

Evaluación Multicéntrica de Métodos comerciales de rutina para el estudio de las Proteínas de Bence Jones en orina: Resultados 2000

Comisión de estudio Inter-Regional "Forlì" sobre "Proteínas de Bence Jones y Cadenas Ligeras Libres"

Secreteria Científica: **Gualtiero Pallotti** – Ospedale Pierantoni – Forlì

Participantes en la reunión del 16 de junio de 2000:

Ospedale Civile	Asola	Scipiotti C.
Ospedale di Bentivoglio	Bentivoglio (BO)	Milanesi M.G., 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	Firenze	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 T.

Comisión conjunta SIBioC – AIPAC – SIMEL, Secciones Liguria, sobre "Proteínas de Bence Jones y Cadenas Ligeras Libres"

Secreteria Científica: **Liliana Burlando** – già Ospedale Galliera – Genova

Giovanna Zaninetta – Ospedale S. Martino - Genova

Participantes en la reunión del 22 de junio de 2000:

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

Organización y Coordinación:

Leonardo Massaro, Rita Scaringi

New Scientific Company S.r.l. – Via Dante, 35 – I 20032 Cormano (MI)

Abstract

Multicentre Evaluation of Routine Commercial Methods for the Detection of Bence Jones Proteins in Urine – Results 2000

The object of the study groups is to verify the possibility of making uniform the evaluation, interpretation and reporting of Bence Jones Proteins (BJP) and, more generally, of Free Light Chains (FLC) in urine.

It emerged from previous work carried out by both the “Forli” and the “Liguria” groups (1) (2) that:

- the dosage of Total Proteins in urine and
- the stick for the dosage of Total Proteins in urine

are unreliable for BJP testing.

The results obtained from the multimethodological multicentre evaluation of dilutions of three urine samples are presented in this work: one with lambda BJP and one with kappa BJP.

For both samples the concentration of BJP in the dilutions distributed is between 2 mg/dl and 0.3 mg/dl.

The results demonstrate that the best performances were obtained with the nephelometry/turbidimetry with reagent for Free Light Chains, followed immediately by the one with Free Light Chains Bound & Free; clearly standing out are the Immunofixation and Electrophoresis which have given some negative results, even on the “A1” samples with the BJP concentration of approximately 2 mg/dl.

The assessment defined as “reference samples”, at least in positive/negative terms, two dilutions of kappa-BJP Lavagna sample and two of the lambda-BJP Bellaria sample. For both samples, the concentration of BJP in the two proposed preprepared dilutions was estimated at about 2 mg/dl and 0.5 mg/dl.

Resumen

El objetivo de los grupos de estudio es la verificación de la posibilidad de uniformizar la evaluación, la interpretación y la comunicación del resultado de las Proteínas de Bence Jones (BJP) y, de una manera más genérica, de las Cadenas Ligeras Libres (CLL) en orina.

De un trabajo precedente del grupo “Forli” (1) y de sucesivas evaluaciones multicéntricas efectuadas tanto por el grupo “Forli” como por el grupo “Liguria” se ha concluido que para el estudio de las BJP no resultan fiables:

- la determinación de las Proteínas Totales en orina
- las tiras para la determinación de las Proteínas Totales en orina.

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos en la evaluación multicéntrica y multimetodológica de diluciones escalares de dos muestras de orina: una con BJP lambda y otra con BJP kappa. Para ambas muestras la concentración de BJP en las diluciones distribuidas es de entre unos 2 mg/dl y 0.3 mg/dl.

Los resultados demuestran que las mejores prestaciones han sido obtenidas con la Nefelometría/Turbidimetría con reactivos para las Cadenas Ligeras Libres inmediatamente seguida por la efectuada con reactivos para las Cadenas Ligeras Totales (B&F); claramente distanciadas están la Inmunofijación y la Electroforesis que han dado algunos resultados negativos incluso sobre las muestras “A1” con una concentración de BJP de alrededor de 2 mg/dl.

La evaluación ha permitido definir como “muestras de referencia”, al menos en términos de “positivo/negativo”, dos diluciones de la muestra BJP-kappa Lavagna y dos de la muestra BJP-lambda Bellaria. Para ambas muestras la concentración de BJP en las dos diluciones preconfeccionadas propuestas se ha estimado en alrededor de 2 mg/dl y 0.5 mg/dl.

Introducción

Actualmente el estudio de las Cadenas Ligeras Libres (CLL) se centra en la búsqueda de las Proteínas de Bence Jones (BJP), es decir de Cadenas Ligeras Libres Monoclonales en orina, mientras que las Cadenas Ligeras Libres Policlonales (CLLP) se consideran un hallazgo accesorio, a menos que no se pretenda buscarlas de manera específica, como índice de proteinuria tubular, y en este caso el método que parece de elección es la determinación cuantitativa directa con la InmunoPrecipitación en fase líquida (IPL), turbidimetría o nefelometría, realizada con reactivos específicos para las CLL.

A la importancia del estudio de las BJP (y las CLL), no parece, en la actualidad, corresponderse una adecuada estandarización ni de métodos, protocolos, referencias, controles, ni de la comunicación de los resultados obtenidos, todas exigencias fuerte y justamente reclamadas por los operadores.

Presentación de los Grupos de Estudio

La exigencia de estandarización en la determinación de las BJP es insistentemente reclamada por los operadores del sector, así como también lo es la posibilidad de la comparación de experiencias concretas.

New Scientific Company (NSC) recogió estas exigencias cuidándose de los aspectos organizativos de los grupos de estudio.

Hasta la fecha, el Grupo "Forli" ha celebrado diez reuniones, desde 1993, con una media de 30 Laboratorios de la Emilia-Romagna y de otras regiones, y el Grupo "Liguria", con una media de 14 Laboratorios, ha celebrado cuatro reuniones, desde 1997.

Metódica de Trabajo

Los grupos de estudio celebran periódicamente "reuniones de coordinación" con la fórmula de mesa redonda a debate abierto.

En las reuniones se examinan y se discuten los resultados del trabajo previamente efectuado y se define el trabajo a efectuar para la reunión sucesiva.

Objetivos y Estrategia General

El objetivo de los grupos de estudio es la verificación de la posibilidad de uniformizar:

- la evaluación,
- la interpretación y
- la comunicación de los resultados

de las Proteínas de Bence Jones (BJP) y, de una manera más general, de las Cadenas Ligeras Libres (CLL) en orina

Seria conveniente (deseable) que una muestra resultase, por lo menos, "BJP-positiva" o "BJP-negativa" en todos los Laboratorios prescindiendo del método o del protocolo, es decir del conjunto de métodos de Screening y de confirmación, empleados.

La estrategia adoptada es la de la comparación de las experiencias operativas de la rutina cotidiana de los distintos laboratorios, de realidades dimensionales, estructurales y organizativas diversas, partiendo de la verificación de las "*características reales*" de los métodos utilizables en la práctica.

A tal fin se ha decidido evaluar la "sensibilidad" y la "precisión" de cada método para luego insertarlos en la estrategia de la determinación de las BJP.

La evaluación de la "precisión", además de previa a la posibilidad de una eventual determinación cuantitativa, es también indispensable para la correcta evaluación de la "sensibilidad".

Para una primera verificación hemos empleado el modelo elemental, pero lineal, constituido por diluciones escalares de muestras con una BJP importante y sólo trazas de otras proteínas.

Ello permite evaluar y comparar "sensibilidad y precisión" de los métodos al determinar la "*anormalidad de la muestra*", prescindiendo de cualquier consideración acerca de la concentración absoluta de las BJP.

Este enfoque nos pareció indispensable, como punto de partida, aunque no fuese exhaustivo a causa de la heterogeneidad de las BJP y las CLL:

- Las BJP son antigénicamente distintas entre ellas, incluso en el ámbito del mismo tipo, y ello puede determinar variaciones de respuesta en las técnicas de InmunoPrecipitación en fase líquida (IPL) (Nefelometría, Turbidimetría) y en la InmunoFijación (IFE), mientras no influencia a la Electroforesis (EF).
- Las Cadenas Ligeras Libres Policlonales (CLLP) se evidenciarán con menor sensibilidad con la EF y con la IFE, respecto a una cantidad equivalente de BJP, puesto que, por la distribución sobre una superficie mas amplia respecto a la banda estrecha típica de las BJP, las CLLP tendrán una concentración por unidad de superficie mas baja.

Características deseables para los Métodos y Protocolos

Para las BJP y las CLL el método o el protocolo “**perfectamente eficaz**” debería caracterizarse por:

a) ningún “falso negativo” – Sensibilidad y Precisión

Es la característica principal e irrenunciable y consiguientemente, para ella, se exige la máxima reproducibilidad intra e inter-laboratorio: debería definirse la “sensibilidad” y la “precisión” de cada método.

b) ningún “falso positivo” – Especificidad de la Señal de Positividad

La eficacia disminuye a medida que aumenta el número de “falsos positivos”.

c) buena información cuantitativa

Se debería evaluar además de la “precisión” también la “exactitud”.

El valor de este elemento depende de cuanto se valore la necesidad de la determinación cuantitativa absoluta.

Objetivos de la experimentación multicéntrica

Esta experimentación ha pretendido verificar, sobre las “muestras de referencia” tal y como se definieron en el precedente trabajo multicéntrico de 1999 (2), la eficacia de los métodos empleados por los Laboratorios participantes en términos de “sensibilidad” y “precisión”.

La evaluación de la “exactitud” y de la “eficacia general” serán objeto de futuras experimentaciones, ya programadas para el 2001.

Muestras y Metodología

Las Muestras han sido obtenidas diluyendo las orinas originarias preseleccionadas para la experimentación de manera que se obtuviesen las concentraciones aproximadas de BJP acordadas por los participantes.

New Scientific Company se ha encargado de la preparación y distribución de las muestras a los participantes.

Las diluciones se han efectuado con PBS y se han distribuido en viales de 5 ml etiquetados de manera explícita con el nombre convencional de la muestra, el tipo de BJP presente y la dilución.

Junto a las muestras identificadas se han distribuido los módulos para la anotación de los resultados.

En la tabla siguiente se relacionan las muestras y las diluciones examinadas por ambos grupos de trabajo:

Muestra	BJP kappa (Lavagna) (2)			BJP lambda (Bellaria)		
	<i>AI</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>AI</i>	<i>A</i>	<i>B</i>
Dilución						
Concentración orientativa (1) mg/dl	1,9	0,6	0,3	1,7	0,6	0,2

Notas

1) La concentración orientativa se relaciona sólo a título informativo y ha sido obtenida a posteriori como la media de las medidas obtenidas con los métodos cuantitativos.

2) La muestra BJ-kappa Lavagna evidencia en la IFE además de las BJP también CLL policlonales.

El “Interrogante”

Si las muestras hubiesen llegado a los laboratorios participantes como muestras normales con la solicitud de “Estudio de la Proteína de Bence Jones”, ¿ cual hubiese sido la respuesta ?

Procedimiento Operativo

Todas las diluciones han sido analizadas por los Laboratorios participantes con los métodos, tanto de Screening como de confirmación, usados en la rutina para el estudio de las BJP.

Algunos Laboratorios han efectuado varias réplicas en series analíticas distintas.

Resultado Esperado

Todas las muestras deberían haber dado un resultado positivo para el tipo de BJP indicado en la etiqueta de identificación de la muestra.

Resultado Positivo

Se ha considerado “resultado positivo” la “señal de anormalidad” típica de cada método.

Estabilidad de las Diluciones Distribuidas

El intervalo entre la preparación de las diluciones distribuidas y la ejecución de los test en los Laboratorios ha sido muy variable.

Por ello, la estabilidad de las diluciones distribuidas ha sido controlada determinando las CLL con método inmunoturbidimétrico manual con reactivos específicos anti CLL.

Se ha observado que diluciones superiores a las distribuidas de ambas muestras, kappa y lambda, han presentado una cierta degradación para luego estabilizarse, mientras todas las diluciones preconfeccionadas no han mostrado variaciones apreciables durante todo el período de observación.

La estabilidad se ha confirmado además “sobre el campo” por la reproducibilidad interlaboratorio de las determinaciones nefelométricas y turbidimétricas.

Resultados y Discusión

Las seis Muestras fueron examinadas por **25 Laboratorios** hospitalarios que efectuaron un conjunto de **1406 determinaciones**, con los distintos métodos empleados rutinariamente por cada uno de ellos.

De trabajos previos de evaluación multicéntrica (1) (2) se concluyó que, para la determinación de las BJP, son poco fiables y por lo tanto **actualmente** no deberían emplearse:

- la determinación de las Proteínas Totales en orina
- las tiras para la determinación de las Proteínas Totales en orina

Por ello, tales métodos no han sido empleados por los Laboratorios participantes.

Resumen y Comparación de los Métodos

La Tabla 1 muestra de una manera sintética el conjunto de la comparación de los resultados obtenidos sobre las seis muestras con los cinco tipos de técnicas empleadas por los distintos Laboratorios.

Las muestras han sido analizadas por 25 Laboratorios que, en su conjunto, efectuaron 1406 test - muchos Laboratorios han controlado la repetibilidad intra-laboratorio efectuando varias réplicas - de los que se han obtenido para cada muestra con las distintas técnicas 79 “resultados finales”.

La comparación de las técnicas en su conjunto evidencia que las mejores prestaciones se han obtenido con la Nefelometría/Turbidimetría con reactivos para las Cadenas Ligeras Libres, seguida de cerca por la efectuada con reactivos para las Cadenas Ligeras Totales (B&F); claramente distanciadas en prestaciones están la Inmunofijación y la Electroforesis que han dado algunos resultados negativos incluso en las muestras “A1” con una concentración de BJP de alrededor de 2 mg/dl.

Electroforesis (EF)

La Tabla 2 relaciona los resultados de las seis muestras con los distintos métodos electroforéticos comerciales empleados.

El oro coloidal empleado por un laboratorio no ha dado resultados mejores respecto a los demás métodos con colorantes “tradicionales” confirmando, como ya se obtuvo previamente (1), que este colorante en su versión comercial no tiene las prestaciones del “home made” descritas en la bibliografía (3).

Si la sensibilidad ha resultado en líneas generales la esperada, hay sin embargo que subrayar la falta de reproducibilidad inter-laboratorio, incluso en el ámbito del mismo método, como muestran ambas muestras en su dilución “A1” (≈ 1.8 mg/dl) con Hydragel tanto con colorante negro como con el violeta. Esto demuestra que el método ha trabajado al límite de su sensibilidad analítica y que sobre muestras con una concentración mayor los resultados probablemente serían homogéneos. Ello no quita que, al menos sobre dos muestras examinadas, en 5 Laboratorios que estaban convencidos de emplear el mismo método - Hydragel Violeta -, dos habrían dado un resultado BJP positivo y 3 BJP negativo.

Este hecho podría resultar sorprendente a no ser que se reflexione sobre el número de variables que influyen sobre la técnica electroforética: hidratación del gel, temperatura, humedad y ventilación del ambiente, cantidad de muestra realmente aplicada y realmente absorbida por el gel, “frescura” del tampón de migración

y del colorante, tiempo de migración, voltaje, intensidad, tiempo de coloración y calidad de la decoloración, etc..

La conclusión es que la electroforesis, entre sus características no aporta, y no puede aportar, la de una buena repetibilidad.

Inmunofijación (IFE)

Los resultados de la IFE con antisueros anti Cadenas Ligeras Totales (Libres y Ligadas) y con anti Cadenas Ligeras Libres se relacionan respectivamente en la Tabla 3 y la Tabla 4.

Las consideraciones sobre la repetibilidad de la IFE, incluso en el ámbito del mismo método, son análogas a las ya vistas para al electroforesis que, de hecho, constituye el primer paso de la IFE; además hay que añadir las demás variables ligadas a la Inmunoprecipitación: calidad del antisuero, tiempo de incubación, lavado, etc..

En cuanto a sensibilidad la IFE no ha mostrado, respecto a la EF, aquella grandísima mejora que se esperaba, ni tampoco, en la sensibilidad, una diferencia importante entre el uso de antisueros anti Cadenas Ligeras Totales y anti Cadenas Ligeras Libres.

Nefelometría/Turbidimetría con Reactivos anti Cadenas Ligeras Totales (CLT)

Los resultados cualitativos, en términos de positivo/negativo, se relacionan en la Tabla 5 y en términos cuantitativos en la Tabla 7.

La nefelometría de Dade Behring ha dado resultados muy buenos tanto para la sensibilidad, con un solo resultado negativo entre todas las muestras examinadas, como para la precisión con CV inter-laboratorio aceptables (Tabla 7).

La nefelometría de Beckman ha mostrado una menor sensibilidad ligada al límite mínimo de medida fijado por el productor.

Los resultados suministrados por los instrumentos de ambos productores son formalmente distintos en un factor de aproximadamente 3.33; por ello los resultados de los instrumentos Beckman han sido divididos por tal factor para poder también comparar mejor el dato numérico con el obtenido con reactivos anti Cadenas Ligeras Libres.

Nefelometría/Turbidimetría con Reactivos anti Cadenas Ligeras Libres (CLL)

Los resultados cualitativos, en términos de positivo/negativo, se relacionan en la Tabla 6 y en términos cuantitativos en la Tabla 8.

Sobre nefelómetros BNA/BNII, de Dade Behring, e Image, de Beckman, el método ha evidenciado la positividad de todas las muestras con ningún negativo sobre un conjunto de **124 resultados**, con **642 réplicas**.

Los resultados sobre el nefelómetro APS, de Beckman, y de la turbidimetría sobre Cobas Mira son discretos.

Desde el punto de vista cuantitativo la precisión ha resultado en su conjunto aceptable con CV inter-laboratorio algo altos sólo con la dilución "B" (≈ 0.3 mg/dl).

Conclusiones

Métodos

Para la Electroforesis y la Inmunofijación se debería proceder, contando incluso con la colaboración de productores, a una mejor estandarización de las metodicas para mejorar la reproducibilidad al menos en el ámbito del mismo método comercial.

En cuanto a la nefelometría anti Cadenas Ligeras Totales, Beckman debería adecuar la sensibilidad y concordar con Dade Behring una uniformización en la expresión del resultado con la eliminación del factor actual de 3.33.

El uso de la EF y de la IFE efectuadas con materiales y métodos comerciales de rutina, cómo único método para la determinación de las BJP, produce una cierta perplejidad dados los resultados obtenidos y la insuficiente reproducibilidad demostrada a bajas concentraciones que, sin embargo, parecen ser clínicamente significativas.

Dada la situación actual parecería indicado, para la determinación de las BJP, el uso de un protocolo constituido por: un método nefelométrico/turbidimétrico para las Cadenas Ligeras, Totales o Libres, y la Inmunofijación (o incluso, en la mayoría de casos, sólo la Electroforesis); el primer paso, usado como Screening, aseguraría sensibilidad, reproducibilidad y automatización y el segundo, a emplear siempre como

confirmación del primero, aseguraría la especificidad en la individualización de la monoclonalidad. Lo ideal sería emplear contemporáneamente ambos tipos de métodos y, en caso de discordancias, efectuar los oportunos estudios de profundización, aunque esto resultaría costoso tanto económicamente como en tiempo operativo.

En base a los resultados de este trabajo la hipótesis de un protocolo constituido por dos pasos: nefelometría como método de primer nivel e IFE sobre las muestras positivas, podría ser la mejor elección siempre que se demuestre, con una experimentación que compare ambos métodos sobre un número significativo de muestras, que la nefelometría no presente “falsos negativos” respecto a la IFE.

Muestras de Referencia

La evaluación multicéntrica ha permitido seleccionar las dos concentraciones más altas de las muestras empleadas como “muestras de referencia” en términos de “positivo/negativo”.

Para ambas muestras las concentraciones de BJP en las dos diluciones se ha estimado de alrededor de 2 mg/dl y 0.5 mg/dl.

Las “muestras de referencia” arriba definidas están disponibles en New Scientific Company.

Bibliografía

- 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
Presentado en el Curso CEFAR “Le Proteine: dal Laboratorio alla Clinica”, Desenzano, 13 octubre 1999
Disponible en: New Scientific Company
- 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 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 CLT (B&F)		As CLL		CLT (B&F)		CLL						
Laboratori	13		18		16		9		23		25				
Test eseguiti	144		210				215				265		666	1500	
Camp. kappa															
Dil. A1	pos	6	15		11		9		23		64				
1.9 mg/dl	neg	7	54%	3	17%	5	31%	0	0%	0	0%	15			
Dil. A	pos	1	7		5		5		22		40				
0.6 mg/dl	neg	12	92%	11	61%	11	69%	4	44%	1	4%	39			
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	7	25		18		17		65		132				
	neg	32	82%	29	54%	30	63%	10	37%	4	6%	105			
Camp. lambda															
Dil. A1	pos	7	16		15		9		23		70				
1.7 mg/dl	neg	6	46%	2	11%	1	6%	0	0%	0	0%	9			
Dil. A	pos	1	4		7		5		22		39				
0.6 mg/dl	neg	12	92%	14	78%	9	56%	4	44%	1	4%	40			
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	8	22		23		19		65		137				
	neg	31	79%	32	59%	25	52%	8	30%	4	6%	100			
Totali Generali	pos	15	47		41		36		130		269				
	neg	63	81%	61	56%	55	57%	18	33%	8	6%	205			
	test	78		108				96				54		138	474

Abbreviazioni: As = antisiero

CLT (B&F) = Catene Leggere Libere & Legate o Catene Leggere Totali (Bound&Free)

CLL = Catene Leggere Libere

Tabella 2

Alcuni Laboratori hanno eseguito più repliche

Elettroforesi

Risultati espressi in numero di Laboratori

Metodo	CTE 5000	Paragon SPE	Hydragel	Hydragel	Acetato Cell.	Rep Helena	Totali	
Colorante	rosso	blu	nero	violetto	oro Helena	blu		
Laboratori	1	2	3	5	1	1	13	
Test eseguiti	6	18	54	42	18	6	144	
Camp. kappa								
Dil. A1	pos	0	2	1	2	0	1	6
1.9 mg/dl	neg	1	0	2	3	1	0	7
Dil. A	pos	0	1	0	0	0	0	1
0.6 mg/dl	neg	1	1	3	5	1	1	12
Dil. B	pos	0	0	0	0	0	0	0
0.3 mg/dl	neg	1	2	3	5	1	1	13
Totali	pos	0	3	1	2	0	1	7
	neg	3	3	8	13	3	2	32
Camp. lambda								
Diluizione A1	pos	0	2	1	2	1	1	7
1.7 mg/dl	neg	1	0	2	3	0	0	6
Diluizione A	pos	0	1	0	0	0	0	1
0.6 mg/dl	neg	1	1	3	5	1	1	12
Diluizione B	pos	0	0	0	0	0	0	0
0.2 mg/dl	neg	1	2	3	5	1	1	13
Totali	pos	0	3	1	2	1	1	8
	neg	3	3	8	13	2	2	31
Totali Generali	pos	0	6	2	4	1	2	15
	neg	6	6	16	26	5	4	63
								78

Tabella 3

Alcuni Laboratori hanno eseguito più repliche

Immunofissazione

Risultati espressi in numero di Laboratori

Sistema	As Catene Leggere Libere & Legate (CLT)						As Catene Leggere Libere (CLL)						Totali	
	Beckman Paragon Protur	Helena ImmunFix	Helena Auto IFE	Helena Auto IFE	Sebia Hydragel	Totali	Beckman Paragon Protur	Helena ImmunFix	Helena Auto IFE	Helena Auto IFE	Sebia Hydragel	Sebia Hydragel		Totali
	Beckman	Helena	Helena	Sebia	Sebia		N S C	Helena	Helena	N S C	Sebia	N S C		
Laboratori	7	1	1	1	8	18	2	1	1	2	9	1	16	
Test eseguiti	72	6	6	18	108	210	42	18	6	30	120	12	216	
Camp. kappa														
Dil. A1	pos	7	1	1	1	5	15	2	0	1	2	5	1	11
1.9 mg/dl	neg	0	0	0	0	3	3	0	1	0	0	4	0	5
Dil. A	pos	3	0	0	1	3	7	2	0	0	1	2	0	5
0.6 mg/dl	neg	4	1	1	0	5	11	0	1	1	1	7	1	11
Dil. B	pos	1	0	0	1	1	3	0	0	0	1	1	0	2
0.3 mg/dl	neg	6	1	1	0	7	15	2	1	1	1	8	1	14
Totali	pos	11	1	1	3	9	25	4	0	1	4	8	1	18
	neg	10	2	2	0	15	29	2	3	2	2	19	2	30
Camp. lambda														
Dil. A1	pos	7	1	1	1	6	16	2	1	1	2	8	1	15
1.7 mg/dl	neg	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	1	0	1
Dil. A	pos	2	0	0	0	2	4	2	0	1	1	2	1	7
0.6 mg/dl	neg	5	1	1	1	6	14	0	1	0	1	7	0	9
Dil. B	pos	1	0	0	0	1	2	0	0	0	0	1	0	1
0.2 mg/dl	neg	6	1	1	1	7	16	2	1	1	2	8	1	15
Totali	pos	10	1	1	1	9	22	4	1	2	3	11	2	23
	neg	11	2	2	2	15	32	2	2	1	3	16	1	25
Totali Generali	pos	21	2	2	4	18	47	8	1	3	7	19	3	41
	neg	21	4	4	2	30	61	4	5	3	5	35	3	55
	test						108							96

Tabella 4

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

Alcuni Laboratori hanno eseguito più repliche

Risultati Qualitativi espressi in numero di Laboratori

Metodo Reagente	Reag. Cat. Leggere Libere & Legate (CLT)					Reag. Catene Leggere Libere (CLL)					
	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	4	2	2	1	9	14	6	2	1	23	
Test eseguiti	170	54	11	30	265	548	96	16	6	666	
Camp. kappa											
Dil. A1	pos	4	2	2	1	9	14	6	2	1	23
1.9 mg/dl	neg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dil. A	pos	4	0	0	1	5	14	6	1	1	22
0.6 mg/dl	neg	0	2	2	0	4	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	11	2	2	2	17	42	18	3	2	65
	neg	1	4	4	1	10	0	0	3	1	4
Camp. lambda											
Dil. A1	pos	4	2	2	1	9	14	6	2	1	23
1.7 mg/dl	neg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dil. A	pos	4	0	0	1	5	14	6	1	1	22
0.6 mg/dl	neg	0	2	2	0	4	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	12	2	2	3	19	42	18	3	2	65
	neg	0	4	4	0	8	0	0	3	1	4
Totale Generali	pos	23	4	4	5	36	84	36	6	4	130
	neg	1	8	8	1	18	0	0	6	2	8
						54					138

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

Alcuni Laboratori hanno eseguito fino a 10 repliche in 10 giorni diversi

Risultati Quantitativi - Media e CV interlaboratorio

Metodo Reagente	Reag. Catene Leggere Libere & Legate (CLT)								Reag. Catene Leggere Libere (CLL)																						
	Determinazioni complessive: 265																Determinazioni complessive: 666														
	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	1	3	2	2	2	2	1	1	2	12	6	2	2	1	1	1															
Test	170		54		11		30		548		96		16		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	2.18	19%	1.69	1%	2.01	4%	1.51	n.c.	1.92	14%	2.09	9%	n.s.	n.c.	2.36	n.c.															
Dil. A	0.84	11%	< 0.55	n.c.	< 0.55	n.c.	0.66	n.c.	0.63	13%	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	2.18	3%	1.65	12%	1.84	18%	4.87	n.c.	1.74	6%	1.79	6%	n.s.	n.c.	2.36	n.c.															
Dil. A	0.83	7%	< 1.5	n.c.	< 1.5	n.c.	1.22	n.c.	0.63	18%	0.57	13%	n.s.	n.c.	0.93	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