

Analisi nefelometrica di proteine del plasma: valutazione di un nuovo strumento

Ilenia Infusino, Anna Pagani, Sara Salti^f, Massimo Griffini^f, Carlo Franzini^{*}

Università degli Studi di Milano, Scuola di Specializzazione in Biochimica Clinica

[#]Radim Group Pomezia Roma

^{*}Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Scienze Cliniche L. Sacco

ABSTRACT

Nephelometric measurement of plasma proteins: evaluation of a new instrument

The aim of this study was to evaluate a new dedicated immunonephelometer for plasma proteins determination. We estimated the instrument's performance in the measurement of immunoglobulins (IgG, IgA, IgM), transferrin and C-reactive protein. We considered: system stability with or without repeated calibration; linearity; overall analytical imprecision; turbidity interference; inter-methods comparison by using Beckman Image and Roche Modular as alternative systems. The results can be considered "state of the art" concerning overall imprecision (CV values between 3.7% and 15.6%), stability, linearity and sensibility to turbidity. Inter-methods comparison showed systematic differences, generally smaller than the critical differences except for IgA, which showed, at the upper limit of the reference interval, an inter-methods systematic difference (-15.6%) correspondent to the critical difference's value ($\pm 15.5\%$).

RIASSUNTO

In questo lavoro sono state valutate le prestazioni analitiche di un nuovo immunonefelometro dedicato per la misura delle proteine del plasma. Sono state valutate le prestazioni nella misura delle immunoglobuline (IgG, IgA, IgM), della transferrina e della proteina C-reattiva. Sono state prese in considerazione: stabilità del sistema con e senza calibrazione ripetuta; linearità; imprecisione analitica globale; influenza della torbidità; confronto inter-metodo, utilizzando Beckman Image e Roche Modular come sistemi di comparazione. Globalmente i risultati ottenuti possono essere considerati "stato dell'arte" per quanto riguarda imprecisione globale (valori di CV compresi tra 3.7% e 15.6%), stabilità, linearità e sensibilità alla torbidità. Nel confronto inter-metodi si sono rilevate differenze sistematiche, che peraltro risultavano inferiori alla differenza critica anche marcatamente con l'eccezione della IgA, che al livello superiore dell'intervallo di riferimento mostrava differenze sistematiche con il metodo di confronto (-15.6%) corrispondenti ai valori di differenza critica ($\pm 15.5\%$).

INTRODUZIONE

La misura delle proteine specifiche del plasma viene oggi prevalentemente eseguita con analizzatori automatici, che applicano i principi di immunoturbidimetria o immunonefelometria (1-3). Tali tecniche ottiche, che misurano rispettivamente la luce trasmessa residua e la luce diffratta dalle particelle di immunocomplesso sospese nel campione, hanno ottenuto negli ultimi anni notevole sviluppo per la vantaggiosa praticabilità e precisione di misura consentite.

Attualmente le ditte produttrici di strumenti analitici hanno messo in commercio differenti immunonefelometri dedicati, mentre le misure immunoturbidimetriche vengono prevalentemente eseguite su analizzatori automatici per chimica clinica di uso generale. Negli ultimi anni sono state pubblicate diverse valutazioni di tali analizzatori, al fine di verificarne la attendibilità analitica (4-7).

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare un nuovo strumento automatico dedicato (Delta), prodotto dalla Ditta Radim (Pomezia, Roma), basato sulla misura immunonefelometrica delle proteine plasmatiche. I risultati della nostra sperimentazione (8), e di un'altra esperienza analoga (9), sono stati presentati in via preliminare al Congresso SIBioC 2002, Rimini, settembre 2002.

MATERIALI E METODI

Sono state valutate le prestazioni analitiche nella misura delle seguenti proteine: immunoglobuline A, G e M (IgA, IgG, IgM), transferrina (TRF) e proteina C-reattiva (CRP).

Le misure sono state eseguite con lo strumento in valutazione (Delta), utilizzando reagenti, calibratori e controlli forniti dalla medesima Ditta. I calibratori ed i controlli per le cinque proteine plasmatiche in esame e gli antisieri anti-IgA, anti-IgG, anti-IgM e anti-TRF sono pronti all'uso, mentre l'antisiero anti-CRP è un materiale liofilizzato, da ricostituire con 2 mL di acqua distillata. La misura della CRP prevede l'utilizzo di un tampone supplementare e di un diluente, anch'essi forniti dalla ditta produttrice dello strumento.

Per la verifica della stabilità di calibrazione si sono preparate per ciascuna proteina in esame 3 miscele di sieri (concentrazione alta, media, bassa), conservate in aliquote congelate a -20°C . Per quanto concerne le immunoglobuline e la TRF, le miscele sono state analizzate (in duplicato) 5 volte successive per un arco di 28 giorni mediante calibrazione unica e 4 volte successive per un periodo di 36 giorni con calibrazione ripetuta. Per quanto riguarda la CRP, sono state analizzate (in duplicato) 3 volte consecutive per un periodo di 10 giorni mediante

calibrazione unica e 3 volte successive per un arco di 16 giorni con calibrazione ripetuta. I risultati di questo esperimento sono stati utilizzati anche per la stima dell'imprecisione globale tra le serie.

Per la verifica della linearità, si sono allestite 6 miscele scalari di sieri ad alta e bassa concentrazione. Tali miscele sono state analizzate ognuna in 10 replicati; i risultati sono stati impiegati anche per la stima della imprecisione entro la serie.

Per il controllo dell'influenza della torbidità, si sono allestite 3 miscele di sieri a differente concentrazione; ad aliquote di 2 mL di ciascuna di esse si sono aggiunti 100 L di differenti diluizioni (0; 1/5; 2/5; 3/5; 4/5; 1) di Intralipid (Pharmacia) 20% (10, 11).

Come sistemi di confronto si sono utilizzati lo strumento Image (Beckman), basato su principio immunonefelometrico, per la misura delle Ig e della CRP, e lo strumento Modular (Roche) basato su principio immunoturbidimetrico, per la misura della TRF e della CRP. Per le prove di comparazione, si sono raccolti per ciascuna proteina 120 campioni di siero, contenenti la relativa proteina in concentrazioni variabili, a coprire l'intervallo di valori normali e patologici abitualmente riscontrati.

Per l'analisi dei risultati si sono utilizzate statistiche descrittive parametriche standard (media, DS, CV). Per l'analisi della linearità si è utilizzata la regressione lineare (modello standard, metodo dei minimi quadrati); per il confronto tra metodi la regressione non parametrica secondo Passing e Bablok (12) e l'analisi della distribuzione delle differenze (13), questa ultima accoppiata alla presentazione grafica secondo il cosiddetto "difference plot". I calcoli sono stati effettuati con il pacchetto "Method Validator" (Philippe Marquis, Metz, France) e con l'applicativo MS Excel.

RISULTATI

I dati relativi alla valutazione della stabilità di calibrazione hanno dimostrato una equivalente stabilità del sistema analitico, nell'arco di almeno 4 settimane (poco più di 2 settimane solo nel caso della CRP), sia con calibrazione unica sia con calibrazione ripetuta. I valori del CV% tra i giorni per ciascuna proteina a 3 livelli di concentrazione, calcolati per l'intero periodo e nelle due condizioni sperimentali, sono riassunti nella tabella 1. I medesimi risultati sono stati utilizzati per lo studio di un profilo di imprecisione globale, nel quale i valori di imprecisione globale (CV%), osservati per le diverse proteine ai vari livelli di concentrazione, sono riportati contro i rispettivi valori di concentrazione (figura 1).

I risultati della valutazione statistica della linearità sono mostrati nella tabella 2: la linearità nell'ambito dell'intervallo dei valori di concentrazione di ciascuna proteina è documentata dal buon adattamento della retta ai singoli punti, a sua volta espresso dai valori elevati di "r" e dai valori bassi di Sy/x, che risultano compresi tra 0,2 e 2,5 % del valore medio, con la eccezione delle IgA dove risulta comunque pari a 4,5% del valore medio. Nella tabella 2 sono anche riportati i valori di imprecisione entro la serie, come CV% osservato ai diversi livelli di concentrazione.

Negli esperimenti di comparazione tra metodi si sono prodotti dati relativi a sei confronti, perché i valori ottenuti con lo strumento Delta per la CRP sono stati confrontati con quelli ottenuti con due strumenti alternativi (Image e Modular). Le sei serie di 120 coppie di dati ciascuna sono state analizzate con due approcci grafico-statistici. Secondo il primo approccio si è costruito un grafico di dispersione y/x, in cui i singoli punti sono confrontati con la retta di regressione e con la retta dell'equivalenza (figure 2-7, grafici superiori); i parametri statistici delle regressioni lineari sono riportati nella tabella 3. Per il secondo approccio si sono costruiti "difference plots", riportando le differenze intermetodi contro il valore medio di concentrazione

Tabella 1

Imprecisione globale valutata con calibrazione unica (I) e con calibrazione ripetuta (II)

Proteina	Pool	Imprecisione, CV %	
		I	II
IgG	Alto	4,8	5,8
	Medio	4,5	4
	Basso	4,8	3,7
IgA	Alto	7,4	7,1
	Medio	8,8	5,6
	Basso	8	7,2
IgM	Alto	7,3	7
	Medio	3,9	5,5
	Basso	5,3	5,7
TRF	Alto	7,1	9,7
	Medio	5,7	9,3
	Basso	7	3,9
CRP	Alto	15,6	10,6
	Medio	10,5	13,4
	Basso	14,6	15,2

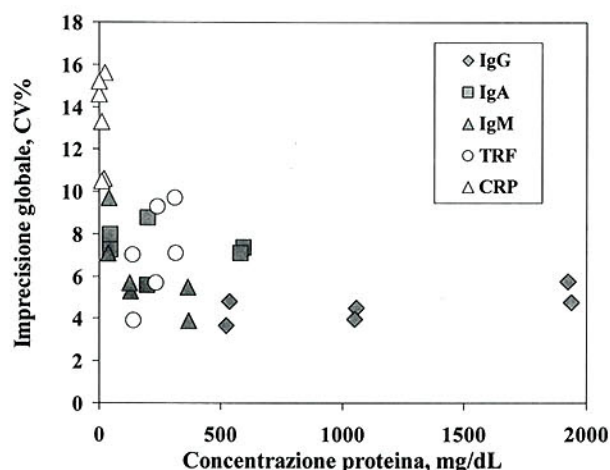


Figura 1

Profilo di imprecisione nella misura delle differenti proteine. I valori di CV globale sono riportati contro i valori medi di concentrazione

Tabella 2

Linearità: parametri statistici della regressione lineare/correlazione dei valori medi misurati sulla frazione di volume

Proteina	Intervallo dei valori di		Concentrazione media mg/dL	Sy/x mg/dL	r
	Concentrazine mg/dL	CV %			
IgG	469-1662	2,1 -3,8	1065,5	7,06	0,999
IgA	33 - 453	2,7 - 5,8	243	11,04	0,997
IgM	34 - 292	2,8 - 5,3	163	4,07	0,999
TRF	135 - 281	4,9 - 14,1	208	3,77	0,999
CRP	1,8 - 14,3	3,0 - 5,9	8,05	0,09	0,998

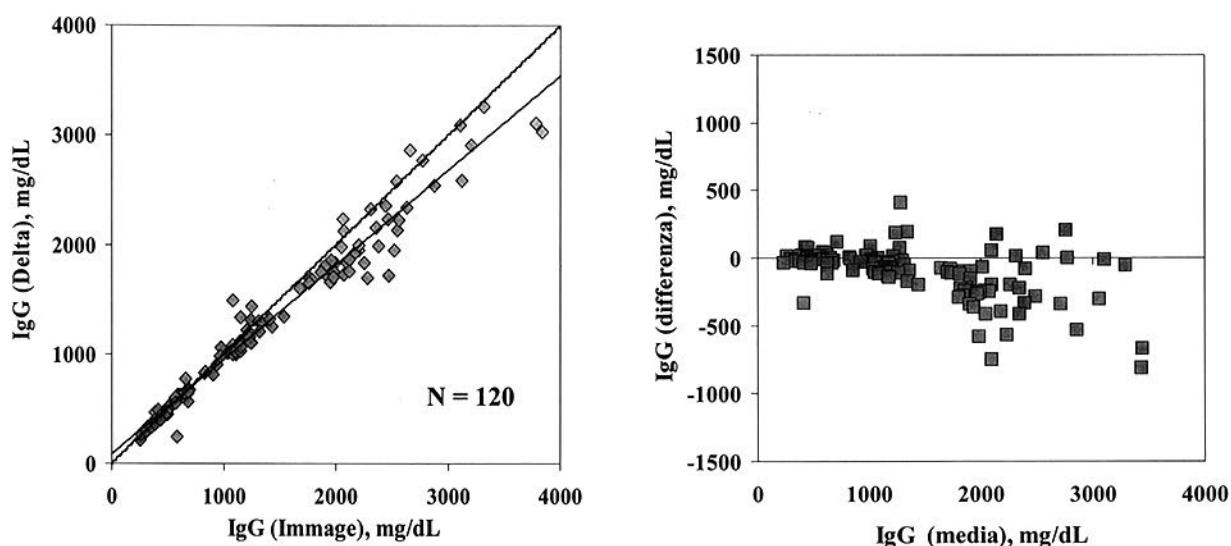


Figura 2

Rappresentazione grafica del confronto inter-metodi nella determinazione delle IgG.

Pannello a sinistra: grafico di dispersione, e rette di equivalenza (tratteggiata) e di regressione (continua). Pannello a destra: "difference plot" (differenza inter-metodi contro i corrispondenti valori medi)

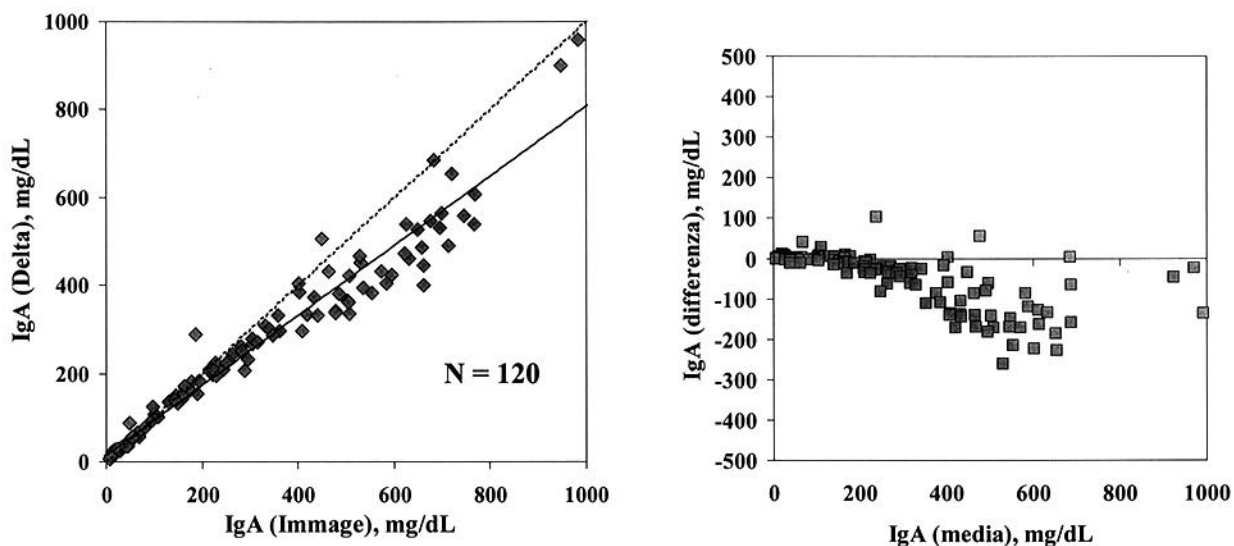


Figura 3

Rappresentazione grafica del confronto inter-metodi nella determinazione delle IgA

Come figura 2

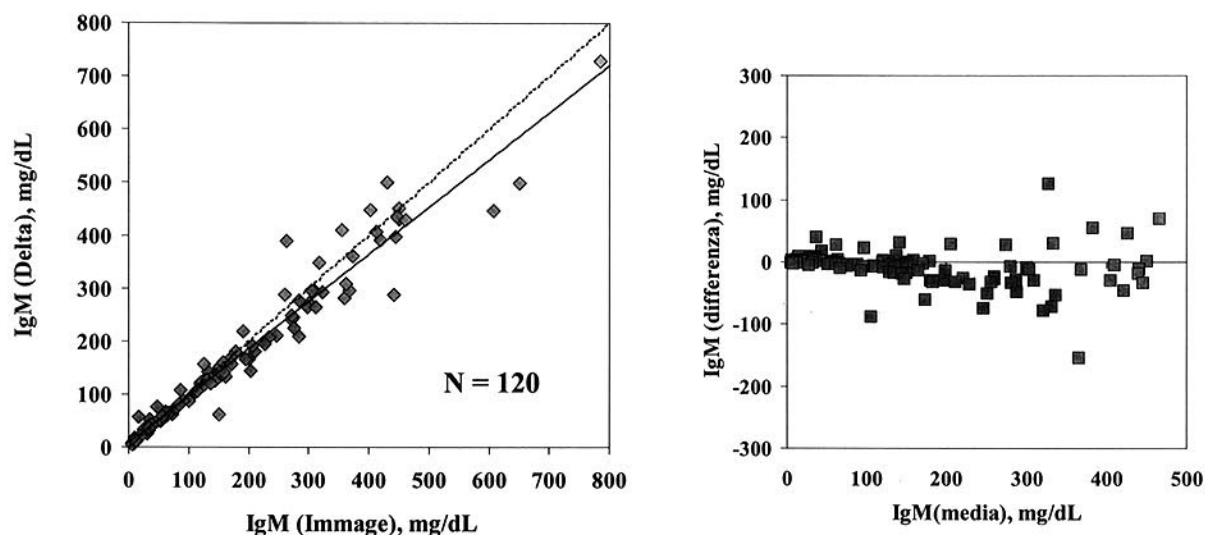


Figura 4
Rappresentazione grafica del confronto inter-metodi nella determinazione delle IgM
Come figura 2

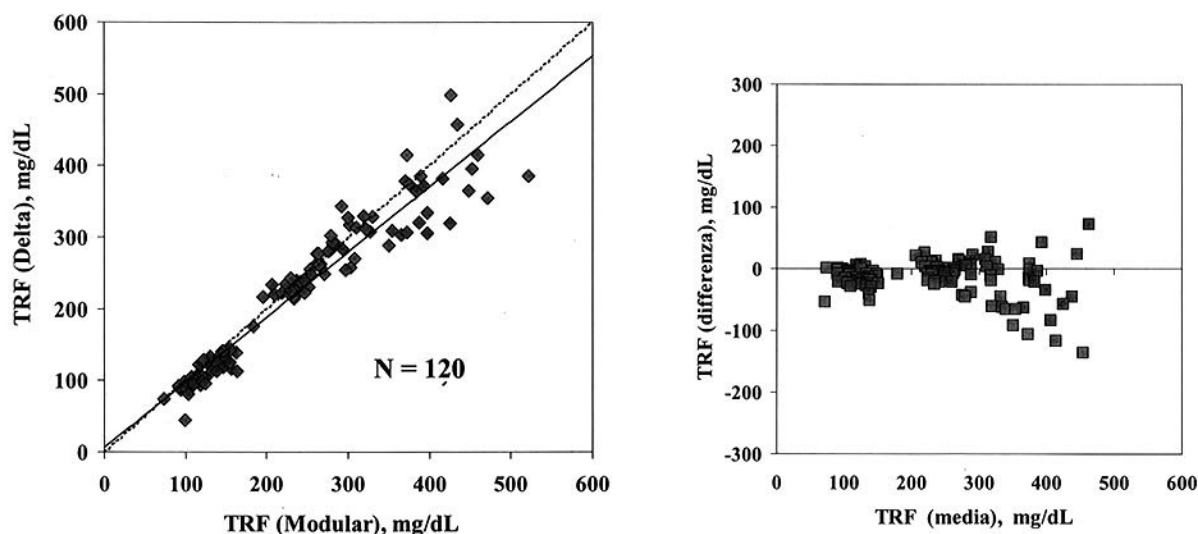


Figura 5
Rappresentazione grafica del confronto inter-metodi nella determinazione della TRF.
Come figura 2

(figure 2-7, grafici inferiori). I parametri statistici della distribuzione delle differenze intermetodi sono indicati nella tabella 4. Per interpolazione delle rette di regressione (tab. 4) sono state calcolate le variazioni percentuali tra i valori

Tabella 3
Confronto Delta (y)/Metodo di confronto (x): parametri statistici della regressione lineare non parametrica (Passing e Bablok)

Proteina	n	Intecetta* mg/dL	Pendenza*	r
IgG	120	56,8 (32,0/76,3)#	0,89 (0,86/0,91)\$	0,981
IgA	120	9,76 (6,13/15,6)#	0,82 (0,78/0,85)\$	0,977
IgM	120	3,44 (1,18/6,00)#	0,92 (0,89/0,94)\$	0,975
TRF	120	-7,72 (-18,2/0,70)#	1,00 (0,95/1,04)	0,961
CRP1	119	-0,11 (-0,13/-0,02)	1,06 (1,04/1,09)\$	0,989
CRP2	120	0,05 (-0,07/0,02)#	0,91 (0,88/0,94)\$	0,983

1 = metodo di confronto Immage Beckman; 2 = metodo di confronto Modular Roche; * = intervallo di confidenza al 95%
= significativamente diverso da 0; \$ = significativamente diverso da 1

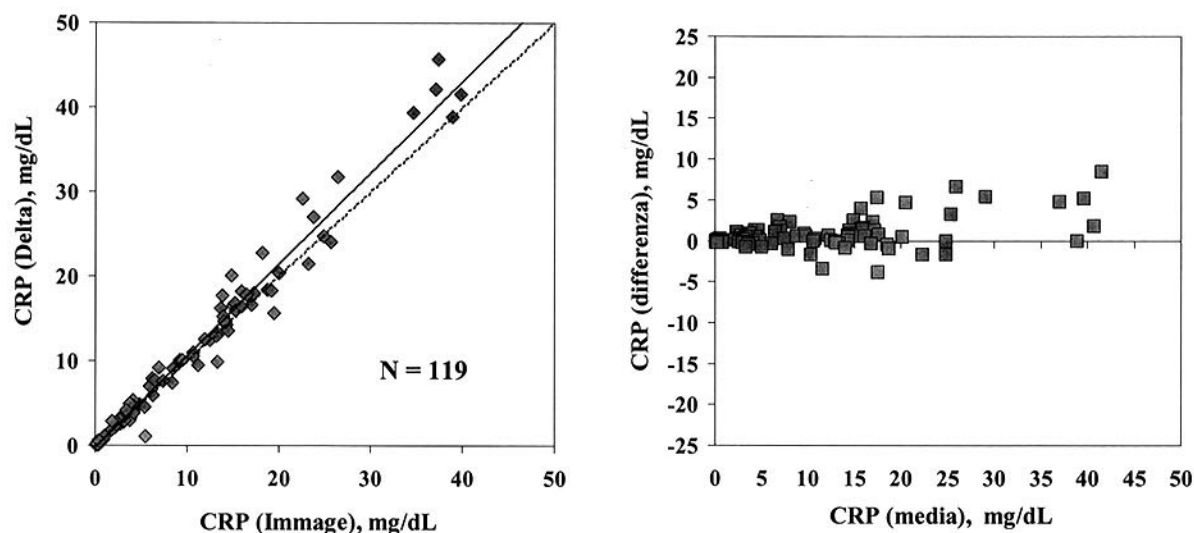


Figura 6
Rappresentazione grafica del confronto inter-metodi nella determinazione della CRP.
Come figura 2

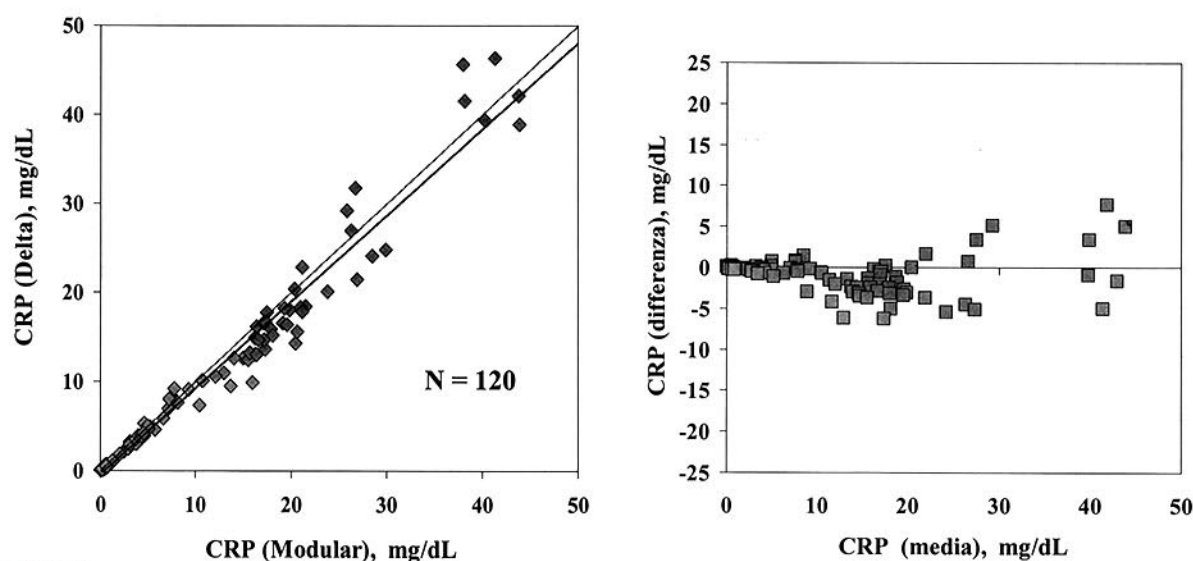


Figura 7
Rappresentazione grafica del confronto inter-metodi nella determinazione della CRP.
Come figura 2

del metodo sperimentato e quelli del metodo di confronto, ai livelli inferiori e superiori dei rispettivi intervalli di riferimento. Tali differenze sono risultate rispettivamente: -2.9% e -7.5% per le IgG; -4.1% e -15.6% per le IgA; 0.6% e -6.5% per le IgM; -3.9% e -2.1% per la TRF; -5.0% per la CRP al livello di 1 mg/dL (confronto con strumento Immage).

I risultati del controllo di interferenza da parte delle torbidità sono riportati graficamente nella figura 8, che mostra l'andamento dei valori medi di concentrazione misurati in funzione della frazione di volume di Intralipid aggiunto.

DISCUSSIONE

L'analisi delle proteine del plasma è applicata come

mezzo per la diagnosi clinica "di routine" da quasi 50 anni, con approcci differenti e di crescente sofisticazione tecnologica (14, 15).

Le caratteristiche dell'analisi immunonefelometrica-turbidimetrica sono state recentemente discusse in relazione anche alle caratteristiche strumentali adatte ad assicurare misure attendibili, con particolare riferimento ai "bianchi" (16). Lo strumento valutato in questa sperimentazione soddisfa i requisiti richiesti.

Nel corso della sperimentazione abbiamo potuto verificare innanzitutto la stabilità della calibrazione, che è risultata effettivamente stabile per almeno 4 settimane, periodo ridotto a poco più di 2 settimane nel caso solamente della CRP.

La precisione è stata valutata come imprecisione glo-

Tabella 4

Confronto Delta (y)/Metodo di confronto (x): parametri statistici della distribuzione delle differenze

Proteina	n	Differenze y - x	
		media mg/dL	i.c. 95%
IgG	120	-10,4#	-138/-70,8
IgA	120	-46,4#	-58,9/-34
IgM	120	-10,3#	-16,7/-3,82
TRF	120	-14,7#	-20,2/-9,29
CRP1	119	0,53#	0,22/0,83
CRP2	120	-0,77#	-1,12/-0,43

1 = metodo di confronto Immage Beckman

2 = metodo di confronto Modular Roche

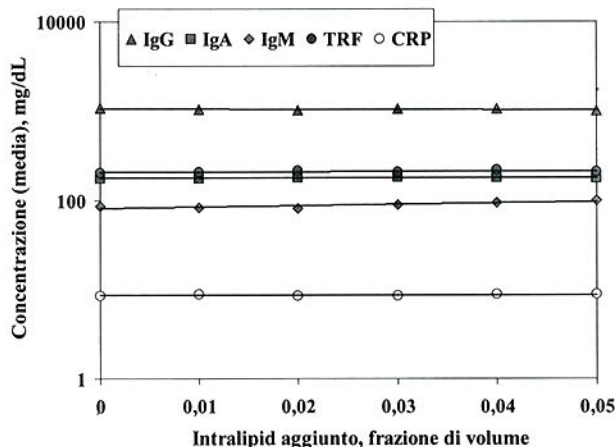
= significativamente diverso da 0

bale, inclusiva della componente entro e della componente tra le serie, a 3 livelli di concentrazione, sia con calibrazione unica sia con calibrazione ripetuta. Come conseguenza della su menzionata stabilità di calibrazione le imprecisioni globali misurate nelle 2 condizioni non differiscono sistematicamente ed appaiono tra loro sostanzialmente in linea con lo "stato dell'arte" per questo tipo di analisi. Esiste un evidente effetto della concentrazione della proteina sull'imprecisione misurata, abbastanza indipendente dal tipo di proteina come illustrato in fig. 1.

La concentrazione misurata per le 5 proteine è risultata linearmente correlata con la concentrazione effettiva (arbitrariamente espressa dalla frazione di volume del "siero alto" nella miscela) per intervalli di concentrazione abbastanza ampi, estesi per le proteine oltre i corrispondenti intervalli di riferimento: i coefficienti di correlazione sono risultati compresi tra 0,997 - 0,999.

L'effetto della torbidità è stato valutato utilizzando il modello sperimentale consigliato dalle associazioni competenti (10, 11) ed è risultato sostanzialmente nullo anche in presenza di torbidità (artificiale) assai elevata ed assai raramente riscontrabile nella pratica.

L'interpretazione dei dati relativi al confronto tra metodi è in genere la parte più complessa nelle valutazioni dei sistemi analitici. Si deve in ogni caso tener presente che se il sistema in valutazione non è confrontato con un metodo di riferimento (17-18) gli eventuali accordi o disaccordi verificati non garantiscono la accuratezza o la inaccuratezza del metodo. In ogni caso tuttavia si ottiene una valutazione di quelle che sono le differenze sistematiche generate da un "nuovo" metodo rispetto ad un altro eventuale già esistente. In questo senso appare comunque utile ed importante che i nuovi metodi vengano confrontati con un metodo di provata affidabilità clinica. Il quesito che si può porre è se la differenza inter-metodo (o inter-strumento) nella misura di una data proteina in un paziente sia tale da assumere significato clinico. In assenza di un criterio valido in assoluto, per questa verifica si può fare riferimento al principio della "differenza critica", calcolata sulla base della variabilità biologica intraindividuale. Abbiamo calcolato i valori di differenza critica utilizzando i

**Figura 8**

Effetto della torbidità: concentrazione media misurata contro la frazione di volume di Intralipid 20% aggiunto

valori di variabilità biologica riportati in letteratura per le prime 4 proteine (19) e per la proteina C-reattiva (20), e nella ipotesi abbastanza realistica che la variabilità analitica entro la serie corrispondesse a metà della variabilità biologica. Tali valori di differenza critica compresi fra 9.3% (TRF) e 33% (CRP) sono risultati più elevati, talora marcatamente, dei valori di differenza sistematica percentuale su menzionati, con la sola eccezione della IgA che a livello del limite superiore dell'intervallo di riferimento (400 mg/dL) ha mostrato una differenza inter-metodi pari a -15.6%, sostanzialmente identica alla differenza critica ($\pm 15.5\%$).

L'insieme dei dati qui riportati e discussi permette di concludere per una sostanziale validità analitica "stato dell'arte" dello strumento valutato. Rispetto a sistemi preesistenti lo strumento ha generato alcune differenze sistematiche inferiori alla differenza critica e quindi, verosimilmente, di scarso significato clinico, con una eccezione.

BIBLIOGRAFIA

- Ritchie RF, Alper Ca, Graves J, Pearson N, Larson C. Automated quantitation of proteins in serum and other biological fluids. *Am J Clin Pathol* 1973;59:151-9.
- Stenberg JC. A rate nephelometer for measuring specific proteins by immunoprecipitin reactions. *Clin Chem* 1977;23:1456-64.
- Hills LP, Tiffany TD. Comparison of turbidimetric and light-scattering measurements of immunoglobulins by use of a centrifugal analyzer with absorbance and fluorescent/light-scattering optics. *Clin Chem* 1980;26:1459-66.
- Hamwi A, Vukovich T, Wagner O, Rumpold H, Spies R, Stich M, and Langecker C. Evaluation of turbidimetric high-sensitivity C-reactive protein assay for cardiovascular risk estimation. *Clin Chem* 2001;47:2044-46.
- Duly EB, Barnes G, Grimason S, Trinick TR. Analytic performance of specific protein assays on the Abbott Aeroset System. *Clin Chem* 2001;47:1709-10.
- Ledue TB, Collins MF, Ritchie RF. Development of immunoturbidimetric assays for fourteen human serum proteins on the Hitachi 912TM. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40: 520-28.

7. Arcangeli L, Franzini C, Galletta G, Pagani A, Scapellato L. Analisi immunoturbidimetrica automatica di proteine del siero: valutazione dello strumento Olympus au 560. *Biochim Clin* 1995;19:17-23.
8. Infusino I, Luraschi P, Franzini C. Valutazione di un nuovo nefelometro per la misura delle proteine del plasma. [Abstract]. *Biochim Clin* 2002;26:317.
9. Ballerini S, Bernardini S, Marchei A, Casalino P, Cortese C, Federici G. Valutazione del nefelometro Delta (Radim): comparazione tra metodiche nefelometriche e turbidimetriche. [Abstract]. *Biochim Clin* 2002;26:321.
10. Vassault A, Azzadine MC, Bailly M, Cam G, Dumont G, Ekindjia OG, et al. Protocole de validation de techniques (document B, stade 3). *Ann Biol Clin* 1986;44:686-745.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Interference testing in clinical chemistry: Proposed Guideline. NCCLS publication EP7-P. Villanova, Pa: NCCLS; 1986.
12. Passing H, Bablok W. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Applications of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry. Part I. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983;21:709-20.
13. Hollis S. Analysis of method comparison studies. *Ann Clin Biochem* 1996;33:1-4.
14. Ritchie RF. A knowledge-based system to aid the clinical interpretation of complex serum protein data. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:1045-53.
15. Carlson J. From paper electrophoresis to computer-supported interpretation of capillary electrophoresis - Clinical plasma protein analysis in Malmo, Sweden. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:1020-1024.
16. Blirup-Jensen S. Protein standardization III: method optimization. Basic principles for quantitative determination of human serum proteins on automated instruments based on turbidimetry or nephelometry. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:1098-109.
17. Ledue BT, Johnson M. Commutability of serum protein values: persisting bias among manufacturers using values assigned from the certified reference material 470 (CRM 470) in the United States. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:1129-33.
18. Johnson AM, Whicher JT. Effect of certified reference material 470 (CRM 470) on national quality assurance programs for serum proteins in Europe. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:1123-1128.
19. Ricòs C, Alvarez V, Cava F, Garcia-Lario JV, Hernández A, Jimenez CV, Minchinella J, Perich C, Simón M. Current data bases on biological variation: pros, cons and progress. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59:491-500.
20. Franzini C. Need for correct estimates of biological variation: the example of C-reactive protein. *Clin Chem Lab Med* 1998;36:131-132.