redatto dal Comitato Direttivo.

Processo del consenso. Il processo del consenso volontario NCCLS è un protocollo che stabilisce criteri formali per:

- l'autorizzazione ad un progetto standard
- lo sviluppo e revisione aperta di documenti

- la revisione di documenti in risposta a commenti degli utenti di laboratorio
- l'accettazione di un documento come standard di laboratorio clinico.

La maggior parte dei documenti NCCLS sono soggetti a due livelli di consenso "proposto" (proposed) e "approvato" (approved). In base al tipo di processo di consenso usato, i documenti possono anche essere soggetti a revisione ad un livello intermedio (tentative).

Proposed. Il documento NCCLS viene sottoposto ad una prima fase di revisione dalla comunità dei laboratori clinici come proposta di standard o linee guida. Il documento viene sottoposto ad ampia ed approfondita revisione tecnica, e ad una globale revisione dei suoi obiettivi, del suo approccio, della sua utilità e viene condotto un controllo riga per riga dei contenuti tecnico ed editoriale.

Tentative. Uno standard o linee guida "tentative" sono sottoposti a commento solo quando un metodo raccomandato implica un'esigenza ben definita di valutazione sul campo o quando un protocollo raccomandato richiede che siano raccolti dei dati specifici. Deve essere rivisto per garantire la sua utilità.

Approved. Uno standard o linee guida "approved" hanno raggiunto il consenso nella comunità dei laboratori clinici. Deve essere rivisto per garantire la conformità al consenso (cioè che i commenti alle versioni precedenti siano stati adeguatamente trattati) e per identificare il bisogno di ulteriori standards.

Gli standard e linee guida NCCLS rappresentano una opinione consensuale sulla buona pratica di laboratorio. I requisiti degli standard e linee guida NCCLS possono essere più o meno restrittivi rispetto alla normativa in vigore. Conseguentemente la conformità a questi standard (o linee guida) volontari non esime l'utente dalla responsabilità di confrontarsi alla normativa in vigore.

Commenti. I commenti degli utenti di laboratorio sono essenziali nel processo di consenso. Tutti possono sottoporre un commento e tutti i commenti sono trattati in base al processo di consenso del Comitato che ha scritto il documento.

Interferenti in chimica clinica

Il documento a cui si fa riferimento, fornisce una linea guida pratica per testare se le sostanze coesistenti in un campione clinico, interferiscono con la misurazione dell'analita ricercato.

Per interferenza clinica, si intende "l'effetto di una sostanza sulla misura nella determinazione della concentrazione o della attività catalitica dell'analita".

L'analita è il componente misurato nel campione. Un interferente è un componente del campione diverso dall'analita che altera il risultato finale.

Gli effetti dell'interferenza possono essere considerati in due modi:

- Assoluto. Il termine di confronto è un campione non contenente la sostanza interferente
- Relativo. Il termine di confronto è un insieme di campioni contenente il livello medio di interferente nel campione del paziente.

L'approccio "relativo" per considerazioni pratiche è il più significativo. Per esempio, l'interferenza causata dalle proteine in un campione contenente 12 g/L, sarebbe dovuta essere determinata dal confronto con un normale campione contenente 7 g/L (che è la concentrazione media di proteina sierica); l'effetto netto è dovuto a 5 g/L, non 12 g/L. L'effetto della concentrazione proteica di 7 g/L nella matrice del siero normale è costante, relativo al vero valore dell'analita e contribuisce all'errore sistematico del metodo. Bianco campioni, pretrattamenti, calibrazione con standard a base di siero, compensazioni matematiche, sono spesso usati per rendere minimo l'errore sistematico dovuto alle interferenze.

Questo tipo di approccio non è interessato agli effetti che sono dovuti alle effettive modificazioni di concentrazione dell'analita precedente all'analisi. Questi effetti possono essere dovuti a:

- interazioni *in vivo* da farmaci (come i cambiamenti in una concentrazione di ormoni dovuti a risposte fisiologiche da farmaco indotto)
- lavorazione dei campioni (come l'alterazione del contenuto in elettroliti, proteine ed acqua dovuto all'evaporazione, emolisi, o contatto prolungato di siero e coagulo)
- raccolta del campione (come il prelievo di un campione da un'infusione intravenosa che contiene l'analita).

Questi effetti possono interferire con l'uso clinico di un risultato, ma non possono essere considerati "interferenze analitiche", perché un metodo analitico "dovrebbe" misurare tutto l'analita nel campione senza riguardo alla sua origine. L'interferenza analitica può causare un artefatto del risultato finale aumentando (interferenza positiva) o diminuendo (interferenza negativa) la concentrazione.

Un interferente può essere presente nel campione da fonti endogene o esogene e può essere:

- prodotto *in vivo* in certe condizioni patologiche (es. bilirubina, lipidi, proteine, emoglobina, ecc.);
- somministrato al paziente durante il trattamento (far-

maci, nutrizione parenterale, plasma dilatatori, anti-coagulanti, ecc.);

- autosomministrato (supplementi, nutrizionali, eccessi di dieta, intossicazione da alcol e droga, ecc.);
- dovuto a contaminazione di campione (anticoagulanti, conservanti, separatori di siero, contenitori di trasporto, ecc.).

Il processo analitico può essere artefatto da un interferente in vari modi:

- Effetti fisici. L'interferente può avere proprietà fisiche (colore, fluorescenza, ecc.) che possono essere rilevate e misurate come analita: può alterare le caratteristiche fisiche del campione (tensione superficiale, viscosità, torbidità, forza ionica, ecc.).
- Effetti chimici. L'interferente può influenzare l'attività enzimatica (per esempio legandosi al sito catalitico degli attivatori metallici, ossidando gruppi sulfidrilici essenziali, ecc.); può inibire la reazione reagendo per esempio con i composti che fanno parte del kit di reazione o inibendo le reazioni dell'indicatore; può alterare la forma dell'analita attraverso formazione di complessi o precipitazione.

L'interferente inoltre, può reagire allo stesso modo dell'analita, avere una reazione incrociata con l'anticorpo nei metodi immunochimici. Può catalizzare una reazione usando il substrato dell'enzima.

L'interferenza può contribuire notevolmente all'errore analitico totale. In generale il risultato di un test analitico può variare dal suo valore reale per un errore sistematico, per imprecisione e per interferenza. Generalmente i test di interferenza si limitano alle condizioni del campione che sono visibili agli operatori del laboratorio: emolisi, ittero, lipemia.

Una interferenza può essere considerata sistematica nel caso di un paziente con presenza di interferente a concentrazione costante (l'errore sarà diverso a diverse concentrazioni dell'interferente); per una data popolazione di pazienti, l'errore dovuto agli interferenti sarà random come le concentrazioni dell'interferente variano e può contribuire significativamente all'errore totale random che influenza i risultati dei pazienti.

Il laboratorio ha un ruolo centrale nell'affrontare il problema:

- usando soltanto metodi la cui suscettibilità agli interferenti è ben compresa e documentata
- ottenendo informazioni per determinare quando la sostanza interferente possa essere presente nei campioni sottoposti ad analisi
- avvertendo il medico quando l'interferenza è sospetta e il risultato può essere inaffidabile.

In questo contesto, hanno grande importanza le ditte produttrici di kit analitici, in quanto hanno le risorse per poter esaminare una vasta lista di interferenti, documentando chiaramente e informando il laboratorio delle valutazioni a cui sono giunte.

Pochi metodi possono essere considerati assolutamente liberi da tutte le interferenze analitiche. Il grado di accettabilità deve essere deciso in base alle richieste mediche.

Il progetto sperimentale per testare l'interferenza dipende dall'accuratezza nella determinazione della concentrazione dell'analita; cioè, quanto è importante clinicamente una piccola discrepanza.

Significato statistico e clinico

La distinzione tra il significato statistico e clinico sarà evidente in questo documento. Mediante una replicazione estesa, noi potremmo trovare effetti statisticamente significativi ma minimi, i quali per tutti gli scopi pratici saranno persi nell'errore random di una routine. Tali piccoli errori, ovviamente, non dovrebbero avere significato clinico. Del resto non ripetendo adeguatamente il nostro test statistico mancherebbe di sufficiente potere per indagare un errore clinicamente importante. I metodi descritti successivamente possono essere usati per determinare la quantità di ripetizioni richieste per evidenziare in quale misura un effetto statisticamente significativo riflette un effetto clinicamente importante.

La ripetizione dell'analisi è necessaria allo scopo di assicurarsi, con un rischio di conclusioni erronee accettabilmente basso, che ogni effetto osservato è realmente provocato dal potenziale interferente e non è attribuibile ad altre cause di variazione casuali.

Il numero di ripetizioni necessarie per ogni campione, dipende da tre fattori:

- l'entità della più piccola differenza considerata clinicamente significativa
- l'intervallo di confidenza richiesto per la stima
- l'imprecisione intraserie del test (deviazione standard).

Sono necessarie ripetizioni del campione per ridurre l'imprecisione analitica a livelli tali da non mascherare possibili interferenze. Il numero di ripetizioni "d" richieste per una affidabile identificazione di una interferenza può essere calcolato con l'aiuto di tabelle pubblicate in letteratura. In pratica il parametro **d** è calcolato dividendo l'effetto minimo dovuto ad interferenza che deve essere rilevato sulla deviazione standard del metodo, secondo la formula

$$\frac{d = \text{effect}}{\text{sd}} \quad (1)$$

Metodi applicabili

Tutti i metodi analitici sono potenzialmente soggetti ad interferenza. Perciò questa linea guida può essere applicata ad una ampia gamma di analizzatori e metodi. Nonostante diversi metodi per un particolare analita possano essere basati sulla stessa ben accettata procedura, le caratteristiche di interferenza possono differire da prodotto a prodotto a causa di sottili fattori non prontamente apparenti.

Le linee guida sono intese per essere applicate a qualsiasi tipo di campione clinico inclusi siero, plasma, sangue intero, fluido cerebro-spinale e urina.

Approccio sperimentale

Ci sono due approcci di base per valutare la suscettibilità di un metodo all'interferenza. Ciascuno ha i propri limiti. Questa linea guida, raccomanda che vengano usati insieme per fornire informazioni complementari. Il *primo approccio* è di aggiungere il potenziale interferente ad una porzione di un pool di campioni clinici e cercare l'errore relativo ad una porzione di controllo dello stesso pool (test di differenza accoppiata). La concentrazione dell'analita nel pool, dovrebbe corrispondere ad un livello decisionale. Testare a più di un livello decisionale può essere appropriato a secondo del tipo di analita. Generalmente è più efficiente condurre uno screening preliminare di una serie di composti a concentrazioni relativamente alte. Se non viene osservato nessun dato clinico significativo, la sostanza può essere considerata "non interferente" e non vi è il bisogno di eseguire ulteriori test. I composti che mostrano un effetto clinicamente significativo, devono essere ulteriormente valutati per determinare la relazione tra la concentrazione dell'interferente ed il grado di interferenza (dose-risposta). Le limitazioni di questo tipo di approccio sono dovute alla natura artificiale dei campioni:

- l'effettivo interferente nel campione clinico può non essere il farmaco originale ma un metabolita
- la matrice del test campione può non rappresentare tipici campioni patologici per l'analita in questione
- la sostanza aggiunta può non essere identica all'interferente nei campioni patologici; per esempio in conseguenza di legami proteici, precipitazione o eterogeneità
- i livelli dei test scelti possono essere troppo alti o troppo bassi per essere reali.

Il *secondo approccio* è cercare risultati in gruppi selezionati di campioni di pazienti. La selezione dovrebbe essere fatta sulla base di:

- malattia (es. campioni da pazienti con problemi cardiaci, renali, o di fegato)
- terapia (es. campioni da pazienti di cui sappiamo che stanno prendendo i farmaci del caso)
- altri costituenti anormali (es. campioni contenenti livelli anormali di bilirubina, lipidi, emoglobina o proteine).

Questo approccio richiede un metodo di riferimento, cioè, un metodo ben caratterizzato con bassa suscettibilità all'interferenza, in modo da stabilire il "vero valore" da poter paragonare. Le limitazioni del secondo tipo di approccio sono correlate alla mancanza del controllo sulle variabili del test:

- questo metodo non può dimostrare una relazione causa effetto; esso può soltanto mostrare una correlazione tra l'errore e la concentrazione di un interferente sospettato
- alcuni costituenti labili sono persi se i campioni non sono freschi
- i pazienti sono generalmente sotto regime di più farmaci, così è difficile identificare la causa dell'interferenza

- il raggruppamento prospettivo di pazienti per malattia e trattamento, può essere molto difficile
- ci sono pochi metodi di riferimento riconosciuti. Quando tali metodi sono pubblicati, essi non sono facilmente adattabili ad una routine di laboratorio e inoltre il metodo di riferimento potrebbe anche essere influenzato dallo stesso interferente.

Nonostante ciò, il secondo approccio può essere utile per individuare interferenti che potrebbero altrimenti non essere osservati, e può essere il solo approccio per indagare l'interferenza da parte del metabolita di un farmaco.

Selezione potenziali interferenti

Un enorme numero di possibili interferenti può apparire nei campioni del paziente. Il numero ed il tipo di sostanze interferenti che devono essere testate dipenderà dallo scopo della valutazione.

Una valutazione per le interferenze dovrebbe essere fatta da:

- un produttore prima di mettere sul mercato un nuovo prodotto. I risultati dovrebbero essere comunicati agli utilizzatori e alle istituzioni di controllo
- una organizzazione indipendente di valutazione intesa ad approvare o ad accreditare un nuovo metodo. I risultati dovrebbero essere disponibili agli utilizzatori, preferibilmente attraverso pubblicazione nella letteratura di chimica clinica
- un laboratorio che ha sviluppato un nuovo metodo. I risultati di interferenza dovrebbero essere pubblicati come parte della valutazione di prestazione.

Una lista globale di potenziali interferenti relativa al metodo dovrebbe essere compilata seguendo le considerazioni sotto elencate:

- identificare l'interferente, i suoi metaboliti e le anomalie biochimiche attese nella popolazione di pazienti per la quale viene richiesto l'analisi; identificare inoltre le anomalie biochimiche più frequentemente trovate nella popolazione generale
- rivelare in letteratura relazioni di interferenze con metodi simili nel principio a quello che viene valutato
- fare una lista di tutte le sostanze che possono essere aggiunte o che possono venire in contatto con il campione *in vitro*: anticoagulanti (eparina, EDTA, citrato, ossalato, ecc.), conservanti (NaF, iodio acetato, acido borico, HCl, timolo, ecc.), separatori di siero usati dal laboratorio (gels, filtri, perle di plastica, ecc.), contenitori di campioni (tubi sottovuoto, contenitori di urine)
- identificazione di sostanze nella dieta con significativa concentrazione (caffeina, beta-carotene, ecc.).

La lista dovrebbe essere rivista e selezionata eliminando sostanze giudicate non probabili interferenti. Il valutatore dovrebbe documentare le ragioni per decidere di non testare le sostanze sulla lista.

Una lista di potenziali interferenti, per limitati test, dovrebbe includere:

- composti non adeguatamente testati dall'industria
- sostanze caratteristiche nella popolazione dei pazienti del laboratorio

- additivi nei campioni comunemente usati in laboratorio
- costituenti alimentari
- contaminazioni potenziali del campione.

Determinazione massimi livelli di test

I test devono essere condotti inizialmente ad alte concentrazioni di sostanza da testare per determinare se essa interferisce con il metodo sotto condizioni come "caso peggiore".

Sostanze endogene. Selezionare la più alta concentrazione attesa sulla base dell'esperienza nella popolazione dei pazienti considerati.

Farmaci e metaboliti. Per il siero plasma o sangue testare il campione a 10 volte la più alta concentrazione riportata per il dosaggio fino alla concentrazione letale del farmaco. Se non è conosciuta la concentrazione attesa nel sangue, presumere che la dose terapeutica sia distribuita in 5 litri e testare a questa concentrazione. Per l'urina determinate la massima quantità eliminata nelle 24 ore e testate 5 volte questa quantità per litro di urina; se l'eliminazione urinaria è sconosciuta, provate 5 volte il massimo dosaggio terapeutico per litro di urina.

Additivi nel campione. Per il siero, plasma, o sangue, testare a 5 volte la concentrazione di additivo consigliata per simulare un prelievo scarso. Per l'urina, testare per ciascun litro di urina, 5 volte la quantità di conservante consigliata per una raccolta di 24 ore.

Sostanze alimentari. Per il siero, plasma, o sangue, testare ai massimi livelli attesi. Per l'urina, testate per ciascun litro di urina, 10 volte la quantità eliminata in 24 ore.

Raccolta di campioni. Lasciare il campione a contatto con il contenitore per 24 ore per estrarre qualsiasi sostanza potenzialmente interferente. Devono essere prese precauzioni contro l'evaporazione del campione o perdita degli analiti labili. Un campione appropriato, identico al campione del test, trattato esattamente allo stesso modo, deve essere incluso nell'esperimento. Se viene trovato un effetto di interferenza, si deve eseguire una serie di test per determinare il grado di interferenza a concentrazioni più basse. Le concentrazioni appropriate sono acquisite diluendo il valore massimo nel pool, con un pool di normali campioni clinici presumibilmente contenenti l'interferente.

Criteri clinici

È importante decidere fin dall'inizio che grandezza di effetto analitico costituisce una interferenza con l'impiego clinico del risultato. Questa decisione è necessaria per interpretare non soltanto i risultati, ma anche per programmare il test in modo da ottenere risultati statisticamente validi.

In assenza di una guida di riferimento, i limiti di interferenza possono essere definiti in termini di imprecisione a lungo termine dell'analisi. Se l'effetto anali-

tico fa parte della variabilità casuale dell'analisi e l'errore incrementale causato dalla sostanza sperimentale non è abbastanza grande da avere un effetto clinico, la sostanza non dovrebbe essere considerata un interferente. In generale è suggerito il valore di 1 deviazione standard. Se una sostanza causa un errore che eccede i criteri stabiliti dei test di verifica, allora la sostanza può essere considerata un interferente e i risultati ottenuti dovrebbero essere presi come potenzialmente errati.

Metodo delle differenze accoppiate

Questa prova è idonea per selezionare una serie di sostanze potenzialmente interferenti ad alta concentrazione. Il presupposto è che i composti che non interferiscono ad una concentrazione alta non sono *probabilmente* interferenti alle concentrazioni più basse. Le sostanze da esaminare sono divise in aliquote ricavate da un pool di base di campioni freschi. Un campione di controllo senza sostanze interferenti, è preparato da un'altra porzione dello stesso pool. Sia i test che i campioni di controllo sono esaminati come campioni da pazienti con ripetizione inserite casualmente nell'ambito di ogni serie analitica.

Materiali per il test. Procurarsi campioni freschi di natura appropriata, da numerosi individui in buone condizioni di salute che non facciano uso di droghe o medicinali.

Adeguare il pool al livello decisionale di concentrazione dell'analita richiesto. Se necessario possono essere utilizzati campioni o pool congelati, non devono essere usati controlli commerciali allo stato liquido perché frequentemente questi contengono additivi, farmaci ed altre sostanze in combinazioni e concentrazioni non verosimili.

Ogni sostanza deve essere utilizzata nella forma più pura disponibile.

Come solventi, se possibile, usare acqua al grado di purezza analitica. Se necessario, dissolvere il composto in HCl, NaOH, etanolo, metanolo. Può essere impiegato il cloroformio ma la sua bassa solubilità impone una diluizione in siero di almeno 1:100. È preferibile evitare acetone ed altri solventi organici a meno che non sia possibile dimostrare l'assenza di interferenze significative.

È importante ridurre al minimo le interferenze da matrice del campione.

Per lo stoccaggio, vanno preparate soluzioni concentrate in diluente appropriato, se possibile, a concentrazioni non inferiori a 20 volte la concentrazione di esame. Questo accorgimento permette di diluire la matrice del campione di non più del 5%. I solventi organici possono richiedere diluizioni molto maggiori allo scopo di evitare interferenze dovute al solvente. In tali casi la soluzione di stoccaggio dovrebbe essere preparata a concentrazioni corrispondentemente superiori allo scopo di ottenere la concentrazione appropriata per il test.

Diluire la soluzione di stoccaggio con il pool di base. Calcolare la concentrazione della sostanza test in base alla concentrazione nota della soluzione di stoccaggio, oppure misurare direttamente la concentrazione se è disponibile una procedura analitica idonea (metodo di riferimento). Osservare attentamente le usuali procedure nella manipolazione del campione: refrigerare i campioni, prevenire l'evaporazione, analizzare rapidamente, minimizzare l'esposizione alla luce, ecc.

Tenere sempre presenti le caratteristiche di stabilità dei potenziali interferenti e degli analiti.

Controllo di qualità. Prima di condurre un esperimento di interferenza, bisogna verificare le caratteristiche dei metodi analitici:

- studi di recupero e di comparazione fra metodi dovrebbero dimostrare che non esistono significativi errori casuali
- la precisione intraserie deve essere accettabile. Una stima affidabile è richiesta per determinare il numero di ripetizioni necessarie per l'esperimento
- studi di "carryover" (trasporto) devono accertare se il risultato di un campione è influenzato dal campione precedente o dai successivi. Se sono dimostrabili fenomeni di "carryover", deve essere messo a punto un disegno sperimentale per distinguere l'effetto "carryover" da effetti di interferenza
- le operazioni devono essere confermate dalle procedure del controllo di qualità.

Protocollo sperimentale. La procedura ideale da seguire in uno studio sulle interferenze con differenze accoppiate, è la seguente:

- determinare la concentrazione appropriata alla quale studiare i potenziali interferenti.
- determinare quale differenza è considerata clinicamente significativa
- determinare il numero di ripetizioni (**n**) necessarie per ogni pool allo scopo di evidenziare una differenza "clinicamente significativa" con meno del 5% di possibilità di dichiarare erroneamente che una sostanza è un interferente
- preparare un pool base di siero o altri materiali clinici
- preparare una soluzione di stoccaggio della sostanza da esaminare
- pipettare un ventesimo del volume della soluzione di stoccaggio. Questo è il campione da testare. Es.: per una quantità volumetrica di 10 mL aggiungere 0.5 mL di soluzione di stoccaggio
- portare a volume con il pool base, miscelare accuratamente
- in un secondo contenitore pipettare una frazione volumetrica di un ventesimo del solvente usato per la preparazione della soluzione di stoccaggio del campione di controllo
- portare a volume con il pool di base, miscelare accuratamente
- preparare **n** aliquote del campione da esaminare; preparare lo stesso numero di aliquote per il campione di controllo
- analizzare i campioni (T) e i controlli (C) in sequenza alternata.

Per es.: C₁ T₁ C₂ T₂ C₃ T₃ ... C_n T_n

C₁ T₀ C_x C_x C₂ T₂ C_x C_x C₃ T₃ ... C_x C_x C_n T_n, nella quale i risultati C_x sono scartati

- registrare i risultati per l'analisi dei dati.

Calcolo dell'interferenza analitica. Calcolare la media e la deviazione standard di ogni serie di risultati (test e controlli). L'interferenza è calcolata come differenza fra la media dei campioni e la media dei controlli

$$\text{Interferenza} = \bar{x}_{\text{test}} - \bar{x}_{\text{controlli}} \quad (2)$$

Questo valore è chiamato "stima puntuale dell'interferenza". Le deviazioni standard dei campioni e dei controlli, sono usati poi per stimare la confidenza statistica che possiamo attribuire ai risultati dell'interferenza.

Calcolo dell'intervallo di confidenza. Calcolare l'intervallo di confidenza al 95% per il vero effetto ignoto di interferenza o errore casuale nel modo seguente

$$(\bar{x}_{\text{test}} - \bar{x}_{\text{controlli}}) \pm 1.96 * \sqrt{\frac{2s^2}{n}} \quad (3)$$

in cui *s* è l'imprecisione intraserie del metodo ed *n* il numero di ripetizioni del campione.

Benché la stima (2) dia la grandezza più verosimile dell'effetto di interferenza, è probabile che il valore reale sia in qualche misura diverso a causa dell'errore sperimentale.

Noi stimiamo comunque che l'interferenza reale è compresa nell'intervallo calcolato con l'equazione (3), con una probabilità di errore del 5%. Se l'intervallo di confidenza include lo zero, il risultato non è considerato statisticamente significativo e non è possibile concludere che esista un reale effetto di interferenza. D'altra parte, è possibile che l'effetto esista e che siano necessari più dati per risolvere il problema.

Metodo dose-risposta

Questo test è usato per determinare la relazione tra la concentrazione della sostanza che crea interferenza e l'intensità dell'interferenza.

Si prepara una serie di campioni, sistematicamente variata solo nella concentrazione della sostanza interferente ad alta, a media ed a bassa concentrazione. Tutti i campioni sono analizzati insieme, in ordine casuale, nello stesso processo analitico. Questo metodo richiede un numero minore di repliche per livello in quanto le informazioni derivano da tutti i campioni ed empiricamente si può risolvere alle minime differenze di concentrazione valutabili e agli intervalli di confidenza.

Protocollo sperimentale. Le fasi del protocollo da seguire per ottenere un tipico esperimento dose-risposta, sono le seguenti:

- determinare l'entità della concentrazione più alta

da testare e quale differenza potrebbe essere considerata clinicamente significativa: ciò potrebbe essere fatto nell'esperimento "differenza accoppiata"

- determinare il numero di repliche, *n*, necessarie per ogni campione
- preparare i livelli alto e basso
- preparare un livello di concentrazione intermedio mescolando delicatamente volumi uguali dei livelli ad alta e bassa concentrazione in un contenitore idoneo
- preparare un livello al 25% mescolando delicatamente un ugual volume dei livelli basso ed intermedio di concentrazione in un altro contenitore
- preparare un livello al 75% mescolando delicatamente un ugual volume dei livelli alto ed intermedio di concentrazione in un altro contenitore
- preparare una aliquota per ogni campione
- analizzare una serie di 5 campioni; per evitare confusione nel contesto delle procedure analitiche, soprattutto per gli errori sistematici (come il carryover), fare partire il primo set di repliche in ordine crescente ed il secondo in ordine decrescente, il terzo in ordine crescente e così via. Questo metodo tende a minimizzare ogni errore sistematico di carryover. Un altro metodo per minimizzare questi effetti è di far partire tutti i campioni e le repliche in ordine casuale
- sottrarre la concentrazione media misurata per la bassa concentrazione da tutti gli altri risultati. Tabulare tutti i risultati.

Calcolo dell'interferenza analitica. La forma della relazione dose-risposta può essere estrapolata mettendo i risultati su un grafico. Sull'asse della *y* verranno riportate le differenze calcolate tra la bassa concentrazione ed ogni livello delle sostanze interferenti; sull'asse della *x* verranno riportate le concentrazioni dell'interferente. Si estrapola subito una correlazione non lineare. Se i dati sono lineari può essere applicato il metodo della regressione lineare. Determinare la pendenza e l'errore residuo (*s_{y*x}*) usando i valori singoli piuttosto che i valori medi. Disegnare la linea di regressione su un grafico per confermare i dati e che l'andamento sia lineare.

Gli effetti delle sostanze interferenti possono essere descritti attraverso una curva di regressione, che è influenzata nel suo andamento dalla quantità dell'interferente.

Calcolo dell'intervallo di confidenza. Possiamo calcolare una banda di confidenza del 95% attorno alla curva del test sperimentale. L'intervallo di confidenza del 95% per l'interferente può quindi essere determinato ad ogni livello dell'interferente.

Notare che la misura dell'intervallo di confidenza varia, come una funzione di *x*, la concentrazione dell'interferente. Per questo motivo, l'intervallo sperimentale alle medie concentrazioni dell'interferente ricade nella zona di confidenza più grande.

Conclusioni

I requisiti di etichettatura sanciscono che un produttore indichi le interferenze conosciute. Coloro che propongono nuovi metodi o metodi modificati, sono tenuti a riportare questi sulla letteratura scientifica. Devono essere date informazioni sufficienti per permettere l'interpretazione dei dati da parte dell'utente e nell'uso di specifiche applicazioni cliniche. Di norma gli utenti dovrebbero essere in grado di verificare le interferenze o le non interferenze dichiarate dal produttore.

Quando i risultati sono basati sulla sperimentazione con pools completi, le seguenti informazioni possono permettere una appropriata interpretazione e verifica delle interferenze dichiarate:

- concentrazioni degli analiti testati
- concentrazioni dei potenziali interferenti
- effetti apparenti osservati
- intervallo di confidenza al 95%
- metodo diagnostico impiegato
- se l'interferenza è confermata con campioni provenienti da pazienti
- modifiche che possono influenzare l'interpretazione.

È ragionevole richiedere qualunque dettaglio ulteriore risulti necessario agli autori o ai produttori allo scopo di verificare le interferenze dichiarate.

Nonostante le raccomandazioni bisogna riconoscere che molti laboratori spesso non dispongono delle riserve necessarie a monitorare e controllare l'ingente quantità di letteratura scientifica che esce ogni giorno. Bisogna spesso affidarsi, per la maggior parte ai venditori di kit diagnostici e di analizzatori per la valutazione delle interferenze. Le indicazioni sull'etichetta

idealmente dovrebbero contenere le seguenti informazioni:

- il massimo effetto atteso per la sostanza alla concentrazione specificata e alle concentrazioni terapeutiche delle sostanze per le quali si studia l'interferenza
- una indicazione concisa di come è stata ottenuta l'informazione
- una dichiarazione se l'interferente costituisce o meno effetto clinico significativo
- una lista di sostanze testate che non hanno arrecato interferenza.

Le informazioni sulle interferenze sui test di laboratorio clinico dovrebbero essere prontamente disponibili nei locali di lavoro di tecnici e medici. Un meccanismo ideale dovrebbe allertare i medici al momento della refertazione del test e scrivere una nota sulla risposta in modo che possa essere subito disponibile per il medico che interpreterà il referto. Probabilmente in molti casi, non è possibile. Potrebbe essere messo a punto con l'ausilio informatico un software sul quale indicare le possibili sostanze interferenti ed al quale il medico possa attenersi. Il dato ottenuto deve considerare la clearance del farmaco, così da aiutare il medico nella somministrazione del farmaco.

Tutti i campioni di cui si è trattato in questo protocollo devono essere considerati potenzialmente infetti. Devono essere seguite tutte le norme di sicurezza applicabili ai laboratori oltre alla buona pratica di laboratorio. Gli strumenti devono essere appropriatamente usati e le operazioni su tutti gli strumenti devono essere fatte in accordo con le norme di sicurezza e le istruzioni dei produttori.