

## **Relazione finale relativa al progetto:**

*“Studio analitico metodologico che abbia come scopo il confronto fra metodi e la valutazione delle performance analitiche del sistema Lumipulse® G1200 ed in particolare per i seguenti parametri: TSH, FT<sub>3</sub>, FT<sub>4</sub>”*

### **Introduzione e scopo dello studio**

Nel corso degli ultimi decenni i miglioramenti di sensibilità e specificità analitiche dei test di laboratorio per la misura dei parametri di funzionalità tiroidea hanno influenzato in modo considerevole le strategie cliniche finalizzate alla diagnosi e al trattamento delle malattie tiroidee. I metodi attualmente in uso si avvalgono di immunoanalizzatori automatici e impiegano anticorpi altamente specifici (prevalentemente monoclonali) e marcatori non radioisotopici (enzimatici, chemiluminescenti, fluorescenti) in grado di generare un segnale ad elevata attività specifica.

Le malattie tiroidee autoimmuni interessano il 5-10% della popolazione mondiale e sono le più frequenti malattie autoimmuni organo-specifiche. La misura di anticorpi specifici contro la tiroide permette la diagnosi, ma risente di problematiche di tipo analitico principalmente riconducibili ai ben noti problemi di standardizzazione.

Scopo dello studio è stato la valutazione dei test TSH, FT<sub>3</sub> e FT<sub>4</sub> su immunoanalizzatore LUMIPULSE® G1200 (Fujirebio INC), di recente introduzione nel mercato europeo. La valutazione è stata effettuata mediante un confronto con il metodo Abbott su strumentazione Architect System® Plus i2000SR, utilizzata per la routine clinica presso il laboratorio analisi dell'A.O. Ordine Mauriziano di Torino. E' stata inoltre eseguita la valutazione dei metodi per gli anticorpi anti-tireoglobulina (AbTg) e anti-perossidasi tiroidea (AbTPO) su immunoanalizzatore LUMIPULSE® G1200 (Fujirebio INC) mediante un confronto con i metodi Siemens su strumentazione Immulite® 2000 Xpi.

### **Materiali e metodi**

Sono stati utilizzati 525 campioni di siero ottenuti da pazienti afferenti al nostro laboratorio per la valutazione dei test TSH, FT<sub>3</sub> e FT<sub>4</sub>. Nessun paziente ha espresso il proprio dissenso per la partecipazione allo studio. La casistica dei pazienti risultava così costituita: 155 pazienti eutiroidei (27 M e 128 F), 152 pazienti ipotiroidei (32 M e 120 F), 158 pazienti ipertiroidei (33 M e 125 F) e 60 pazienti che presentavano possibili fattori interferenti (farmaci, autoanticorpi, cross-reagenti) (13 M e 47 F). E' stata valutata l'imprecisione analitica (CV% intra e intersaggio), mediante sieri di controllo su 3 livelli di concentrazione Lyphocheck® Immunoassay Plus Control (BIORAD). Sono stati verificati il Limite del Bianco (Limit of Blank, LoB), il Limite di Rilevazione (Limit of Detection, LoD) e il Limite di Quantificazione (Limit of Quantification, LoQ) per il test Lumipulse® GTSH-III, in accordo al protocollo CLSI EP17-A. E' stato eseguito inoltre il test di parallelismo sulla misura del TSH, utilizzando il siero di controllo Lyphocheck® a concentrazione maggiore.

Il test Lumipulse® GTSH-III prevede uno schema di dosaggio sandwich two-step, con tecnologia CLEIA (metodo immunoenzimatico in chemiluminescenza), mentre i test Lumipulse® GFT<sub>3</sub>-III e GFT<sub>4</sub>-N utilizzano uno schema di dosaggio competitivo one-step, con tecnologia CLEIA. I metodi

Architect Abbott per il dosaggio di TSH, FT<sub>3</sub> e FT<sub>4</sub> si basano su schemi immunologici a due fasi, rispettivamente non competitivo sandwich (TSH) e competitivo two-step (FT<sub>3</sub> e FT<sub>4</sub>), e utilizzano la

tecnologia CMIA (chemiluminescenza a cattura di microparticelle). Il confronto fra metodi è stato effettuato mediante l'analisi di regressione di Passing&Bablok (P&B) e l'analisi di correlazione secondo Pearson (r).

Il confronto con i metodi Siemens per la valutazione degli anticorpi è stato realizzato utilizzando 79 campioni di siero ottenuti da pazienti afferenti al nostro laboratorio. Nessun paziente ha espresso il proprio dissenso per la partecipazione allo studio. La casistica dei pazienti risultava così costituita: 37 pazienti eutiroidei (8 M e 29 F), 23 pazienti ipotiroidei (4 M e 19 F), 19 ipertiroidei (3 M e 16 F).

I test Lumipulse<sup>®</sup> GTgAb e GTPOAb sono immunodosaggi diretti two-step con tecnologia CLEIA. Il valori soglia di positività suggeriti dalla ditta sono rispettivamente per Lumipulse<sup>®</sup> GTgAb 55.4 IU/mL e per Lumipulse<sup>®</sup> GTPOAb 6.9 IU/mL.

I metodi Immulite per il dosaggio di AbTg e AbTPO si basano su saggi immunometrici diretti in chemiluminescenza in fase solida marcati con fosfatasi alcalina. I valori soglia di positività suggeriti dalla ditta per AbTg e AbTPO sono rispettivamente 40 IU/mL e 35 IU/mL.

Il confronto fra metodi è stato effettuato mediante correlazione secondo Pearson (r) fra i valori normalizzati rispetto al cut-off dei singoli metodi (ratio). E' stata inoltre valutata la concordanza tra metodi mediante il test esatto di Fisher.

Sono stati infine valutati i risultati di AbTg e AbTPO ottenuti con i metodi Lumipulse<sup>®</sup> su alcuni campioni del programma 2014 di valutazione esterna qualità (VEQ) QualiMedLab.

## Risultati e discussione

L'imprecisione analitica dei metodi TSH, FT<sub>3</sub> e FT<sub>4</sub>, valutata mediante il CV% intra e intersaggio, è risultata per tutti i metodi inferiore al 5% su tutti i livelli di concentrazione. Il LoB del TSH è stato verificato ed è risultato di 0.00064 mIU/L (LoB dichiarata: 0.00100 mIU/L). La verifica del LoD del TSH ha portato al valore di 0.00161 mIU/L, al di sotto dell'atteso (LoD TSH dichiarata 0.00423 mIU/L). Il LoQ del test TSH con CV al 20% è stato di 0.00320 mIU/L in accordo a quanto dichiarato dal costruttore (LoQ TSH <0.00423 mIU/L). I risultati del test di parallelismo sul TSH sono stati valutati come confronto tra valori attesi (x) e misurati (y), sia su scala aritmetica (a) che geometrica (b); il coefficiente di correlazione di Pearson (r) e l'analisi di regressione di Passing&Bablok hanno evidenziato in entrambi i casi un'ottima associazione ( $r_s=0.999$ ,  $p<0.0001$ ;  $r_b=0.999$ ,  $p<0.0001$ ) e un ottimo accordo ( $y_a=1.0155x_a + 0.269$ ;  $y_b=1.0321x_b + 0.0256$ ).

Le mediane dei valori di TSH, FT<sub>3</sub> e FT<sub>4</sub> ottenuti con il sistema Lumipulse<sup>®</sup> G1200 (y) sono: TSH 1.37 mIU/L; FT<sub>3</sub> 3.18 pg/mL; FT<sub>4</sub> 10.70 pg/mL. Le mediane dei valori di TSH, FT<sub>3</sub> e FT<sub>4</sub> ottenuti con il metodo Architect System<sup>®</sup> (x) sono: TSH 1.48 mIU/L; FT<sub>3</sub> 2.79 pg/mL; FT<sub>4</sub> 10.70 pg/mL. I dati relativi al confronto fra metodi sono riportati in Tab.1. Per quanto riguarda il confronto effettuato sui 60 pazienti con possibili fattori interferenti, non sono emerse differenze significative rispetto a quanto ottenuto nella popolazione "eutiroidea-ipotiroidea-ipertiroidea".

Le mediane e gli intervalli dei valori di AbTg e AbTPO ottenuti con il sistema LUMIPULSE<sup>®</sup> G1200 sono: AbTg 20.9 IU/mL (10 – 3000), AbTPO 4.5 IU/mL (1.1 – 500). Le mediane e gli

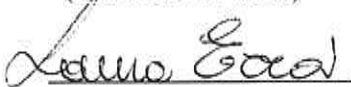
intervalli dei valori di AbTg e AbTPO ottenuti su strumentazione Immulite® 2000 Xpi sono: AbTg 20.0 IU/mL (<20.0 – 3000), AbTPO 22.4 IU/mL (<10 – 1000). Nelle figure 1a e 1b sono riportati gli istogrammi di frequenza dei valori di AbTg e AbTPO ottenuti con i due metodi, mentre nelle figure 2a e 2b sono rappresentati gli scatter plot delle ratio “valore/cut-off”. I coefficienti di correlazione di Pearson sono: AbTg,  $r=0.944$  ( $p<0.0001$ ); AbTPO,  $r=0.950$  ( $p<0.0001$ ). Il test esatto di Fisher fornisce un valore di 0.85 per AbTg ( $p<0.0001$ ) e di 0.75 per AbTPO ( $p<0.0001$ ), mettendo in evidenza per entrambi i parametri una discordanza tra metodi di tipo casuale. Infine, è emersa anche un’ottima concordanza fra i risultati ottenuti con i metodi Lumipulse® e la classificazione positivo/negativo fornita dalla VEQ QualiMedLab (tabelle 2a e 2b).

### Conclusioni

I risultati ottenuti dimostrano per TSH, FT3 e FT4 un buon accordo e un’ottima associazione fra i metodi. Allo stesso modo i metodi Lumipulse® per la misura degli anticorpi antitiroidei dimostrano una buona concordanza e un’ottima affidabilità con i metodi utilizzati in routine nel nostro laboratorio. L’uso della strumentazione Lumipulse® G1200 si è dimostrato semplice ed immediato sia per l’esecuzione dei dosaggi sia per la manutenzione ordinaria eseguita dall’operatore. In conclusione, le ottime prestazioni analitiche e l’utilizzo intuitivo del software rendono la strumentazione Lumipulse® G1200 affidabile per i parametri inclusi in questo studio.

Il progetto è stato realizzato con il contributo della Fondazione Scientifica Mauriziana Onlus, che si ringrazia.

L’esecutore del lavoro  
(dr.ssa Laura Erroi)



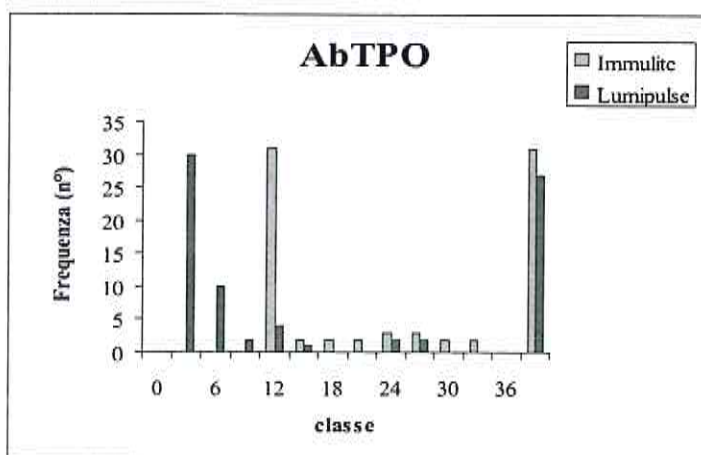
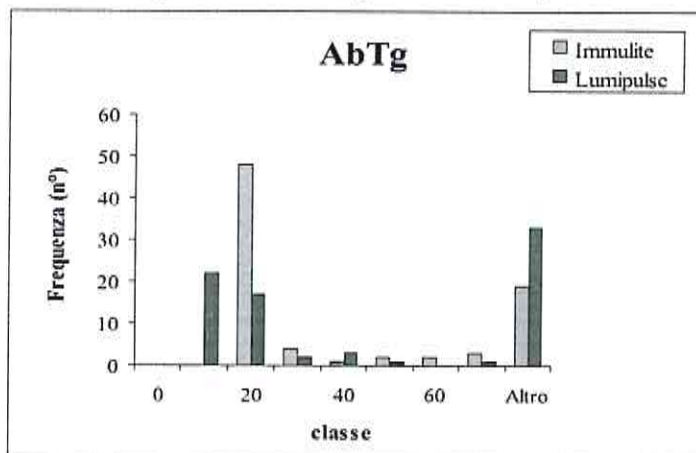
Il responsabile scientifico.

(dr. Marco Migliardi)  
A.O. ORDINE MAURIZIANO DI TORINO  
S.C. Laboratorio Analisi  
Direttore: Dr. Marco Migliardi

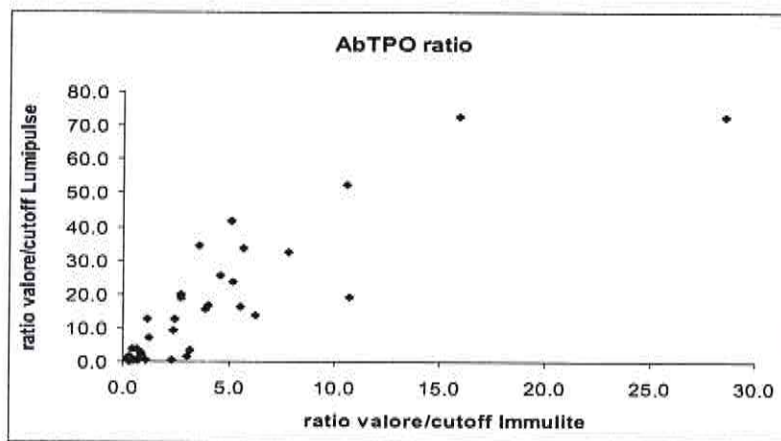
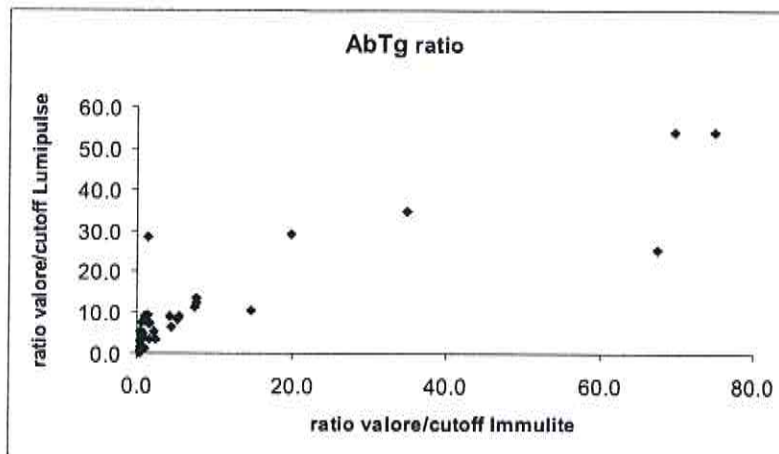
Tab.1 Intervallo di valori, regressione di P&B, coefficiente di correlazione e bias medio relativi al confronto fra metodi per TSH, FT3 e FT4

ANALITA	Intervallo valori Architect System®	Intervallo di valori LUMIPULSE® G 1200	Pendenza	Intercetta	r	Bias medio
<b>TSH mU/L</b>						
Eu-Ipo-Iper (n= 465)	0.001 – 195.2	0.003 – 182.6	0,949	-0,004	0.994*	0,285
Interferenti (n= 60)	0.001 – 103.2	0.003 – 109.6	1,049	-0,001	0.994*	0,178
<b>FT<sub>3</sub> pg/mL</b>						
Eu-Ipo-Iper (n= 465)	1.0 – 30.0	0.69 – 28.1	1,244	-0,304	0.963*	0,417
Interferenti (n= 60)	1.0 – 30.0	0.59 – 24.2	1,165	0,082	0.966*	0,171
<b>FT<sub>4</sub> pg/mL</b>						
Eu-Ipo-Iper (n= 465)	4.0 – 31.6	0.70 – 69.9	1,382	-4,012	0.932*	0,426
Interferenti (n= 60)	4.0 – 25.8	0.50 – 41.7	1,404	-3,987	0.927*	0,118

Figg.1a e 1b. AbTg e AbTPO: istogramma di frequenza



Figg. 2a e 2b. Scatter plot delle ratio "valore/cut-off"



Tabb.2a e 2b. Valori ottenuti con i metodi Lumipulse sui campioni VEQ QualiMedLab

AbTg - VEQ QualiMedLab 2014		
campione	AbTg (IU/mL) cut-off: 55.4	Classificazione VEQ
TO69	10,0	negativo
TO82	10,0	negativo
TO88	11,4	negativo
TO80	21,7	negativo
TO85	78,2	positivo
TO84	136,6	positivo
TO79	158,7	positivo

AbTPO - VEQ QualiMedLab 2014		
campione	AbTPO (IU/mL) cut-off: 6.9	Classificazione VEQ
TO79	2,1	negativo
TO82	2,2	negativo
TO88	6,0	negativo
TO69	7,1	negativo
TO85	19,6	positivo
TO80	141,3	positivo
TO84	452,1	positivo