

Misura della concentrazione della albumina del siero: differenti approcci statistici applicati al confronto intermetodi

Cosimo Ottomano¹, Paolo Amboni¹, Arialdo Vernocchi¹, Giampaolo Cattozzo², Carlo Franzini³

¹Laboratorio Analisi, Ospedali Riuniti di Bergamo

²Ospedale F. Del Ponte - A.O. Fondazione Macchi, Varese

³Dipartimento di Scienze Cliniche L. Sacco, Università di Milano

ABSTRACT

Serum albumin measurement: different statistic approaches applied to intermethod comparison

Data from a comparative evaluation of four methods for serum albumin measurement (immunonephelometry, agarose gel and capillary electrophoresis, dye-binding), applied to 100 serum samples covering a wide interval of albumin concentration, were used as a real (non-simulated) model for comparing five methods of statistical analysis. These last included: 4 regression analysis methods (ordinary least-squares regression; Deming and Passing/Bablok regressions; standardized principal component analysis) and the analysis of the differences' distribution. The three distribution-free regression methods gave consistent results, as far as value of the regression coefficients and their significance. Results from the ordinary regression were, on the contrary, somewhat different. Regression analysis, giving separate estimates of both the proportional and the constant components of systematic error, were of some advantage over the differences' distribution approach, but this last gave overall results in substantial agreement with distribution-free regression models. The two basic approaches, regression and differences' analysis gave also similar estimates of the dispersion of single values around the mean estimate of agreement.

RIASSUNTO

I dati ottenuti nel corso di una valutazione comparativa di quattro metodi per la determinazione della albumina del siero (immunonefelometria, elettroforesi zonale su gel di agarosio e capillare, legame con colorante), applicati in parallelo a 100 sieri, i cui valori di albumina coprivano un ampio intervallo, sono stati presi come modello reale (ossia non-simulato) per un confronto di cinque metodi di analisi statistica. Questi comprendevano 4 metodi di analisi della regressione (regressione ordinaria, regressioni di Deming e di Passing/Bablok, componente principale standardizzata) e l'analisi della distribuzione delle differenze. I tre metodi di regressione "distribution free" davano risultati tra loro in accordo per quanto riguarda le dimensioni e la significatività dei parametri della regressione, mentre la regressione ordinaria forniva risultati alquanto differenti. L'applicazione della regressione, fornendo valutazioni separate delle componenti costante e proporzionale dell'errore sistematico, risultava di un certo vantaggio nei confronti della analisi della distribuzione delle differenze, che pure forniva risultati globali sostanzialmente equivalenti. I due approcci fondamentali (regressione e distribuzione delle differenze) fornivano stime sostanzialmente equivalenti anche per quanto concerne la dispersione dei singoli valori attorno alla stima media di accordo.

INTRODUZIONE

Il confronto intermetodi è una tecnologia su base statistica assai importante (1), frequentemente impiegata nel laboratorio di biochimica clinica per la valutazione relativa di differenti metodi (o sistemi analitici) per la misura del medesimo componente, ai fini anche di armonizzare i risultati ottenuti con metodi differenti. Dei tre punti fondamentali per un corretto approccio sperimentale al confronto di metodi (selezione dei campioni, selezione dei metodi di cui possibilmente uno con caratteristiche "di riferimento", valutazione statistica dei risultati), il terzo è probabilmente il più controverso. L'approccio tradizionale a questo punto è stato per anni rappresentato dall'analisi della correlazione/regressione (2), quest'ultima valutata come regressione "ordinaria" con il metodo dei minimi quadrati. Da diversi

anni tuttavia si è posto l'accento sulla inadeguatezza del modello (3,4), basato su alcuni assunti (variabile "indipendente" misurata senza errore; uguale varianza delle due variabili) non sempre rispettati o comunque dimostrati (5,6). Sono stati di conseguenza sostenuti i relativi vantaggi rappresentati da una parte dal ricorso all'approccio completamente differente della analisi della distribuzione delle differenze accompagnata dal supporto grafico del cosiddetto "bias-plot" (7,8), dall'altra dall'analisi della regressione con metodi "distribution free", ossia non basati sugli assunti menzionati. Tra questi ultimi ha incontrato particolare favore la regressione secondo Deming negli Stati Uniti (9), mentre in Europa hanno destato interesse il metodo della componente principale standardizzata (10) e la regressione non parametrica di Passing e Bablok (11).

Nel corso di una serie di confronti inter-metodi per la misura della concentrazione della albumina del plasma si sono rese disponibili 4 serie di dati rappresentati dai valori di concentrazione di albumina misurati con quattro differenti metodi nel medesimo gruppo di 100 sieri aventi valori compresi in un intervallo abbastanza ampio. Nel presente lavoro riportiamo la applicazione di cinque differenti metodi statistici alla valutazione delle differenze sistematiche inter-metodi, discutendo le conclusioni che se ne possono trarre.

MATERIALI E METODI

Si sono utilizzati sieri da 100 campioni di sangue inviati per analisi ordinarie, selezionati in modo da ricoprire intervalli abbastanza ampi di valori di concentrazione di albumina (vedi tabella 2). Le analisi sono state effettuate entro 30 giorni dal prelievo; i campioni sono stati conservati a -20°C ed analizzati in parallelo.

La misura della concentrazione di albumina in ciascun campione è stata eseguita con quattro metodi, comprendenti: determinazione immunonefelometrica, con sistema Image (Beckman Coulter); elettroforesi su gel di agarosio, seguita da colorazione con blu di Comassie e lettura densitometrica con apparecchiatura Hydrasys (Sebia), accoppiata a determinazione delle proteine totali con reazione del biureto con analizzatore Mega (Toshiba, Dade Behring); analisi fotometrica del legame con colorante rosso di bromocresolo con analizzatore Mega (Toshiba, Dade Behring); elettroforesi capillare zonale, con sistema dedicato Capyllaris (Sebia) accoppiata a determinazione delle proteine totali con reazione del biureto con analizzatore Mega (Toshiba, Dade Behring). In ogni caso si sono utilizzati reagenti e calibratori e si sono seguite le istruzioni

operative fornite dalle rispettive Ditte. Tutti i valori di concentrazione di albumina sono stati espressi in g/dL.

Per la analisi statistica descrittiva dei valori ottenuti con i differenti metodi si sono utilizzate statistiche parametriche ordinarie (media e deviazione standard). Per il confronto inter-metodi si è scelto arbitrariamente un metodo (immunonefelometria) come confronto comune per una coppia di metodi, dove l'altro metodo della coppia era rappresentato, alternativamente, da uno degli altri tre metodi. Per la analisi statistica con il metodo della distribuzione delle differenze si è calcolata la media e la deviazione standard delle differenze tra coppie di valori, nonché l'intervallo di confidenza 95 % della media rappresentato da $\text{media} \pm 2\text{ES}$. Per la analisi della regressione si è impiegata la regressione ordinaria (metodo dei minimi quadrati), la regressione secondo Deming, la regressione non parametrica di Passing e Bablok e l'analisi della componente principale standardizzata. I valori di pendenza e di intercetta ottenuti con tali metodi sono stati considerati significativamente differenti da, rispettivamente, 1 (uno) e 0 (zero) se 1 o 0 non risultavano inclusa nell'intervallo di confidenza 95 % del rispettivo parametro statistico.

I calcoli statistici sono stati eseguiti con il pacchetto Method Validator, Philippe Marquis (Biologiste de hopitaux, Metz, France), o con applicativo MS Excel.

RISULTATI

La tabella 1 riporta i metodi inclusi nei tre confronti. La tabella 2 riporta i dati descrittivi della distribuzione dei valori ottenuti con i differenti metodi e delle differenze intermetodi. Le differenze intermetodo per ciascun siero sono riportate contro il corrispondente valore medio (cosiddetto difference-plot) nei diagrammi superiori delle fig-

Tabella 1
Metodi utilizzati nei tre confronti inter-metodo

Confronto	Campioni n.	Metodi	
		X	Y
1	100	Immunonefelometria (INF)	Elettroforesi su gel di agarosio (AGE)
2	100	Immunonefelometria (INF)	Legame con colorante (BCP)
3	100	Immunonefelometria (INF)	Elettroforesi capillare zonale (CZE)

Tabella 2
Analisi statistiche descrittive (distribuzioni) dei valori ottenuti con i quattro metodi e delle differenze nei tre confronti

Confronto	Metodo x			Metodo y			Differenza (y-x)		
	n.	m \pm DS g/dL	Min g/dL	Max g/dL	m \pm DS g/dL	Min g/dL	Max g/dL	m \pm DS g/dL	Inter.confidenza* g/dL
1		3,05 \pm 0,68	1,60	4,48	3,32 \pm 0,74	1,89	4,74	0,27 \pm 0,21	0,22/0,31#
2		3,05 \pm 0,68	1,60	4,48	2,92 \pm 0,71	1,71	5,50	-0,13 \pm -0,24	-0,18/-0,08#
3		3,05 \pm 0,68	1,60	4,48	3,16 \pm 0,65	1,82	4,54	0,11 \pm 0,21	0,07/0,15#

*Intervallo di confidenza 95% della medie delle differenze (media \pm 2SE)

#Media delle differenze significativamente differente da 0

ure 1, 2 e 3, dove la linea tratteggiata orizzontale rappresenta la media delle differenze.

I parametri statistici della regressione, calcolata con quattro diversi metodi, ed i relativi intervalli di confidenza 95 % sono riportati nella tabella 3. Le corrispondenti rappresentazioni grafiche (grafici di dispersione) sono riportate nei diagrammi inferiori delle figure 1, 2 e 3, dove i singoli punti sono confrontati con la retta della regressione secondo Passing e Bablock (linea continua), che è considerato il modello di regressione più corretto (13), e con la retta della equivalenza ($y=x$, linea tratteggiata).

Nella tabella 4 sono confrontati, come indice di dispersione dei singoli valori attorno alla misura media di accordo, le deviazioni standard delle differenze, i valori di deviazione standard residua (Sy/x) nella regressione secondo Passing e Bablok, ed i valori del coefficiente di correlazione "r".

DISCUSSIONE

Nell'ambito del confronto tra metodi, l'analisi statistica descrive la interrelazione tra i dati, rivelando la eventuale esistenza di deviazione sistematica mascherata dall'errore casuale inerente alle due misure. Nei casi in cui la differenza sistematica è marcata, come per esempio accade nelle misure immunochimiche dove entrambi "misurando" e "reagente" possono essere non completamente definiti o comunque eterogenei, il problema può essere di

più facile soluzione. Verosimilmente, metodi statistici applicati anche violando alcuni assunti possono dare una

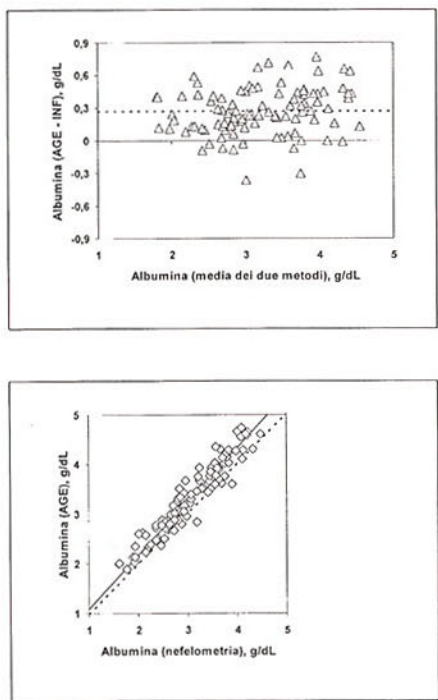


Figura 1
Confronto [elettroforesi su gel di agarosio (AGE)]/[immunonefelometria]. Diagramma superiore: la linea tratteggiata rappresenta la differenza media. Diagramma inferiore: la linea tratteggiata rappresenta la retta della concordanza ($y=x$), la linea continua la retta di regressione secondo Passing e Bablok

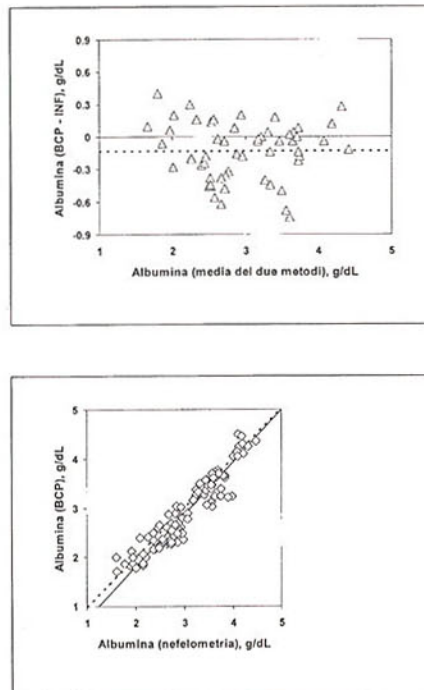


Figura 2
Come figura 1, relativa al confronto [metodo di legame con colorante (BCP)]/[immunonefelometria]

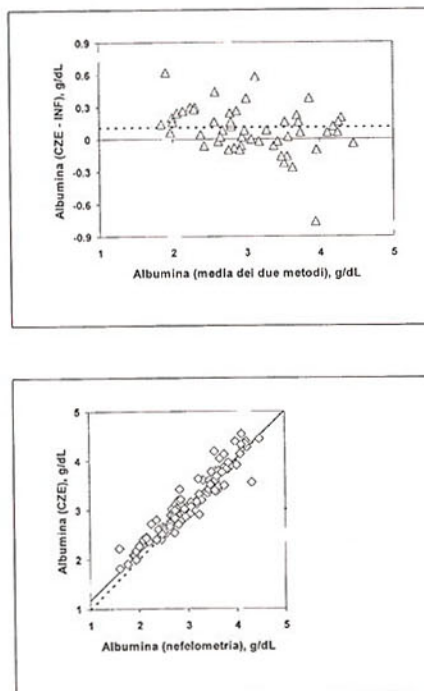


Figura 3
Come figura 1, relativa al confronto [elettroforesi capillare (CZE)]/[immunonefelometria].

Tabella 3

Tabella 3. Parametri della regressione per i tre confronti inter-metodi, calcolati secondo i modelli: regressione ordinaria (metodo dei minimi quadrati); regressione secondo Deming; regressione non parametrica di Passing e Bablok (P.B.); componente principale standardizzata (c.p.s.)

Confronto n.	Pendenza (e relativo intervallo di confidenza 95%)				Intercetta (e relativo intervallo di confidenza 95%)			
	Ordinaria	Deming	P.B.	c.p.s.	Ordinaria	Deming	P.B.	c.p.s.
1	1,02 (0,95/1,08)	1,07* (1,01/1,13)	1,08* (1,01/1,14)	1,09* (1,03/1,16)	0,22# (0,02/0,41)	0,06 (-0,13/0,26)	0,01 (-0,18/0,22)	0 (0,20/0,20)
2	0,98 (0,91/1,05)	1,04 (0,97/1,12)	1,06 (0,97/1,14)	1,04 (0,98/1,11)	-0,07 (-0,29/0,15)	-0,27# (-0,52/-0,02)	-0,31# (-0,55/-0,02)	-0,26# (-0,45/-0,07)
3	0,91* (0,86/0,97)	0,96 (0,89/1,03)	0,96 (0,91/1,02)	0,96 (0,89/1,04)	0,37# (0,19/0,56)	0,24# (0,35/0,43)	0,21# (0,03/0,37)	0,24# (0,01/0,47)

* significativamente differente da 1
significativamente differente da 0

Tabella 4

Parametri della dispersione dei dati attorno alla stima media di concordanza

Confronto n.	Distribuzione delle differenze DS delle differenze	Regressione di P.B. DS dei residui (Sy/x)	r
1	±0,21	±0,22	0,956
2	±0,24	±0,25	0,940
3	±0,21	±0,20	0,953

valutazione realistica della presenza, del tipo (se proporzionale o costante) e della entità di errore sistematico, quando un metodo misura il doppio od il quadruplo di un altro (vedi per esempio 14,15). Quanto più le differenze (sistematiche) sono piccole, tanto più la correttezza dell'analisi statistica può divenire critica.

Nel tentativo di definire in termini comparativi la "bontà" di un approccio rispetto all'altro si è spesso fatto ricorso a modelli simulati (16-19). I dati raccolti nel corso della nostra sperimentazione fornivano invece un modello sperimentale reale, caratterizzato da due elementi favorevoli. Infatti, di fronte all'osservazione che i cattivi risultati della analisi della regressione possono spesso derivare da cattivo disegno sperimentale piuttosto che da inadeguatezza del modello statistico (20), i nostri risultati erano caratterizzati dal fatto che le differenze sistematiche, se esistenti, erano comunque piccole. Inoltre il rapporto tra valore massimo e minimo misurato (compreso tra 2,49 e 3,33) era tale da considerare la numerosità del campione ($n = 100$) adeguata ad una stima corretta dei parametri della regressione (19). Pertanto ci è sembrato interessante applicare a tali dati diversi modelli statistici, valutando comparativamente le conclusioni che essi permettevano di raggiungere.

L'analisi della distribuzione delle differenze mostra che in ogni caso esiste una differenza media statisticamente significativa tra ciascuno dei metodi confrontati ed il comune metodo di confronto, indicativa di una modesta ma significativa sovrastima (differenza positiva, confronti 1 e 3) o sottostima (differenza negativa, confronto 2) dei primi rispetto al secondo. L'osservazione dei difference-plots non consente di trarre sicure conclusioni, che comunque

sarebbero soggettive, circa la variazione della differenza in funzione della media, a causa della dispersione dei dati.

I risultati del calcolo della regressione consentono due osservazioni principali.

In primo luogo si osserva che i tre metodi "distribution-free" (Deming, Passing e Bablok e componente principale standardizzata) consentono di calcolare parametri di regressione (pendenza ed intercetta) sostanzialmente equivalenti tra loro per quanto concerne il valore assunto dal parametro ed equivalenti per quanto concerne la loro significatività statistica (tabella 3). Nel confrontare tali tre modelli con la regressione "ordinaria" si osserva invece che questa ultima genera parametri di regressione alquanto differenti, sia per quanto concerne i valori assunti dai parametri medesimi, sia in relazione alla loro significatività statistica, pur con qualche eccezione in questo ultimo caso (pendenza nel confronto 2 ed intercetta nel confronto 3, tabella 3).

In secondo luogo, pur essendo lo scostamento sistematico medio (nei tre confronti "distribution-free") abbastanza vicino a quello evidenziato dalla distribuzione delle differenze, la analisi della regressione consente una stima separata delle componenti costante (intercetta) e proporzionale (pendenza) dell'errore sistematico. Questa distinzione non è triviale, poichè il tipo di errore in causa (o prevalentemente in causa) può indirizzare gli interventi correttivi finalizzati alla equalizzazione dei risultati, se ritenuta necessaria.

Il problema della corretta valutazione dei risultati di confronto tra metodi, ai fini di evidenziare la presenza di scostamento sistematico, non è semplice. Ciò è anche evidenziato dai numerosi approcci grafico-statistici sugge-

riti, in alternativa a quelli qui adottati, per la soluzione di tale problema (21-24). L'applicazione di tre metodi di regressione "distribution-free" ad un modello sperimentale reale ha permesso qui di constatare che essi forniscono risultati sostanzialmente equivalenti tra loro ma alquanto differenti da quelli della regressione ordinaria. Questa ultima dovrebbe quindi essere abbandonata a favore di una delle prime. Il metodo della distribuzione delle differenze fornisce indicazioni corrispondenti, ma meno analitiche: può essere considerato forse un utile complemento ma non un sostituto della regressione (25). Sia la regressione che la distribuzione delle differenze sembrano fornire equivalenti valutazioni della dispersione dei dati attorno alla media (tabella 4).

RINGRAZIAMENTI

Caterina Defendenti, Ospedale Fatebenefratelli, Milano, ha curato l'effettuazione delle misure.

BIBLIOGRAFIA

- Haeckel R. Evaluation methods in laboratory medicine. VCH, Weinheim, Germany, 1993.
- Westgard JO, Hunt MR. Use and interpretation of common statistical tests in method-comparison studies. *Clin Chem* 1973;19:49-57.
- Wakkers PJN, Hellendoorn HBA, Op De Weegh GJ, Heerspink W. Applications of statistics in clinical chemistry. A critical evaluation of regression lines. *Clin Chim Acta* 1975;64:173-84.
- Cornbleet PJ, Gochman N. Incorrect least-squares regression coefficients in method-comparison analysis. *Clin Chem* 1979;25:432-8.
- Besozzi M, Franzini C. Impiego della regressione lineare nel confronto tra metodi: approccio critico. *Giorn It Chim Clin* 1983;8:37-51.
- Besozzi M, Franzini C. Impiego della regressione lineare nel confronto tra metodi: nuove tecniche statistiche parametriche e non parametriche. *Giorn It Chim Clin* 1986;11:29-41.
- Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *The Lancet* 1986; February 8:307-10.
- Hollis S. Analysis of method comparison studies. *Ann Clin Biochem* 1996;33:1-4.
- Martin RF. General Deming regression for estimating systematic bias and its confidence interval in method-comparison studies. *Clin Chem* 2000;46:100-4.
- Feldman U, Schneider B, Klinkers H. A multivariate approach for the biometric comparison of analytical methods in clinical chemistry. *J Clin Chem Clin Biochem* 1981;19:121-37.
- Passing H, Bablok W. Comparison of several regression procedures for method comparison studies and determination of sample size. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part II. *J Clin Chem Clin Biochem* 1984;22:431-45.
- Bablok W, Passing H, Bender R, Schneider B. A general regression procedure for method transformation. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part III. *J Clin Chem Clin Biochem* 1988;26:783-90.
- Payne RB. Method comparison: evaluation of least squares, Deming and Passing/Bablok regression procedures using computer simulation. *Ann Clin Biochem* 1997;34:319-20.
- Tamarin S, Bionaz S, Manes M, Cristoferi M. Determinazione dell'osteocalcina nella diagnosi differenziale dell'osteopatia uremica: aspetti metodologici. *Biochim Clin* 1993;17:71523.
- Pepe F, Patrucco G, Cerrato D. Determinazione del recettore solubile della transferrina: valutazione di un metodo immunoturbidimetrico applicato all'analizzatore automatico Mega. *Biochim Clin* 2001;25:379-81.
- Eksborg S. Evaluation of method-comparison data (Letter). *Clin Chem* 1981;27:1311-2.
- Linnet K. Evaluation of regression procedures for methods comparison studies. *Clin Chem* 1993;39:424-32.
- Stockl D. Beyond the myths of difference plots (Letter). *Ann Clin Biochem* 1996;33:575-7.
- Linnet K. Necessary sample size for method comparison studies based on regression analysis. *Clin Chem* 1999;45:882-94.
- Stockl D, Dewitte K, Thienpont LM. Validity of linear regression in method comparison studies: is it limited by the statistical model or the quality of the analytical input data? *Clin Chem* 1998;44:2340-6.
- Lin LI-K. A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. *Biometrics* 1989;45:255-68.
- Bartko JJ. General methodology II. Measures of agreement: a single procedure. *Statistics in Medicine* 1994;13:737-45.
- Krower JS, Monti KL. A simple, graphical method to evaluate laboratory assays. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995;33:525-7.
- Magari RT. Evaluating agreement between two analytical methods in clinical chemistry. *Clin Chem Lab Med* 2000;38:1021-5.
- Dewitte K, Fierens C, Stockl D, Thienpont LM. Application of the Bland-Altman plot for interpretation of method-comparison studies: a critical investigation of its practice (Letter). *Clin Chem* 2002;48:799-801.