

dal Meeting

“Le proteine: dal Laboratorio alla Clinica”

X Edizione - Castrocaro, 24 – 26 Ottobre 2001

Organizzato da: CEFAR – Centro Europeo per la Formazione e la Ricerca in Scienze Sanitarie e in Biotecnologie
Patrocino di: SIBioC – Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica

Valutazione Multicentrica di Metodi commerciali di routine per la ricerca delle Proteine di Bence Jones in urine – Risultati 2001

Presenta: Walter Tizzanini – Laboratorio Analisi – Azienda Policlinico - Modena

- ❑ Commissione di studio InterRegionale "**Forlì**" su “Proteine di Bence Jones e Catene Leggere Libere”
Segreteria Scientifica: **Gualtiero Pallotti** – Ospedale Pierantoni – Forlì
- ❑ Commissione congiunta SIBioC – AIPAC – SIMEL, **Sezioni Liguri**, su “Proteine di Bence Jones e Catene Leggere Libere”
Segreteria Scientifica: **Liliana Burlando** – già Ospedale Galliera – Genova
Giovanna Zaninetta – Ospedale S. Martino - Genova
- ❑ Commissione di studio "**Lazio**" su “Proteine di Bence Jones e Catene Leggere Libere”
Segreteria Scientifica: **Maria Teresa Muratore** – Ospedale Civile – Viterbo
- ❑ Commissione di studio "**Toscana-Umbria**" su “Proteine di Bence Jones e Catene Leggere Libere”
Segreteria Scientifica: **Enzida Piazza** – Ospedale Careggi – Firenze

Organizzazione e coordinamento:

Leonardo Massaro, Rita Scaringi - New Scientific Company S.r.l. – Via Dante, 35 – I 20032 Cormano (MI)

Indice

- ❑ Partecipanti
- ❑ Abbreviazioni non standard
- ❑ Parole chiave
- ❑ Riassunto
- ❑ Introduzione
- ❑ Metodo di lavoro
- ❑ Obiettivi e Strategie Generali
- ❑ Caratteristiche auspicabili per metodi e protocolli
- ❑ Obiettivi della sperimentazione multi-centrica
- ❑ Campioni e Metodologia
- ❑ Stabilità delle Diluizioni Distribuite
- ❑ Risultati e Discussione
- ❑ Conclusioni
- ❑ Bibliografia
- ❑ Tabelle

Abbreviazioni non standard

BJP	(Bence Jones Proteins) Proteine di Bence Jones
BJ	Bence Jones
FLC	(Free Light Chains) Catene Leggere Libere
FRK	(Free Light Chains kappa) Catene Leggere Libere kappa
FRL	(Free Light Chains lambda) Catene Leggere Libere lambda
FLC-pc	(policlonal-Free Light Chains) Catene Leggere Libere policlonali
LC(b&f)	(Light Chains bound & free) Catene Leggere Totali libere & legate
IFE	Immunofissazione

Parole Chiave

Proteine di Bence Jones, Catene Leggere Libere kappa, Catene Leggere Libere lambda, Bence Jones Proteins, Free Light Chains, Light Chains kappa, Light Chains lambda

Partecipanti

Commissione di studio InterRegionale **"Forlì"** su "Proteine di Bence Jones e Catene Leggere Libere"

Partecipanti al lavoro della riunione del 16 giugno 2000

Ospedale Civile	Asola	Scipiotti C
Ospedale di Bentivoglio	Bentivoglio (BO)	Milanesi MG, Turra F
Ospedale Bellaria	Bologna	Martelli M, Zannini R
Ospedale Maggiore	Bologna	Cucci A
Ospedale Civile	Bra (CN)	Testa G, Valle S
Spedali Civili – Lab. Immunologia	Brescia	Quinzanini M
Ospedale di Faenza	Faenza	Gollini C
Ospedale Santa Croce	Fano	Sadori R
Ospedale Careggi	Florence	Piazza E
Ospedale Pierantoni	Forlì	Mambelli C, Pezzi L
Ospedale Civile	Fossombrone (PS)	Del Prete E
Ospedale Policlinico	Modena	Tizzanini W, Guidetti F
Ospedale Civile	Monselice (PD)	Mingardo S
Ospedale Destra Secchia	Pieve di Coriano (MN)	Tirelli F, Zanni R
Ospedale San Salvatore	Pesaro	Acetoso M
Ospedale Civile	Piacenza	Croci E
Ospedale del Ceppo	Pistoia	Valenti D, Lucherini M
Ospedale Santa Maria degli Angeli	Pordenone	Ferrai MG
Ospedale Santa Maria delle Croci	Ravenna	Gardini G
Ospedale Infermi	Rimini	Argento A, Conti C
Ospedale Civile	Viterbo	Muratore MT

Commissione congiunta **SIBioC – AIPAC – SIMEL, Sezioni Liguri**, su "Proteine di Bence Jones e Catene Leggere Libere"

Partecipanti al lavoro della riunione del 22 giugno 2000

Ospedale S. Martino	Genoa	Zaninetta G, Milone S
Ospedale Galliera	Genoa	Campanella A, Romano R
Ospedale Evangelico	Genoa	Baiardi C, Intra E
Ist.to Giannina Gaslini	Genoa	Famularo L, Mangraviti S
Ospedale S. Carlo	Genoa Voltri	Barbaro GB, Patrone C
Ospedale Civile	Lavagna	Venturini M, Albalustri G, Marrè V, Musso M
Ospedale San Paolo	Savona	Minetti F, Parodi EF

Commissione di studio "Lazio" su "Proteine di Bence Jones e Catene Leggere Libere"

Partecipanti al lavoro della riunione del 10 Aprile 2001

Istituto Dermatologico Villa Paola	Capranica P. (RM)	Lo Monaco
Ospedale Civile	Civita Castellana (VT)	Ceccarelli P
Ospedale Civile	Montefiascone (VT)	Brutti A, Flais D, Montanaro
Ospedale Civile	Rieti	Ursicino N, Zepponi E
Ospedale S.Camillo	Rome	Gubbiotti A, Lenci G
Ospedale Sandro Pertini	Rome	Lenci G
Ospedale S.Giovanni	Rome	Ruggeri M
Policlinico Umberto I	Rome	Ciarla MV, Carlizzi G
Ospedale S.Anna	Ronciiglione (VT)	Petruzzi S
Ospedale Civile	Sora (FR)	Busi Rizzi C
Ospedale Civile	Viterbo	Muratore MT

Commissione di studio "Toscana-Umbria" su "Proteine di Bence Jones e Catene Leggere Libere"

Partecipanti al lavoro della riunione del 24 Maggio 2001

Ospedale Civile	Abbadia S.Salvatore SI	Piccini L
Ospedale S.Donato	Arezzo	Guidelli M, Panichi F
Ospedale Civile	Borgo S.Lorenzo FI	Rosichini
Ospedale Civile	Castel del Piano GR	Giacalone G
Ospedale Civile	Città di Castello PG	Mari , Sabini D
Ospedale Serristori	Figline Valdarno FI	Pani , Righi
Ospedale Careggi	Florence	Chiarugi , Messeri G, Piazza E
Istituto Ricerche Cliniche M. Fanfani	Florence	Fuzi
Ospedale S.M.Nuova	Florence	Biliotti G, Casprini P, Spadolini MP
Ospedale Civile della Misericordia	Grosseto	Capirci G, Rechichi
Ospedale ASL 6	Livorno	Leoni
Ospedale Civile	Lucca	Donati , Savarino A
Ospedale del Ceppo	Pistoia	Valenti D
Ospedale Civile Elbano	Porto Ferraio LI	Barracchia A
Ospedale S.Maria	Terni	Caffarelli
Usl 7 zona Valdichiana	Cianciano SI	Scapellato C
Ospedale Tarrabacci	Viareggio	Bartoli , Galleni , Polvani

Riassunto

Obiettivo dei gruppi di studio è la verifica della possibilità di uniformare la valutazione, l'interpretazione e la comunicazione refertuale delle Proteine di Bence Jones (BJP) e, più in generale, delle Catene Leggere Libere (FLC) in urine.

Da un precedente lavoro del gruppo "Forlì" (1) e dalle successive valutazioni multicentriche condotte in questi anni sia dal gruppo "Forlì" sia dal gruppo "Liguria" è emerso che per la ricerca delle BJP sono inaffidabili:

- il dosaggio delle Proteine Totali in urine
- lo stick per dosaggio delle Proteine Totali in urine.

In questo lavoro vengono presentati i risultati complessivi ottenuti dalla valutazione multi-centrica multi-metodologica di tre diluizioni scalari di due campioni di urina: uno con BJP lambda e uno con BJP kappa eseguita dai Gruppi di Studio "Forlì" e "Liguria" nel 2000 (25 Laboratori). Per entrambi i campioni la concentrazione di BJP nelle diluizioni distribuite è compresa tra circa 2 mg/dl e 0.3 mg/dl. Questi risultati sono stati integrati con quelli ottenuti nel corso del 2001 dai Gruppi "Lazio" e "Toscana-Umbria" (27 Laboratori) su due delle suddette diluizioni, quelle a maggiore concentrazione.

I risultati dimostrano che le migliori performance sono state ottenute con la Nefelometria/Turbidimetria con reagente per le Catene Leggere Libere (FLC) subito seguita da quella con reagente per le Catene Leggere Totali libere & legate (LC(b&f)); nettamente staccate risultano l'ImmunoFissazione (IFE) e l'Elettroforesi (EF) che hanno dato alcuni risultati negativi anche sui campioni "A1" con concentrazione di BJP di circa 2 mg/dl.

La valutazione ha consentito di definire quali "campioni di riferimento" almeno in termini di "positivo/negativo" due diluizioni del campione BJP-kappa Lavagna e due del campione BJP-lambda Bellaria. Per entrambi i campioni la concentrazione di BJP nelle due diluizioni proposte preconfezionate è stata stimata in circa 2 mg/dl e 0.5 mg/dl.

Introduzione

Attualmente l'indagine sulle Catene Leggere Libere (FLC) è rivolta alla ricerca delle Proteine di Bence Jones (BJP), cioè di Catene Leggere Libere Monoclonali in urine, mentre le Catene Leggere Libere Policlonali (FLC-pc) sono considerate un rilievo accessorio, a meno che non si intenda ricercarle specificamente, come indice di proteinuria tubulare, e in questo caso parrebbe metodo d'elezione la determinazione quantitativa diretta con l'ImmunoPrecipitazione in fase Liquida, turbidimetria o nefelometria, realizzata con Reagenti specifici per le FLC.

All'importanza della ricerca intorno alle BJP (e alle FLC), non sembra, allo stato, corrispondere una adeguata standardizzazione di metodi, protocolli,

riferimenti, controlli e della comunicazione refertuale, tutte esigenze fortemente sentite dagli operatori unitamente alla possibilità del confronto di esperienze concrete sull'argomento.

Tale esigenza, unita alla possibilità del confronto di esperienze concrete è fortemente sentita dagli operatori del settore.

La New Scientific Company (NSC) ha raccolto queste esigenze curando la parte organizzativa dei gruppi di studio che si sono via via andati costituendo.

Il Gruppo "Forlì" ha tenuto dieci riunioni a partire dal 1993 con una media di 30 Laboratori dall'Emilia-Romagna e da altre regioni; il Gruppo "Liguria" con una media di 10 Laboratori ha realizzato quattro riunioni dal 1997. A questi si sono recentemente aggiunti i gruppi "Lazio" e "Toscana-Umbria"

Metodo di Lavoro

I gruppi di studio realizzano periodicamente "riunioni di coordinamento" con a formula della tavola rotonda a libero dibattito.

Nella riunione si esaminano e si discutono i risultati del lavoro precedentemente svolto e si definisce il lavoro da svolgere per la riunione successiva.

Obiettivi e Strategie Generali

Obiettivo dei gruppi di studio è la verifica della possibilità di uniformare

- la valutazione,
- l'interpretazione e
- la comunicazione refertuale

delle Proteine di Bence Jones (BJP) e, più in generale, delle Catene Leggere Libere (FLC) in urine.

Sarebbe infatti auspicabile che un campione risultasse almeno "BJP-positivo" o "BJP-negativo" in tutti i Laboratori a prescindere dal metodo o dal protocollo, cioè dall'insieme di metodi di screening e di approfondimento, utilizzato.

La strategia adottata è quella del confronto delle esperienze operative della routine quotidiana di realtà dimensionali, strutturali e organizzative diversificate e molteplici partendo dalla verifica delle "caratteristiche reali" dei metodi percorribili nella pratica.

A tal fine è stato stabilito di valutare la "sensibilità" e la "precisione" dei singoli metodi per poi collocarli nella strategia di ricerca delle BJP.

La valutazione della "precisione" non solo è preliminare alla possibilità di una eventuale determinazione quantitativa ma è indispensabile per la corretta valutazione della "sensibilità".

Per una prima verifica abbiamo utilizzato il modello elementare, ma lineare, costituito da diluizioni scalari di campioni con una importante BJP e solo tracce di altre proteine.

Ciò consente di valutare e confrontare "sensibilità e precisione" dei metodi nel rilevare la "anormalità del campione" a prescindere da qualsiasi considerazione sulla concentrazione assoluta della BJP.

Questo approccio è sembrato l'indispensabile punto di partenza pur non essendo esaustivo causa l'eterogeneità delle BJP e delle FLC:

- Le BJP sono tra loro antigenicamente diverse pur nell'ambito dello stesso tipo e questo può determinare variazioni di risposta nelle tecniche di ImmunoPrecipitazione in fase Liquida (Nefelometria, Turbidimetria) e nella ImmunoFissazione (IFE) mentre non influenza l'ElettroForesi (EF).
- Le Catene Leggere Libere Policlonali (FLC-pc) saranno evidenziate con minore sensibilità dalla EF e dalla IFE rispetto ad una pari quantità di BJP poiché, per la distribuzione su una superficie più ampia rispetto alla banda ristretta tipica della BJP, le FLC-pc avranno una concentrazione per unità di superficie più bassa.

Caratteristiche auspicabili per metodi e protocolli

Il metodo o il protocollo “**perfettamente efficace**” per le BJP e le FLC dovrebbe essere caratterizzato da:

- a) **nessun “falso negativo” – Sensibilità e Precisione**
E' la caratteristica principale e irrinunciabile e di conseguenza per essa si richiede la massima riproducibilità intra ed inter-laboratorio: si dovrebbe definire la “sensibilità” e la “precisione” di ciascun metodo.
- b) **nessun “falso positivo” – Specificità del Segnale di Positività**
L'efficacia diminuisce man mano che aumenta il numero di “falsi positivi”.
- c) **buona informazione quantitativa**
Si dovrebbe valutare oltre alla “precisione” anche la “accuratezza”.
La valenza di questo elemento dipende da quanto è sentita l'esigenza della determinazione quantitativa assoluta.

Obiettivi della sperimentazione multi-centrica

Questa sperimentazione ha inteso verificare, sui “campioni di riferimento” come definiti nella precedente multi-centrica '99 (2), l'efficacia dei metodi in uso nei Laboratori partecipanti in termini di “sensibilità” e “precisione”.

La valutazione della “accuratezza” e della “efficacia generale” sarà oggetto di future sperimentazioni già programmate per il 2001 - 2002.

Campioni e metodologia

I Campioni sono stati ottenuti diluendo le urine originarie prescelte per la sperimentazione così da avere le concentrazioni approssimative di BJP concordate dai partecipanti.

La NSC ha curato la preparazione dei campioni e la distribuzione ai partecipanti.

Le diluizioni sono state eseguite in PBS e distribuite in flaconi da 5 ml etichettate in esplicito con il nome convenzionale del campione, il tipo di BJP presente e la diluizione.

Insieme ai campioni identificati sono state distribuite le schede per l'annotazione dei risultati.

La tabella sottostante riporta i campioni e le diluizioni esaminate.

Campione	BJP kappa (Lavagna) (2)			BJP lambda (Bellaria)		
	AI	A	B	AI	A	B
Diluizione						
Concentrazione orientativa (1) mg/dl	1,8	0,7	0,3	1,8	0,7	0,2

Nota bene

- 1) La concentrazione orientativa viene qui riportata per chiarezza; essa è stata ottenuta a posteriori ed è la media delle misurazioni ottenute con i metodi quantitativi.
- 2) Il campione BJ-kappa Lavagna evidenzia alla IFE oltre alla BJP anche FLC policlonali.
- 3) I campioni “B” sono stati esaminati solo dai Gruppi “Forli” e “Liguria” e non sono stati inseriti nella multi-centrica dei Gruppi “Lazio” e “Toscana-Umbria” perché ritenuti eccessivamente bassi.

Quesito

Se i campioni fossero arrivati ai laboratori partecipanti con la richiesta di “Ricerca della Proteina di Bence Jones” quale sarebbe stata la risposta?

Procedura Operativa

I Laboratori partecipanti hanno analizzato i campioni con i metodi sia di screening sia di approfondimento in uso nella routine per la ricerca delle BJP.

Alcuni Laboratori hanno eseguito più repliche in diverse sedute analitiche.

Risultato atteso

Tutti i campioni avrebbero dovuto dare risultato positivo per il tipo di BJP indicato sulla etichetta di identificazione del campione

Risultato Positivo

E' stato considerato “risultato positivo” il “segnale di anormalità” tipico di ciascun metodo.

Stabilità delle Diluizioni Distribuite

L'intervallo tra preparazione delle diluizioni distribuite ed esecuzione dei test nei Laboratori è stato molto variabile.

La stabilità delle diluizioni distribuite è stata perciò controllata determinando le FLC con metodo immunoturbidimetrico manuale con reagente specifico anti FLC.

Si è rilevato che entrambi i campioni kappa e lambda “B” hanno avuto un certo degrado per poi stabilizzarsi, mentre gli altri non hanno mostrato variazioni apprezzabili nel periodo di osservazione.

La stabilità è stata inoltre confermata “sul campo” dalla riproducibilità interlaboratorio delle determinazioni nefelometriche e turbidimetriche.

Risultati e Discussione

I Campioni sono stati esaminati da **52 Laboratori** ospedalieri che hanno complessivamente eseguito **oltre 2000 determinazioni**.

Da precedenti lavori di valutazione multi-centrica (1) (2) è emerso che, per la ricerca delle BJP, sono poco affidabili e **attualmente** non dovrebbero essere utilizzati:

- il dosaggio delle Proteine Totali in urine
 - lo stick per dosaggio delle Proteine Totali in urine
- Pertanto tali metodi non sono stati utilizzati dai Laboratori partecipanti.

Riepilogo e confronto dei metodi

La Tabella 1 mostra sinteticamente il confronto complessivo dei risultati ottenuti sui sei campioni con i cinque tipi di tecniche utilizzate dai diversi Laboratori.

I campioni sono stati analizzati da 52 Laboratori che complessivamente hanno eseguito oltre 2000 test – molti Laboratori infatti hanno controllato la ripetibilità intra-laboratorio eseguendo più repliche – e sono stati così ottenuti con le diverse tecniche **750 “risultati finali”**.

Il confronto complessivo delle tecniche evidenzia che le migliori performance sono state ottenute con la Nefelometria/Turbidimetria con reagente per le FLC subito seguita da quella con reagente per le LC(b&f); nettamente staccate risultano l’Immunofissazione e l’Elettroforesi che hanno dato alcuni risultati negativi anche sui campioni “A1” con concentrazione di BJP di circa 2 mg/dl.

Elettroforesi (EF)

La Tabella 2 riporta i risultati dei campioni con i diversi metodi elettroforetici commerciali.

L’oro colloidale utilizzato da un laboratorio non ha dato risultati migliori rispetto agli altri metodi con coloranti “tradizionali” confermando, come già precedentemente ottenuto (1), che questo colorante nella versione commerciale non ha le performance di quello “home made” descritte in letteratura (3).

Se la sensibilità della EF è risultata tutto sommato quella attesa, è invece da sottolineare la mancanza di riproducibilità inter laboratorio, anche nell’ambito dello stesso metodo, come mostrato su entrambi i campioni già alla diluizione “A1” (≈ 1.8 mg/dl) con Hydragel sia con colorante nero sia con il violetto. Questo dimostra che il metodo ha lavorato al limite della sua sensibilità analitica e che sui campioni a maggiore concentrazione i risultati sarebbero omogenei. Ma ciò non toglie che, almeno sui due campioni esaminati, su 7 Laboratori che siano convinti di utilizzare lo stesso metodo – Hydragel Violetto –, 3 avrebbero dato il risultato BJ positiva e 4 BJ negativa.

Questo fatto potrebbe risultare sorprendente ove non si rifletta sul numero di variabili che influenza la tecnica

elettroforetica: idratazione del gel, temperatura, umidità e ventilazione dell’ambiente, quantità di campione realmente applicata e realmente assorbita dal gel, “freschezza” del tampone di migrazione e del colorante, tempi di migrazione, voltaggio, amperaggio, tempi di colorazione e qualità della decolorazione, ecc. Ne consegue che l’elettroforesi tra i tanti pregi non ha e non può avere quello di una buona ripetibilità.

Immunofissazione (IFE)

I risultati della IFE con antisieri anti LC(b&f) e con anti FLC sono riportati in Tabella 3.

Le considerazioni sulla riproducibilità della IFE, anche nell’ambito dello stesso metodo, sono analoghe a quelle già viste per l’elettroforesi che della IFE costituisce comunque il primo step; bisogna poi aggiungere le altre variabili legate all’Immunoprecipitazione: qualità dell’antisiero, tempo di incubazione, lavaggi, ecc.

Per quanto riguarda la sensibilità, la IFE non ha mostrato rispetto all’EF quel sensibile miglioramento che ci si sarebbe attesi, né una rilevante differenza tra l’uso di antisieri anti LC(b&f) e anti FLC.

Nefelometria/Turbidimetria con Reagenti anti Catene Leggere Totali (CLT)

I risultati qualitativi, in termini di positivo/negativo, sono riportati in Tabella 4 e in termini quantitativi complessivi in Tabella 5.

La nefelometria di Dade-Behring ha dato risultati molto buoni sia per sensibilità, con solo 6 risultati negativi su tutti i campioni esaminati, sia per precisione con CV inter-laboratorio accettabili.

La nefelometria di Beckman ha mostrato minore sensibilità legata al limite minimo di misurazione fissato dal produttore.

I risultati forniti dagli strumenti dei due produttori sono formalmente differenti per il fattore 3.33; perciò i risultati degli strumenti Beckman sono stati divisi per tale fattore poiché in tal modo il dato ha migliore paragonabilità con quello della nefelometria e turbidimetria con reagente anti Catene Leggere Libere.

Nefelometria/Turbidimetria con Reagenti anti Catene Leggere Libere (FLC)

I risultati qualitativi, in termini di positivo/negativo, sono riportati in Tabella 4 e in termini quantitativi complessivi in Tabella 5.

Sui nefelometri BNA/BNII di Dade-Behring e Image di Beckman il metodo ha “centrato” tutti i campioni con nessun negativo su un complessivo di **152 risultati** e ben **724 repliche**.

Discreto anche il risultato sul nefelometro APS e con la turbidimetria su Cobas.

Dal punto di vista quantitativo la precisione è risultata complessivamente discreta considerati i valori piuttosto bassi dei campioni.

Conclusioni

Metodi

Per l'Elettroforesi e l'ImmunoFissazione si dovrebbe procedere, anche con la collaborazione di produttori, ad una migliore standardizzazione delle metodiche per ottenere una migliore riproducibilità almeno nell'ambito dello stesso metodo commerciale.

Riguardo la nefelometria Catene Leggere Totali la Beckman dovrebbe adeguare la sensibilità e dovrebbe concordare con Dade-Behring l'uniformità di espressione del risultato con l'eliminazione del fattore 3.33.

L'uso della EF e della IFE eseguite con i materiali e metodi del commercio per la routine, quale unico metodo per la ricerca delle BJP, desta qualche perplessità dati i risultati ottenuti e l'insufficiente riproducibilità dimostrata alle basse concentrazioni che pure sembrano essere clinicamente rilevanti.

Allo stato attuale sembrerebbe indicato, per la ricerca delle BJP, l'uso di un protocollo costituito da: un metodo nefelometrico/turbidimetrico per le Catene Leggere Totali o per le Libere e la Immunofissazione (o anche, nella maggior parte dei casi, la sola Elettroforesi); la prima assicurerebbe sensibilità, riproducibilità e automazione, la seconda, da usare sempre a conferma della prima, assicurerebbe la specificità nell'individuare la monoclonalità. L'ideale sarebbe eseguire contemporaneamente entrambi i tipi di metodo e, nel caso di discordanza, eseguire gli opportuni approfondimenti; ma ciò sarebbe dispendioso economicamente e per tempo-lavoro.

In base ai risultati di questo lavoro l'ipotesi di un protocollo a due step: nefelometria come metodo di primo livello e IFE sui campioni positivi, potrebbe essere la scelta migliore, sempre che si dimostri, con una sperimentazione condotta con entrambi i metodi su un numero significativo di campioni, che la nefelometria sia paragonabile alla IFE nel rilevare i soggetti BJP-positivi.

Campioni di riferimento

La valutazione multi-centrica ha consentito di scegliere le due concentrazioni più alte dei campioni utilizzati quali "campioni di riferimento" in termini di "positivo/negativo".

Per entrambi i campioni la concentrazione di BJP nelle due diluizioni è stata stimata in circa 2 mg/dl e 0.5 mg/dl.

I "campioni di riferimento" sopra definiti sono disponibili presso la New Scientific Company.

Bibliografia

- 1) Pallotti G. et al.
Valutazione multicentrica di metodi e protocolli per le Catene Leggere Libere e Proteine di Bence Jones in urine – Primi risultati
Biochimica Clinica, 19, 1995, pp 410-425
- 2) Pallotti G. et al.
Valutazione multicentrica di metodi commerciali di routine per la ricerca delle Proteine di Bence Jones in urine – Primi risultati
Presentato al Corso CEFAR "Le Proteine: dal Laboratorio alla Clinica" Desenzano, 13 ottobre 1999
Disponibile presso: New Scientific Company – Via Dante, 35 – I 20032 Cormano (MI)
Tel +39 02 6152021, Fax +39 02 6152154, e-mail: nsцит@newscientific.com
- 3) Aguzzi F; Gasparro C; Bergami MR; Merlini M
High-sensitivity electrophoretic method for the detection of Bence Jones protein and for the study of proteinuria in unconcentrated urines
Ann Clin Biochem 1993 May;30 (Pt 3):287-92

Tabella

Tabella 1

Alcuni Laboratori hanno eseguito più metodi e/o più repliche per ciascun metodo

Confronto complessivo dei metodi

Risultati qualitativi in numero di Laboratori che hanno eseguito ciascun metodo

Metodo	Elettroforesi		Immunofissazione				Nefelometria - Turbidimetria				Totali	
			As LC (b&f)		As FLC		LC (b&f)		FLC			
Laboratori	26		39		28		23		32		25	
Test eseguiti	240		344		316		389		750		2039	
Camp. kappa												
Dil. A1	pos	7	28		16		23		32		106	
1.9 mg/dl	neg	19	73%	11	28%	12	43%	0	0%	0	0%	42
Dil. A	pos	1	17		9		13		31		71	
0.6 mg/dl	neg	25	96%	22	56%	19	68%	10	43%	1	3%	77
Dil. B	pos	0	3		2		3		20		28	
0.3 mg/dl	neg	13	100%	15	83%	14	88%	6	67%	3	13%	51
Totali	pos	8	48		27		39		83		205	
	neg	57	88%	48	50%	45	63%	16	29%	4	5%	170
Camp. lambda												
Dil. A1	pos	8	30		23		22		32		115	
1.7 mg/dl	neg	18	69%	9	23%	5	18%	1	4%	0	0%	33
Dil. A	pos	1	13		11		18		31		74	
0.6 mg/dl	neg	25	96%	26	67%	17	61%	5	22%	1	3%	74
Dil. B	pos	0	2		1		5		20		28	
0.2 mg/dl	neg	13	100%	16	89%	15	94%	4	44%	3	13%	51
Totali	pos	9	45		35		45		83		217	
	neg	56	86%	51	53%	37	51%	10	18%	4	5%	158
Totali Generali	pos	17	93		62		84		166		422	
	neg	113	87%	99	52%	82	57%	26	24%	8	5%	328
	test	130	192		144		110		174		750	

Abbreviazioni: As = antisiero
LC (b&f) = Catene Leggere Libere & Legate o Catene Leggere Totali (Bound&Free)
FLC = Catene Leggere Libere

Tabella 2

Alcuni Laboratori
hanno eseguito più
repliche

Elettroforesi

Risultati espressi in numero di Laboratori

Metodo	Acetato	Paragon SPE Protur HiSi	Hydragel	Hydragel	Acetato Cell.	Rep Helena	Capillare	Totale
Colorante	rosso	blu	nero	violetto	oro Helena	blu		
Laboratori	2	3	10	7	1	2	1	26
Test eseguiti	10	22	106	58	18	22	4	240
Camp. kappa								
Dil. A1 pos	0	2	1	3	0	1	0	7
1.9 mg/dl neg	2	1	9	4	1	1	1	19
Dil. A pos	0	1	0	0	0	0	0	1
0.6 mg/dl neg	2	2	10	7	1	2	1	25
Dil. B pos	0	0	0	0	0	0	0	0
0.3 mg/dl neg	1	2	3	5	1	1	0	13
Totale pos	0	3	1	3	0	1	0	8
Totale neg	5	5	22	16	3	4	2	57
Camp. lambda								
Dil. A1 pos	0	2	1	3	1	1	0	8
1.7 mg/dl neg	2	1	9	4	0	1	1	18
Dil. A pos	0	1	0	0	0	0	0	1
0.6 mg/dl neg	2	2	10	7	1	2	1	25
Dil. B pos	0	0	0	0	0	0	0	0
0.2 mg/dl neg	1	2	3	5	1	1	0	13
Totale pos	0	3	1	3	1	1	0	9
Totale neg	5	5	22	16	2	4	2	56
Totale Generali pos	0	6	2	6	1	2	0	17
Totale Generali neg	10	10	44	32	5	8	4	113
								130

Tabella 3

Alcuni Laboratori
hanno eseguito più
repliche

Immunofissazione

Risultati espressi in numero di Laboratori

Sistema	As Catene Leggere Libere & Legate (LC(b&f))							As Catene Leggere Libere (FLC)							Totale
	Beckman Paragon Protur Beckman	Helena Immuno Fix Helena	Helena Auto IFE Helena	Helena Auto IFE Sebia	Sebia Hydragel Sebia	Acetato oro Dasit	Totale	Beckman Paragon N S C	Helena Immuno Fix Helena	Helena Auto IFE Helena	Helena Auto IFE N S C	Sebia Hydragel Sebia	Sebia Hydragel N S C	Acetato oro Dasit	
Laboratori	9	2	4	1	22	1	39	2	2	2	2	17	2	1	28
Test eseguiti	80	10	40	18	192	4	344	42	22	22	30	180	16	4	316
Camp. kappa															
Dil. A1 pos	8	1	3	1	14	1	28	2	0	1	2	8	2	1	16
1.9 mg/dl neg	1	1	1	0	8	0	11	0	2	1	0	9	0	0	12
Dil. A pos	4	0	1	1	10	1	17	2	0	0	1	5	0	1	9
0.6 mg/dl neg	5	2	3	0	12	0	22	0	2	2	1	12	2	0	19
Dil. B pos	1	0	0	1	1	0	3	0	0	0	1	1	0	0	2
0.3 mg/dl neg	6	1	1	0	7	0	15	2	1	1	1	8	1	0	14
Totale pos	13	1	4	3	25	2	48	4	0	1	4	14	2	2	27
Totale neg	12	4	5	0	27	0	48	2	5	4	2	29	3	0	45
Camp. lambda															
Dil. A1 pos	8	1	3	1	16	1	30	2	1	1	2	14	2	1	23
1.7 mg/dl neg	1	1	1	0	6	0	9	0	1	1	0	3	0	0	5
Dil. A pos	3	0	0	0	9	1	13	2	0	1	1	5	1	1	11
0.6 mg/dl neg	6	2	4	1	13	0	26	0	2	1	1	12	1	0	17
Dil. B pos	1	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	1	0	0	1
0.2 mg/dl neg	6	1	1	1	7	0	16	2	1	1	2	8	1	0	15
Totale pos	12	1	3	1	26	2	45	4	1	2	3	20	3	2	35
Totale neg	13	4	6	2	26	0	51	2	4	3	3	23	2	0	37
Totale Generali pos	25	2	7	4	51	4	93	8	1	3	7	34	5	4	62
Totale Generali neg	25	8	11	2	53	0	99	4	9	7	5	52	5	0	82
test							192								144

Tabella 4

Nefelometria e Turbidimetria Catene Leggere⁽¹⁾ - Campione non concentrato

Risultati Qualitativi espressi in numero di Laboratori

Metodo Reagente	Reag. Cat. Leggere Libere & Legate (LC(b&f))					Reag. Catene Leggere Libere (FLC)				
	BNA/BNII Behring	Immagine Beckman	APS Beckman	Cobas Mira Dako	Totale	BNA/BNII N S C	Immagine N S C	APS N S C	Cobas Mira N S C	Totale
Laboratori Test eseguiti	17 278	3 70	2 11	1 30	23 389	22 628	6 96	3 20	1 6	32 750
Camp. kappa										
Dil. A1	pos 17	3	2	1	23	22	6	3	1	32
1.9 mg/dl	neg 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dil. A	pos 12	0	0	1	13	22	6	2	1	31
0.6 mg/dl	neg 5	3	2	0	10	0	0	1	0	1
Dil. B	pos 3	0	0	0	3	14	6	0	0	20
0.3 mg/dl	neg 1	2	2	1	6	0	0	2	1	3
Totale	pos 32	3	2	2	39	58	18	5	2	83
	neg 6	5	4	1	16	0	0	3	1	4
Camp. lambda										
Dil. A1	pos 17	2	2	1	22	22	6	3	1	32
1.7 mg/dl	neg 0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
Dil. A	pos 17	0	0	1	18	22	6	2	1	31
0.6 mg/dl	neg 0	3	2	0	5	0	0	1	0	1
Dil. B	pos 4	0	0	1	5	14	6	0	0	20
0.2 mg/dl	neg 0	2	2	0	4	0	0	2	1	3
Totale	pos 38	2	2	3	45	58	18	5	2	83
	neg 0	6	4	0	10	0	0	3	1	4
Totale Generali	pos 70	5	4	5	84	116	36	10	4	166
	neg 6	11	8	1	26	0	0	6	2	8
					110					174

Note (1) Nel protocollo di ricerca della BJP il test è considerato di primo livello. Sui campioni positivi si eseguono EF e/o IFE
Mancanza di ripetibilità intra-laboratorio in termini di positivo/negativo: nessun caso

Tabella 5

Nefelometria e Turbidimetria Catene Leggere⁽¹⁾ - Campione non concentrato

Risultati Quantitativi - Media e CV interlaboratorio

Metodo Reagente	Reag. Catene Leggere Libere & Legate (LC(b&f))								Reag. Catene Leggere Libere (FLC)							
	Determinazioni complessive: 389				Determinazioni complessive: 746											
	BNA/BNII Behring	Immagine ⁽²⁾ Beckman	APS ⁽²⁾ Beckman	Cobas Mira Dako	BNA/BNII N S C	Immagine N S C	APS N S C	Cobas Mira N S C								
Laboratori Test	9 278	8 70	3 11	2 30	6 628	16 96	2 16	1 6								
Campione	Media mg/dl	CV	Media mg/dl	CV	Media mg/dl	CV	Media mg/dl	CV	Media mg/dl	CV	Media mg/dl	CV	Media mg/dl	CV	Media mg/dl	CV
kappa																
Dil. A1	1,52	31%	1,53	19%	2,01	4%	1,51	n.c.	1,84	16%	2,09	9%	n.s.	n.c.	2,36	n.c.
Dil. A	0,79	13%	0,61	n.c.	< 0,55	n.c.	0,66	n.c.	0,73	22%	0,62	20%	n.s.	n.c.	0,93	n.c.
Dil. B	0,80	n.c.	< 0,55	n.c.	< 0,55	n.c.	<	n.c.	0,34	28%	0,32	29%	n.s.	n.c.	neg	n.c.
lambda																
Dil. A1	1,97	12%	1,65	12%	1,84	18%	4,87	n.c.	1,75	5%	1,79	6%	n.s.	n.c.	1,96	n.c.
Dil. A	0,92	13%	< 1,5	n.c.	< 1,5	n.c.	1,22	n.c.	0,67	17%	0,57	13%	n.s.	n.c.	0,72	n.c.
Dil. B	0,40	3%	< 1,5	n.c.	< 1,5	n.c.	0,25	n.c.	0,18	42%	0,20	28%	n.s.	n.c.	neg	n.c.

Legenda: n.c. = non calcolabile; n.s. = non significativo

- (1) Nel protocollo di ricerca della BJP il test è considerato di primo livello. Sui campioni positivi si eseguono EF e/o IFE
(2) I risultati strumentali sono stati divisi per il fattore 3.33