

Valutazione Multicentrica di Metodi commerciali di routine per la ricerca delle Proteine di Bence Jones in urine – Risultati 2000

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

Segreteria Scientifica: **Gualtiero Pallotti** – Ospedale Pierantoni – Forlì

Partecipanti al lavoro della riunione del 16 giugno 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.

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

Partecipanti al lavoro della riunione del 22 giugno 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., Mangraviti S.
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.

Organizzazione e coordinamento:

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 “Forlì” 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 three dilutions from two 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.

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 (CLL) 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 ottenuti dalla valutazione multicentrica multimetodologica di tre diluizioni scalari di due campioni di urina: uno con BJP lambda e uno con BJP kappa. Per entrambi i campioni la concentrazione di BJP nelle diluizioni distribuite è compresa tra circa 2 mg/dl e 0.3 mg/dl.

I risultati dimostrano che le migliori performance sono state ottenute con la Nefelometria/Turbidimetria con reagente per le Catene Leggere Libere subito seguita da quella con reagente per le Catene Leggere Totali (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.

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 (CLL) è rivolta alla ricerca delle Proteine di Bence Jones (BJP), cioè di Catene Leggere Libere Monoclonali in urine, mentre le Catene Leggere Libere Policlonali (CLLP) 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 (IPL), turbidimetria o nefelometria, realizzata con Reagenti specifici per le CLL.

All'importanza della ricerca intorno alle BJP (e alle CLL), non sembra, allo stato, corrispondere una adeguata standardizzazione di metodi, protocolli, riferimenti, controlli e della comunicazione refertuale, tutte esigenze fortemente e giustamente sentite dagli operatori.

Presentazione dei Gruppi di Studio

L'esigenza di standardizzazione nella ricerca delle BJP è fortemente sentita dagli operatori del settore così come la possibilità del confronto di esperienze concrete.

La New Scientific Company (NSC) ha raccolto queste esigenze curando la parte organizzativa dei gruppi di studio.

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.

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 (CLL) 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 CLL:

- 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 (IPL) (Nefelometria, Turbidimetria) e nella ImmunoFissazione (IFE) mentre non influenza l'ElettroForesi (EF).
- Le Catene Leggere Libere Policlonali (CLLP) 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 CLLP avranno una concentrazione per unità di superficie più bassa;

Caratteristiche auspicabili per metodi e protocolli

Per le BJP e le CLL il metodo o il protocollo "perfettamente efficace" 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 multicentrica

Questa sperimentazione ha inteso verificare, sui “campioni di riferimento” come definiti nella precedente multicentrica '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.

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 New Scientific Company 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 da entrambi i gruppi di lavoro.

Campione	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>
Concentrazione orientativa (1) mg/dl	1,9	0,6	0,3	1,7	0,6	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 CLL policlonali.

Quesito

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

Procedura Operativa

Tutte le diluizioni sono state analizzate dai Laboratori partecipanti 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 la preparazione delle diluizioni distribuite e l'esecuzione dei test nei Laboratori è stato molto variabile.

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

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 sei Campioni sono stati esaminati da **25 Laboratori** ospedalieri che hanno complessivamente eseguito **1'500 determinazioni**.

Da precedenti lavori di valutazione multicentrica (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 25 Laboratori che complessivamente hanno eseguito 1500 test – molti Laboratori infatti hanno controllato la ripetibilità intra-laboratorio eseguendo più repliche – e sono stati così ottenuti con le diverse tecniche 474 “risultati finali”.

Il confronto complessivo delle tecniche evidenzia che le migliori performance sono state ottenute con la Nefelometria/Turbidimetria con reagente per le Catene Leggere Libere subito seguita da quella con reagente per le Catene Leggere Totali (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 6 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 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 alla diluizione “A1” (≈ 1.8 mg/dl) con Hydrigel sia con colorante nero sia con il violetto. Questo dimostra che il metodo ha lavorato al limite della sua sensibilità analitica e che su campioni a maggiore concentrazione i risultati sarebbero omogenei. Ma ciò non toglie che, almeno sui due campioni esaminati, su 5 Laboratori che siano convinti di utilizzare lo stesso metodo – Hydrigel Violetto –, 2 avrebbero dato il risultato BJ positiva e 3 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 Catene Leggere Totali (Libere & Legate) e con anti Catene Leggere Libere sono riportati rispettivamente in Tabella 3.

Le considerazioni sulla ripetibilità 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 drammatico miglioramento che ci si sarebbe attesi, né una rilevante differenza tra l’uso di antisieri anti Catene Leggere Totali e anti Catene Leggere Libere.

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 un solo risultato negativo su tutti i campioni esaminati, sia per precisione con CV inter-laboratorio accettabili (Tabella 7).

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 (CLL)

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 120 risultati e ben 644 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 con CV inter-laboratorio un po’ alti solo sulla diluizione B (≈ 0.3 mg/dl).

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 non rilevi "falsi negativi" rispetto alla IFE.

Campioni di riferimento

La valutazione multicentrica 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 – Risultati 1999
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: nscit@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 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 Laboratori Test eseguiti	Elettroforesi		Immunofissazione				Nefelometria - Turbidimetria				Totali	
			As CLT (B&F)		As CLL		CLT (B&F)		CLL			
	13 144		18 210		16 215		9 265		23 666		25 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
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
	test							78

Tabella 3

Alcuni Laboratori hanno eseguito più repliche

Immunofissazione
Risultati espressi in numero di Laboratori

Sistema	Antiserio	As Catene Leggere Libere & Legate (CLT)						As Catene Leggere Libere (CLL)						
		Beckman Paragon	Helena ImmunFix	Helena Auto IFE	Helena Auto IFE	Sebia Hydragel	Totali	Beckman Paragon	Helena ImmunFix	Helena Auto IFE	Helena Auto IFE	Sebia Hydragel	Sebia Hydragel	Totali
		Protur Beckman	Helena	Helena	Sebia	Sebia		NSC	Helena	Helena	NSC	Sebia	NSC	
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 Test eseguiti	4 170	2 54	2 11	1 30	9 265	14 548	6 96	2 16	1 6	23 666
Camp. kappa										
Dil. A1 1.9 mg/dl	pos 4	2	2	1	9	14	6	2	1	23
	neg 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dil. A 0.6 mg/dl	pos 4	0	0	1	5	14	6	1	1	22
	neg 0	2	2	0	4	0	0	1	0	1
Dil. B 0.3 mg/dl	pos 3	0	0	0	3	14	6	0	0	20
	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 1.7 mg/dl	pos 4	2	2	1	9	14	6	2	1	23
	neg 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dil. A 0.6 mg/dl	pos 4	0	0	1	5	14	6	1	1	22
	neg 0	2	2	0	4	0	0	1	0	1
Dil. B 0.2 mg/dl	pos 4	0	0	1	5	14	6	0	0	20
	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 Test	1	3	2	2	2	2	1	1	2	12	6	2	2	2	1	1
	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