

## SHORT COMMUNICATIONS/NOTE

# Percorso rapido per la validazione di analizzatori automatici per test immunoenzimatici in micropiastra

**Massimo De Paschale, Debora Cagnin, Teresa Cerulli, Luisa Belvisi, Pierangelo Clerici, Eleonora Dell'Aquila, Maria Teresa Manco, Egidio Franco Viganò**

*U.O. Microbiologia*

*A.O. Ospedale Civile di Legnano (Mi)*

**Key words:** Automatic analyzer, ELISA

**Quick path for the validation of automatic analyzers performing microplate immunoenzymatic assays**

### SUMMARY

The introduction of new diagnostic instruments in the Microbiology Laboratory imposes a trial period which must precede introduction in the routine. This period is aimed to minimize any organizational difficulty and/or staff distress. In this context, we suggest an organizational model that can quickly evaluate accuracy, repeatability and carry over of new diagnostic instruments.

### RIASSUNTO

L'introduzione in un Laboratorio di Microbiologia di nuove strumentazioni diagnostiche, impone prima del loro utilizzo routinario, un periodo di prove; ne conseguono difficoltà organizzative e particolare impegno per il personale. Per minimizzarne l'impatto abbiamo ottimizzato i tempi proponendo un modello organizzativo in grado di valutare velocemente accuratezza, ripetibilità e carry over.

### INTRODUZIONE

L'introduzione di nuove strumentazioni diagnostiche richiede una approfondita valutazione prima del loro utilizzo in routine.

Mentre i reagenti possono essere provati e valutati in manuale (se la metodica lo consente) prima dell'acquisizione (1-4), difficilmente si avrà conoscenza approfondita dello strumento scelto, potendosi avvalere solo delle specifiche della ditta produttrice, di eventuali pubblicazioni (5) e dell'opinione di altri utilizzatori.

In seguito ad aggiudicazione in gara, l'operatore potrà trovarsi in diverse situazioni:

- nel caso di reagenti nuovi le prove di accuratezza, sensibilità e specificità generalmente sono state eseguite in precedenza, normalmente in manuale o con strumentazione già in uso. Mancano le prove sullo strumento nuovo
- nel caso di reagenti già in uso, questi sono ampiamente conosciuti, ma devono essere adattati allo strumento nuovo e viceversa
- nel caso in cui non sia stato possibile eseguire prove preliminari sui reagenti ci si trova a valutare in contemporanea sia i reagenti che il nuovo strumento.

Per valutare le performances di uno strumento devono essere eseguite prove di ripetibilità e carry over a cui possono aggiungersi prove di accuratezza

per la valutazione globale del sistema nella sua completezza (reagenti e strumenti).

Poiché occorre validare tutte le procedure prima dell'introduzione in routine, il fattore tempo è determinante. Dall'arrivo in laboratorio del nuovo strumento le prove devono essere eseguite in parallelo alla routine con l'evidente raddoppio degli strumenti e aumento del lavoro e dell'impegno dell'operatore.

In caso di gara, inoltre, il passaggio da reagenti in uso a nuovi richiede un'attenta programmazione temporale delle prove in modo da non esaurire i vecchi reagenti prima di aver validato i nuovi.

Abbiamo voluto, quindi, pianificare un percorso rapido di validazione su nuova strumentazione automatica per test immunoenzimatici in micropiastra che ottimizzi al massimo i tempi delle prove da eseguire su reagenti sia nuovi che in uso.

### MATERIALI E METODI

A seguito di gara per reagenti e strumentazione per sierologia infettiva dell'U.O. Microbiologia dell'A.O. Ospedale Civile di Legnano, sono stati acquisiti due analizzatori automatici in service:

- Genesis RPS 100 (Tecan, Hombrechtikon, Svizzera) ad aghi fissi o monouso collegato informaticamente con il processore di micropiastre Summit Processor (Hamilton Bonaduz,

Bonaduz, Svizzera)

- Eti-Max 3000 (DiaSorin, Saluggia, Italia) con aghi monouso.

Il nostro flusso di lavoro prevedeva il caricamento sullo strumento Genesis/Summit ad aghi fissi di metodiche ad ampia richiesta: HBsAg, anti-HBc totale, anti-HIV, anti-HCV (Ortho-Clinical Diagnostics, Raritan, USA), anti-HBs (DiaPro, Milano, Italia) e anti-Treponema (Diesse, Siena, Italia). Solo i test per anti-HCV e anti-HBs erano in uso. Su questo strumento era prevista anche la sierazione di tutti i campioni da congelare e conservare in sieroteca.

Sullo strumento Eti-Max erano previste metodiche a bassa richiesta (HBeAg, anti-HBe, HDVAg, anti-HDV, anti-HBcIgM, anti-HAV totale e IgM (DiaPro, Milano, Italia) tutte in uso.

Il programma delle prove è stato:

1° giorno: prova preliminare di carry over e lettura fotometrica facendo dispensare due micropiastre per ogni strumento con una soluzione di o-fenildiammina (OPD) e tetrametilbenzidina (TMB) a cui era stato aggiunto un coniugato marcato con perossidasi di rafano. Le micropiastre sono state lette dai fotometri dei due strumenti a 492 nm (per OPD) e 450 nm (per TMB) con filtro di riferimento a 620 nm.

2° giorno: prove di accuratezza, ripetibilità intraserie e carry over. E' stato ideato uno schema di dispensazione sulla micropiastro dove campioni noti (negativi, positivi forti o border line), provenienti dalla nostra sieroteca o acquistati (Accurun, BBI Diagnostics, West Bridgewater, USA) erano dispensati secondo una ben definita disposizione a scacchiera (Figura I).

Per ogni test è stata preparata una micropiastro completa (96 pozzetti) processata sullo strumento secondo la metodica certificata dalla ditta produttrice dei reagenti.

3° e 4° giorno: prove di ripetibilità interserie.

**RISULTATI**

La prova preliminare di carry over e lettura foto-

metrica ha dato un CV% di 0.96 (D.O. media 1.505; range 1.472-1.535) per l'OPD su Genesis/Summit e 1.47 (D.O. media 1.483; range 1.414-1.531) su Eti-Max 3000. Per TMB il CV% è stato di 1.63 (D.O. media 0.921; range 0.899-0.968) su Genesis/Summit e 0.98 (D.O. media 0.942; range 0.920-0.959) su Eti-Max.

Per tutte le prove, la concordanza dei risultati è stata assoluta per tutti i test eseguiti sullo strumento Eti-Max 3000 e per HBsAg, anti-HBs e anti-Treponema su Genesis/Summit.

Problemi si sono verificati per:

- Anti-HCV: inquinamento dovuto a una dispensazione troppo violenta del diluente e del campione nel pozzetto della micropiastro con fuoriuscita di microgocce di liquido dai pozzetti. Il problema è stato risolto diminuendo la forza di dispensazione.
- Anti-HBc totale: parziale inquinamento dovuto a un insufficiente lavaggio della micropiastro con permanenza del coniugato nella parte alta dei pozzetti. Risolutivo è stato adeguare i livelli di riempimento dei pozzetti durante il lavaggio.
- Anti-HIV: problema di carry over a livello di dispensazione dei campioni. Tale problema è rimasto nonostante l'introduzione di soluzioni di lavaggio contenenti tensioattivi (Extran) per gli aghi fissi. Il problema è stato risolto utilizzando l'opzione della gestione combinata di 4 aghi fissi/4 aghi monouso con l'utilizzo degli aghi fissi per tutti i test tranne per l'anti-HIV e per la sierazione.

Per tutti i test il problema non si è più verificato nelle prove successive di controllo.

**CONCLUSIONI**

Il nostro schema di dispensazione sulla micropiastro consente di verificare contemporaneamente sia l'accuratezza dei risultati, poiché i campioni sono tutti già noti e considerati come veri positivi o negativi o border line, sia la ripetibilità intraserie, poiché gli stessi campioni sono ripetuti all'in-

B	3+	11-	19+	3+	11-	19+	3+	11-	19+	3+	11-
CN	4-	12+	20-	4-	12+	20-	4-	12+	20-	4-	12+
CN	5BL	13-	21+	5BL	13-	21+	5BL	13-	21+	5BL	13-
CN	6-	14BL	22+	6-	14BL	22+	6-	14BL	22+	6-	14BL
CP	7+	15+	23-	7+	15+	23-	7+	15+	23-	7+	15+
CP	8-	16-	24BL	8-	16-	24BL	8-	16-	24BL	8-	16-
1-	9BL	17+	25-	9BL	17+	25-	9BL	17+	25-	9BL	17+
2+	10-	18-	26+	10-	18-	26+	10-	18-	26+	10-	18-

**Figura I:** Schema a scacchiera per la dispensazione dei campioni per un analizzatore automatico per test immunoenzimatici in micropiastro.

B = bianco, CN = controllo negativo del test, CP = controllo positivo del test

1-, 4-, 6- .... = campione 1 negativo, campione 4 negativo, campione 6 negativo ....

2+, 3+, 7+... = campione 2 positivo, campione 3 positivo, campione 7 positivo ....

5BL, 9BL, 14BL...= campione 5 border line, campione 9 border line, campione 14 border line....

terno della piastra in posizione diversa, sia il carry over, in quanto i campioni positivi forti sono inseriti vicino a campioni negativi o border line. Con tale schema è stato possibile identificare subito un possibile problema, risolverlo e avviare le ulteriori prove di controllo.

Tale sistema ha anche consentito di utilizzare un numero limitato di sieri noti che possono essere non abbondanti, se presenti in sieroteca, o costosi, se acquistati.

Un ulteriore vantaggio del sistema ripetitivo a scacchiera è quello di poter ottenere valutazioni anche a piastra non completa nei casi in cui, esami a bassa richiesta (e rari sieri noti stoccati), sia sufficiente valutare solo la prima parte della piastra che sarà poi l'unica utilizzata in routine. Per la valutazione complessiva delle performances dello strumento si potrà eseguire prove a micropiastra completa utilizzando un test a maggior richiesta. Il modello proposto consente d'introdurre facilmente un nuovo siero noto (qualora sia finito quello in uso per le prove) senza sovvertire il sistema delle prove (perdita in ripetibilità, ma non in accuratezza e carry over).

In conclusione il nostro modello permette di ottimizzare i tempi delle prove diminuendo l'impatto delle stesse sulla gestione totale del laboratorio e consentendoci di validare rapidamente 13 test immunoenzimatici diversi.

## BIBLIOGRAFIA

1. Lumsden JH. Laboratory test method validation. *Revue Méd Vét* 2000; 151: 623-30.
2. NCCLS: Document I/LA 18-A2. Specifications for immunological testing for infectious diseases. Approved guideline-second edition. NCCLS 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA, 2001.
3. NCCLS: Document EP12-A. User protocol for evaluation of qualitative test performance. Approved guideline. NCCLS 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA, 2002.
4. NCCLS: Document I/LA 21-A. Clinical Evaluation of Immunoassays. Approved Guideline. NCCLS 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA, 2002.
5. Public Health Laboratory Service. Evaluation of Open Serology Analysers. Gennaio 2002, [www.hpa-midas.org.uk](http://www.hpa-midas.org.uk)

**Massimo De Paschale**  
U.O. Microbiologia  
A.O. Ospedale Civile di Legnano  
Via Candiani 2 - 20025 Legnano (Mi)  
Tel.: 0331 449319 - Fax: 0331 449578  
E-mail: [massimo.depaschale@ao-legnano.it](mailto:massimo.depaschale@ao-legnano.it)