

Il consolidamento della diagnostica proteica

Maria Stella Graziani¹, Gabriella Righetti¹, Maddalena Marini¹, Lorena Zardo², Paolo Rizzotti¹

¹Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche ed Ematologiche, Ospedale Civile Maggiore, Azienda Ospedaliera di Verona

²Centro di Ricerca Biomedica, Castelfranco Veneto (TV)

ABSTRACT

The consolidation of the protein measurement. In the last years, under the pressure of cost containment and greater efficiency, the clinical laboratory has evolved by consolidating a number of measurements on a single analytical platform. This laboratory area, named "corelab", usually operates 24 h per day and is characterized by high throughput and short turnaround time. This organisation is considered very successful but, because of its capacity of performing very rapidly an elevated number of measurements, it seems less capable of assuring attention to the appropriateness of requests and to the clinical utilization of laboratory data. This paper is aimed to examine some of the consequences connected to the consolidation of specific protein measurement in the corelab area. These laboratory data typically require to be interpreted together with the results of protein electrophoresis pattern and reported with comments and/or suggestions especially when patients with monoclonal components are involved. For these patients a consultancy with clinicians is quite often necessary. From the point of view of consolidation, proteins can be divided into three groups: proteins that can be consolidated because they do not need to be interpreted on the basis of electrophoresis results and are easily measured by turbidimetry (albumin, haptoglobin); proteins that need to be interpreted on the basis of serum or urine electrophoretic patterns (i.e. immunoglobulins), the consolidation of which is not recommended because they can slow down the corelab turnaround time; and proteins with poor analytical performance on turbidimetry (i.e. low concentration proteins) that cannot be consolidated. In conclusion, the consolidation of specific protein measurements cannot always be recommended. The pros and cons of such a decision also depend on the amount of activity and on the type of laboratory as well.

INTRODUZIONE

Il laboratorio clinico in questi anni si è andato profondamente modificando; le spinte a ricercare, negli schemi organizzativi, una maggiore efficienza unita ad un contenimento dei costi hanno portato alla scomparsa della suddivisione del laboratorio in settori analitici specializzati e alla istituzione di aree analitiche "consolidate", nelle quali accorpate su una sola piattaforma analitica esami eseguibili con metodologie diverse (essenzialmente chimica clinica ed immunometria). Tali piattaforme analitiche identificano un'area del laboratorio denominata "corelab", sovente operativa 24 ore al giorno, all'interno della quale vengono eseguiti un numero importante di esami sia di base che specialistici. Questa organizzazione viene perseguita perché ritenuta più economica ed efficiente di quella tradizionale. Il vantaggio economico deriva dal fatto che un solo potente strumento è senz'altro più economico di molteplici strumenti dedicati e che la trattativa con un'unica azienda porta ad un maggiore contenimento dei prezzi; inoltre (e questa probabilmente è la ragione predominante) questo tipo di gestione richiede meno personale dedicato. Dal punto di vista della efficienza organizzativa è anche necessario rilevare che con questa modalità viene gestito un numero inferiore di provette a parità di prelievi, che il personale viene istruito su un solo strumento e che il flusso lavorativo è generalmente più snello e semplice.

Queste strutture sono create per produrre, spesso a ciclo continuo, un grande numero di risultati con un basso "turnaround time" (TAT), ma spesso proprio per questa caratteristica consentono meno attenzione all'appropriatezza della richiesta ed al corretto utilizzo del dato di laboratorio da parte del clinico. Diversi autori hanno segnalato questo pericolo, specialmente quando il consolidamento riguarda la creazione di megastrutture che accorpano più laboratori (1,2).

Anche all'interno del singolo laboratorio riteniamo che alcune riflessioni vadano fatte su questo tipo di organizzazione, nell'intento di salvaguardare da un lato una gestione efficiente e un corretto utilizzo delle risorse e dall'altro il migliore "outcome" possibile per il paziente. Presentiamo qui alcune considerazioni in merito alle implicazioni di un eventuale consolidamento della diagnostica proteica e in particolare della misura delle proteine specifiche in un'area "corelab".

CONSIDERAZIONI GENERALI

Il campo della diagnostica proteica ha sempre avuto una riconosciuta specificità all'interno del laboratorio. Tipicamente, quelli relativi alle proteine sono dati per i quali viene spesso fornito un referto interpretativo piuttosto che meramente numerico e per i quali si attiva spesso una consulenza con il clinico. Per esempio, il soggetto con componente monoclonale è un soggetto per il

quale, sia al riscontro della malattia che durante il suo monitoraggio (che sovente si protrae per molti anni), si ha necessità di valutare insieme i dati delle tecniche separative con quelli delle analisi quantitative e di fornire un referto unitario (3-5). Per questo motivo le sezioni dedicate si sono dotate negli anni di sistemi (prima manuali e poi informatizzati) che prevedono la creazione e l'aggiornamento progressivo di una sorta di "cartella clinica" che raggruppa i risultati dalle determinazioni dell'elettroforesi proteica e delle immunoglobuline sieriche ed urinarie, eseguite ad ogni successiva visita del paziente, che costituisce un vero e proprio archivio informatizzato. Negli ultimi anni, per soddisfare questa specifica esigenza, sono stati proposti da parte delle aziende che si occupano di questa particolare diagnostica dei "middleware" di settore, che ricevono i dati dalla strumentazione che esegue l'elettroforesi (compreso il tracciato densitometrico) e da quella che esegue la misura delle immunoglobuline e li raggruppano in una scheda-paziente che raccoglie anche le informazioni ottenute dagli esami eseguiti manualmente, come l'elettroforesi urinaria e la ricerca della proteina di Bence Jones. Il tutto consente di seguire la storia clinica del paziente, di orientare il percorso diagnostico all'interno del laboratorio e di pronunciarsi eventualmente in merito, offrendo, se necessario, consulenza al medico curante e fornendo così un servizio che garantisce il miglior "outcome" per il paziente.

L'eventuale consolidamento della misura delle proteine specifiche presenta implicazioni che riguardano ognuna delle fasi del processo che porta alla produzione e all'utilizzo del dato di laboratorio (il "total testing process") che vengono di seguito separatamente esaminate. All'interno dell'area "corelab" potrebbero infatti coesistere due attività: quelle relative a esami a rapido TAT e quelle relative ad esami con TAT più lungo che hanno necessità di essere ricondotti (tramite opportuni "middleware") ad indagini eseguite in altri settori del laboratorio per la produzione di referti interpretativi a loro volta prodotti con l'utilizzo di archivi informatizzati per la gestione di specifiche patologie (accanto alla diagnostica proteica, potremmo ricordare a questo proposito il monitoraggio biochimico delle malattie neoplastiche). Questo secondo tipo di attività, per essere svolta correttamente, necessita di molteplici competenze che potrebbero essere difficili da reperire e mantenere all'interno di un unico gruppo di persone.

Aspetti preanalitici

Il campione di siero o di plasma eparinato sono considerati equivalenti, quindi l'esecuzione delle proteine specifiche su uno o sull'altro è indifferente (6). Tuttavia l'adozione del plasma eparinato (frequente in area corelab per ragioni di maggiore rapidità di trattamento) impedirebbe l'attivazione di un esame riflesso, quale per esempio quello dell'esecuzione di una elettroforesi proteica sul campione che presenti valori anomali e/o inattesi di una classe immunoglobulinica, visto che non è consigliabile eseguire l'elettroforesi proteica su plasma

per l'interferenza da fibrinogeno. In questa evenienza si dovrebbe quindi eseguire l'esame su un prelievo successivo.

Aspetti analitici

Le proteine sono analiti complessi da misurare; la loro misura soffre di variabilità consistente a causa di molteplici motivi (7). Più precisamente:

- sono molecole dotate di un'importante eterogeneità, genetica e acquisita;
- i processi di purificazione dell'antigene, necessari alla produzione degli anticorpi, selezionano necessariamente solo alcuni isotipi della proteina;
- antisieri differenti riconoscono sottogruppi diversi di epitopi;
- metodi basati su principi diversi (nephelometria, turbidimetria) misurano i complessi antigene-anticorpo in maniera diversa (8);
- nel saggio immunologico può venire a mancare il necessario parallelismo tra antigene presente nel calibratore e antigene presente nel liquido biologico in esame (9);
- i materiali di riferimento e quelli utilizzati per le VEQ presentano problemi di variabilità non sempre analoghi a quelli segnalati per i campioni biologici;
- non esistono metodi di riferimento che forniscano valori "veri";
- le proteine presentano un ampio intervallo di concentrazione (l'esempio tipico è quello delle immunoglobuline nelle patologie linfoproliferative), anche perché vengono misurate in liquidi biologici diversi, con la conseguente necessità di porre attenzione al problema dell'eccesso di antigene.

Nelle sezioni specialistiche, le proteine specifiche vengono prevalentemente misurate in nephelometria su strumentazione dedicata, mentre la strumentazione dei "corelab" usualmente utilizza metodi turbidimetrici. La qualità analitica dovrebbe essere la prima preoccupazione del laboratorio e dovrebbe quindi essere garantita indipendentemente dalla tecnologia utilizzata. Nel corso degli anni si è assistito ad un acceso dibattito tra i sostenitori di uno o dell'altro metodo senza che si sia arrivati a conclusioni definitive (10).

Un modo per affrontare il problema può essere quello di utilizzare i risultati delle VEQ. Nella Tabella 1 e nelle Figure 1-3 sono riportati i dati della VEQ del Centro di Ricerca Biomedica di Castelfranco Veneto relativamente alla imprecisione e al bias dei metodi per la determinazione delle immunoglobuline A, G, M del ciclo 2006. È possibile osservare che, mentre i metodi nephelometrici hanno CV abbastanza simili al loro interno, quelli turbidimetrici mostrano risultati meno omogenei. Alcuni sistemi analitici in turbidimetria hanno CV molto buoni e più bassi dei sistemi nephelometrici, mentre altri presentano CV sostanzialmente più elevati. Relativamente al bias, si può osservare che questo è decisamente sistema-dipendente piuttosto che metodo-dipendente. Solo per le immunoglobuline M si osserva la chiara tendenza ad ottenere valori di concentrazione più alti con i sistemi nefe-

Tabella 1

Variabilità interlaboratorio per gruppi di metodiche ottenuta nel programma VEQ del Centro di Ricerca Biomedica per la misura delle immunoglobuline sieriche. I CV riportati rappresentano le medie di 5 esercizi con 12 campioni analizzati nell'anno 2006

	n sistemi	Metodo/Sistema analitico	CV, %
Immunoglobuline A	62	<i>Nefelometria</i>	5,8
	14	Beckman Image	4,2
	38	Dade Behring BN	6,0
	99	<i>Turbidimetria</i>	6,9
	11	Abbott Systems	6,0
	18	Olympus AU	4,6
	10	Roche Cobas Integra	5,4
	30	Roche Hitachi/Modular	3,4
	8	Siemens Advia	6,8
	Immunoglobuline G	66	<i>Nefelometria</i>
14		Beckman Image	4,5
41		Dade Behring BN	5,5
99		<i>Turbidimetria</i>	6,5
11		Abbott Systems	4,3
17		Olympus AU	4,2
11		Roche Cobas Integra	5,2
29		Roche Hitachi/Modular	3,0
8		Siemens Advia	7,0
Immunoglobuline M		64	<i>Nefelometria</i>
	14	Beckman Image	6,4
	39	Dade Behring BN	6,6
	98	<i>Turbidimetria</i>	7,1
	11	Abbott Systems	5,6
	18	Olympus AU	4,6
	10	Roche Cobas Integra	5,0
	30	Roche Hitachi/Modular	3,9
	8	Siemens Advia	8,2

lometrici piuttosto che con i turbidimetrici.

Anche la consultazione dei dati relativi alle verifiche di qualità BioRad, che consentono il confronto fra utilizzatori, porta ad analoghe conclusioni (11). Nella Tabella 2 sono riportati i dati relativi ad alcune proteine; come si può osservare, mentre le medie sono simili fra le due tecniche, i CV medi sono sempre più elevati per la turbidimetria e l'intervallo di variazione più ampio. In alcuni casi, come ad esempio per l'apolipoproteina B, l'intervallo è così ampio che include in larga misura il valore decisionale (1,20 g/L). Risulta facile attribuire questa maggiore variabilità al fatto che il numero di sistemi nefelometrici è molto ristretto, mentre i sistemi analitici che misurano le proteine in turbidimetria su piattaforme di chimica clinica sono molteplici e presentano caratteristiche molto diverse tra di loro.

Una riflessione a parte meritano le VEQ che riguardano le misure di proteine specifiche presenti a bassa concentrazione nei liquidi biologici diversi dal siero. Nella

Tabella 3 e nella Figura 4 sono riportati i dati della VEQ del Centro di Ricerca Biomedica relativamente alla imprecisione e al bias per la misura della albumina nelle urine. Anche in questo caso, il CV è lievemente inferiore per i metodi nefelometrici rispetto ai metodi turbidimetrici. Mentre i diversi metodi nefelometrici hanno CV abbastanza simili, quelli turbidimetrici variano da 4,2% a 7,9%. Per quanto riguarda il bias, i metodi nefelometrici nel loro complesso presentano un bias più contenuto, mentre tra i metodi turbidimetrici troviamo sistemi diagnostici con bias molto ridotti e metodi con bias elevati (oltre il 10%).

Per quanto riguarda l'albumina e le immunoglobuline G misurate nel liquor, la VEQ inglese (UKNEQAS) non riporta i risultati della misura dell'albumina con sistemi turbidimetrici e mostra come le immunoglobuline G siano misurate in turbidimetria solo da un numero ristretto di partecipanti (Tabella 4). La turbidimetria peraltro fornisce valori molto diversi da quelli dei due sistemi nefelometri-

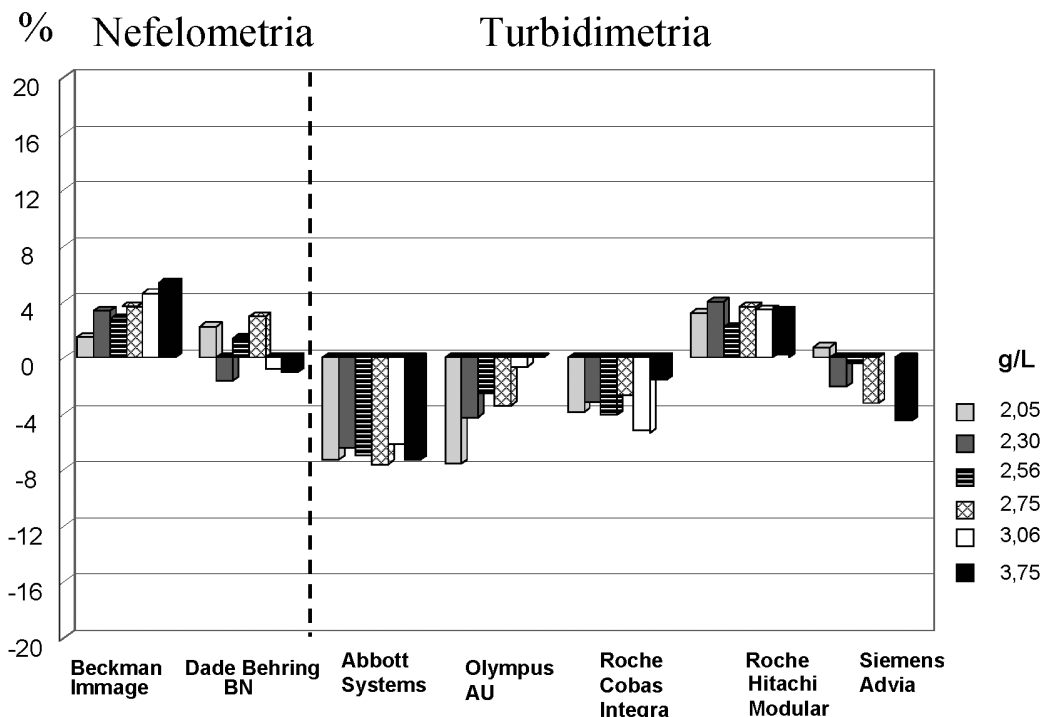


Figura 1
Bias dei sistemi diagnostici maggiormente utilizzati relativi a 6 campioni a concentrazione crescente distribuiti nel ciclo di VEQ 2006 per immunoglobulina A rispetto alla mediana di consenso.

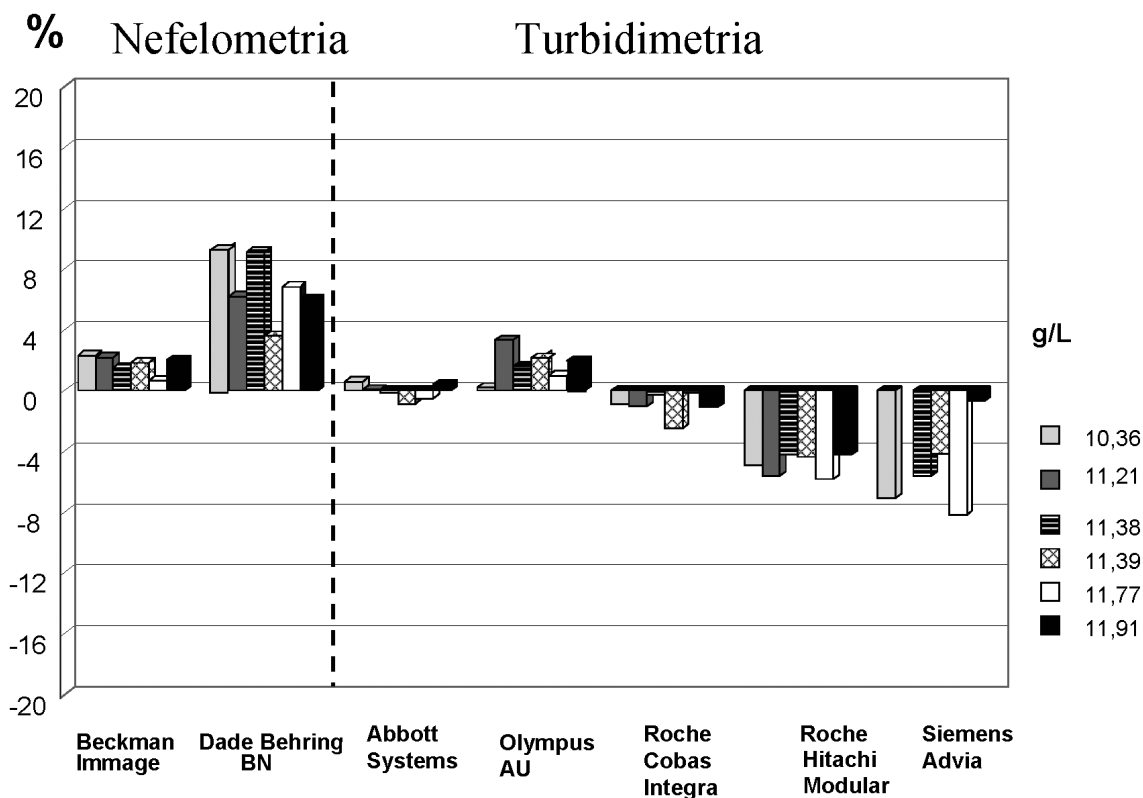


Figura 2
Bias dei sistemi diagnostici maggiormente utilizzati relativi a 6 campioni a concentrazione crescente distribuiti nel ciclo di VEQ 2006 per immunoglobulina G rispetto alla mediana di consenso.

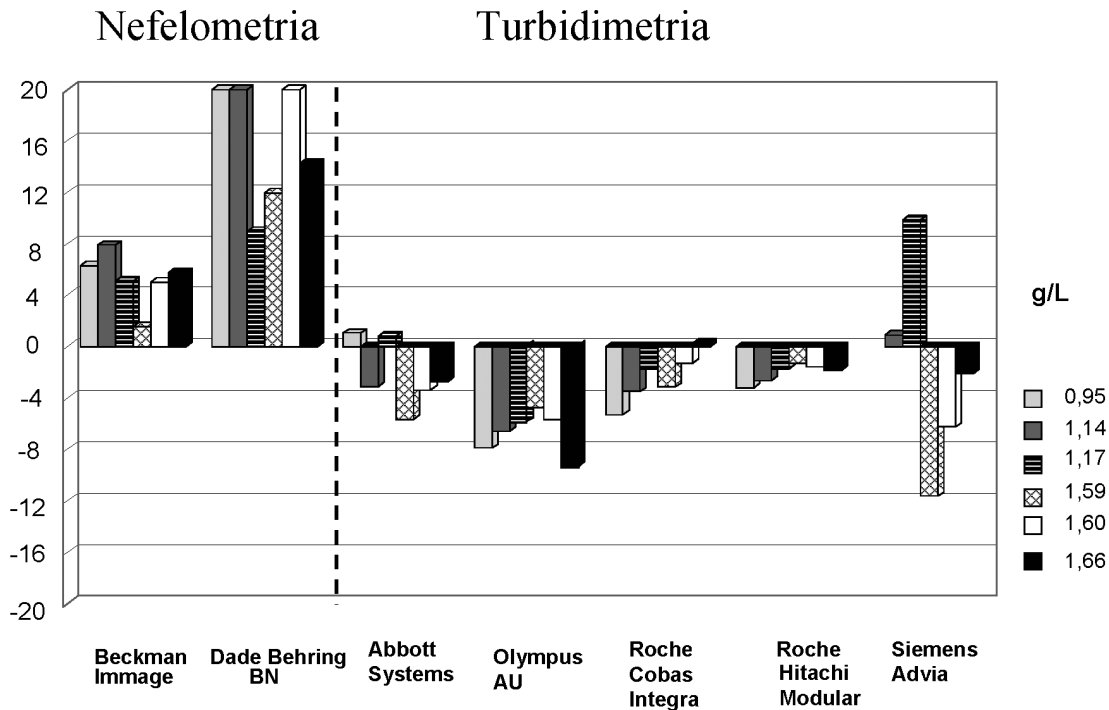


Figura 3
Bias dei sistemi diagnostici maggiormente utilizzati relativi a 6 campioni a concentrazione crescente distribuiti nel ciclo di VEQ 2006 per immunoglobulina M rispetto alla mediana di consenso.

Tabella 2
BioRad worldwide reports. Controllo Immunology, lotto 52270

	n sistemi	n laboratori	Media, g/L	Valore minimo	Valore massimo	CV, %
<i>Apolipoproteina B</i>						
nefelometria	2	19	1,03	1,02	1,03	5,1
turbidimetria	16	48	1,09	0,97	1,36	10,0
<i>Aptoglobina</i>						
nefelometria	2	53	0,60	0,59	0,65	4,5
turbidimetria	18	91	0,65	0,49	0,73	5,7
<i>Immunoglobine G</i>						
nefelometria	2	113	9,81	9,30	10,30	4,0
turbidimetria	20	128	9,47	8,50	10,20	5,0
<i>Immunoglobine A</i>						
nefelometria	2	112	1,35	1,32	1,43	4,1
turbidimetria	20	127	1,26	1,05	1,48	6,6
<i>Immunoglobine M</i>						
nefelometria	2	111	0,64	0,63	0,75	4,8
turbidimetria	19	125	0,64	0,55	0,82	13,9

ci e con una variabilità non accettabile.

Al momento, dunque, non è possibile affermare che i metodi nefelometrici siano superiori a quelli turbidimetrici sempre e per ogni proteina. Sembra tuttavia verificato che mentre i metodi nefelometrici forniscono risultati consistenti tra loro (pur nelle difficoltà della standardizzazione per queste misure, che sappiamo non ottimale (12-

13), la turbidimetria è implementata in numerosi sistemi analitici con caratteristiche molto diverse. Esiste quindi la necessità di valutare singolarmente ogni metodica; purtroppo questo risulta particolarmente difficile da attuare nella filosofia del consolidamento, all'interno della quale si acquistano in blocco da un unico fornitore molte metodiche. Un'ulteriore riflessione riguarda il fatto

che alcune proteine presenti in bassa concentrazione in alcuni liquidi biologici sono misurabili con difficoltà sulle piattaforme di chimica clinica e le implementazioni relative sono poche, probabilmente per la scarsa consistenza numerica di tali richieste.

Aspetti post-analitici

Le misure di diverse proteine (prime fra tutte le immunoglobuline) devono essere valutate sulla base dei risultati di tecniche qualitative relativamente indaginose

(ad esempio l'elettroforesi). Il vantaggio di produrre i risultati rapidamente viene quindi vanificato, in quanto molti di essi non potranno essere resi disponibili velocemente ai reparti. L'esecuzione delle proteine su strumentazione consolidata potrebbe inoltre rendere più difficoltosa la gestione unitaria dei referti attraverso i "middleware" dedicati, anche per la necessaria coesistenza di competenze diverse che dovrebbero risiedere all'interno dello stesso gruppo di lavoro.

Tabella 3

Variabilità interlaboratorio per gruppi omogenei di metodiche ottenuta nel programma di VEQ del Centro di Ricerca Biomedica per la misura dell'albumina urinaria. I CV riportati sono le medie di 4 esercizi con 8 campioni analizzati nell'anno 2006

Metodo/Sistema analitico	n sistemi	CV, %
<i>Nefelometria</i>	57	8,2
Beckman Array	8	7,0
Beckman Immage	13	8,3
Dade Behring BN	33	6,7
<i>Turbidimetria</i>	183	9,5
Bayer Advia	14	7,9
Beckman Synchron CX/LX	13	7,9
Olympus AU	33	4,2
Roche Hitachi/Modular	56	7,5
Roche Integra	20	5,8

Tabella 4

VEQ UKNEQAS per proteine del liquor. Distribuzione 071, campione 0712, marzo 2007

	n sistemi	Media mg/L	SD, mg/L	CV, %
<i>Albumina</i>				
Nefelometria Beckman	11	136,2	8,2	6,1
Nefelometria Dade Behring	15	139,0	11,2	8,0
<i>Immunoglobine G</i>				
Nefelometria Beckman	11	37,1	2,0	5,3
Nefelometria Dade Behring	15	37,2	2,7	7,1
Turbidimetria Roche	5	76,8	96,8	126,1

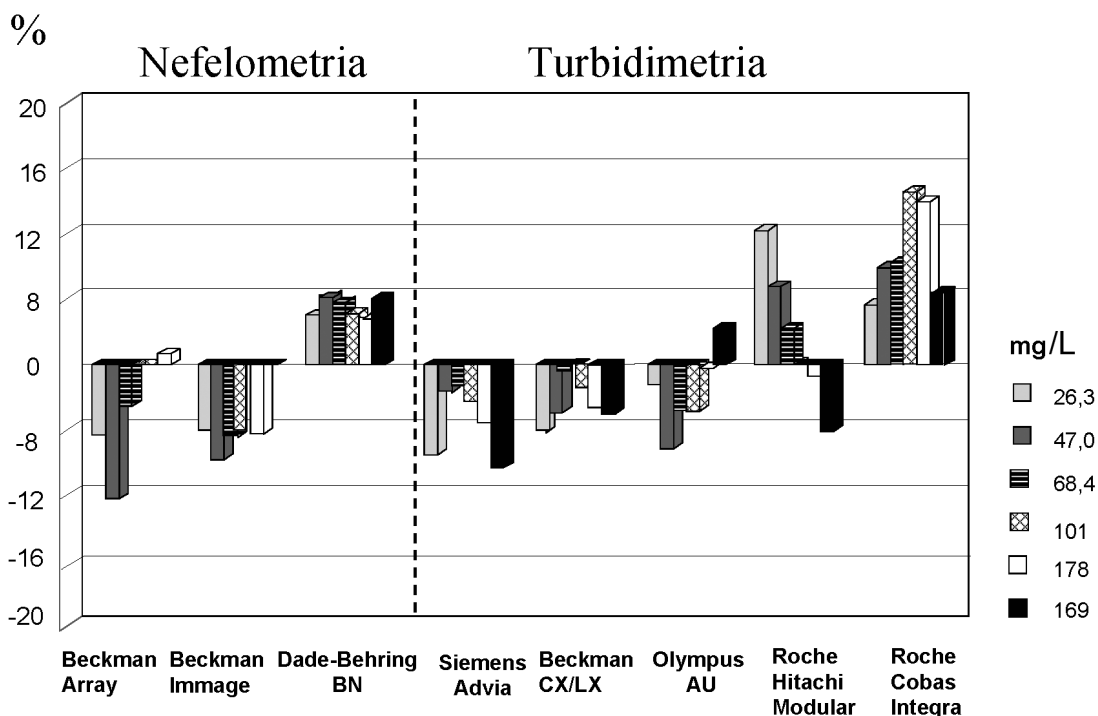


Figura 4

Bias dei sistemi diagnostici maggiormente utilizzati relativi a 6 campioni a concentrazione crescente distribuiti nel ciclo di VEQ 2006 per albumina urinaria rispetto alla mediana di consenso

Aspetti gestionali

Le reazioni immunochimiche sono generalmente più lunghe delle misure colorimetriche o enzimatiche e, quindi, c'è il concreto pericolo che le misure proteiche (che possiamo definire a TAT medio) rallentino il TAT complessivo di un "corelab". Spesso poi, per l'esigenza di verificare che la misura avvenga nella zona di equivalenza antigene-anticorpo, la reazione viene ripetuta a diluizioni diverse da quelle preimpostate, con ulteriore allungamento dei tempi di analisi.

Nella nostra esperienza, circa il 10% delle misure proteiche ogni giorno deve essere ripetuta per questi motivi ed è ipotizzabile che questo avvenga con frequenza anche maggiore se la proporzione di campioni patologici e/o pediatrici che il laboratorio esamina è elevata. La valutazione, quindi, se aggravare il TAT del "corelab", che si suppone ideato per rispondere rapidamente ad un elevato numero di richieste, con esami che non hanno necessità di essere refertati rapidamente deve essere attenta.

Un'ulteriore considerazione è relativa al fatto, già menzionato, che alcune proteine richieste poco frequentemente o le misure di proteine su liquidi biologici diversi dal sangue non sono disponibili sulle piattaforme consolidate e che quindi il laboratorio che serve un ospedale di grandi dimensioni o specialistico avrà comunque bisogno di un nefelometro dedicato a queste misure. I laboratoristi sanno quanto è difficile e nel contempo dispendioso mantenere qualità analitiche adeguate su strumentazioni che eseguono pochi esami. Se è necessario dunque disporre di un nefelometro, sarà più vantaggioso che lo strumento esegua il maggior numero di esami possibili. Questo concetto si può applicare anche al personale: considerato che personale dedicato deve essere mantenuto (per l'esecuzione di elettroforesi sieriche ed urinarie, ricerca Bence Jones, diagnostica liquorale) e che quindi debba esistere nel laboratorio una sezione specialistica, tanto vale che vi si eseguano un certo numero di indagini invece che poche misurazioni.

IPOTESI DI LAVORO

Dal punto di vista della possibile misura delle proteine specifiche in area "corelab", queste si possono suddividere in tre gruppi:

1. proteine per le quali il consolidamento è auspicabile. Si tratta di proteine che non hanno necessità di essere valutate sulla base delle tecniche separative e che non presentano problemi analitici particolari perché sono presenti in concentrazione adeguata, non presentano ampi intervalli di misura e presentano limitata o nota eterogeneità (es. albumina, aptoglobina, α -1-glicoproteina acida, α -1-antitripsina);
2. proteine per le quali il consolidamento è svantaggioso perché hanno necessità di essere valutate sulla base delle tecniche separative e per le quali peraltro la qualità analitica su piattaforme consolidate non può essere data per scontata (es. immunoglobuline, β -2-microglobulina);

3. proteine per le quali il consolidamento non è consigliabile per problemi analitici (la misura turbidimetrica non è adeguata o non è sempre adeguata) (es. lipoproteina(a), apolipoproteine A-I e B, sottoclassi immunoglobuliniche G, proteine su liquidi biologici diversi dal sangue).

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Riteniamo che al momento non possa esistere una risposta univoca al quesito se è vantaggioso consolidare la misura delle proteine specifiche. Piuttosto la risposta deve dipendere dalle caratteristiche del singolo laboratorio, considerando tutte le diverse variabili sopra riportate. Le più importanti rimangono:

- il volume di attività: un laboratorio di piccole/medie dimensioni avrà molti più svantaggi (economici e di gestione) nel mantenere una sezione dedicata alla misura delle proteine;
- la tipologia: un laboratorio che esegua solo albumina e immunoglobuline, con una larga percentuale di pazienti esterni e che invii gli esami più specialistici ad altri laboratori, non presenta particolari svantaggi a consolidare queste misure. Viceversa, un laboratorio di un ospedale complesso e/o ad alta specializzazione, che esegue esami specialistici e riceve da altri centri questo tipo di richieste, sarà opportuno che mantenga una sezione con personale e strumentazione dedicata dove concentrare gli esami proteici.
- le risorse (economiche e di personale) a disposizione: il rapporto costo/beneficio di una determinata organizzazione deve ovviamente essere sempre tenuto in considerazione;
- la presenza in laboratorio di specifica professionalità: se questa non esiste avrà poco significato avere una sezione dedicata.
- le prestazioni analitiche delle strumentazioni disponibili.

BIBLIOGRAFIA

1. Muller MM. The millennium 2000; laboratory medicine-from where? To where? Clin Chem Lab Med 2000;38:1-2.
2. Plebani M. The future of clinical laboratories: more testing or knowledge services? Clin Chem Lab Med 2005;43:893-6.
3. The International Myeloma Working Group. Criteria for classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. Br J Haematol 2003;121:749-57.
4. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, et al. Long term follow up of 241 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance: the original Mayo Clinic series 25 years later. Mayo Clinic Proc 2004;79:859-66.
5. Blade J. Clinical practice. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. N Engl J Med 2006;355:2765-70.
6. Miles RR, Roberts RF, Putnam AR, Roberts WL. Comparison of serum and heparinized plasma samples for measurement of chemistry analytes. Clin Chem 2004;50:1704-5.
7. Whicher JT, Warren C, Chambers RE. Immunochemical

- assays for immunoglobulins. *Ann Clin Biochem* 1984;21:78-91.
8. Price CP, Spencer K, Whicher J. Light-scattering immunoassay of specific proteins: a review. *Ann Clin Biochem* 1983;20:1-14.
 9. Bullock DG, Dumont G, Vassault A, et al. Immunochemical assays of serum proteins: a European external quality assessment survey and the effects of calibration procedures on interlaboratory agreement. *Clin Chim Acta* 1990;31:21-35.
 10. Blirup-Jensen S. Protein standardisation III. Method optimisation basic principles for quantitative determinations of human serum proteins on automated instruments based on turbidimetry or nephelometry. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:1098-109.
 11. <http://classic.qcnet.com/italian/login.asp>
 12. 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;39:1123-8.
 13. Ledue TB, Johnson AM. 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.