

Valutazione Analitica del Metodo Turbidimetrico per Immunoglobuline Sieriche su Dimension RxL.

Francesca Di Serio, Luigia Loiodice, Lucia Varraso, Nicola Pansini

Laboratorio di Patologia Clinica I, Policlinico di Bari, piazza Giulio Cesare N.11 Bari

ABSTRACT

Analytical evaluation of turbidimetric immunoassay for serum immunoglobulins on the dimension RxL.

The purpose of our study was to assess, the analytical performance of the immunoturbidimetric Dimension RxL Immunoglobulins (Ig) assay. Calibration stability, precision, linearity and analytical sensitivity of the method were evaluated, and, the Ig immunoturbidimetric method was compared with the BN II Ig immunonephelometric method. Our data indicate that the Dimension RxL Ig assay is a sensitive, precise and linear method for the quantitative determination of Ig. Method comparison experiments showed a positive correlation; nevertheless Bland and Altman analysis revealed a disagreement between the two methods and a statistically significant bias was measured for IgG and IgA at low concentrations. In conclusion, our data suggest that the Dimension RXL Ig immunoturbidimetric method could be effective in the consolidation processes in the area of laboratory clinical chemistry, nevertheless the results related to low concentrations should be carefully evaluated.

RIASSUNTO

Scopo del nostro studio è stato quello di valutare la performance analitica del metodo immunoturbidimetrico Dimension RxL per la determinazione delle Immunoglobuline (Ig) sieriche. Stabilità della curva di calibrazione, precisione, linearità e sensibilità analitica sono state valutate e sono stati eseguiti studi di comparazione con il metodo immunonefelometrico BN II. I nostri dati indicano che il metodo Dimension RxL è un metodo sensibile, preciso e lineare. Lo studio della comparazione mostrava una correlazione positiva con il metodo immunonefelometrico, tuttavia l'analisi di Bland and Altman evidenziava un disaccordo tra i metodi ed un bias statisticamente significativo era misurato a basse concentrazioni di IgG ed IgA. I nostri dati suggeriscono che il metodo immunoturbidimetrico Dimension RxL può essere efficace nel processo di consolidamento analitico dell'area di chimica clinica, tuttavia i risultati relativi alle basse concentrazioni devono essere attentamente valutati.

INTRODUZIONE

Le immunoglobuline costituiscono una classe di proteine che presentano in comune non solo le affinità strutturali e le proprietà fisico chimiche, ma soprattutto un preciso ruolo funzionale che è quello anticorpale. Sintetizzate dalle plasmacellule nel corso della risposta immunitaria umorale in conseguenza del contatto del sistema immunitario con l'antigene, sono da ritenersi gli agenti ultimi della immunità umorale. La determinazione quantitativa delle immunoglobuline nei fluidi biologici, plasma, siero, liquor e urine rappresenta oggi una delle analisi più richieste nella pratica clinica, per la diagnosi e il monitoraggio di numerose condizioni patologiche che determinano alterazioni quantitative in difetto (agammaglobulinemie), o in eccesso (ipergammaglobulinemie) del patrimonio in immunoglobuline e alterazioni qualitative con perdita dell'attività anticorpale.

La determinazione delle immunoglobuline è anche richiesta per monitorare l'efficacia del trattamento terapeutico. I metodi di studio delle immunoglobuline comprendono sia metodi che consentono una stima qualitativa delle

gammaglobuline ma senza una loro analisi quantitativa (elettroforesi su carta, su acetato di cellulosa), sia metodi che sono in grado di quantificare le singole immunoglobuline. Alcuni metodi di analisi, quali le tecniche di precipitazione in gel, pur essendo molto accurati, richiedono un lungo tempo di analisi, risultano costosi e non sono automatizzabili.

Nell'ultimo decennio queste metodiche sono state sostituite da sistemi automatizzati che utilizzano tecniche ottiche caratterizzate da una rapida e specifica reazione tra antigene ed anticorpo in fase liquida. Questi sistemi sono basati sui principi di immunoturbidimetria e di immunonefelometria: stessa reazione immunochimica in cuvetta ma differente principio di rilevazione, utilizzando l'una la luce trasmessa residua e l'altra la luce diffratta dagli immunocomplessi presenti nel campione (1-5).

I metodi nefelometrici richiedono analizzatori dedicati, ottimizzati per fornire le migliori performance possibili dei metodi, ma allo stato attuale i laboratori devono garantire la migliore efficienza possibile (aumento della produttività con riduzione del turn around time-TAT), nell'ottica di una costante riduzione dei costi (reagenti, calibratori, assisten-

za, risorse umane). In questo senso negli ultimi anni, le industrie si sono adoperate per potenziare l'efficienza dei propri analizzatori automatizzati di chimica clinica con l'introduzione di immunometodi in turbidimetria, permettendo in questo modo un consolidamento analitico delle subspecialità della chimica clinica. Poiché la responsabilità delle figure professionali che operano in un laboratorio clinico include necessariamente un equilibrio tra considerazioni di tipo economico e garanzie di qualità delle prestazioni, per gli immunometodi in turbidimetria su analizzatori di chimica clinica, devono essere dimostrate accettabili performance analitiche (appropriati limiti di rivelazione, specificità, sensibilità, precisione ecc).

Negli ultimi anni numerosi immunometodi su analizzatori automatizzati di chimica clinica sono stati attentamente valutati in termini di performance analitica (6-9). Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare, nel corso di un processo di consolidamento analitico avviato nella sezione di chimica clinica del nostro laboratorio, l'applicabilità e l'affidabilità dei metodi immunoturbidimetrici per la determinazione delle immunoglobuline sull'analizzatore Dimension® RxL (Dade Behring). Nella prima parte del lavoro sono state valutate alcune performance analitiche dei metodi Ig RxL (stabilità della curva di calibrazione, precisione, linearità, sensibilità analitica), in accordo con le linee guida NCCLS (10,11); nella seconda parte sono stati definiti i limiti superiori di riferimento di una popolazione apparentemente sana, e sono stati eseguiti studi di comparazione (12) tra le determinazioni eseguite con tecnica turbidimetrica e quelle eseguite con tecnica nefelometrica sull'analizzatore BN®II (Dade Behring).

MATERIALI E METODI

Principio del metodo

Il Dimension RxL è un analizzatore di chimica clinica completamente automatizzato, ad accesso casuale, per la determinazione di analiti di chimica clinica, tossicologici, farmacologici ed immunometrici su campioni di siero, plasma, urine, versamenti e liquido cefalorachidiano. Esso si avvale delle cartucce analitiche per esami multipli FlexTM Dade Behring, di cuvette di reazione usa e getta, nonché della tecnologia a multisensore integrati (IMT). Le cartucce analitiche sono suddivise in scomparti che contengono tutti i reagenti necessari, liquidi e pronti all'uso.

Il metodo per la determinazione delle immunoglobuline è un metodo turbidimetrico, quantitativo, che utilizza anticorpi policlonali per la formazione di immunocomplessi; la torbidità risultante viene misurata con misure endpoint bicromatiche a 340-700 nm ed è proporzionale alla concentrazione di Ig nel campione. I risultati sono riportati in mg/dL.

Curve di calibrazione

I metodi erano calibrati sull'analizzatore Dimension RxL in accordo con quanto suggerito dal fornitore: ad ogni nuovo lotto di reagenti, cinque diversi livelli di calibratori erano analizzati in duplicato per ogni metodo. I criteri di

accettabilità della curva di calibrazione erano: pendenza (m) = 0,97 - 1,03; intercetta (b) = 0; coefficiente di correlazione (r) = 0,990 - 1,00; controlli di qualità entro la seconda deviazione standard.

Stabilità della curva di calibrazione e studio della precisione

Al fine di valutare la stabilità di ogni curva di calibrazione (tre mesi secondo dichiarazione del fornitore), sieri di controllo a due livelli erano analizzati ogni giorno per 90 giorni; alla scadenza dei tre mesi erano calcolati DS e CV% tra i giorni. La precisione di ogni singola calibrazione era determinata utilizzando sieri di controllo a due livelli ed un pool di sieri ottenuto dai campioni di routine. Il pool era analizzato, aliquotato e congelato entro 4 ore a -20°C fino al termine del suo utilizzo. Sieri di controllo e pools di sieri erano analizzati in duplicato, in una serie giornaliera per 20 giorni consecutivi (n. 40 determinazione): alla fine dei 20 giorni erano calcolati i CV% entro la serie, tra le serie e totali (10).

Linearità della risposta alla diluizione

La linearità era valutata in accordo con quanto descritto nelle linee guida NCCLS EP6-P (11). Un pool di sieri con alta concentrazione delle singole immunoglobuline, era diluito con un pool di sieri con bassa concentrazione. Si ottenevano 5 pool a diversa concentrazione di Ig: pool 1 (IgG = 65 mg/dL; IgA = 14,5 mg/dL; IgM = 4 mg/dL), pool 2 (IgG = 559 mg/dL; IgA = 115 mg/dL; IgM = 45 mg/dL), pool 3 (IgG = 1024 mg/dL; IgA = 237 mg/dL; IgM = 87 mg/dL); pool 4 (IgG = 1547 mg/dL; IgA = 348 mg/dL; IgM = 129 mg/dL); pool 5 (IgG = 2042 mg/dL; IgA = 460 mg/dL; IgM = 171 mg/dL). In ogni pool le singole immunoglobuline erano misurate in quadruplicato in una singola serie.

Limite di rivelazione

Il limite di rivelazione (sensibilità analitica), è definito come la più bassa concentrazione che può essere differenziata da zero e corrisponde alla 2 DS al di sopra della media di N. 20 replicati del calibratore zero.

Intervallo di riferimento

Al fine di definire gli intervalli di riferimento, erano analizzati 100 campioni di siero ottenuti da pazienti esterni (50 donne, 50 uomini; età 19 - 70). Lo stato di buona salute della popolazione era definito sulla base di un questionario e dei risultati degli esami ematochimici.

Metodo di comparazione

Il metodo Ig Dimension RxL, era comparato con il metodo nefelometrico Ig BN II. Il BN II è un analizzatore da banco, completamente automatizzato, per la determinazione di proteine specifiche su campioni di siero, plasma, urine, versamenti e liquido cefalorachidiano. Per la determinazione delle immunoglobuline è stato utilizzato un metodo nefelometrico, che utilizza anticorpi policlonali per la formazione di immunocomplessi; la torbidità risul-

tante provoca dispersione della luce (840 nm), la cui intensità dipende dalla concentrazione dei complessi antigene-anticorpo nel campione. I risultati sono riportati in mg/dL.

103 campioni di siero, con concentrazione di Ig tali da coprire gran parte dell'intervallo riscontrabile nella pratica clinica (IgG: 136 - 5797 mg/dL; IgA: 1 - 485 mg/dL; IgM: 1 - 877 mg/dL), erano selezionati da campioni afferenti al laboratorio di routine. I campioni erano analizzati in duplicato su entrambi gli analizzatori ed i risultati valutati in accordo con le linee guida NCCLS EP9-A (12).

Analisi statistica

Media, DS e CV% erano utilizzati per determinare la stabilità della curva di calibrazione e la precisione dei metodi. La linearità della risposta era verificata mediante regressione lineare, metodo dei minimi quadrati, con il test di linearità (11). La comparazione tra i metodi Ig Dimension RxL e BN II era valutata con la regressione secondo Deming (13) ed il grado di associazione era espresso con il coefficiente di Pearson; l'accordo tra i metodi era valutato secondo l'analisi di Bland e Altman (14).

RISULTATI

Stabilità della curva di calibrazione e studio della precisione

In questi esperimenti, i valori medi e di CV% tra i giorni erano i seguenti:

- IgG: siero di controllo 1 (media = 784 mg/dL), CV% = 9%; siero di controllo 2 (media = 1301 mg/dL), CV% = 8%.
- IgA: siero di controllo 1 (media = 153 mg/dL), CV% = 5,6%; siero di controllo 2 (media = 277 mg/dL), CV% = 3,7%.
- IgM: siero di controllo 1 (media = 67 mg/dL), CV% = 6,5%;

siero di controllo 2 (media = 122 mg/dL), CV% = 5,9%.

I dati relativi alla valutazione della precisione sono riportati nella Tabella 1.

Linearità della risposta alla diluizione

Il nostro studio dimostrava una risposta lineare del metodo (Figura. 1), per le seguenti concentrazioni:

- IgG da 74 a 2163 mg/dL: F = 2,16; p = 0,13
- IgA da 13 a 518 mg/dL: F = 1,0; p = 0,4
- IgM da 6 a 226 mg/dL: F = 1,7; p = 0,19

Limite di rivelazione

I limiti di rivelazione sono risultati i seguenti: IgG = 15,2 mg/dL; IgA = 4,25 mg/dL; IgM = 3,75 mg/dL.

Intervalli di riferimento

Gli intervalli di riferimento, rappresentati dal 95% centrale non parametrico dei valori osservati nel gruppo-campione di riferimento, erano i seguenti: IgG = 700 - 1600 mg/dL; IgA = 70 - 400 mg/dL; IgM = 140 - 230 mg/dL.

Confronto metodi

Gli studi di comparazione e di accordo tra i metodi Ig Dimension RxL e BN II, sono stati condotti separatamente per due gruppi di campioni, il primo includente tutti i campioni selezionati, il secondo quelli con concentrazioni rispettivamente al di sotto ed al di sopra dei limiti di riferimento del metodo Dimension RxL. I risultati sono riassunti nella tabella 2, e riportati graficamente nelle figure 2-5.

Per concentrazioni al di sopra del limite superiore di riferimento, in nessun caso il bias era statisticamente significativo:

- IgG (n. = 73; 700 - 5797 mg/dL): bias = -18,37 (IC 95% da -48,1 a 11,23)
- IgA (n. = 52; 70 - 485 mg/dL): bias = 1,73 (IC 95% da -3,66 a 7,13)
- IgM (n. = 13; 140 - 877 mg/dL): bias 13,53 (IC 95% da -6,66 a 33,8)

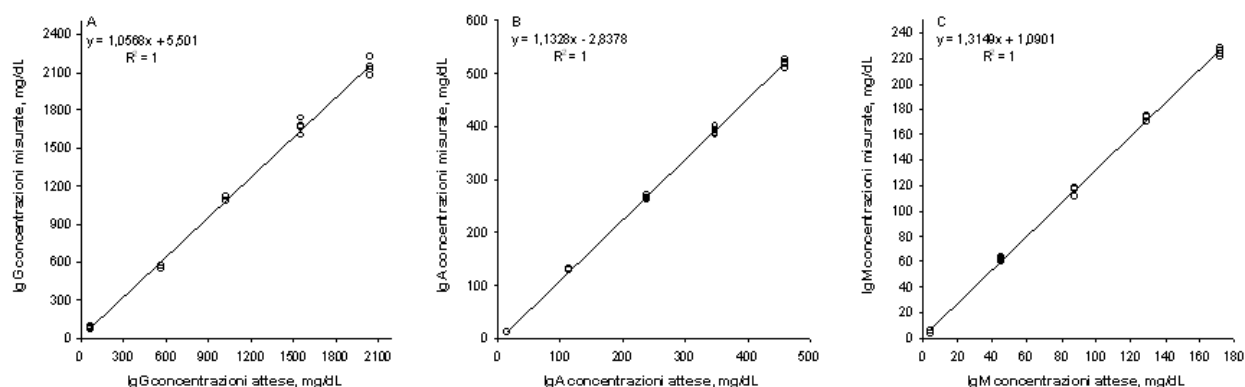
Tabella 1

Valutazione della imprecisione. Ogni campione è stato analizzato in duplicato, per venti giorni consecutivi.

Proteina	Campione	Media mg/dL	CV entro la serie %	CV tra la serie %	CV totale %
IgG	Siero controllo 1	842	2,4	4,8	5,4
IgG	Siero controllo 2	1341	2,5	3,2	4,0
IgG	Pool	988	10,3	4,2	11,1
IgA	Siero controllo 1	152	3,9	1,0	3,8
IgA	Siero controllo 2	277	2,3	1,5	2,8
IgA	Pool	239	3,1	5,7	7,6
IgM	Siero controllo 1	69,3	6,0	2,6	6,6
IgM	Siero controllo 2	128	5,0	1,0	4,4
IgM	Pool	75,0	14,7	16,0	21,0

DISCUSSIONE

Il processo di consolidamento analitico prevede l'accorpamento di più esami sullo stesso analizzatore, al fine di garantire un risparmio in termini di risorse umane e di costi unitamente ad una riduzione del TAT. Le procedure che consentono la messa in atto di tale processo non possono però prescindere da una rigorosa valutazione dell'affidabilità dei metodi, che devono garantire non solo una praticità d'uso ma soprattutto

**Figura 1**

Verifica della linearità. 5 miscele di sieri a differenti livelli di concentrazioni, ciascuna analizzata in quadruplicato

Tabella 2

Valutazione statistica dei risultati del confronto metodi, per tutti i campioni e per i campioni "bassi" (con valori inferiori al limite inferiore di riferimento). Sono riportati i valori di pendenza e di intercetta nella regressione lineare secondo Deming (Dimension RxL = variabile dipendente; BN II = variabile indipendente), il coefficiente di correlazione ed il bias (differenza media).

Proteina	Gruppo di campioni	Intervallo dei valori mg/dLo	n	Pendenza	Intercetta mg/dL	R	Bias (*) (differenza media) mg/dL
IgG	Tutti	136 - 5797	103	1,03±23,9	-68,8±23,9	0,98	-35,8(-60,7/-10,9)
IgG	Bassi (#)	136 - 700	30	0,71±0,07	89,5±44,5	0,87	-78,3 (-122,3/-34,3)
IgA	Tutti	1 - 485	103	1,08±0,02	-13,0±44,5	0,99	-4,10(-7,64/-0,54)
IgA	Bassi (#)	1 - 60	47	1,37±0,15	-23,4±7,1	0,73	-10,0(-14,2/-5,89)
IgM	Tutti	1 - 877	103	1,02±0,02	-1,04±2,36	0,99	-1,29(-2,29/4,86)
IgM	Bassi (#)	1 - 140	90	1,15±0,05	-9,97±3,46	0,93	-0,47(-3,48/2,50)

(*) tra parentesi: I.C. 95

(#) valori inferiori al limite inferiore di riferimento

validi risultati analitici per poter essere efficaci nella diagnostica clinica. A tale scopo noi abbiamo valutato nel nostro studio alcune performance analitiche del metodo turbidimetrico Immunoglobuline Dimension RxL (precisione, sensibilità analitica, linearità) e analizzato una serie di campioni di siero provenienti da pazienti ricoverati, comparando i risultati ottenuti con metodo turbidimetrico con quelli ottenuti con il metodo nefelometrico Ig BN II.

I nostri dati sperimentali dimostrano che il metodo Ig Dimension RxL è un metodo caratterizzato da buona precisione, sia entro sia tra le serie. Lo studio della stabilità della curva di calibrazione, relativo ad un periodo di tre mesi, non evidenziava alcun trend di incremento o decremento nelle concentrazioni osservate. Il metodo mostrava una buona sensibilità analitica per ogni tipo di immunoglobulina, ed una risposta lineare dopo diluizione.

Lo studio di comparazione con il metodo nefelometrico BN II mostrava una positiva correlazione tra i due metodi.

Infatti il grado di associazione, espresso come coefficiente di correlazione Pearson dimostrava che ad alte o basse concentrazioni misurate con il metodo Ig Dimension RxL corrispondevano rispettivamente, alte o basse concentrazioni misurate con il metodo nefelometrico (IgG: $r = 0,98$; IgA: $r = 0,99$; IgM: $r =$

$0,99$). L'analisi della regressione tuttavia dimostrava una sottostima sistematica costante per IgG ed IgA, documentata da valori di intercetta significativamente differenti da 0 (-69 ± 24 mg/dL e -13 ± 2 mg/dL, rispettivamente). L'analisi secondo Bland e Altman confermava lo scarso accordo tra le concentrazioni osservate ($n = 103$), per le IgG (bias = $-35,8$) e per le IgA (bias = $-4,0$), mentre un bias statisticamente non significativo era misurato per le IgM (bias = $1,2$).

Al fine di definire l'intervallo di concentrazioni che più pesava nel determinare la mancanza di accordo, la valutazione era stata successivamente limitata alle osservazioni che cadevano al di sotto dei limiti inferiori di riferimento; il nostro studio evidenziava per le IgG e le IgA una minore correlazione tra i metodi (IgG: $r = 0,87$; IgA: $r = 0,73$) ed una maggiore differenza espressa come misura del bias (IgG: bias = $-78,3$ mg/dL; IgA: bias = -10 mg/dL). Il metodo IgM Dimension RxL, invece mostrava ancora

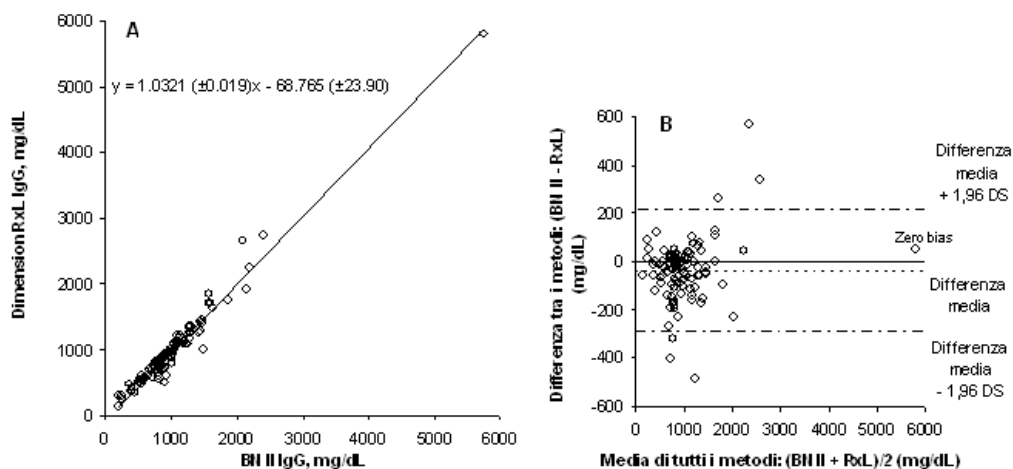


Figura 2
 IgG: Dimension versus BN II, per l'intero gruppo di campioni selezionati (n. 103). A, grafico di dispersione. B, "difference plot" secondo Bland-Altman: limiti di accordo 95% (linee tratteggiate): basso = - 285 mg/dL; alto = 213 mg/dL

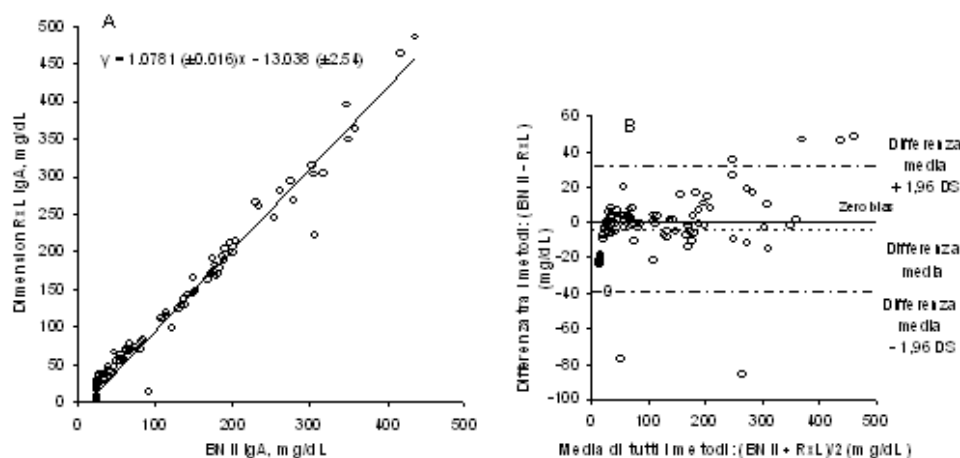


Figura 3
 IgA: Dimension versus BN II, per l'intero gruppo di campioni selezionati (n. 103). A, grafico di dispersione. B, "difference plot" secondo Bland-Altman: limiti di accordo 95% (linee tratteggiate): basso = - 39,6 mg/dL; alto = 31,4 mg/dL.

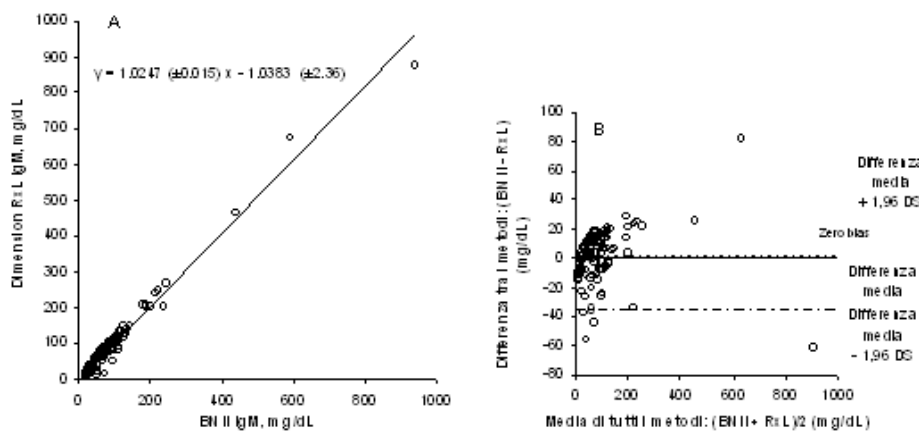


Figura 4
 IgM: Dimension versus BN II, per l'intero gruppo di campioni selezionati (n. 103). A, grafico di dispersione. B, "difference plot" secondo Bland-Altman: limiti di accordo 95% (linee tratteggiate): basso = - 34,5 mg/dL; alto = 37,1 mg/dL.

una ottima correlazione con il metodo nefelometrico (IgM: $r = 0,93$) ed una misura di bias non statisticamente significativa (IgM: bias = 0,47 mg/dL). Per concentrazioni al di sopra dei limiti di riferimento non si misurava alcuna differenza significativa.

In conclusione i nostri dati dimostrano che il metodo Ig Dimension RxL è un metodo preciso e sensibile, che può essere usato nel laboratorio di routine per la determinazione quantitativa delle immunoglobuline; tuttavia gli studi di comparazione evidenziano uno scarso accordo con il metodo nefelometrico di riferimento, particolarmente evidente a concentrazioni al di sotto dei valori di riferimento, per le misure di IgG e IgA. Poi-

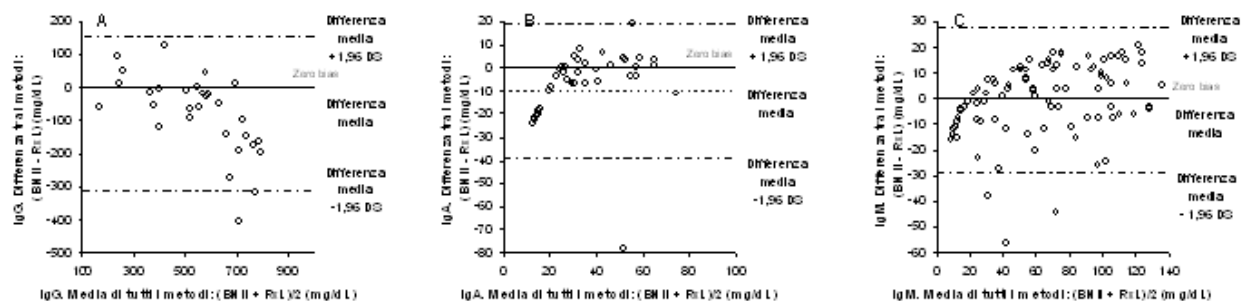


Figura 5

"Difference plot" secondo Bland-Altman, con limiti di accordo 95% (linee tratteggiate). RxL Dimension versus BN II per i campioni con valori al di sotto dei limiti inferiori di riferimento del metodo Ig Dimension RxL. A: IgG (n. 30); limiti di accordo 95% = -309 / 132 mg/dL. B: IgA (n. 47); limiti di accordo 95% = -38,9 / 18,8 mg/dL. C: IgM (n. 90); limiti di accordo 95% = -28,6 / 27,6 mg/dL.

ché le ipogammaglobulinemie sono di frequente riscontro nella pratica clinica, in particolar modo nella clinica pediatrica, è necessario che l'accuratezza dei dati analitici che possano far sospettare una ipogammaglobulinemia, sia sempre verificata con determinazioni eseguite con un metodo nefelometrico.

Se il futuro dei laboratori clinici è il consolidamento e l'automazione delle analisi chimiche di routine, un ulteriore impegno è ancora richiesto a tutte le figure professionali interessate, affinché forniscano un supporto clinico e scientifico per lo sviluppo di differenti tecnologie che pur consentendo una riduzione dei costi, garantiscano il miglioramento dell'outcome del paziente.

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.
- Killingsworth LM, Savory J. Automated immunochemical procedures for measurement of immunoglobulins IgG, IgA, and IgM in human serum. *Clin Chem* 1971; 17:936-40.
- Deaton CD, Maxwell KW, Smith RS, Crevelinf RL. Use of laser nephelometry in the measurement of serum proteins. *Clin Chem* 1976; 22:1465-71.
- Stemberg JC. A rate nephelometer for measuring specific proteins by immunoprecipitin reactions. *Clin Chem* 1977; 23:1456-64.
- Hill 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.
- Blirup-Jensen S. Protein standardization III: method optimization basic principles for quantitative determination of human serum protein on automated instruments based on turbidimetry or nephelometry. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39:1098-109.
- 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 912 TM. *Clin Chem Lab med* 2003; 40:520-28.
- Arcangeli L, Franzini C, Galletta G, Pagani A, Scappellato L. Analisi turbidimetrica automatica di proteine nel siero: valutazione dello strumento Olympus AU 500. *Biochim Clin* 1995; 19:17-23.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of precision performance of clinical chemistry devices; approved guideline. NCCLS guideline EP5-A. Wayne PA: NCCLS, February 1999.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of the linearity of quantitative analytical methods; proposed guideline. NCCLS guideline EP6-A. Wayne PA: NCCLS, September 1986.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Method comparison and bias estimation using patient samples; approved guideline. NCCLS guideline EP9-A. Wayne PA: NCCLS, December 1995.
- Martin RF. General Deming regression for estimating systematic bias and its confidence interval in method-comparison studies. *Clin Chem* 2000; 46:100-4.
- Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986; i:307-10.