

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BOJANA ORAŽEM

DIPLOMSKA NALOGA

VISOKOŠOLSKI STROKOVNI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE
BIOMEDICINE

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BOJANA ORAŽEM

**PRIMERJAVA DVEH NEFELOMETRIČNIH METOD ZA
DOLOČANJE PROSTIH LAHKIH VERIG κ IN λ V SERUMU**

THE COMPARISON OF TWO NEPHELOMETRIC METHODS
FOR THE DETERMINATION OF PRESENCE OF FREE LIGHT
CHAINES κ AND λ IN THE SERUM

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo sem opravljana v Proteinsko lipidnem laboratoriju na Inštitutu za klinično kemijo in biokemijo v Ljubljani pod somentorstvom Mladena Krsnika, spec. med. biokem. in mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, spec. med. biokem.

Zahvale

Najbolj se zahvaljujem svojemu učitelju, kateri mi je vsestransko pomagal in me vodil pri celotni izdelavi diplomske naloge ter mi s svojo resnico, enostavnostjo in ljubeznijo ter veseljem do narave, brezpogojno pripomogel k mojim spoznanjem in razumevanju življenja kot celote. Prav tako Hvala mojim staršem za podarjeno življenje in starim staršem za podporo.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom somentorja Mladena Krsnika, spec. med. biokem. in mentorja prof. dr. Joška Osredkarja, spec. med. biokem.

Ljubljana, 2012

Bojana Oražem

Predsednik diplomske komisije: prof.dr. Marija Sollner Dolenc

Član diplomske komisije: doc.dr. Jožko Cesar

VSEBINA

KAZALO SLIK	II
KAZALO PREGLEDNIC	V
POVZETEK	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VII
1 UVOD	1
1.1 BELJAKOVINE	1
1.2 IMUNOGLOBULINI	2
1.2.1 MONOKLONALNO, POLIKLONALNO PROTITELO	5
1.3 PROSTE LAHKE VERIGE (PLV) IMUNOGLOBULINOV	6
1.3.1 PLV V URINU IN SERUMU	8
1.4 LEDVICA IN URIN	9
1.5 BOLEZNI KOSTNEGA MOZGA	14
1.5.1 PLAZMOCITOM	15
1.5.2 MINP	18
1.5.3 AL AMILOIDOZA	19
1.6 OSNOVA DOLOČANJA BELJAKOVIN	19
1.6.1 REAKCIJA MED ANTIGENOM IN PROTITELESI	20
1.6.2 NEFELOMETRIJA	22
1.7 DOLOČANJA PLV V SERUMU	24
1.7.1 DIAGNOSTIKA MONOKLONALNE GAMOPATIJE – -RAZLIČNE METODE	24
1.7.2 INTERPRETACIJA REZULTATOV	26
1.7.3 OMEJITVE PRI MERJENJU PLV V SERUMU	28
1.7.4 ZAKLJUČEK UVODA	30
2 NAMEN DELA	31
3 METODE IN MATERIALI	32
3.1 MATERIALI	32
3.1.1 BIOLOŠKI VZORCI	32
3.1.2 LABORATORIJSKA OPREMA IN MATERIALI	32
3.2 REAGENTI	34
3.2.1 REAGENTI PROIZVAJALCA THE BINDING SITE	34
3.2.2 REAGENTI PROIZVAJALCA SIEMENS	38
3.3 STATISTIČNA METODA	42
4 REZULTATI IN DISKUSIJA	43
4.1 POTEK DELA	43
4.2 REZULTATI	44
4.3 PRIMERJAVA REZULTATOV	50
5 ZAKLJUČEK	56
6 LITERATURA	57

KAZALO SLIK

Slika 1: Struktura imunoglobulina	3
Slika 2: Imunoglobulini	4
Slika 3: Nastanek imunoglobulinov. Plazmatke sintetizirajo enega od petih tipov težkih verig skupaj s κ ali λ lahкими verigami	4
Slika 4: Prikaz plazmatk, ki izločajo imunoglobulinske molekule in PLV	6
Slika 5: Filtracija, metabolizem in sekrecija PLV	7
Slika 6: Sestava ledvice v prerezu .	9
Slika 7: Linearni prikaz razvoja B-celic in nastanek obolenj	14
Slika 8: Hipotetični primer bolnika z BJ pazmocitomom	17
Slika 9: Heidelberger-Kendall krivulja prikazuje odnos med količino antigena in izmerjenim signalom glede na konstantno količino protitelesa	21
Slika 10: Svetlobni žarek valovne dolžine 840 nm proizveden z LED je usmerjen skozi kiveto	23
Slika 11: Svetloba se razprši na imunskem kompleksu, katerega merimo. Nefelometer meri količino razpršene svetlobe	23
Slika 12: Občuljivost narašča glede na uporabljena protitelesa ali antigen – prosta ali vezana na nosilec, npr. lateks	23
Slika 13: Intenziteta merjene razpršene svetlobe je sorazmerna količini kompleksa antigen – protitelo v vzorcu v širokem koncentracijskem območju. Če je volumen protiteles konstanten, bo intenziteta signala sorazmerna koncentraciji antigena	23
Slika 14: Koncentracije κ in λ v serumu za klinično interpretacijo	27
Slika 15: Nefelometer Siemens BN° II System	33
Slika 16: Reagenti The Binding Site	35
Slika 17: Grafični prikaz referenčnih vrednosti prostih lahkih verig in količnika za proizvajalca reagentov The Binding Site	37
Slika 18: Reagenčni komplet Siemens	39
Slika 19: Grafična prikaz referenčnih vrednosti prostih lahkih verig in količnika za reagente proizvajalca Siemens	42
Slika 20: Grafični prikaz regresijske premice Passing Bablok ($y = 5,245 + 0,762x$) za reagente The Binding Site in Siemens za parameter PLV kapa v serumu	49
Slika 21: Grafični prikaz regresijske premice Passing Bablok ($y = -2,620 + 1,225x$)za reagente The Binding Site in Siemens za parameter PLV lambda v serumu	50
Slika 22: Grafični prikaz regresijske premice Passing Bablok ($y = 0,460 + 0,548x$) za reagente The Binding Site in Siemens za količnik kapa / lambda	51
Slika 23: Grafični prikaz primerjave površin pod krivuljama (ROC) med rezultati količnikov κ/λ proizvajalca Siemens in The Bindig Site ($AUC_{SIM}=0,583$, $AUC_{TBS}=0,547$). Med površinama ni opaziti statistično signifikantne razlike ($p = 0,292$)	55

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Ocenjena diagnostična občutljivost testov in njihovih kombinacij za različne monoklonalne gamopatije	26
Preglednica II: Razvrstitev monoklonskih gamopatij glede na serumske koncentracije PLV in količnika	27
Preglednica III: Območja redčenja vzorcev	36
Preglednica IV: Orientacijske referenčne vrednosti pri osebah brez ledvičnih obolenj	37
Preglednica V: Orientacijske referenčne vrednosti pri osebah z ledvičnim obolenjem	37
Preglednica VI: Referenčni interval za serumske in plazemske vzorce zdravega odraslega	41
Preglednica VII: Rezultati vseh izmerjenih vzorcev	44
Preglednica VIII: Vrednosti koeficientov za vseh 122 vzorcev	47
Preglednica IX: Vrednosti koeficienta korelacije za 114 vzorcev (brez ubežnikov)	48
Preglednica X: Statistična preglednica zbranih rezultatov	52
Preglednica XI: Primerjava števila analiziranih vzorcev PLV kapa glede na referenčno območje	53
Preglednica XII: Primerjava števila analiziranih vzorcev PLV lambda glede na referenčno območje	53
Preglednica XIII: Primerjava izmerjenih količnikov med PLV kapa in lambda glede na referenčno območje	54
Preglednica XIV: Podroben pregled rezultatov vzorcev, katerih količniki se medsebojno ne ujemajo	54

POVZETEK

Koncentracije posameznih beljakovin – imunoglobulinov, določamo v klinični biokemiji, kadar ima to diagnostičen pomen.

Prisotnost prostih lahkih verig kapa (PLV κ) in prostih lahkih lambda (PLV λ) v serumu ugotavljamo pri splošnem imunskem odzivu, (kroničnih) infekcijah in vnetjih, ledvičnih obolenjih (primarna (AL) amiloidoza, prisotnost monoklonskih imunoglobulinov, id.) in obolenjih kostnega mozga (plazmocitom in razne druge monoklonalne gamopatije...), ki vodijo posledično do okvare ledvic.

Imunoglobulini se sintetizirajo v belih krvnih celicah imenovanih B limfociti. Pri zdravem odraslem človeku dnevno nastane v limfnem sistemu približno 500 mg PLV. Zaradi majhne molekulske mase te beljakovine le kratek čas ostanejo v krvnem obtoku saj se z normalno glomerulno filtracijo običajno že v nekaj urah odstranijo iz krvnega obtoka skozi ledvica, kjer jih vsrkajo tubuli in prehajajo v urin.

Proste monoklonske (ne pa tudi poliklonske) lahke verige imunoglobulinov imenujemo po avtorju, ki jih je tudi prvi opisal, Bence Jonesove beljakovine. Že več kot 150 let je prisotnost Bence Jones-ovih beljakovin v urinu pomemben diagnostični označevalec difuznega plazmocitoma. To je bil tudi prvi tumorski označevalec. Izločanje lahkih verig v urinu in serumu je odvisno od velikosti tumorja, ledvične funkcije in lastnosti lahkih verig. V zadnjem času so pomembno vlogo dobile serumske preiskave, kar je povečalo uporabnost in klinični pomen določanja PLV κ in PLV λ , saj so PLV v urinu odvisne od mnogih faktorjev, tako da ne morejo natančno odražati velikosti tumorske mase in tudi ne omogočajo zanesljivega spremljanja poteka bolezni. Vendar bi bila tudi interpretacija samo koncentracij PLV v serumu nezanesljiva, saj ima večina bolnikov okrnjeno ledvično funkcijo in proteinurijo, zato je to zgolj dopolnitvena metoda (potrditvena je biopsija kostnega mozga v primeru plazmocitoma) elektroforezi beljakovin v serumu in služi kot pomoč pri spremljanju zdravljenja pacientov.

Trenutno sta na trgu na voljo reagenti za kvantitativno določanje PLV dveh različnih proizvajalcev, mednarodni standard pa (še) ne obstaja. Proteinsko lipidni laboratorij na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo v Ljubljani je do sedaj v rutinskem delu za določanje vrednosti PLV κ in PLV λ v serumu vrsto let uporabljal reagente s poliklonalnimi protitelesi Freelite™ angleškega proizvajalca The Binding Site, v lanskem letu pa so na tržišče prišli novi reagenti z monoklonalnimi protitelesi N Latex FLC Kappa

& Lambda nemškega proizvajalca Siemens Healthcare Diagnostics GmbH (v nadaljevanju Siemens).

Zanimalo nas je, ali je metoda za določanje prostih lahkih verig κ in λ v serumu z reagenti proizvajalca Siemens Healthcare Diagnostics GmbH priporočljiva za rutinsko uporabo v medicinskem laboratoriju ali ne. Z nefelometrom smo analizirali 122 vzorcev po dveh metodah in dobljene rezultate (koncentracije PLV κ in PLV λ ter vrednosti količnikov κ/λ) medsebojno primerjali. Za koncentracije PLV κ smo dobili dobro korelacijo in ujemanje ($r=0,969$; 88,60 %), medtem ko sta bila oba parametra pri koncentraciji PLV λ »slabša« ($r=0,873$; 80,70 %). Prav tako smo dobili slabšo korelacijo količnikov κ/λ ($r=0,792$), kar je lahko vzrok težavam pri merjenju PLV λ . Ujemanje količnika κ/λ je zadovoljivo (90,35 %) in je primerljivo z izsledki primerjav, ki so bile opravljene v kliničnih laboratorijih po Evropi (28).

SEZNAM OKRAJŠAV

ADH	Antidiuretični hormon
ASMM	Asimptomatski plazmocitom
ATP	Adenozintrifosfat
BJ	Bence-Jones
DNA	Deoksiribonukleinska kislina
DP	Diseminirani plazmocitom
IF	Metoda imunofiksacije
Ig	Imunoglobulini
IIMM	Plazmocitom z intaktnimi imunoglobulini
kDa	Enota kilo Dalton za atomsko maso
KM	Kostni mozeg
LCMM	Bence-Jones (BJ) plazmocitom
LED	(Light-emitting diode) svetleča dioda
MINP	Monoklonalna gamopatija nedoločljivega pomena
mPLV	Monoklonalne proste lahke verige
NSMM	Nesekretorni plazmocitom
PLV	Proste lahke verige
mPLV	Monoklonalne proste lahke verige
SIM	Proizvajalec reagentov – Siemens
SPE	Elektroforeza beljakovin v serumu
TBS	Proizvajalec reagentov – The Binding Site
κ	Kapa
λ	Lambda

1 UVOD

1.1 BELJAKOVINE

Beljakovine so biološki polimeri aminokislin, ki imajo veliko različnih struktur in funkcij. Zgrajene so iz 20 različnih aminokislin, ki se med seboj pojavljajo v različnih zaporedjih. Strukturo vsake beljakovine določa njeno zaporedje aminokislin, ki je zapisano v genih (predelih DNA). Informacija o umestitvi aminokislin v pravilno zaporedje je shranjeno v zaporedju nukleotidov genu (1).

Zgradbo beljakovin lahko opišemo na štirih ravneh, in sicer primarna struktura je določena z zaporedjem aminokislinskih ostankov v beljakovini, ki so med seboj povezani s kovalentno peptidno vezjo. Primarna struktura je osnova za nadaljnje tri strukturne ravni. Krajši predeli primarnega zaporedja se najprej zvijejo v urejene sekundarne strukture, ki vsebujejo ponavljajoče se elemente, kot sta α -vijačnica in β -struktura. Elementi sekundarnih struktur se lahko povezujejo med seboj in se končno zvijejo v kompaktno globularno enoto, ki predstavlja terciarno strukturo. Za četrto raven, imenovano kvartarna struktura, je značilno povezovanje dveh ali več polipeptidnih verig v funkcionalno beljakovino z več podenotami (7).

Značilna sestava in zaporedje aminokislin omogočata vsaki beljakovini, da se zvije v natančno določeno tridimenzionalno strukturo. Beljakovine se kot skupina biomolekul odlikujejo z veliko funkcijsko raznovrstnostjo. Tako nekatere sodelujejo pri krčenju mišic (gibalni proteini) ali pri vzdrževanju čvrstosti struktur (strukturne beljakovine), druge pri prenosu oz. skladiščenju majhnih molekul (transportne in skladiščne beljakovine). Med beljakovine prištevamo tudi imunoglobuline (obrambne beljakovine). Veliko število raznovrstnih bioloških funkcij je pri beljakovinah posledica številnih možnih kombinacij v aminokislinski sestavi in zaporedju (1).

Sinteza beljakovin, ki poteka v celici v skladu z informacijo, ki je zapisana v DNA, vodi do nastanka mnogih različnih molekul. Vsaka vrsta beljakovin ima zaradi določenega zaporedja aminokislinskih ostankov značilno velikost, obliko in biološko aktivnost (1).

Glede na fizikalne lastnosti in kemijsko sestavo jih razvrščamo v dve skupini, in sicer na enostavne in sestavljene beljakovine. Enostavne beljakovine se po hidrolizi cepijo na aminokisliline ali njihove derivate, med te uvrščamo globularne (albumini, globulini,

histoni, protamini) in vlaknaste beljakovine (kolagen, elastin, keratin). Sestavljene beljakovine vsebujejo dve komponenti, prva je beljakovinska komponenta, ki se imenuje apoprotein, druga pa je nebeljakovinska, imenovana prostetična skupina. V to skupino beljakovin pa spadajo nukleoproteini, glikoproteini, mukoproteini, lipoproteini, metaloproteini, fosfoproteini, imunoglobulini (IgG, IgA, IgM, IgE in IgD), Bence Jones beljakovine (lahke verige kapa in lambda), krioglobulini.

Pomembna biološka funkcija beljakovin je prenos telesu potrebnih snovi (bilirubin, hemoglobin, hormoni, lipidi, kovinski ioni, vitamini) in telesu tujih snovi (zdravila, barvila). Večina prenosnih beljakovin so globulini in albumin (3). Fibrinogen, albumin in polovica ali več globulinov nastaja v jetrih, ostali del globulinov pa proizvajajo plazma celice in limfociti v limfo-retikularnem sistemu. Sinteza beljakovin v jetrih je odvisna od koncentracije aminokislin v krvi, kar pomeni, da se koncentracija beljakovin v plazmi zmanjšuje kadarkoli ni ustrezne preskrbe z aminokislinami. Koncentracije celokupnih beljakovin ali posameznih beljakovin v klinični biokemiji določamo, kadar ima to diagnostičen pomen, npr. pri ledvičnih, jeternih boleznih in pri bolezni imunskega sistema. Najbolj pogosti biološki vzorci, ki pridejo v poštev pri določanju beljakovin so serum, plazma, urin, likvor, punktati telesnih votlin in tkivni homogenati (7).

1.2 IMUNOGLOBULINI

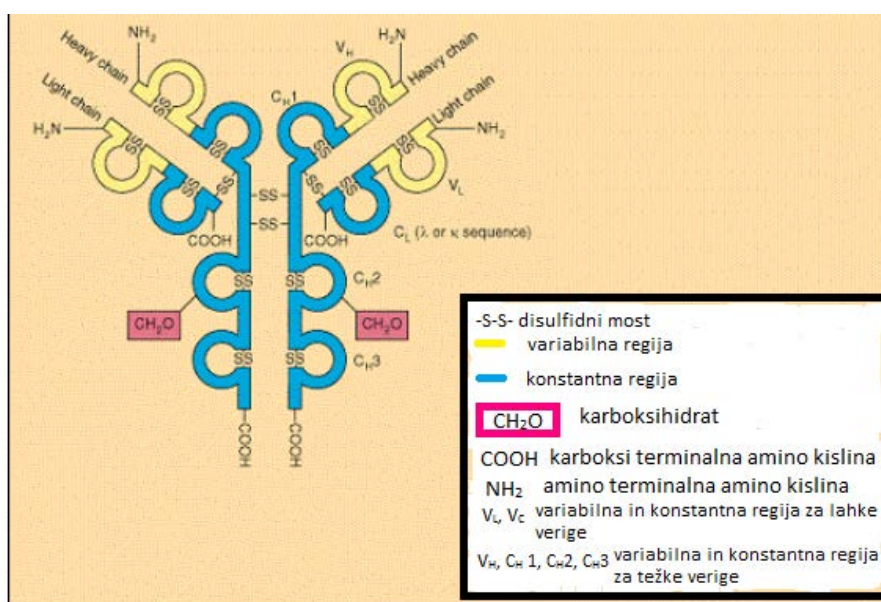
Številne rastline in živali uporabljajo beljakovine v obrambne namene (1). Imunoglobulini (Ig) ali z drugo besedo protitelesa, so pomemben sestavni del imunskega sistema. So glikoproteini, ki so se sposobni vezati na tujke kot so npr. bakterije, virusi ali katere koli tuje molekule (t.i. antigeni) in s tem preprečiti njihovo škodljivo delovanje (7).

Vsi normalni imunoglobulini so sestavljeni iz štirih polipeptidnih verig: dveh istovetnih lahkih in dveh istovetnih težkih verig, čeprav imajo nekateri še dodatne verige. Verige so razporejene v obliki črke Y in so med seboj povezane z nekovalentnimi silami in kovalentnimi disulfidnimi vezmi (12), Slika 1.

Vsaka **težka veriga** (mol. m. 51 – 72 kDa) je sestavljena iz variabilne in konstantne regije. Variabilna regija je sestavljena iz treh ali štirih konstantnih segmentov in karboksi terminalnega segmenta ter gibljive regije v nekaterih verigah. Konstantna regija pa je sestavljena iz amino terminalnega segmenta.

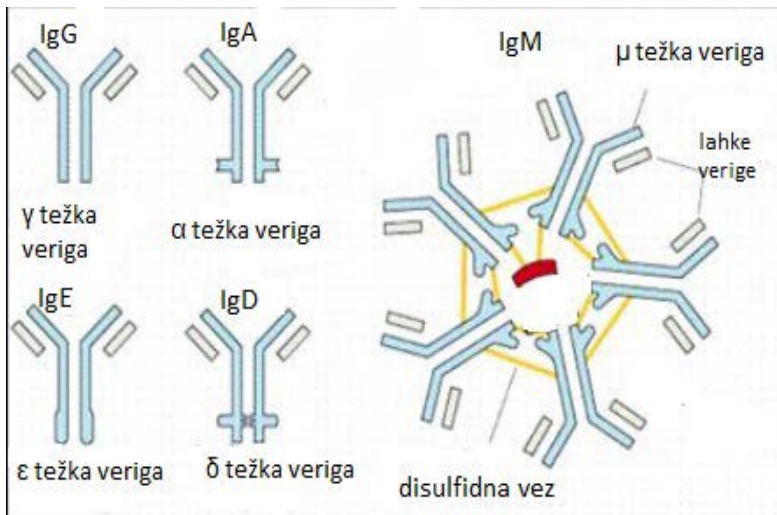
Poznamo več različnih težkih verig kot so prikazane na Sliki 2: α , δ , ϵ , γ in μ . Skupine imunoglobulinov, ki imajo podobne ali istovetne konstantne regije težkih verig, opredeljujejo imunoglobulinske razrede: imunoglobulini A (IgA), IgD, IgE, IgG in IgM (7).

Poznamo dve vrsti **lahkih verig** imunoglobulinov, in sicer lahko verigo kapa (κ) in lahko verigo lambda (λ). Razmerje lahkih verig κ in λ je različno v različnih vrstah (7). Vsaka lahka veriga (mol.m. približno 23 kDa) ima približno 220 aminokislin in je sestavljena iz enega variabilnega segmenta in enega konstantnega kompaktnega segmenta (9).



Slika 1: Struktura imunoglobulina (22).

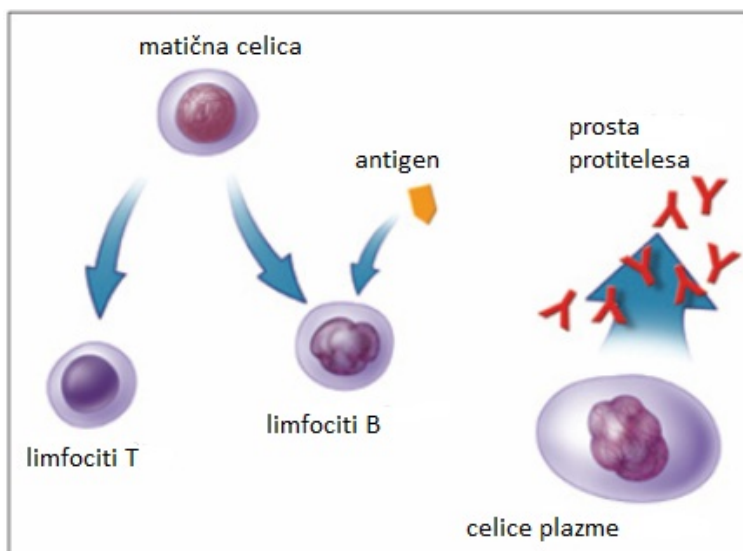
Variabilni deli tvorijo vezavno mesto za antigen. In čeprav je osnovna zgradba vseh protiteles podobna, obstaja med njimi majhna, vendar pomembna razlika. Razlikujejo se v aminokislinskih ostankih, ki se nahajajo na variabilnih delih (na vrhu obeh krakov), kjer je mesto vezave antigena. Na vsaki molekuli Ig sta dve taki mesti. In prav ta razlika na vezavnih mestih omogoča imunskemu sistemu sintezo protiteles za katerikoli antigen (12). Poglavitna funkcija imunoglobulinov je v bistvu vezava antigena, posledica česar je njegova odstranitev (7).



Slika 2: Imunoglobulini (28).

NASTANEK IMUNOGLOBULINOV

Imunoglobulini se sintetizirajo v belih krvnih celicah imenovanih B limfociti. Naše telo je sposobno tvoriti Ig proti praktično vsaki snovi v naravi. Ocenjuje se, da smo sposobni sintetizirati okoli 10 milijard različnih Ig. Vendar se zapisi za ta Ig nahajajo na relativno majhnem številu genov. Zato je evolucija razvila več genetskih mehanizmov, ki nam omogočajo, da z omejenim številom genov sintetiziramo ogromno število različnih imunoglobulinov.



Slika 3: Nastanek imunoglobulinov (23). Plazmatke sintetizirajo enega od petih tipov težkih verig skupaj s κ ali λ lahkimi verigami (9).

Eden izmed teh mehanizmov so genske rekombinacije imenovane V(D)J rekombinacije. Vsak Ig je sestavljen iz dveh težkih in dveh lahkih verig. Vsako verigo kodira več med seboj sestavljenih DNA delcev (V, D in J segmentov) v B limfocitih. Formula za težko verigo se tako glasi: izberi 1 od 400 V, 1 od 15 D in 1 od 4 J segmentov, jih zlepi skupaj ter jim dodaj še segment konstante regije. Na ta način dobimo samo za težko verigo 24000 različnih kombinacij. Na podoben način se sestavi tudi lahka veriga. In ko se verige povežejo med seboj dobimo ogromno število različnih kombinacij (10^8). Vendar tudi s vsemi temi kombinacijami še ne dobimo končne številke (12).

Drug način nastajanja različnih Ig je somatska hipermutacija (v nadaljevanju SHM). SHM poteka v zrelih B limfocitih, Slika 3. Potem, ko se B celice že povežejo z antigenom, se aktivirajo in začnejo hitro deliti. Pri teh delitvah prihaja na segmentih DNA, ki kodirajo lahke in težke verige Ig do mutacij. Pri teh mutacijah prihaja do sprememb enega nukleotida na gen. Posledično ima vsaka hčerinska B celica malenkostno spremenjeno DNA, kar se odraža na spremenjenem zaporedju aminokislinskih ostankov v polipeptidnih verigah Ig. Te mutacije vplivajo na afiniteto, s katero se protitelo veže z antigenom. Tako nastanejo Ig, ki se z nekim antigenom vežejo z manjšo in Ig, ki se s tem antigenom vežejo z večjo afiniteto. Slednja »izrinejo« manj uspešna Ig (12).

1.2.1 MONOKLONALNO, POLIKLONALNO PROTITELO

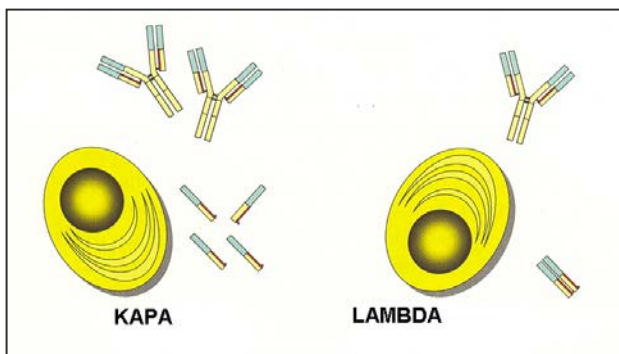
Pri običajnem imunskem odzivu je produciranih več različnih protiteles za različne epitope, ki imajo različno afiniteto in specifičnost. Takim protitelesom pravimo **poliklonalna protitelesa**. Nastanejo v živalih v odgovor na en sam kompleks antigena, so heterogena, saj jih tvorijo različni kloni celic, od katerih vsak izraža protitelo, sposobno reagiranja z različno antigensko determinanto na kompleksu antigena (15).

Pri **monoklonalnih protitelesih** pa je protitelo zgrajeno proti enemu samemu epitopu in nastanejo iz enega samega klona celic, npr. v mielomu (tumor plazmatk) in so homogena (15).

1.3 PROSTE LAHKE VERIGE (PLV) IMUNOGLOBULINOV

PLV so lahke verige imunoglobulinov (κ , λ), ki nastajajo v presežku in se ne vežejo kovalentno na težke verige.

NASTANEK PLV



Slika 4: Prikaz plazmatk, ki izločajo imunoglobulinske molekule in PLV (21). Da bi bila zagotovljena ustrezna konformacija imunoglobulinske molekule, nastaja približno 40 % presežnih PLV glede na težke verige (9).

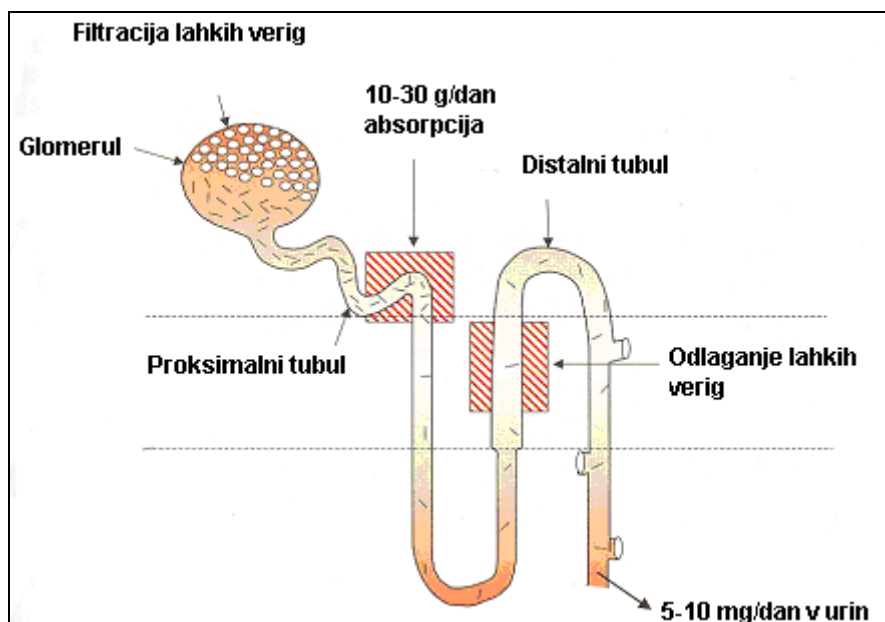
Pri zdravem odraslem nastane dnevno v limfnem sistemu približno 500 mg PLV (8). Obe vrsti vedno nastajata v presežku nad težkimi verigami. PLV κ nastaja dvakrat več kot PLV λ (7). Ob nastanku imata približno enaki molekularni masi.

Lahke verige so manjše od težkih verig. Zaradi majhne molekularne mase te beljakovine le kratek čas ostanejo v krvnem obtoku. PLV κ v krvnem obtoku ostanejo v obliki monomerov, medtem ko PLV λ zlahka polimerizirajo in se nahajajo v krvnem obtoku večinoma v obliki dimerov z molekularno maso 45 kDa (7).

OČISTEK IN PRESNOVA

PLV se običajno že v nekaj urah odstranijo iz krvnega obtoka z normalno glomerulno filtracijo skozi ledvica, kjer jih vsrkajo tubuli (9) in prehajajo v urin (7). Zaradi velikosti je hitrost glomerulne filtracije PLV λ trikrat manjša od PLV κ in posledično je koncentracija PLV λ v serumu večja od koncentracije PLV κ zaradi počasnejšega odstranjevanja

(razmerje κ in λ je 1:1,5) (7). Imamo torej zanimiv pojav, da je koncentracija λ večja od κ , čeprav je njena sinteza manjša (9).



Slika 5: Filtracija, metabolizem in sekrecija PLV (8).

Monomerne PLV κ se očistijo v 2-4 urah, dimerne PLV λ pa v 3-6 urah, večji polimeri še kasneje (9). Očistek in presnovo PLV prikazuje Slika 5: proteinske molekule gredo skozi pore glomerulov in se reabsorbirajo nespremenjene ali razgrajene v proksimalnih tubulih, kjer se izločijo kot fragmenti. To je esencialen mehanizem za preprečevanje izgubljanja proteinov in peptidov z urinom, ki je zelo učinkovit. Ledvica lahko dnevno procesirajo med 10-30 g PLV in v normalnih pogojih gre zelo malo intaktnih lahkih verig mimo proksimalnih tubulov.

Zdrav človek izloči dnevno v urin 5-10 mg PLV. Točen izvor teh je nejasen, najbrž preidejo v urin preko sluznične površine, kot del mukoznega obrambnega mehanizma za preprečevanje vdora infektov v telo. Količina PLV v urinu je zaradi obsežne reabsorpcije v proksimalnih tubulih odvisna predvsem od ledvične funkcije in manj od sinteze v tumorju (8). Navzoče v urinu so v monomerni (22,5 kDa) ali dimerni (45 kDa) obliki ter tudi kot polimeri ali kot nizkomolekularni fragmenti (5-18 kD). Odstranjevanje PLV je podaljšano za 2-3 dni pri bolnikih z DP in okvaro ledvic (9).

1.3.1 PLV V URINU IN SERUMU

Leta 1847 je Bence Jones opisal prisotnost neznanih beljakovin v urinu bolnika s plazmocitomom. Ker takrat še niso poznali imunoglobulinov niti njihovih lahkih verig, so te beljakovine poimenovali po avtorju Bence Jonesu . **Bence Jonesove beljakovine** so proste monoklonalne lahke verige imunoglobulinov (9). Poliklonalne lahke verige v urinu niso Bence Jonesove beljakovine (7).

PLV v urinu so odvisne od serumskih koncentracij, stopnje polimerizacije, ledvične funkcije in hitrosti odlaganja v različna tkiva. Zaradi večjega koncentracijskega območja (ekstremno nizkih kot tudi visokih koncentracij), pomanjkljive standardizacije metod v urinu, velikih variabilnosti med metodami, se kvantitativno določanje PLV v urinu manj uporablja. Iz omenjenih razlogov tudi ne more natančno odražati velikosti tumorske mase . Pa vendar je klinična uporabnost preiskav PLV v urinu izredno široka (8):

- kombinacija kapilarne elektroforeze in določanja PLV predstavlja zelo občutljiv presejalni pristop k odkrivanju bolnikov z monoklonskimi gamopatijami,
- za spremljane zdravljenja bolnikov: odziv na terapijo, poslabšanje bolezni,
- izredno pomembna je pri odkrivanju in spremljanju bolnikov z nesekrecijskim DP, MINP, BJ DP, AL amiloidoze.

Za dokazovanje Bence Jonesovih beljakovin je v nekaterih izjemnih primerih (z nizko koncentracijo monoklonskih PLV ali njihovo posebno epitopsko sestavo), še vedno bolj občutljiva in zanesljiva preiskava urina (U) (7): U-monoklonski imunoglobulini z metodo imunofiksacije. S to metodo lahko urin koncentriramo in zaznamo le monoklonski zobec brez preostalih poliklonalnih lahkih verig, vendar je to kvalitativna metoda, ki ne omogoča zanesljivega spremljanja poteka bolezni, zato koncentracijo prostih lahkih verig merimo tudi v serumu. Za odkrivanje teh beljakovin je navadno potrebno koncentrirati dnevno količino urina.

Zadnjih nekaj let se je na področju določanja PLV marsikaj spremenilo. Razvoj serumske preiskave za določanje PLV κ in λ je povečal njihovo uporabnost in klinični pomen (8).

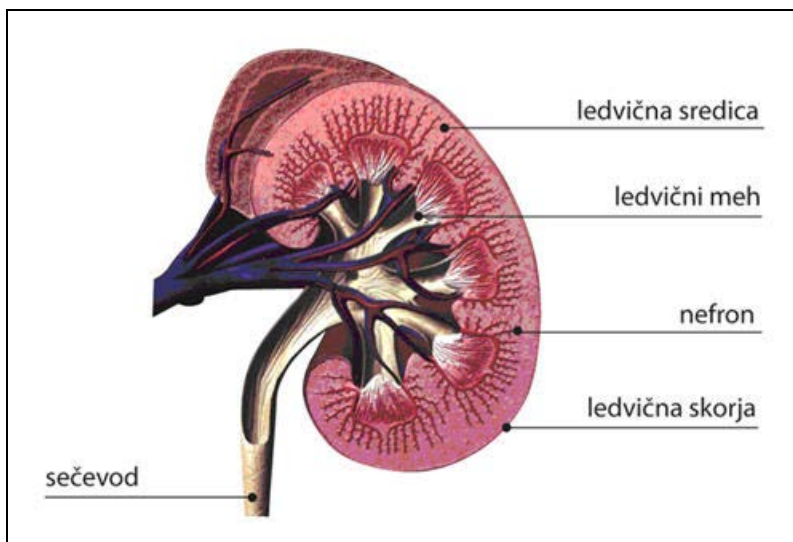
Serumske koncentracije PLV so odvisne od nastanka PLV in ledvičnega očistka. V primeru zvečanega nastanka poliklonskih imunoglobulinov in/ali ledvične okvare, narastejo koncentracije PLV κ in PLV λ tudi za 10 do 20 krat. Vendar pri tem ostane

razmerje κ/λ nespremenjeno. Pri tumorski produkciji PLV, kjer nastajajo monoklonske lahke verige ene vrste v presežku pa postane razmerje κ/λ abnormalno (8).

Koncentracije PLV v serumu naraščajo s starostjo, enako so ugotovili tudi za označevalec ledvične funkcije; cistatin C. Z delitvijo koncentracij PLV s cistatinom C (količnik PLV/cistatin C) izničimo navidezno naraščanje PLV s starostjo. Torej lahko naraščanje koncentracij PLV v serumu pripišemo zmanjšanju ledvične funkcije in ne starosti. Ker ima večina bolnikov z monoklonskimi gamopatijami okrnjeno ledvično funkcijo in proteinurijo, bi bila interpretacija samo koncentracij PLV v serumu zavajajoča (8).

Bence Jonesove beljakovine ugotovimo v serumu, kadar se izločajo v zelo velikih količinah, če polimerizirajo in pri odpovedi ledvic. Zanje je značilno tudi, da precipitirajo ob segrevanju pri 60 °C in se spet raztopijo pri nadaljnjem segrevanju pri 90 °C. Te beljakovine dostikrat izločajo maligne plazmatke, zato je navzočnost večjih količin Bence Jonesovih beljakovin znamenje za malignost in so značilne predvsem za bolnike s plazmocitomom (7).

1.4 LEDVICA IN URIN



Slika 6: Sestava ledvice v prerezu (13).

Ledvice so izločevalni, regulacijski in endokrini organ. Osnovna vloga ledvic je čiščenje krvi oz. plazme z odstranjevanjem končnih proizvodov presnove (predvsem dušikovih spojin, odvečne količine vode, soli, škodljivih toksinov), reabsorpcija organizmu potrebnih snovi (krvnih proteinov, glukoze, aminokislin, elektrolitov), uravnavanje koncentracije večine snovi v telesnih tekočinah in uravnavanje volumna telesnih tekočin, uravnavanje kislinsko – bazičnega ravnotežja, endokrini funkcija - sinteza nekaterih pomembnih hormonov (renin, eritropoetin, vitamin $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$...) (6).

Ledvica so sestavljena iz ledvične skorje, ledvične sredice, ledvičnega meha in ledvičnega telesca, Slika 7. Funkcionalna enota ledvice je nefron ali ledvično telesce. Nefron je sestavljen iz glomerula, proksimalnega tubula, Henlejeve zanke, distalnega tubula in zbirnega voda. Vsaka ledvica ima povprečno od 300000 do 1,8 milijonov nefronov (6). V ledvičnem telescu se v klobčiču drobnih žilic filtrira kri. Urin je ultrafiltrat plazme in ga tvorijo ledvice. Kri se ultrafiltrira v glomerulih, nastane primarni urin, ki se koncentrira v tubulih; določene sestavine in veliko vode se reabsorbira nazaj v krvni obtok, izmenjajo se nekateri ioni, izloči se amoniak), preostanek pa se izliva v ledvično čašico, naprej v ledvični meh ter po sečevodu v sečni mehur (13) kot sekundarni urin (5).

Urin je biološka snov, ki je zelo zanesljiv pokazatelj presnovnih procesov ter vodnega, elektrolitskega in kislinsko-bazičnega ravnotežja v organizmu. Že najmanjše in zgodnje motnje pri delovanju ledvic in sečnih poti se kažejo v spremenjenem videzu, kemični sestavi in mikrobiološki vsebnosti urina. Prav zaradi tega in ker je vzorec lahko dosegljiv v velikih količinah, je urin najprimernejša biološka snov za zgodnje odkrivanje motenj v delovanju ledvic in sečnih poti ter za kasnejše spremljanje terapevtske uspešnosti (5).

PATOFIZIOLOGIJA LEDVIC

Za mnoga primarna obolenja ledvic je značilno, da sčasoma preidejo v končno odpoved ledvic. Znaki ledvične odpovedi se pojavijo, ko ni več homeostatske regulacije, ki jo sicer vzdržujejo ledvica. Nefroni se poškodujejo zaradi toksičnih, anoksičnih ali imunoloških vzrokov. Ti lahko v začetku poškodujejo glomerule, tubule ali nefrone v celoti.

Ledvice imajo veliko sposobnost za povečanje funkcionalne kapacitete. Izgubi se lahko 50-60 % ledvične mase preden se pokažejo simptomi ali celo biokemične spremembe. Najbolj občutljiv in specifičen pokazatelj je določitev hitrosti glomerulne filtracije. Ta se zniža na

manj kot 50 ml/min, preden se pojavijo simptomi ledvične odpovedi. Zaradi večje obremenjenosti še neprizadetih nefronov se verjetno poškodba razširi (6).

Akutna odpoved ledvic:

Do akutne odpovedi ledvic pride najpogosteje zaradi ishemije ali nefrotoksičnih poškodb. Razvije se hitro in simptomi so posledica elektrolitnega, kislinsko-bazičnega in tekočinskega neravnovesja, kar je lahko smrtno (50 %). Zaradi zastajanja dušikovih spojin (sečnina, kreatini) se lahko razvije uremični sindrom. Vzrok za akutno ledvično odpoved je lahko prerentalen (krvavitev, akutna srčna odpoved, poškodbe, opekline, ateroskleroza, ACE inhibitorji, sepsa, šok), renalen (infekcije, toksini, zdravila, obežna hemoliza, nalaganje kristalov) ali postrenalni (kamni, tumorji, prostatizem, radioterapija) (6).

Kronična odpoved ledvic (6):

Kronična odpoved ledvic je postopno, napredujoče izgubljanje funkcije nefronov; razvija se več let ali desetletij. Glavni vzroki so diabetes, ledvične žilne bolezni, glomerulonefritis, cistične ledvice. Ko se ledvične rezerve toliko zmanjšajo, da se pojavi ledvična insuficienca in kasneje ledvična odpoved, se razvije uremični sindrom, značilen za končno odpoved ledvic.

Končna odpoved ledvic:

Do končne odpovedi ledvic pride lahko zaradi katerekoli bolezni ledvic ali poškodbe. Razvije se uremični sindrom s povišano koncentracijo sečnine, kreatinina in ostalih neproteinskih dušikovi spojin v krvi. Za ohranitev življenja je potrebna dializa ali transplatacija ledvic (6).

MONOKLONSKE LAHKE VERIGE IN KRONIČNA LEDVIČNA ODPOVED

Večino ledvičnih okvar povzroča odlaganje monoklonskih imunoglobulinov ali njihovih fragmentov, saj so ledvice precej izpostavljene za njihovo odlaganje, kar je posledica velikega pretoka krvi skozi organ, glomerulne filtracije (GFR) in prevladujoče vloge ledvičnih tubulov pri metabolizmu lahkih verig imunoglobulinov. Okvare tubulov so posledica direktnih toksičnih učinkov PLV ali indirektnih učinkov, kot je sproščanje lizosomskih encimov (8).

Zmanjšanje glomerulna filtracije pomeni zmanjšanje očistka serumskih PLV.

Koncentracije PLV so zelo občutljive na spremembe v GFR. Ledvična okvara je pogost pojav pri resnih boleznih, zato so zvečane koncentracije poliklonskih PLV pogost pojav pri hospitaliziranih bolnikih. Če so temu pridružene še akutne ali kronične vnetne bolezni, so lahko serumske koncentracije izredno visoke (sistemski lupus eritematosus), količnik κ/λ lahko ostane normalen (8).

Ledvična okvara

Z ledvično okvaro se povečuje koncentracija PLV in je lahko 20-30 krat nad normalno vrednostjo pri končni stopnji ledvične okvare. Koncentracije PLV se dobro ujemajo z nekaterimi označevalci glomerulne filtracije (MDRD formula, cistatin C) (8).

Količnik κ/λ pri bolnikih z ledvično boleznijo

Pri zmanjšani ledvični funkciji se odstranjevanje podaljša iz 2-6 ur na 2-3 dni pri dokončni odpovedi. Tedaj poteka odstranjevanje PLV iz krvnega obtoka s pomočjo pinocitoze celic retikuloendotelnega sistema in ostalih tkiv (8).

Čeprav koncentracije PLV v serumu naraščajo s slabšanjem ledvične funkcije, se njihove relativne količine zelo malo spremenijo. Ledvični mehanizem odstrani monomerne kapa molekule tri krat hitreje kot lambda dimere, pinocitoza pa odstranjuje obe lahki verigi z enako hitrostjo. Torej se z zmanjševanjem ledvične funkcije povečuje razmerje κ/λ in znaša pri končni odpovedi ledvic toliko, kot je razmerje sinteze κ/λ , približno 1,8/1 (8). To povečevanje razmerja κ/λ je kliničnega pomena pri interpretaciji mejnih vrednosti količnika. V teh primerih predlagajo uporabo korekcijskega faktorja, ki temelji na oceni glomerulne filtracije s cistatinom C, kar pa do danes še ni klinično validirano (8).

BELJAKOVINE V URINU

Celokupne beljakovine v urinu so zmes beljakovin z visoko molekularno težo (albumina, transferina, intaktnega imunoglobulina,...) in z nizko molekularno težo, običajno filtriranih iz plazme (alfa-1-mikroglobulina, beta-2-mikroglobulina, retinol binding proteina, lahkih verig κ in λ), beljakovin iz ledvic (Tamm-Horsfallova beljakovina) in beljakovin iz urinskega trakta. Urin zdravega človeka vsebuje največ do 0,15 g beljakovin dnevno, povečano količino beljakovin v zbirnem urinu pa imenujemo **proteinurija**. Proteinurijo označujemo kot blago (0,150 do 1 g), zmerno (1 do 3,5 g) in nefrotsko (nad 3,5 g).

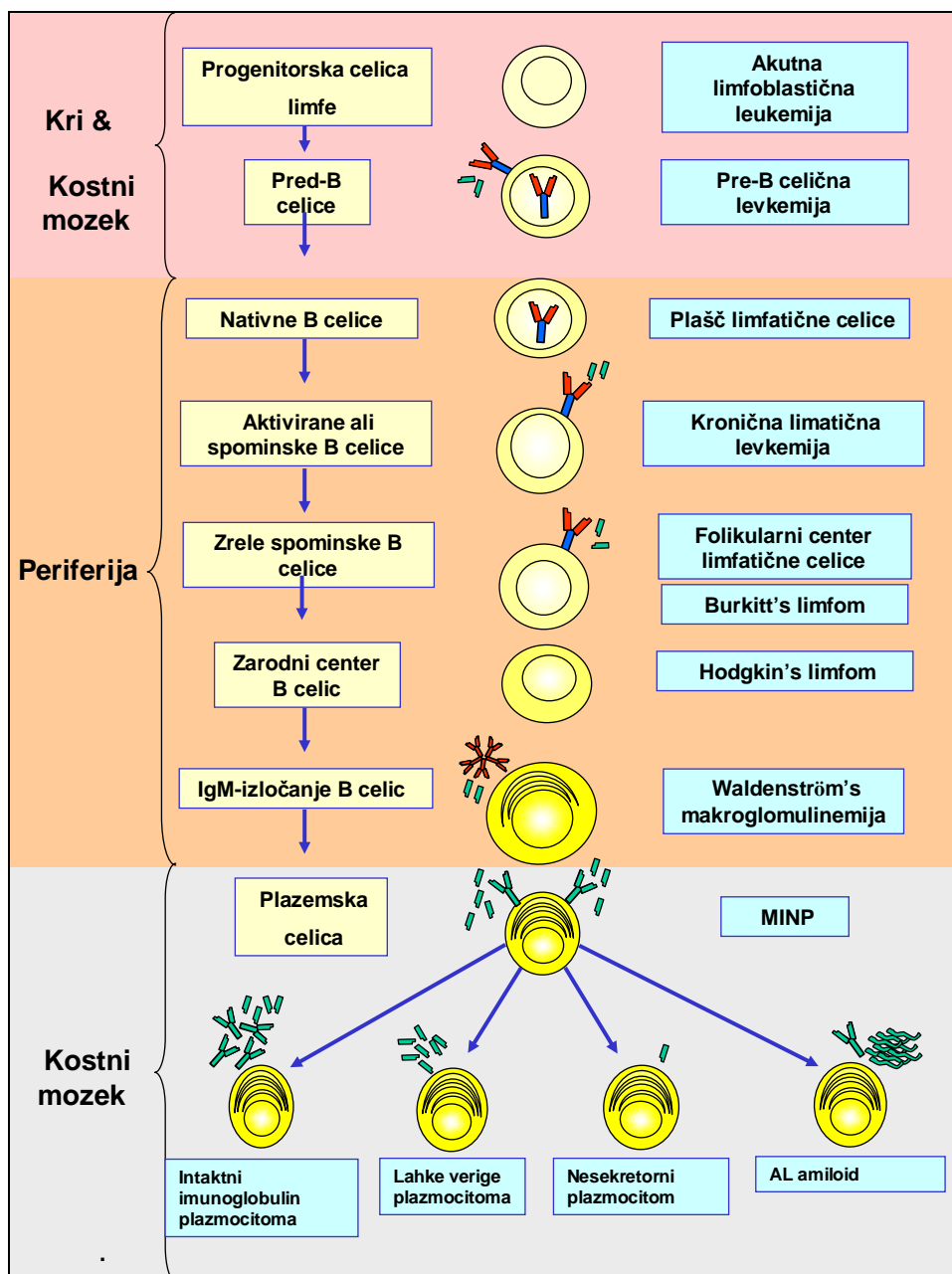
Klasični test za klinično proteinurijo (testni listič in sulfosalicilna kislina) je občutljiv predvsem za albumine pri koncentraciji 0,2 g/L in več. Manj občutljiv je za mukoproteine in beljakovine z nizko molekulsko težko ter neobčutljiv za monoklonske Ig oz. njihove lahke verige (Bence-Jonesove beljakovine) (5).

Proteinurija je lahko posledica (7):

- spremenjenega prehajanja beljakovin preko glomerulne bazalne membrane,
- izločanja beljakovin iz tubularnih celic,
- zvišana koncentracija plazemskih beljakovin, ali pa
- znižana tubularna reabsorpcija, sicer normalne količine beljakovin v glomerularnem filtratu.

1.5 BOLEZNI KOSTNEGA MOZGA

Slika 7 prikazuje razvojne stopnje celice in razvoj bolezni v različnih področjih. Bolezni kostnega mozga določamo z diagnostično metodo biopsije, določanje PLV v serumu pa služi zgolj kot potrditvena metoda in za spremljanje poteka bolezni oz. zdravljenja.



Slika 7: Linearni prikaz razvoja B-celic in nastanek obolenj (10).

1.5.1 PLAZMOCITOM

Plazmocitom oz. multipli mielom spada med plazmocitne novotvorbe. Te nastanejo kot posledica nekontrolirane monoklonske proliferacije enega klona plazma celice oz. razrasti limfocitov vrste B, ki so skoraj dosegli zrelost plazmatke in s tem do nastanka PLV, znanih kot Bence Jonesove beljakovine (14).

Proliferacija in preživetje mielomskih celic je odvisna od vrste citokinov, od katerih je najpomembnejši IL-6. Serumske vrednosti IL-6 so povišane pri pacientih v aktivni fazi bolezni, visoke vrednosti pa pomenijo slabšo prognozo. Neoplastične celice proizvajajo tudi vrsto drugih faktorjev, ki aktivirajo osteoklaste in so odgovorni za razgrajevanje kostnine ter nastanek hiperkalcemije. Hiperkalcemijo najdemo pri 30% - 100% bolnikov z multiplim mielomom. Hiperkalcemija je odgovorna za nastanek simptomov kot so: zmedenost, oslabelost, letargija, zaprtje, bruhanje, poliurija, polidipsija... Pri napredovali bolezni plazmocitomske celice "spodrinejo" normalne hematopoetske celice, kar privede do anemije, trombocitopenije in levkopenije. Pri teh pacientih so zato pogoste okužbe (pljučnica, pielonefritis) (14).

Za plazmocitom so značilne multiple tumorske mase neoplastičnih celic v kostnem mozgu. Te se razraščajo otočkasto ali difuzno, zato govorimo o **diseminiranem plazmocitomu** (DP). Prizadenejo predvsem rdeči kostni mozeg ploščatih kosti vretenc, reber, glave, medenice, stegenic, ključnic in lopatic. Posledično se pojavijo bolečine v kosteh, osteoporoza, osteoliza kosti in patološki prelomi (14).

Kadar plazmocitomske celice izločajo monoklonski imunoglobulin razreda G, A ali D, govorimo o plazmocitomu IgG, IgA in IgD. To imenujemo tudi **monoklonska gamopatija** (8). Če se plazmocitomske celice razraščajo omejeno v kostnem mozgu na enem mestu, takrat govorimo o solitarnem plazmocitomu, če pa se pojavijo v mehkem tkivu, govorimo o solitarnem ekstramedularnem plazmocitomu (14).

Kadar klon plazmocitomskih celic izloča samo fragmente imunoglobulinov oz. lahke in težke verige, govorimo o **Bence Jonesovem plazmocitomu**. Izločanje lahkih verig je prisotno pri več kot četrtini bolnikov s plazmocitomom. Lahke verige se hitro izločijo v ledvične tubule in se reabsorbirajo, pri tem lahko pride do okvare tubulnih celic oz. do odpovedi ledvic. K odpovedi ledvic prispeva še povečana koncentracija kalcija (hiperkalcemija) in sečne kisline v serumu. Pri bolnikih s plazmocitomom se pojavi pri

skoraj eni četrtini amiloidoza, ki zaradi odlaganja amiloida v glomerulih prav tako lahko prispeva k ledvični okvari; vse to pa prispeva k nastanku anemije, ker se zmanjša tvorba eritropoetina. Velika koncentracija gama globulinov v plazmi vpliva tudi na sedimentacijo eritrocitov. Makromolekule kot so gama globulini namreč vežejo eritrocite in zato povečajo sedimentacijo. Pri bolnikih s plazmocitomom pride tudi do sindroma povečane viskoznosti krvi, ki zajema motnje v krvnem obtoku in motnje v strjevanju krvi. Viskoznost krvi se poveča zaradi velike koncentracije imunoglobulinov v plazmi, ki lahko tvorijo dimere in polimere med seboj, pride pa tudi do interakcij imunoglobulinov z eritrociti. Zaradi povečane viskoznosti se upočasni pretok v kapilarah zaradi česar lahko pride do motenj vida, šumenja v ušesih in motenj zavesti. Motnje v hemostazi so posledica trombocitopenije in interakcij imunoglobulinov s trombociti in koagulacijskimi faktorji (14).

Incidenca plazmocitoma je do 3/100.000 prebivalcev. Najpogosteje zbolevalo bolniki stari od 60 do 70 let, moški zbolevalo enako pogosto kot ženske. Vzroka za nastanek plazmocitoma še vedno ne poznamo (8).

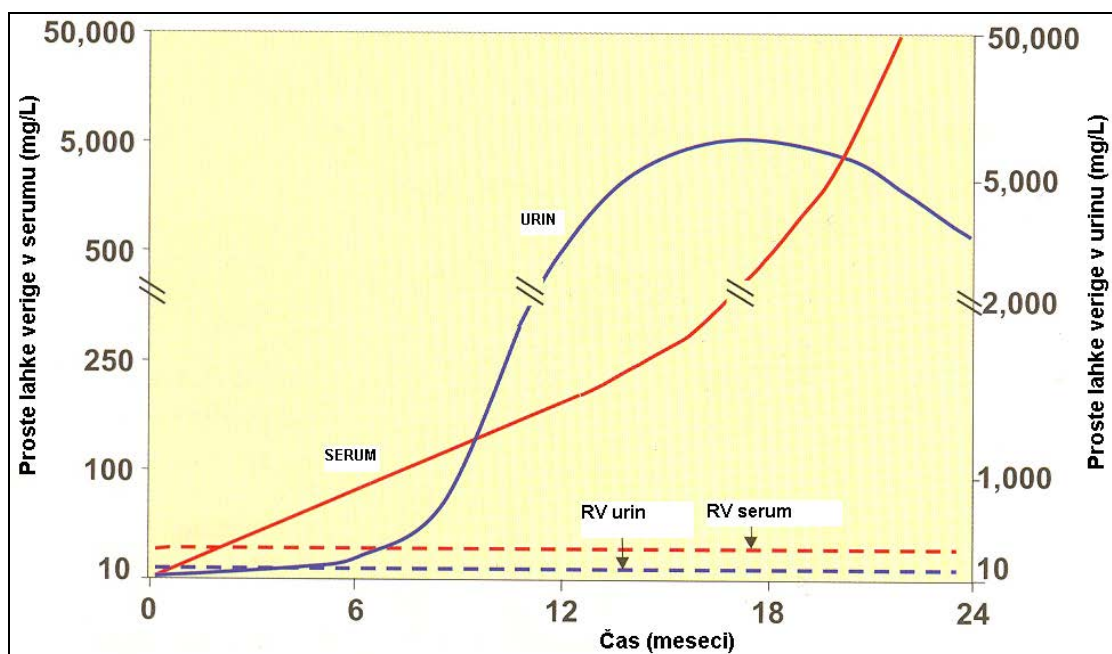
VPLIV BENCE JONES-OVEGA PLAZMOCITOMA NA KONCENTRACIJO PLV V SERUMU IN URINU

Že več kot 150 let je prisotnost Bence Jones-ovih beljakovin v urinu pomemben diagnostični označevalec difuznega plazmocitoma. To je bil tudi prvi tumorski označevalec, kar 100 let pred ostalimi.

Monoklonske PLV imunoglobulinov so pomemben tumorski označevalec pri bolnikih z DP, saj so pri 20 % teh bolnikov edina monoklonska komponenta, ki jo dokažemo v urinu. Izločanje lahkih verig je odvisno od velikosti tumorja, ledvične funkcije in lastnosti lahkih verig. Molekule vstopijo v kri in se porazdelijo med znotraj- in zunaj-žilnimi prostori. V kostnem mozgu (KM) zdravega je približno 1 % plazma celic, pri bolnikih z DP lahko to število naraste na 90 %. Pri kronični infekciji in avtoimunskih boleznih KM vsebuje tudi do 5-10 %, kar je povezano z hipergamaglobulinemijo in odgovarjajočim zvečanjem prostih poliklonalnih lahkih verig v serumu (8).

Katabolizem PLV v tubulih vpliva na koncentracije PLV v serumu in v urinu različno pri razvojnih stopnjah plazmocitoma lahkih verig (BJ plazmocitom): prvih 12 mesecev

naraščajo serumske koncentracije PLV z naraščanjem tumorske mase, Slika 8. Ko sinteza PLV preseže 10-30 g/dan (30 x več od normalne) se pojavi prelivna proteinurija, v urinu se pojavijo velike količine PLV in to je navadno čas, ko takšnega bolnika odkrijemo. PLV, ki presegajo absorpcijski mehanizem proksimalnih tubulov, vstopijo v distalne tubule, kjer lahko precipitirajo v obliki cilindrov, kar povzroči odmrtnje nefrona. S povečevanjem serumskih koncentracij PLV se povečuje obseg filtracije preostalih nefronov, kar še pospešuje ledvično okvaro. Ta proces podaljša serumsko razpolovno dobo PLV, zato koncentracije v serumu strmo naraščajo, za razliko od upadajočega izločanja PLV z urinom, ki se z razvojem bolezni zmanjša na ničlo, ko postane bolnik anuričen. Povečevanje koncentracij PLV v serumu nakazuje napredovanje bolezni, padec koncentracije v urinu nam lahko lažno nakaže stabilizacijo ali izboljšanje bolezni (8).



Slika 8: Hipotetični primer bolnika z BJ plazmocitomom (8).

Razumevanje vplivov ledvične funkcije na koncentracije PLV v urinu in serumu je pomembno. Opisani fiziološki in patofiziološki mehanizmi nam nakazujejo, da je za določanje koncentracij PLV pri bolnikih z BJ plazmocitomom serum primernejši kot urin (8).

NEFROTOKSIČNOST MONOKLONSKIH LAHKIH VERIG IMUNOGLOBULINOV

Okvara ledvic je opazna pri 25-30 % bolnikov s plazmocitomom, zastopane so različne oblike ledvičnih bolezni. Te se kažejo se kot depoziti monoklonskih lahkih verig v obliki tubularnih cilindrov, kot linearni precipitanti na bazalni membrani ali v obliki fibril. Obseg in vrsta bolezni se razlikuje od bolnika do bolnika (8).

Leta 1991 je Solomon A. v *The New England Journal of Medicine* prikazal eksperimentalni model za identifikacijo nefrotoksičnega in amiloidogenega delovanja lahkih verig. Monoklonske lahke verige bolnikov, ki so imeli ledvične bolezni, so tudi pri poskusnih živalih (miškah) povzročile podobne patološke spremembe ledvic. Potencialno škodljivo delovanje nosi V (variabilna) domena lahkih verig. Že majhne spremembe v aminokislinski sekvenci V regije imajo lahko za posledico nagnjenost k odlaganju v tkiva. Variabilne domene so strukturno zelo različne, vendar ima prvih 23 amino kislin variabilne domene na regiji 1 omejeno število variacij, ki določajo podskupine variabilne domene. Z monoklonskimi protitelesi so dokazali 4 kapa ($V_{\kappa 1} - V_{\kappa 4}$) in 6 lambda ($V_{\lambda 1} - V_{\lambda 6}$) podskupin. Te specifične strukture podskupin vplivajo na nagnjenje lahkih verig k polimerizaciji, tako da povezujejo nastanek AL amiloidoze z $V_{\lambda 6}$ in bolezen odlaganja lahkih verig z $V_{\kappa 1}$ in $V_{\kappa 4}$ podskupinami.

Nagnjenost posamezne lahke verige k odlaganju v tkiva še ne pomeni bolezenskih sprememb, zato samo z imunohistološkimi tehnikami ne moremo ovrednotiti bolezenskih sprememb funkcije organa (8).

1.5.2 MINP

Monoklonalni gamopatiji nedoločljivega pomena (MINP) je bolezen, pri kateri je v serumu prisoten monoklonski Ig. Tega lahko najdemo tudi pri limfoproliferativnih boleznih, primarni amiloidozi, malignem limfomu, Hodgkinovi bolezni, jetrni cirozi, aktivnem hepatitisu, eritematoznem sistemskem lupusu in epiteljskih novotvorbah (karcinom) (14).

MINP je pogostejši kot plazmocitom. Pacienti imajo povišane Ig, prisoten je mIg, vendar niso prisotni znaki plazmocitoma. V urinu ni Bence-Jonesovih proteinov, v kostnem mozgu je manj kot 5 % plazmatk, ni anemije, litičnih lezij, hiperkalcemije in odpovedi

ledvic. Pri 11 % bolnikov se razvije plazmocitom, zaradi česar so potrebne redne kontrole. Zdravljenje ni potrebno (14).

1.5.3 AL AMILOIDOZA

Amiloidoza so raznovrstne skupine bolezni, za katere je značilno zunajcelično odlaganje/kopičenje fibrilarne beljakovine, imenovane amiloid. Različne vrste amiloidoze razlikujemo glede na proteinski predhodnik amiloida in glede na prizadete organe (8).

Sistemska amiloidoza je razvrščena v tri glavne skupine, katere se zelo razlikujejo med seboj. Te so označene z začetno črko A (= amiloid) in druga označuje proteine, ki se nakopičijo v tkivu značilno za posamezen tip amiloidoze. Tipi sistemske amiloidoze so razvrščeni kot primarna (AL), sekundarna (AA) in prirojena (ATTR) (25).

Ledvična amiloidoza je najpogostejša bolezen odlaganja. Najpogosteje se v ledvicah odlaga amiloid AL in amiloid AA. Prevalenca amiloidoze pri ledvičnih bolnikih s proteinurijo je 2-3 %, pri revmatoidnem artritisu 1-5 % in pri difuznem plazmocitomu 6-15 %. Pri nastajanju amiloidnih depozitov je pomembna okvarjena razgradnja prekursorških beljakovin v celicah makrofagnega sistema, ki imajo sposobnost prevzeti amiloidogeno strukturo in se lahko kopičijo zaradi čezmerne tvorbe, ali pa zmanjšane očistka. Pri AL amiloidozi so fibrile najpogosteje sestavljene iz fragmentov monoklonskih lahkih verig (z molekulske maso 5-8 kDa), ki so včasih povezane s celimi molekulami lahkih verig, njihova enotna lastnost je zmanjšana stabilnost zvijanja (8).

Amiloid dokažemo s posebnimi histološkimi tehnikami. Od ostalih hialinih struktur (kolagen, fibrin) jih ločimo s pomočjo specifičnih histoloških tehnik (8).

Monoklonske PLV se v urinu pojavijo v 70-90 %, odvisno od občutljivosti tehnike določanja, prevladuje lambda tip. Najpogosteje so prizadeti glomeruli, proteinurija je prisotna pri 80 % bolnikih (8).

1.6 OSNOVA DOLOČANJA BELJAKOVIN

Teoretično lahko določamo vse humane beljakovine s protitelesi živalskega izvora. Vendar v praksi ni vse tako enostavno, ker imunski sistem živali ne more izdelati zadostnega števila protiteles z zadostno afiniteto vezave za vse beljakovine, ki bi jih želeli izmeriti.

Razen tega so tiste antigenske determinante, ki so najbolj imunogene, pogosto prekrivane z motečimi snovmi ali nedostopne zaradi združevanja in polimerizacije z drugimi proteini. In če nam že uspe beljakovino zaznati z ustreznimi protitelesi, to še ne pomeni, da nam bo uspelo tudi zanesljivo izmeriti njeno koncentracijo. Problem leži v nestabilnosti raztopin standardov ali slabi občutljivosti denzitometrov ali neenakomerni vezavi indikatorskega barvila in podobno. Za imunokemično merjenje majhnih koncentracij se poslužujemo ojačanja meritvenega signala s pomočjo lateksa, encimov ali radioizotopov. Te metode so v rabi pod imenom lateks nefelometrija ali turbidimetrija, ELISA (encimskoimunski test) ali RIA (radialna imunodifuzija). Zaradi narave poliklonalnih protiteles v reagentu nikakor ne moremo imunokemično zanesljivo izmeriti koncentracije monoklonalnih imunoglobulinov v vzorcu, saj v reagentu nikoli ne moremo imeti vseh protiteles – proti vsem različnim antigenom.

Kvantitativno, vendar nespecifično (s SPE ne moremo razlikovati različne tipe Ig) jih lahko izmerimo le v dobro definiranem monoklonskem zobcu elektroforeze beljakovin v serumu – proteinogramu (9).

Kvalitativno ugotavljamo le prisotnost neke beljakovine v vzorcu. Običajno so to metode imunofiksacije po elektroforezni ločbi, npr. postopki določanja monoklonalnih Ig v serumu ali oligoklonalnih IgG v likvorju (9).

1.6.1 REAKCIJA MED ANTIGENOM IN PROTITELESI

Ko topen antigen dodamo k ustreznim protitelesom nastane precipitat. To reakcijo sta prva opisala Heidelberger in Kendall leta 1929. V sedaj klasičnem poiskusu sta prikazala, da se z naraščanjem količine antigena, dodanega v določeno število epruvet, katere vsebujejo stalno količino ustreznih protiteles, tvori določena količina precipitata, katerega analiziramo (4).

Heidelberger-Kendall krivulja je razdeljena v tri dele (4):

1. del - zona prebitka protiteles

Količina precipitate narašča skladno z dodano količino antigena.

Supernatant poleg kompleksov antigen – protitelo vsebuje še prosta protitelesa.

2. del - cona ekvivalence

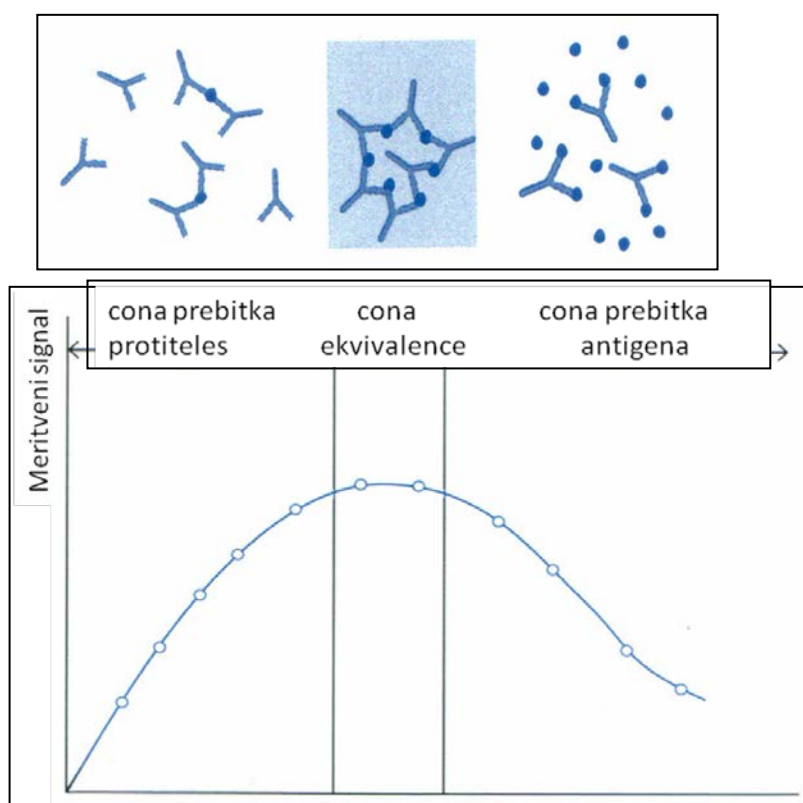
Dosežena je maksimalna precipitacija.

Supernatant poleg kompleksov antigen – protitelo ne vsebuje prostih antigenov niti prostih protiteles.

3. del - cona prebitka antigena

Zaradi visoke koncentracije antigena se pri reakciji porabijo vsa razpoložljiva protitelesa.

Supernatant poleg kompleksov antigen – protitelo vsebuje še proste antigene.



Slika 9: Heidelberger-Kendall krivulja prikazuje odnos med količino antigena in izmerjenim signalom glede na konstantno količino protitelesa (3).

Heidelberg-Kendall-ova krivulja je osnova za vse vrste imunoprecipitacijskih metod, vključno z imuniturbidimetrijo (= turbidimetrijo) in imunonefelometrijo (= nefelometrijo). Ko izvajamo kvantitativno turbidimetrično ali nefelometrično določitev, je zelo pomembno vedeti, v katerem delu krivulje poteka reakcija, saj isti rezultati lahko odgovarjajo dvema različnima koncentracijama antigenov. Namenoma zato vedno izvedemo vsa določanja za levi del krivulje, to je cone s prebitkom protiteles. Pri elektroforezi na gelskem ali kakšnem

drugem mediju, pa antigeni potujejo po gelu, ki vsebuje protitelesa v presežku. V tem primeru prav tako poteka reakcija v coni prebitka protiteles. Eden izmed razlogov za odstopanje med rezultati med obema tehnikama je različen način odčitavanja reakcije med antigenom in protitelesi. Nefelometrija je popolnoma kvantitativna metoda, imunofiksacija je kvalitativna ali v določenih primerih semikvantitativna metoda. Pri IFE gre bolj za oceno prisotnosti monoklonskih imunoglobulinov ali prostih lahkih verig, medtem ko pri nefelometriji dobimo količinsko podane rezultate.

1.6.2 NEFELOMETRIJA

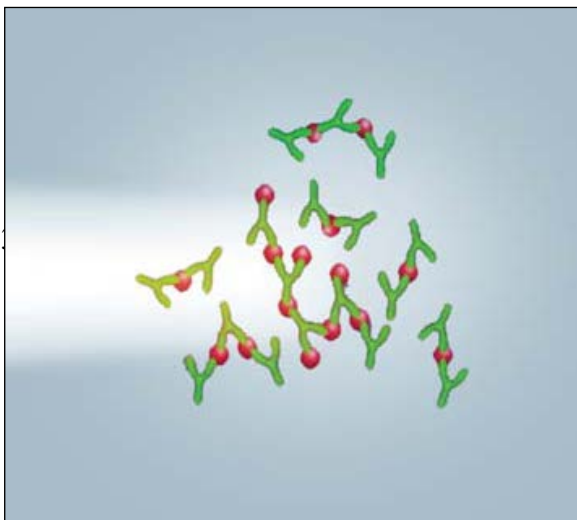
Najpogosteje uporabljena metoda v imunokemiji za merjenje proteinov v serumu, urinu in drugih telesnih tekočinah je nefelometrija (3). Temelji na merjenju razpršenosti svetlobnega žarka na kompleksu antigen – protitelo. Referenčna krivulja je oblikovana s standardom z znano vsebnostjo antigena, razpršena svetloba signala vzorca pa je preračunana kot koncentracija antigena (3). Odnos med intenziteto razpršene svetlobe in koncentracijo je polinomski.

Pri nefelometriji merimo intenziteto le tistih svetlobnih žarkov, ki se odbijejo pod določenim kotom na izbranih delcih v raztopini. Kot odbite svetlobe je odvisen od velikosti delcev in valovne dolžine svetlobe. S tem se v primerjavi s turbidimetrijo poveča specifičnost in občutljivost metode. Običajno merimo nastale imunske komplekse (11).

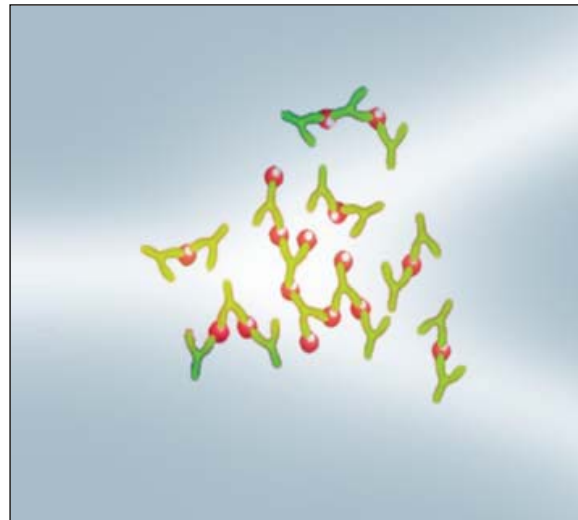
Ta tehnika zamenjuje radialno imunodifuzijo, ker je preprostejša in hitrejša, saj RIA uporablja še radioaktivne spojine, kar vse skupaj zaplete analizo. Z nefelometrijo lahko merimo nastale komplekse v ekvivalentni točki. Poznamo pa tudi 'kinetične' metode, pri katerih merimo hitrost tvorbe imunskih kompleksov (11).

Princip delovanja:

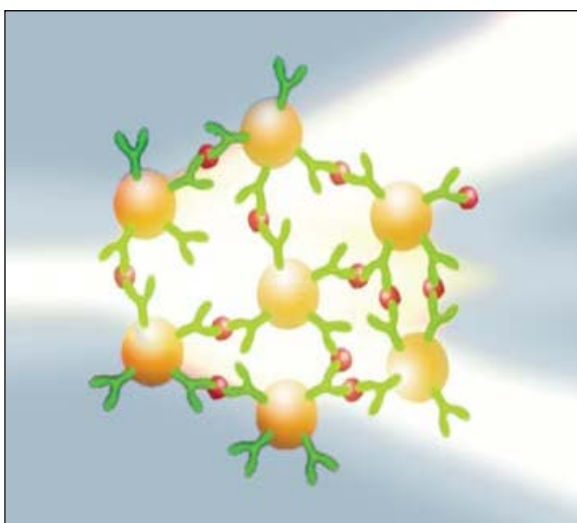
Kompleks antigen – protitelo dobimo, ko v kiveto z vzorcem, kateri vsebuje antigen, dodamo odgovarjajoče protitelo.



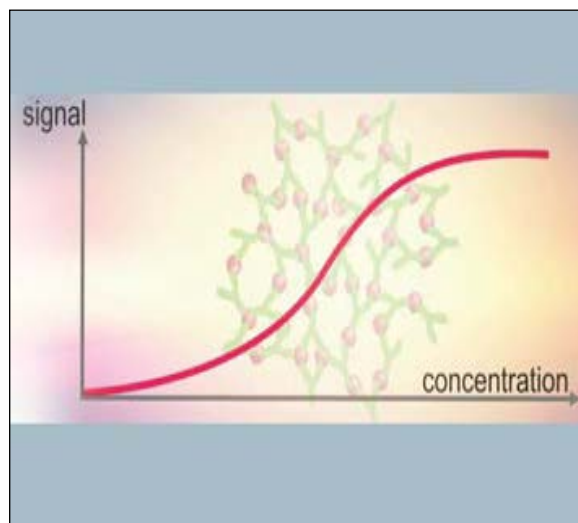
Slika 10: Svetlobni žarek valovne dolžine 840 nm proizveden z LED je usmerjen skozi kiveto (17).



Slika 11: Svetloba se razprši na imunskem kompleksu, katerega merimo (3). Nefelometer meri količino razpršene svetlobe (17).



Slika 12: Občuljivost narašča glede na uporabljena protitelesa ali antigen – prosta ali vezana na nosilec, npr. lateks (17).



Slika 13: Intenziteta merjene razpršene svetlobe je sorazmerna količini kompleksa antigen – protitelo v vzorcu v širokem koncentracijskem območju (17). Če je volumen protiteles konstanten, bo intenziteta signala sorazmerna koncentraciji antigena (3).

1.7 DOLOČANJA PLV V SERUMU

Merjenje PLV v serumu služi kot:

- diagnostični test za ugotavljanje monoklonske gamopatije
- nadgradnja preiskave U-Monoklonski imunoglobulini za Bence Jones proteine
- hitra ocena učinka terapije pri plazmocitomu
- monitoring pacientov s plazmocitomom in odpovedjo ledvic po hemodializi

PLV raje merimo v serumu kot v urinu. Urinski vzorci imajo širši razpon vrednosti, veliko težje jih je zbrati in obdelati ter so manj občutljivi, če je nastanek PLV nizek.

PREDANALITIKA

Za analizo se uporabljajo serumski ali plazemski vzorci, ki so shranjeni pri 4 °C stabilni nekaj tednov. Za daljše shranjevanje je potrebno hraniti pri -20 °C z dodanimi konzervansi. Odvzem vzorca ob različnih urah dneva povzroča minimalno variabilnost (21).

ANALITIKA

Analizo PLV lahko opravljamo na večino znanih proizvajalcev biokemičnih in nefelometričnih analizatorjev. Metoda je lahko dostopna kliničnim laboratorijem (21).

POSTANALITIKA

Rezultate podajamo kot koncentracije posamezne proste lahke verige in količnik κ/λ . Podatke prikažemo tudi v grafični obliki (21).

1.7.1 DIAGNOSTIKA MONOKLONALNE GAMOPATIJE – RAZLIČNE METODE

Preglednica I prikazuje natančnost različnih diagnostičnih postopkov pri identifikaciji monoklonalnih gamopatij (21). Razlaga preglednice:

- 1) Elektroforeza beljakovin v serumu (SPE) zazna vse paciente s plazmocitomom z intaktnimi imunoglobulini. Ti vsebujejo najmanj 10 g/L monoklonskih beljakovin kar je veliko več kot je občutljivost metode (1-5 g/L). Test ne zazna približno 30 % LCMM (preostalih 70 % ima zobce zaradi PLV ali hipogamaglobulinemijo) in vseh NSMM. Približno 50 % vseh pacientov z AL amiloidozo opazimo s SPE.

- Marsikateri posamezniki z nedotaknjnim imunoglobulini MINP so prav tako analizirani.
- 2) Kombinacija metod SPE in imunofiksacije (IF) je bolj občutljiva, vendar kljub vsemu ne zazna nekaj pacientov z LCMM in vse paciente z NSMM. 70 % pacientov z amiloidozo lahkih verig s kombinacijo metod zaznamo, vendar če proizvajajo samo PLV, jih ta kombinacija metod ne zazna. Veliko več pozameznikov zaznamo z MINP, vendar monoklonalni imunoglobulini z manj kot 1-5 g/L imajo manjše klinične posledice, sploh če so PLV priporočenih mejah.
 - 3+4) Če kombinaciji SPE+IF dodamo še IF v urinu, zaznamo še preostanek pacientov (30 %) z LCMM in mnogo pacientov z AL amiloidozo. Zaznamo le nekaj več pacientov z MINP, saj ti redko proizvajajo dovolj monoklonalnih PLV, da bi presegli ledvični prag odstranjevanja beljakovin.
 - 5) Analiza PLV z imunološko metodo zazna monoklonske gamopatije, vendar se je ne uporablja samostojno. Po definiciji je metoda primerna za določanje PLV in ne za monoklonskih gamopatij z intaktnimi imunoglobulini. 30 – 60 % pacientov z MINP, 10 % z ASMM in 5 % z IIMM nima presežka nastajanja PLV.
 - 6) Kombinacija SPE in imunološke metode za določanje PLV serumu zazna vse intaktne monoklonalne imunoglobuline in monoklonske PLV. Približno 20 % pacientov z NSMM ta kombinacija izpusti. Ne zaznajo jih niti druge razpoložljive metode v serumu ali urinu. Tovrstni pacienti ne proizvajajo ali ne izločajo in mnogi imajo mutacijo v DNK (območje lahkih verig), kar privede do spremenjene strukture. Tovrstna kombinacija zazna vse paciente z AL amiloidozo in bolezenskim odlaganjem lahkih verig (LCDD). Prepoznanih je še nekaj dodatnih posameznikov z MINP, kateri proizvajajo samo monoklonalne PLV. Prav tako so identificirani pacienti z ledvično okvaro.
 - 7) Če dodamo prejšnji kombinaciji še metodo imunofiksacije v serumu, ta kombinacija ne zazna dodatnih pacientov s plazmocitomom, vendar identificira približno 2-10 % dodatnih AL amiloidoznih pacientov. Prav tako zaznamo nekaj dodatnih posameznikov z MINP za katere je malo verjetno da bo prišlo do napredovanja bolezni, če ni nenormalnega PLV količnika κ/λ .

Preglednica I: Ocenjena diagnostična občutljivost testov in njihovih kombinacij za različne monoklonalne gamopatije (21).

Natančnost v % diagnostičnih testov za klinično interpretacijo				
	Protokol	Plazmocitom	AL amiloid	MINP
1	SPE	90	50	45
2	SPE, serum IF	95	70	80
3	SPE in UPE	95	75	70
4	SPE, UPE, serum in urin IF	97	90	80
5	PLV	96	95	65
6	SPE in PLV	99	98	85
7	SPE, PLV, serum IF	99	99	100

Legenda: SPE-elektroforeza beljakovin v serumu, IF - določanje monoklonskih imunoglobulinov v serumu z metodo imunofiksacije, UPE- določanje monoklonskih imunoglobulinov v urinu z metodo imunofiksacije MGUS ali MINP – monoklonalna gamopatija nedoločljivega pomena

Kombinacija elektroforeze beljakovin v serumu in imunološke metode določanja PLV nudi enostavno in učinkovito začetno diagnostično preiskavo za monoklonalne gamopatije. Metodi imunofiksacije v serumu in urinu sta potrditveni metodi, kjer kvalitativno ovrednotimo monoklonalne imunoglobuline in PLV - kvalitativna tipizacija monoklonskega zobca (21).

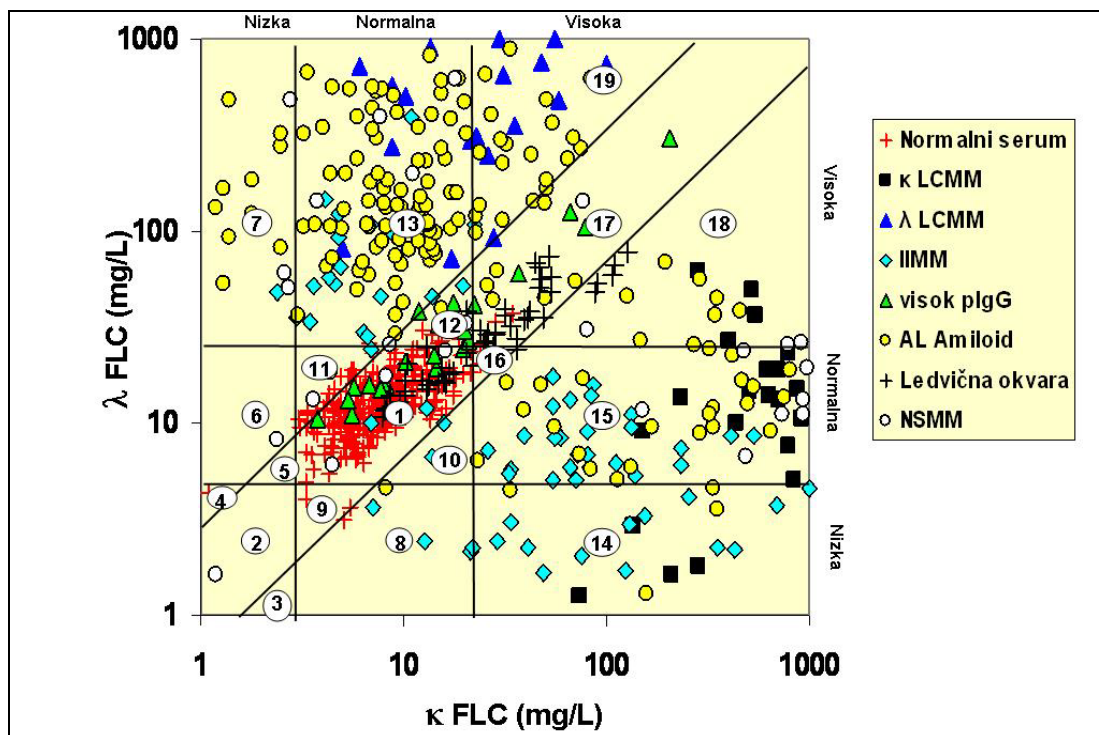
1.7.2 INTERPRETACIJA REZULTATOV

Z določitvijo PLV v serumu skupaj z elektroforezo beljakovin in imunofiksacijo v serumu zaznamo več kot 99 % pacientov z monoklonsko gamopatijo, kot je prikazano tudi v Preglednici II. Rezultati so nenormalni, če odstopajo od priporočenih referenčnih vrednosti (primer proizvajalca The Binding Site) (21):

S κ TBS 3,30 - 19,40 mg/L

S λ TBS 5,71 - 26,30 mg/L

S κ / λ TBS 0,26 – 1,65



Slika 14: Koncentracije κ in λ v serumu za klinično interpretacijo (21).

Preglednica II: Razvrstitev monoklonskih gamopatij glede na serumske koncentracije PLV in količnika (21).

	Kapa	Lambda	κ/λ Količnik	Interpretacija	
1	Normalno	Normalno	Normalno	Normalni serum	
2	Nizko	Nizko	Normalno	Zavora sinteze	
3			Visoko	mIg	
4		Nizko			
5		Normalno	Normalno	Normalni serum	
6	Visoko	Nizko	Nizko	mIg	
7			Visoko		
8		Normalno	Normalno		Normalni serum
9	Normalno	Nizko	Visoko	mIg	
10			Normalno		
11		Visoko	Normalno		Poliklonalno zvečanje sinteze imunoglobulinov ali okvara ledvic
12	Visoko	Nizko	Normalno	Poliklonalno zvečanje sinteze imunoglobulinov ali okvara ledvic	
13			Visoko	mIg z zavoro sinteze	
14	Visoko	Nizko	Visoko	mIg	
15			Normalno	Visoko	mIg z zavoro sinteze
16		Visoko	Normalno	Poliklonalno zvečanje sinteze imunoglobulinov ali okvara ledvic	
17			Normalno	Normalno	Poliklonalno zvečanje sinteze imunoglobulinov ali okvara ledvic
18			Visoko	Visoko	mIg z okvaro ledvic
19	Nizko	Nizko			

Legenda: KM = kostni mozeg; mIg = monoklonski imunoglobulin

Rezultati pacientov na sliki 14 so razvrščeni v različne kategorije odvisno od različnih faktorjev: ali je klon κ ali λ , prisotnost ledvične okvare ali poliklonalne hipergamaglobulinemije in stopnja okvare kostnega mozga glede na rast tumorja ali terapijo zdravil.

Opis preglednice II:

1. NORMALNI VZORCI. Serumska κ , λ in κ/λ količnik so vsi v znotraj orientacijskih referenčnih vrednosti. Če je spremljevalna elektroforeza beljakovina seruma normalna, potem je zelo malo verjetno, da ima pacient monoklonski imunoglobulin.
2. NENORMALNI KOLIČNIK κ/λ . Pomoč diagnozi za monoklonalno gamopatijo in zahteva za ustrezno tkivno biopsijo. Presežena vrednost κ/λ količnik z ledvično odpovedjo in lahko zahteva ustrezen ledvični funkcijski test.
3. NIZKE KONCENTRACIJE κ , λ ALI OBEH. Okvara funkcije kostnega mozga.
4. VISOKE KONCENTRACIJE κ IN λ Z NORMALNIM κ/λ KOLIČNIKOM. Lahko gre za ledvično okvaro (pogosto), čezmerno produkcijo poliklonalnih PLV z vnetnimi znaki (pogosto), biklonalno gamopatijo z različnimi tipi PLV (redko).
5. VISOKE KONCENTRACIJE κ IN λ Z NENORMALNIM KOLIČNIKOM κ/λ . Nakazuje na kombinacijo prisotnosti monoklonskega imunoglobulina in ledvične okvare (21).

1.7.3 OMEJITVE PRI MERJENJU PLV V SERUMU

Merjenje PLV v serumu ima prednosti kot tudi omejitve v primerjavi z elektroforezo beljakovin v serumu.

1. Metoda PLV ne meri intaktnih monoklonskih imunoglobulinov

PLV Ig ne reagirajo z intaktnimi monoklonskimi imunoglobulini, če v vzorcu niso prisotne tudi monoklonske PLV. Takšnih pacientov s to metodo ne moremo zaznati.

2. Ocena klonalnosti

Pri analizi PLV v serumu dobimo rezultat v obliki številčne vrednosti, kot količnik κ/λ . Presoja monoklonskih zobcev pri elektroforeznih metodah je lahko v nekaterih primerih težavna in subjektivna. Nov način vrednotenja klonalnosti v obliki številčnih vrednosti je v začetni fazi lahko težaven, vendar se pomočjo grafičnega prikaza interpretacija poenostavi.

3. Netočnost merjenja PLV v serumu

Vsak monoklonalna beljakovina ima edinstveno strukturo, zato so rezultati odvisni kako dobro Ig prepoznajo različice molekul in polimerne konfiguracije. Nekaj takšnih različic pripomore k netočnosti meritve.

4. Standardizacija

Za določanje PLV ne obstajajo sledljivi mednarodni standardi, ki bi harmonizirali rezultate med različnimi proizvajalci. Laboratorij uporabi standarde in priporočene referenčne vrednosti proizvajalca. V primeru, da se populacija zelo razlikuje od populacije, s katerimi so določili priporočene vrednosti, mora laboratorij vzpostaviti svoje referenčne vrednosti.

5. Nelinearnost monoklonalnih PLV beljakovin

Pri redčenju primarnega vzorca lahko pride do nelinearnega odziva. Vzroki so lahko naslednji:

- monoklonalne PLV imajo neobičajne konformacije, zato jih Ig ne prepoznajo
- polimerizirane oblike ali fragmenti PLV ne reagirajo vedno s protitelesi
- navzkrižna reakcija protiteles z intaktnimi imunoglobulini
- interference, kot so lipemičnost, hemoliza,...
- uporaba neprimerne materiala (standarda) za kalibracijo

6. Različne serije protiteles

Vsaka serija („lot“) reagenčnega kompleta („kit-a“) je pripravljen tako, da ima čim nižjo variabilnost. Proizvajalci poskušajo zmanjšati vpliv „lot-to-lot“ nekonsistence. Vsaka monoklonalna PLV je edinstvena in odreagira s protitelesi na svoj način. Včasih lahko z enim lotom to monoklonsko PLV zaznamo, z drugim ne. Zato moramo pri nenavadnih spremembah rezultatov biti pozorni tudi na raznolikost protiteles v reagenčnem kitu.

7. Prisotnost poliklonalnih PLV

Poliklonalne PLV v vseh serumih vodijo v precejitveni monoklonalnih PLV. Najdemo jih pri pacientih z ledvično odpovedjo, kjer prevladujejo poliklonalne in ne monoklonalne PLV. Kljub vsemu količnik κ/λ običajno ostane normalen.

8. Biklonalna gamopatija z različnimi tipi lahkih verig

Približno 1-2 % pacientov s plazmocitomom ima biklonalno gamopatijo. V primeru, da se PLV razlikujejo (cca 50 %), pacienti imajo oba tipa PLV, je količnik κ/λ lahko normalen.

Vrednosti PLV bodo kljub vsemu povišane. Za identifikacijo uporabimo metodo imunofiksacije, kjer lahko dokažemo dva različna klona. Prav tako moramo vzeti v obzir ledvično funkcijo, ki lahko prispeva znaten delež poliklonalnih PLV zaradi zmanjšane glomerulnega očistka (21).

1.7.4 ZAKLJUČEK UVODA

Trenutno sta na tržišču dva proizvajalca reagentov za kvantitativno določanje PLV, The Binding Site in Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, mednarodni standard še ne obstaja.

V nekaterih primerih nefelometrične preiskave precenijo dejansko koncentracijo PLV. Polimeri PLV se obnašajo kot multiantigenske tarče (multipli antigeni) in pospešijo kinetiko imunoprecipitacije, kar ima za posledico netočen rezultat. Nefelometrična preiskava za določanje PLV je kalibrirana za reakcijo z monomeri in dimeri, v primeru polimerov pa je rezultat lažno zvišan. Takšne primere odkrijemo z določanjem monoklonskega zobca s pomočjo elektroforeze proteinov seruma, kjer opazimo neujemanje rezultatov z nefelometričnimi rezultati merjenja PLV. V takšnih primerih (ti so redki) je tudi z elektroforeznimi metodami težko kvantificirati mPLV. Natančno določanje s katerokoli metodo pod takimi pogoji je izredno težko (8).

Kljub temu, da metoda ni kvantitativna, ostaja elektroforeza z imunofiksacijo »zlati standard« za identifikacijo mPLV v urinu.

V nekaterih primerih elektroforeza urina z imunofiksacijo zazna mPLV, kljub normalnim serumskim preiskavam (pri vsem naštetem gre za redek pojav) (8):

- ko gre za fragmente monoklonskih prostih lahkih verig, ki hitro izginejo iz krvnega obtoka. Kratek življenjski čas v serumu onemogoči kopičenje, v urinu pa so lahko prisotne signifikantne količine.
- nenormalne aminokislinske sekvence lahko spremenijo obliko površinskega epitopa na konstantnem delu prostih lahkih verig. S protitelesi pri imunofiksaciji lahko detektiramo nekatere še nespremenjene epitope in dobimo pozitivno reakcijo.
- V primeru biklonalne gamopatije različnih tipov lahkih verig je lahko razmerje κ/λ normalno.

2 NAMEN DELA

Proteinsko lipidni laboratorij na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo v Ljubljani je do sedaj v rutinskem delu za določanje vrednosti prostih lahkih verig κ in λ v serumu vrsto let uporabljal reagente s poliklonalnimi protitelesi na lateks delcih Freelite™ angleškega proizvajalca The Binding Site. V lanskem letu so na tržišče prišli novi reagenti z monoklonalnimi protitelesi N Latex FLC nemškega proizvajalca Siemens Healthcare Diagnostics GmbH (kratko Siemens).

V okviru diplomskega dela, bomo opravili analize vzorcev z reagenti obeh proizvajalcev in pridobljene rezultate koncentracij PLV κ in PLV λ ter vrednosti količnikov κ/λ primerjali med seboj. Iz zaključkov bomo nato lahko sklepali, ali so novi reagenti priporočljivi za rutinsko uporabo v medicinskem laboratoriju ali ne.

3 METODE IN MATERIALI

3.1 MATERIALI

3.1.1 BIOLOŠKI VZORCI

Biološke vzorce serumov, minimalnih količin 600 μL , smo zbirali v 24-urnem in Proteinsko lipidnem laboratoriju Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo v Ljubljani. Izbor vzorcev pacientov primernih za nabor smo določili na podlagi naročenih preiskav za PLV κ in PLV λ ter njunega količnika. Vzorce smo pred analizo hranili v hladilniku (2 – 8 °C) in kasneje v zamrzovalniku (pod -18 °C).

3.1.2 LABORATORIJSKA OPREMA IN MATERIALI

- Ročne pipete
- Pasteurjeve pipete
- Epruvete (PP)
- Stojalo za epruvete
- Eppendorf epruvete
- Posode za shranjevanje Eppendorf epruvel
- Rokavice
- Laboratorijska namizna centrifuga Eppendorf
- Nefelometer (SIEMENS BN° II SYSTEM, slika 15)

NEFELOMETER SIEMENS BN° II SYSTEM

Proste lahke verige kapa in lambda v serumu določamo kvantitativno z imunokemično metodo na nefelometru Siemens BN° II System.

Osnovni podatki nefelometra Siemens BN° II System:

- je popolnoma avtomatiziran analizator za merjenje, ki temelji na principu imunonefelometrične analize tehnike.
- za izvorno svetlobo uporablja valovno dolžino 840 nm.

- detektor meri razpršene žarke, kateri padejo pod kotom 13° in 24° .
- detektor pretvori vpadno razpršeno svetlobo v električni signal, ki je sorazmeren koncentraciji beljakovine v merilni kiveti. Signal se primerja s predhodno pripravljeno umeritveno krivuljo in pretvori v ustrezno koncentracijo.
- Pri visokih koncentracijah beljakovin v vzorcu, se lahko nekatere analize opravijo s pomočjo ti. pred-reakcije. Z manjšim volumnom vzorca in reagentov se ugotovi pravo merilno območje.
- merjeni signal, ki presega pred-reakcijsko vodilno mejno vrednost, avtomatsko ponovi meritev vzorca v naslednjem višjem razredčitvenem razredu.
- opravljanje pred-reakcije izključi vzorce z zelo visoko vsebnostjo antigenov, ki dajejo lažno nizke rezultate v padajočem delu Heidelberger-Kendall krivulje – antigenski presežek.
- v pred-reakciji so frakcije vzorcev pripravljene s polno količino reagenta.
- povezava z laboratorijskim informacijskim sistemom deluje dvosmerno (3).



Slika 15: Nefelometer Siemens BN° II System (26).

3.2 REAGENTI

3.2.1 REAGENTI PROIZVAJALCA THE BINDING SITE

PRINCIP METODE

Vzorec seruma v katerem so proste lahke verige kapa ali lambda, najprej redčimo na delovno koncentracijo. Začetna redčitev vzorca za proste lahke verige kapa ali lambda znaša 1:100. Pripravljen vzorec analizator odpipetira v merilno kiveto, kjer poteče reakcija s pomočjo dodanega reagent – protiteles. V reakcijsko zmes se doda še pomožni reagent, ki omogoča bolj specifično medsebojno vezavo med antigenom in protitelesi. V primeru prenizke ali previsoke izmerjene vrednosti analizator ponovno izmeri koncentracijo v nižji ali višji redčitvi (1:20 ali 1:400). Ko izmerjena vrednost pade v območje umeritvene krivulje, dobimo rezultat.

Rezultat prenesemo v laboratorijski informacijski sistem, kjer se opravi izračun količnika med izmerjeno koncentracijo proste lahke verige kapa in lambda, izris grafa in izpis pripadajočega komentarja (16).

REAGENTI

Lateks reagenti: so sestavljeni iz monospecifičnih protiteles vezanih na polistiren lateks. Konzervans: ProClin™, E-amino-n-heksanojska kislina (EACA) in benzamidin.

Standard in kontrole: vsebujejo humani serum, v katerih so poliklonalne lambda ali kapa proste lahke verige. Ti so hranjeni v stabilni tekoči obliki in vsebujejo natrijev azid, EACA in benzamidin kot konzervans.

Pomožni reagent: vsebuje natrijev azid kot konzervans (16).

PRIPRAVA REAGENTA

Human Kappa Free / Human Lambda Free sta tekoča reagent in se uporabljata brez predhodnih priprav. Pred uporabo ju je potrebno previdno premešati brez nastanja pene ali mehurčkov (19).

SHRANJEVANJE IN STABILNOSTI REAGENTA

Originalni reagenčni kit mora biti shranjen pri 2-8 °C in so uporabni do datuma odtisnjenege na embalaži (16).

VSEBNOST REAGENČNEGA KITA KAPA/LAMBDA

2 x 2,0 mL Human Kappa Free / Human Lambda Free reagent

1 x 3,0 mL Human Kappa Free / Human Lambda Free pomožnega reagenta

2 x 1,0 mL Human Kappa Free / Human Lambda Free standarda

1 x 1,5 mL Human Kappa Free / Human Lambda Free kontrole

1 x 1,5 mL Human Kappa Free / Human Lambda Free visoke kontrole

Reagenti so v tekoči obliki in pripravljeni za analizo. Preden stekleničke reagentov uporabimo, je potrebno paziti, da pri mešanju ne nastaja pena oziroma mehurčki (16).



Slika 16: Reagenti The Binding Site (27).

VZORCI ZA ANALIZO

Uporabljamo sveži ali globoko zamrznjeni vzorec seruma. Vzorec centrifugiramo po retrakciji koaguluma, da preprečimo hemolizo. Serum je uporaben za analizo 21 dni, če je shranjen pri 2-8 °C, za daljše shranjevanje pa ga je potrebno zamrzniti pri najmanj -20 °C. Ponavljajoče odtajevanje in zamrzovanje ni dovoljeno (16).

INTERFERENCE

Moteče snovi, ki pri analizi metodi povzročajo odstopanja od prave vrednosti (18): ikteričnost (nad 342 $\mu\text{mol/L}$ bilirubina), hemoliza (nad 5 g/L hemoglobin) in motnost nativnega seruma.

MERILNO OBMOČJE

Vsi vzorci so najprej izmerjeni s standardno stopnjo razredčitve vzorca 1:100, kar da približno merilno območje 5,9 – 190 mg/L. Občutljivost metode v tem območju znaša 0,3 mg/L. Nespecifična precipitacija lahko nastane z nativnim neredčenim serumom, kjer lahko opazimo lažno povišane rezultate (18).

Preglednica III: Območja redčenja vzorcev (21, 23).

Celotna razredčitev analizatorja	Merilno območje* kapa (mg/L)	Merilno območje* lambda (mg/L)
1:5	0,25 – 0,8	0,3 – 9,5
1:20	1,0 – 32,0	1,2 – 38,0
1:100	5,0 – 160	5,9 – 190
1:400	20,0 – 640	23,6 – 760
1:2000	100 – 3200	118 – 3800
1:8000	400 – 12800	472 - 15200

*Merilna območja se spreminjajo z vsakim novim lotom reagenčnega kita.

KONTROLA KAKOVOSTI

Predpisana kontrola mora biti vključena v vse postopke dela. Rezultati pridobljeni med delom so sprejemljivi samo, če kontrolni rezultati ustrezajo znotraj $\pm 20\%$ navedene koncentracije.

Če so rezultati zunaj vrednosti, je potrebno izvesti ponovno kalibracijo (18).

Kontrolo kakovosti izvajamo vsakodnevno pred začetkom rutinskega dela. S tem preverimo natančnost in točnost analizatorja. Sistem avtomatsko izvede in izračuna posamezne statistične parametre za kontolo kakovosti. V kolikor dobljene vrednosti ne ustrezajo predpisanim, nadaljne analize vzorcev ne bodo dale zanesljivih rezultatov, zato je potrebno izvesti recalibracijo.

REFERENČNE VREDNOSTI PROIZVAJALCA

Komentar, ki ga Proteinsko – lipidni laboratorij oddaja, kadar so vrednosti količnika med 1,65 in 3,1: “Pri ledvičnih okvarah z oGF (MDRD) pod 60 mL/min/1,73m² veljajo

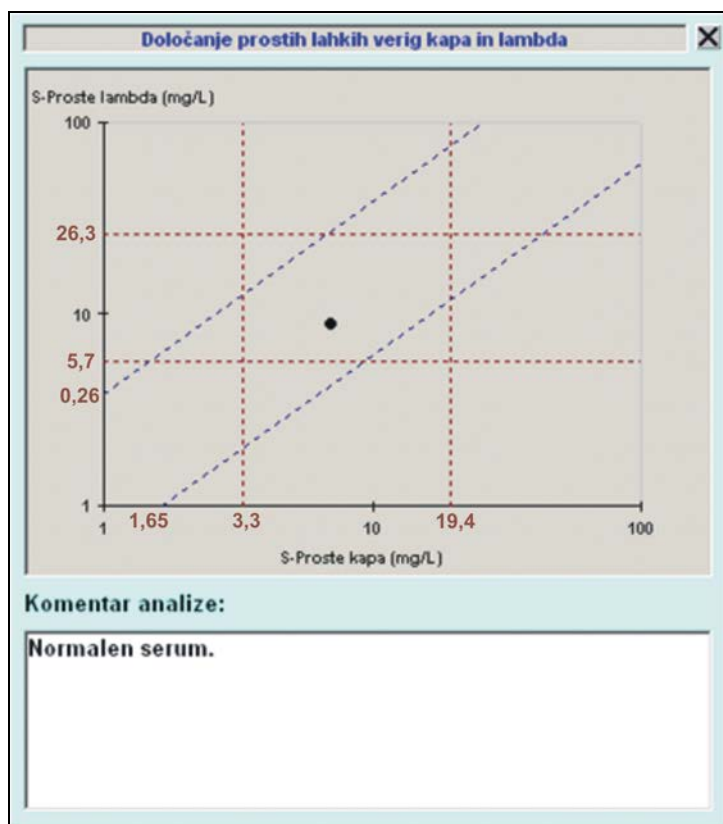
spremenjene referenčne vrednosti za količnik kapa/lambda: 0,3 - 3,1. Pri ledvični odpovedi (5. stopnja KLB) upoštevamo koncentracije prostih lahkih verig in ne količnik.”

Preglednica IV: Orientacijske referenčne vrednosti pri osebah brez ledvičnih obolenj (21, 23).

NORMALNI SERUM ODRASLE OSEBE	Srednja vrednost	Mediana	Območje 95 percentila
Proste lahke verige kapa	8,36 mg/L	7,30 mg/L	3,30 – 19,40 mg/L
Proste lahke verige lambda	13,43 mg/L	12,40 mg/L	5,71 – 26,30 mg/L
	Srednja vrednost	Mediana	Celotno območje
Količnik kapa/lambda	0,63	0,60	0,26 – 1,65

Preglednica V: Orientacijske referenčne vrednosti pri osebah z ledvičnim obolenjem (21, 23).

	Celotno območje
Količnik kapa/lambda	0,3 – 3,1



Slika 17: Grafični prikaz referenčnih vrednosti prostih lahkih verig in količnika za proizvajalca reagentov The Binding Site.

Graf na sliki 17 je povzet po inovatorju in avtorju AR Bradwellu (10), ki je prirejen za priporočene orientacijske vrednosti PLV κ in PLV λ ter količnika κ/λ proizvajalca Siemens. V takšni obliki ga Proteinsko – lipidni laboratorij (pripravljeno v LIS-u s pomočjo Žive Flisar, univ. dipl. inž. kem., spec. med. biokem. in podjetja Kobis d.o.o.) uporablja pri svojem rutinskem delu.

OBČUTLJIVOST IN PONOVLJIVOST METODE

Občutljivost merjenja je določena z najnižjo vrednostjo je odvisna proteinov v Human Kappa Free/Human Lambda Free standarda v umeritveni krivulji.

Ponovljivost: Koeficient variacije (KV) v seriji za proste lahke verige kapa znaša od 3,10 do 4,23 %, za proste lahke verige lambda pa 4,80 do 8,40 %.

Koeficient variacije med serijami za proste lahke verige kapa znaša od 6,27 do 7,40 %, za proste lahke verige lambda pa od 7,45 do 8,08 % (21, 23).

3.2.2 REAGENTI PROIZVAJALCA SIEMENS

PRINCIP METODE

V tem primeru najprej poteče pred-reakcija. Pred-reakcija je reakcija med manjšim volumnom vzorca in reagenta, da preverimo koncentracijsko območje prostih lahkkih verig v vzorcu. Če je koncentracija prostih lahkkih verig prevelika, gre analizator avtomatično v višjo razredčitev in zavrže uporabljen reagent in vzorec (manjši volumni) ter obratno. Če reakcija ustreza danim pogojem, program doda še manjkajoči del vzorca in reagentov v merilno kiveto. Začetna redčitev vzorca za proste lahke verige kapa znaša 1:100, za lambda pa 1:20. V reakcijsko zmes se doda še pomožni reagent, ki omogoča bolj specifično medsebojno vezavo med antigenom in protitelesom. Ko izmerjena vrednost ustreza območju umeritvene krivulje, dobimo rezultat.

Rezultat prenesemo v laboratorijski informacijski sistem, kjer se opravi izračun količnika med koncentracijo proste lahke verige kapa in lambda, izris grafa in izpis pripadajočega komentarja (19).

REAGENTI

N Latex FLC kapa vsebuje suspenzijo polistirenskih delcev prekritih z monoklonalnimi protitelesi (mišjih) proti humanim PLV kapa. Vsebuje še natrijev azid kot konzervans.

N Latex FLC lambda vsebuje suspenzijo polistirenskih delcev prekritih z monoklonalnimi protitelesi (mišjih) proti humanim PLV lambda. Vsebuje še natrijev azid kot konzervans (19).

Pomožni reagent, standard, kontrolni materiali:

N FLC pomožni reagent – vsebuje mišje imunoglobuline (reagent A) v pufri (reagent B). Vsebuje še natrijev azid kot konzervans.

N FLC standard SL, N FLC kontrola SL1 in N FLC kontrola SL2 – je stabilizirana tekočina, ki vsebuje proste lahke verige humanega izvora (znane koncentracije), albumin humanega izvora in inhibitorje proteaz. Vsebuje še natrijev azid kot konzervans (19).



Slika 18: Reagenčni komplet Siemens (26).

PRIPRAVA REAGENTA

N Latex FLC kappa in N Latex FLC lambda sta tekoča reagentna in se uporabljata brez predhodnih priprav. Pred uporabo ju je potrebno previdno premešati brez nastanjanja pene ali mehurčkov (19).

Dva mililitra pomožnega reagenta B odpipetiramo v vialo pomožnega reagenta A. Tako pripravljen reagent je potrebno previdno premešati brez nastanjanja pen ali mehurčkov (19). Standard in kontrolni material sta že pripravljena za uporabo.

SHRANJEVANJE IN STABILNOST REAGENTA

Originalni reagenčni kit mora biti shranjen pri 2-8 °C in so uporabni do datuma odtisnjenega na embalaži.

Po odprtju je reagent uporaben 4 tedne, ob shranjevanju pri 2-8 °C varno zaprto in z izvzeto mikrobiološko kontaminacijo.

Pripravljen pomožni reagent je stabilen 4 tedne, ob shranjevanju pri 2-8 °C varno zaprto in z izvzeto mikrobiološko kontaminacijo. Pri uporabi reagenta 8 ur dnevno na sobni temperature, je reagent stabilen 5 dni.

Standard je stabilen 42 dni po odprtju in ob shranjevanju pri 2-8 °C varno zaprto in z izvzeto mikrobiološko kontaminacijo.

Kontrolni material je stabilen 28 dni po odprtju in ob shranjevanju pri 2-8 °C varno zaprto in z izvzeto mikrobiološko kontaminacijo (19).

VSEBNOST KITOV ZA ANALIZO PROSTIH LAHKIH VERIG

N Latex FLC kappa: 3 x 1,7 mL

N Latex FLC lambda: 3 x 2,1 mL

N FLC Standard SL: 3 x 1,0 mL

N FLC CONTROL SL1: 3 x 1,0 mL

N FLC CONTROL SL2: 3 x 1,0 mL

N FLC SUPPLEMENT: 3 x 0,5 mL (reagent A) in 3 x 2,0 mL (reagent B) (19).

VZORCI ZA ANALIZO

Primerni vzorci so humani serum ali plazma (heparin, EDTA), vedno sveža, če je le možno (shranjena ne več kot 7 dni na 2-8 °C) ali zmrznjena. Vzorci shranjeni v zmrzovalniku (pri -20 °C ali nižje) so stabilni več kot 6 mesecev, če so zmrznjeni v manj kot 24 urah po odvzemu. Serumski vzorci morajo po odvzemu popolnoma koagulirati, po centrifugiranju ne smejo vsebovati nobenih delcev ali sledi fibrina. Lipemične vzorce ali zamrznjeni vzorce, ki po odtajanju postanejo motni, pred testiranjem centrifugiramo, da se zbistrijo (19).

INTERFERENCE

Diagnoza in zdravljenje ne smeta temeljiti samo na merjenju prostih lahkih verig.

Moteče snovi, ki pri analizi metodi povzročajo odstopanja od prave vrednosti:

revmatoidni faktor 2000 IU/mL, trigliceridi 5,7 mmol/L, konjugiran bilirubin 1025

µmol/L, nekonjugiran bilirubin 618 µmol/L, prosti hemoglobin 5 g/L in celokupni proteini

60 g/L. Interference za splošno uporabo drog niso poznane.

Motni vzorci in delci v vzrocu lahko motijo med merjenjem, zato je pred merjenjem potrebno centrifugirati vzorce. Lipemični ali motni vzorci, ki jih ne moremo razbistriti z centrifugiranjem (10 min pri približno 15 000g), ne smemo analizirati (19).

MERILNO OBMOČJE

Vsi vzorci so najprej izmerjeni s standardno stopnjo razredčitve vzorca 1:100 za proste lahke verige kapa, kar da približno merilno območje 3,4 – 110 mg/L in 1:20 za proste lahke verige lambda, kjer merilno območje znaša 1,6 – 60 mg/L. Občutljivost metode je enaka najnižji vrednosti umeritvene krivulje (se spreminja z vsakim lotom) (18).

KONTROLA KAKOVOSTI

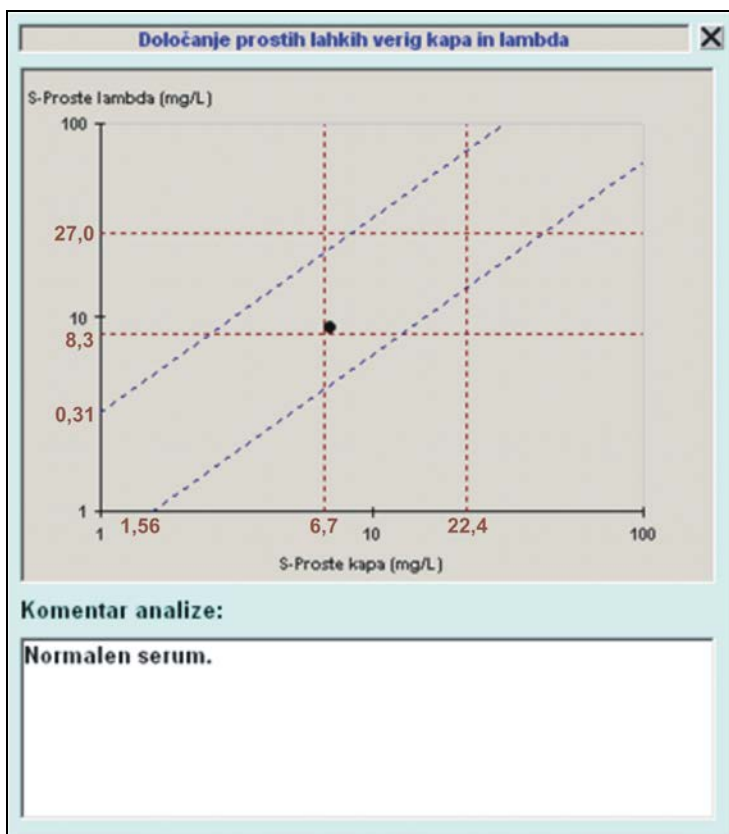
Za merjenje referenčne krivulje uporabimo umeritvena reagenta N FLC Control SL1 in N FLC Control SL2, katero preverimo pred vsakim analiziranjem vzorca seruma ali plazme. Notranja kontrola kakovosti se izvaja na isti način kot pri metodi The Binding Site (glej 3.2.1 stran 38).

REFERENČNE VREDNOSTI PROIZVAJALCA

Preglednica VI: Referenčni interval za serumske in plazemske vzorce zdravega odraslega (19).

NORMALNI SERUM ODRASLEGA	Območje 95 percentila
Proste lahke verige kapa	6,7 – 22,4 mg/L
Proste lahke verige lambda	8,3 – 27,0 mg/L
	Celotno območje
Količnik kapa/lambda	0,31-1,56

Graf na sliki 19 je povzet po inovatorju in avtorju AR Bradwellu (10), ki je prirejen za priporočene orientacijske vrednosti PLV κ in PLV λ ter količnika κ/λ proizvajalca Siemens. V takšni obliki bi ga Proteinsko – lipidni laboratorij (pripravljeno v LIS-u s pomočjo Žive Flisar, univ. dipl. inž. kem., spec. med. biokem. in podjetja Kobis d.o.o.) uporabljal pri svojem rutinskem delu in bi bil prirejen za delo s Siemensovimi reagenti.



Slika 19: Grafična prikaz referenčnih vrednosti prostih lahkih verig in količnika za reagente proizvajalca Siemens.

OBČUTLJIVOST IN PONOVLJIVOST METODE

Občutljivost merjenja je določena z najnižjo vrednostjo v umeritveni krivulji s standardom N FLC Standard SL (se spreminja z vsakim lotom).

Ponovljivost:

Koeficient variacije (KV) v seriji za proste lahke verige kapa znaša od 1,4 do 3,6 %, za proste lahke verige lambda pa 1,7 do 2,2 do %.

Koeficient variacije med serijami za proste lahke verige kapa znaša od 1,9 do 4,2 %, za proste lahke verige lambda pa 2,7 od 4,8 do % (19).

3.3 STATISTIČNA METODA

Statistična obdelava vzorcev je bila opravljena s pomočjo programov Excel in MedCalc V11.

4 REZULTATI IN DISKUSIJA

4.1 POTEK DELA

V obdobju od februarja do aprila 2012 smo v Proteinsko lipidnem laboratoriju na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo (KIKKB) zbirali vzorce pacientov, pri katerih so bile zaradi različnih vzrokov naročene preiskave za določanje vrednosti prostih lahkkih verig κ in λ v serumu.

Paciente smo najprej razvrstili v tabelo z osebnimi podatki za lažjo sledljivost (ime in priimek, datum rojstva in datum sprejema vzorca) ter jim določili našo zaporedno številko. V programu LIS, katerega uporablja KIKKB v povezavi z UKC Ljubljana za naročanje preiskav, smo tem vzorcem poiskali njihovo zaporedno številko predhodno naročene preiskave in jo uvrstili v tabelo. Izpisali smo si tudi številko stojala in pozicijo epruvete v arhivu vzorcev v 24-urnem laboratoriju, kjer hranijo vzorce preiskav za 7 dni nazaj.

Vzorce za tekoči dan smo pridobili iz arhivskega vzorca Proteinsko lipidnega laboratorija, vzorce za pretekle dni pa smo poiskali v arhivu 24-urnega laboratorija. Ustrezni vzorci za nabor so bili tisti, ki so vsebovali minimalno količino 600 μL seruma in zapolnili smo celotno merilno območje po priporočilih CLSI (EP9-A2) (25). Ta količina je zadoščala za merjenje PLV κ in PLV λ z obema proizvajalcema.

Vzorce smo pred analizo shranili v hladilniku in preostanek količine v zamrzovalniku. Pred analizo smo jih nato najprej centrifugirali (3000 obr., 10 min) in jih nato vstavili v nefelometer BN^o II System proizvajalca Siemens (pred zagonom smo opravili ustrezno kalibracijo in izmerili kontrolne vzorce). Izmerili smo 122 vzorcev z reagentoma TBS in SIM. Izmerjene vrednosti iz analizatorja smo beležili v Excel preglednico in jih tudi hkrati prenesli v program LIS (za grafični prikaz rezultata). Vrednosti smo nato prepisali v ustrezne tabele za nadaljnjo statistično obdelavo. Prav tako smo beležili število ponovitev analiz za posamezen vzorec in stopnjo redčenja.

4.2 *REZULTATI*

Za primerjavo dveh nefelometričnih metod z reagentoma TBS in SIM za določanje PLV κ in λ v serumu smo medsebojno primerjali rezultate 122 vzorcev. Reultati izmerjenih koncentracij so prikazani v preglednici VII. Namen naloge je bila primerjava izmerjenih rezultatov SIM (testirana metoda) z TBS (referenčna metoda). Diagnoza pacientov (pridobljeno iz klinike) je v diplomski nalogi uvrščena v razpredelnico VII za dodatno primerjavo rezultatov oziroma rezultate lahko uporabimo za oceno diagnostične specifičnosti in občutljivosti analiznih metod. Naše delo ni bilo spremljanje diagnoze pacientov, saj bi drugače paciente morali spremljati že od samega začetka in z obema metodoma. Rezultati diagnoze katere smo uvrstili v razpredelnico VII so bili postavljeni veliko kasneje, zato sedaj ne moremo opredeliti ali so naši izmerjeni rezultati odraz stanja pacienta na začetku ali v času zdravljenja. Poleg tega smo se omejili samo na monoklonalno gamopatijo, saj TBS metoda zazna tako monoklonalne gamopatije kot tudi opredeli ledvična obolenja (komentar diagnoz laboratorija: N, PO, MZ, ...), medtem ko SIM še nima ovrednotenih referenčnih vrednosti za ledvična obolenja, zato primerjava diagnoz zaenkrat ni možna.

Da smo lahko rezultate medsebojno primerjali, smo originalni grafični prikaz proizvajalca TBS, preuredili v grafični prikaz, kjer smo uporabili podatke orientacijskih referenčnih vrednosti proizvajalca Siemens (slika 19).

Preglednica VII: Rezultati vseh izmerjenih vzorcev.

Številka vzorca	TBS		SIM		TBS		SIM		Ujemanje	Diag.
	K	λ	K	Λ	količnik κ/λ	komentar	količnik κ/λ	komentar		
1	27,80	23,10	27,20	19,10	1,2035	PO	1,4241	PO	Da	0
2	16,30	13,00	18,00	13,90	1,2538	N	1,2950	N	Da	0
3	29,80	24,50	33,70	25,30	1,2163	PO	1,3320	PO	Da	0
4	15,20	26,70	18,80	27,10	0,5693	PO	0,6937	PO	Da	0
5	7,71	11,80	8,86	6,15	0,6534	N	1,4407	NZ	Ne	0
6	22,30	15,60	25,30	22,40	1,4295	PO	1,1295	PO	Da	0
7	11,10	8,08	13,70	11,80	1,3738	N	1,1610	N	Da	0
8	13,60	9,40	16,60	9,84	1,4468	N	1,6870	MZ	Ne	0
9	15,70	13,80	17,20	19,70	1,1377	N	0,8731	N	Da	0
10	23,20	21,20	26,90	31,20	1,0943	PO	0,8622	PO	Da	0
11	14,70	15,70	12,80	8,22	0,9363	N	1,5572	NZ	Ne	0
12	26,80	16,60	31,10	23,00	1,6145	PO	1,3522	PO	Da	0
13	14,10	15,90	17,20	15,40	0,8868	N	1,1169	N	Da	0
14	18,00	16,50	15,60	11,90	1,0909	N	1,3109	N	Da	0
15	17,90	24,70	18,20	16,90	0,7247	N	1,0769	N	Da	0
16	20,90	20,40	22,00	22,30	1,0245	PO	0,9865	N	Ne	0
17	20,30	15,30	17,00	9,55	1,3268	PO	1,7801	MZ	Ne	0
18	15,40	16,90	19,80	23,90	0,9112	N	0,8285	N	Da	0
19	10,30	13,10	11,50	8,90	0,7863	N	1,2921	N	Da	0
20	16,30	15,80	16,10	13,70	1,0316	N	1,1752	N	Da	0
21	31,60	21,10	30,40	22,20	1,4976	PO	1,3694	PO	Da	0
22	32,60	17,10	29,60	15,00	1,9064	M	1,9733	M	Da	0
23	12,50	15,50	13,30	15,00	0,8065	N	0,8867	N	Da	0
24	16,20	11,50	15,80	9,78	1,4087	N	1,6155	MZ	Ne	0
25	12,90	15,00	12,70	10,30	0,8600	N	1,2330	N	Da	0
26	14,80	12,90	17,10	12,60	1,1473	N	1,3571	N	Da	0
27	15,00	15,20	18,40	19,10	0,9868	N	0,9634	N	Da	0
28	17,10	17,10	18,60	12,50	1,0000	N	1,4880	N	Da	0
29	8,86	10,60	8,87	8,54	0,8358	N	1,0386	N	Da	0
30	14,70	14,10	18,00	20,70	1,0426	N	0,8696	N	Da	0
31	24,80	23,90	26,20	28,70	1,0377	PO	0,9129	PO	Da	0
32	19,50	15,90	19,50	14,10	1,2264	PO	1,3830	N	Ne	0
33	16,90	17,90	18,50	17,80	0,9441	N	1,0393	N	Da	0
34	15,70	15,30	17,20	14,30	1,0261	N	1,2028	N	Da	0
35	36,90	21,50	42,10	31,60	1,7163	M	1,3323	PO	Ne	0
36	16,00	15,60	18,70	16,80	1,0256	N	1,1131	N	Da	0
37	19,30	14,30	23,90	18,30	1,3497	N	1,3060	PO	Ne	0
38	15,10	16,00	20,30	20,60	0,9438	N	0,9854	N	Da	0
39	18,70	19,00	21,30	18,50	0,9842	N	1,1514	N	Da	0
40	13,80	15,90	14,00	14,80	0,8679	N	0,9459	N	Da	0
41	13,10	13,40	18,60	12,40	0,9776	N	1,5000	N	Da	1
42	10,80	11,80	14,80	10,10	0,9153	N	1,4653	N	Da	1
43	680,00	13,30	215,00	18,80	51,1278	M	11,4362	M	Da	1
44	10,90	0,26	16,40	1,64	41,9231	MZ	10,0000	MZ	Da	1
45	380,00	2,21	202,00	5,69	171,9457	MZ	35,5009	MZ	Da	1
46	7,65	9,04	11,40	5,12	0,8462	N	2,2266	MZ	Ne	1
47*	0,30	1330,00	2,86	1030,00	0,0002	MZ	0,0028	MZ	Da	1
48	9,39	10,30	14,20	8,54	0,9117	N	1,6628	MZ	Ne	1
49	28,50	11,00	29,30	13,20	2,5909	N	2,2197	N	Da	1
50	69,90	30,40	73,50	54,10	2,2993	MO	1,3586	PO	Ne	1
51	23,70	30,50	23,40	29,80	0,7770	PO	0,7852	M	Ne	1
52	5,99	163,00	9,84	35,70	0,0367	M	0,2756	M	Da	1
53	19,20	18,60	20,10	14,60	1,0323	N	1,3767	M	Ne	1
54	1,93	7,75	8,24	6,92	0,2490	MZ	1,1908	N	Ne	1
55	14,80	11,30	18,60	23,60	1,3097	N	0,7881	N	Da	1
56	25,80	21,70	23,30	19,50	1,1889	PO	1,1949	PO	Da	1

57	283,00	8,42	213,00	12,00	33,6105	M	17,7500	M	Da	1
58	0,81	0,56	2,39	1,70	1,4464	Z	1,4059	Z	Da	1
59	6,23	0,56	9,91	5,16	11,1250	MZ	1,9205	MZ	Da	1
60	11,00	13,40	11,90	13,20	0,8209	N	0,9015	N	Da	1
61	46,40	17,10	38,90	21,20	2,7135	M	1,8349	M	Da	1
62	119,00	28,50	78,70	45,80	4,1754	MO	1,7183	MO	Da	1
63	402,00	10,50	192,00	12,60	38,2857	M	15,2381	M	Da	1
64	18,70	23,30	21,20	30,30	0,8026	N	0,6997	PO	Ne	1
65	24,10	24,00	28,30	41,60	1,0042	PO	0,6803	PO	Da	0
66	19,40	20,80	26,90	29,80	0,9327	N	0,9027	PO	Ne	1
67	71,40	56,30	92,00	103,00	1,2682	PO	0,8932	PO	Da	1
68	8,70	8,58	12,60	8,31	1,0140	N	1,5162	N	Da	1
69	13,30	13,70	15,00	11,30	0,9708	N	1,3274	MZ	Ne	1
70	222,00	1,45	193,00	5,08	153,1034	MZ	37,9921	MZ	Da	1
71	2,20	5,72	6,51	6,82	0,3846	NZ	0,9545	Z	Ne	1
72	15,60	46,00	15,10	53,30	0,3391	PO	0,2833	M	Ne	1
73	65,80	68,20	61,80	72,10	0,9648	PO	0,8571	PO	Da	0
74	32,60	20,70	34,90	27,60	1,5749	PO	1,2645	PO	Da	0
75	621,00	7,43	212,00	9,24	83,5801	M	22,9437	M	Da	1
76	315,00	8,50	164,00	9,99	37,0588	M	16,4164	M	Da	1
77	0,30	0,71	5,04	5,63	0,4225	Z	0,8952	Z	Da	1
78	92,50	15,70	82,00	19,40	5,8917	M	4,2268	M	Da	1
79	31,30	27,30	37,60	32,70	1,1465	PO	1,1498	PO	Da	0
80	30,30	8,43	31,70	8,53	3,5943	PO	3,7163	PO	Da	1
81	18,50	15,00	23,10	24,30	1,2333	N	0,9506	PO	Ne	0
82	8,35	76,50	12,20	256,00	0,1092	M	0,0477	M	Da	1
83	22,30	12,60	24,80	14,90	1,7698	M	1,6644	M	Da	1
84	15,90	19,00	16,10	13,90	0,8368	N	1,1583	N	Da	0
85	7,76	13,80	11,70	18,50	0,5623	N	0,6324	N	Da	1
86	41,40	7,71	49,60	5,78	5,3696	M	8,5813	MZ	Ne	1
87	865,00	16,40	445,00	7,62	52,7439	M	58,3990	MZ	Ne	1
88	7,11	24,30	8,97	27,10	0,2926	N	0,3310	PO	Ne	1
89	474,00	1,19	79,20	6,68	398,3193	MZ	11,8563	MZ	Da	1
90	15,50	18,50	17,10	14,30	0,8378	N	1,1958	N	Da	0
91	19,80	14,50	24,20	16,60	1,3655	PO	1,4578	PO	Da	1
92	13,50	13,60	17,30	13,10	0,9926	N	1,3206	N	Da	1
93	7960	10,1	3740	10,7	788,1188	M	349,5327	M	Da	1
94	197,00	8,74	110,00	7,02	22,5400	M	15,6695	MZ	Ne	1
95	10,20	9,25	8,80	4,89	1,1027	N	1,7996	MZ	Ne	1
96	8,18	10,90	6,96	12,10	0,7505	N	0,5752	N	Da	1
97	25,30	19,10	20,80	18,30	1,3246	PO	1,1366	N	Ne	1
98	368,00	18,00	223,00	27,40	20,4444	M	8,1387	MO	Ne	1
99	27,40	32,50	23,10	27,40	0,8431	PO	0,8431	PO	Da	1
100	14,30	16,80	10,70	12,60	0,8512	N	0,8492	N	Da	1
101	45,70	37,60	33,30	23,00	1,2154	PO	1,4478	PO	Da	1
102	446,00	29,10	92,30	62,90	15,3265	MO	1,4674	PO	Ne	1
103	3,12	6,16	3,87	3,48	0,5065	NZ	1,1121	Z	Ne	1
104	865,00	30,50	319,00	20,00	28,3607	MO	15,9500	Z	Ne	1
105	1460,00	2,16	382,00	4,47	675,9259	MZ	85,4586	MZ	Da	1
106	393,00	7,95	191,00	9,26	49,4340	M	20,6263	M	Da	1
107	335,00	12,30	71,60	8,67	27,2358	M	8,2584	M	Da	1
108	49,80	46,50	35,10	50,70	1,0710	PO	0,6923	PO	Da	1
109	6,87	8,81	4,88	5,44	0,7798	N	0,8971	Z	Ne	1
110*	8,61	541,00	6,94	1250,00	0,0159	M	0,0056	M	Da	1
111*	6,66	8,17	5,18	656,00	0,8152	N	0,0079	MZ	Ne	1
112	20,70	23,10	17,70	12,10	0,8961	PO	1,4628	N	Ne	0
113*	27,90	840,00	29,20	635,00	0,0332	MO	0,0460	M	Ne	1
114	4,44	725,00	4,42	364,00	0,0061	M	0,0121	MZ	Ne	1
115*	27,50	1360,00	3,22	850,00	0,0202	MO	0,0038	MZ	Ne	1
116*	23,30	1180,00	24,50	713,00	0,0197	MO	0,0344	MO	Da	1
117	30,60	185,00	42,10	283,00	0,1654	MO	0,1488	MO	Da	1
118	479,00	14,90	191,00	14,80	32,1477	M	12,9054	M	Da	1
119*	33500,00	4,48	9820,00	19,20	7477,6786	MZ	511,4583	M	Ne	1

120	987,00	1,57	440,00	2,11	628,6624	MZ	208,5308	MZ	Da	1
121	5,46	6,97	5,57	7,46	0,7834	N	0,7466	Z	Ne	1
122*	26900	5,79	6790	4,92	4645,9413	M	1380,0813	MZ	Ne	1

*ubežniki (izven ± 3 SD)

Oznake:

N	Normalen
M	Monoklonski Ig
MZ	Monoklonski z zavoro sinteze
PO	Poliklonski z okvaro
MO	Monoklonski z okvaro
Z	Zavora sinteze
NZ	Normalni z zavoro
0	NEGATIVNO
1	POZITIVNO (Plazmocitom, Hodgkinov limfom, Diseminirani plazmocitom, Monoklonalni Ig, Ne-Hodgkinov limfom, Kronična limfatična levkemija, Monoklonalna gamopatija nedoločljivega pomena)
Da	Ujemanje diagnoz glede na primerjanje rezultatov izmerjenih laboratorijsko z biopsijo kostnega mozga
Ne	Neujemanje diagnoz glede na primerjanje rezultatov izmerjenih laboratorijsko z biopsijo kostnega mozga

Vrednosti PLV ne sledijo Gaussovi porazdelitvi, zato smo zbranim rezultatom določili najprej Spearmanov koeficient korelacije (r):

Preglednica VIII: Vrednosti koeficientov za vseh 122 vzorcev.

R	κ TBS	λ TBS	κ/λ TBS
κ SIM	0,953		
λ SIM		0,846	
κ/λ SIM			0,827

Vrednosti osmih vzorcev so bilo izredno visoke, zato smo še v skupini iskali morebitne ubežnike (vrednosti izven ± 3 SD) za parametre kapa in lambda proizvajalca The Binding Site kot referenčno metodo. Nato smo preverili, ali izmerjeni rezultati in količnika sledijo normalni porazdelitvi. Uporabili smo Kolmogorov-Smirnov test. Vsi parametri so nenormalno porazdeljeni ($p < 0,0001$), zato smo v nadaljevanju uporabili le neparametrične statistične metode.

Na podlagi tega smo izločili 8 vzorcev (v tabeli označenih z *) in pripravili celovito statistično analizo na 114 izmerjenih vzorcih.

Preglednica IX: Vrednosti koeficienta korelacije za 114 vzorcev (brez ubežnikov).

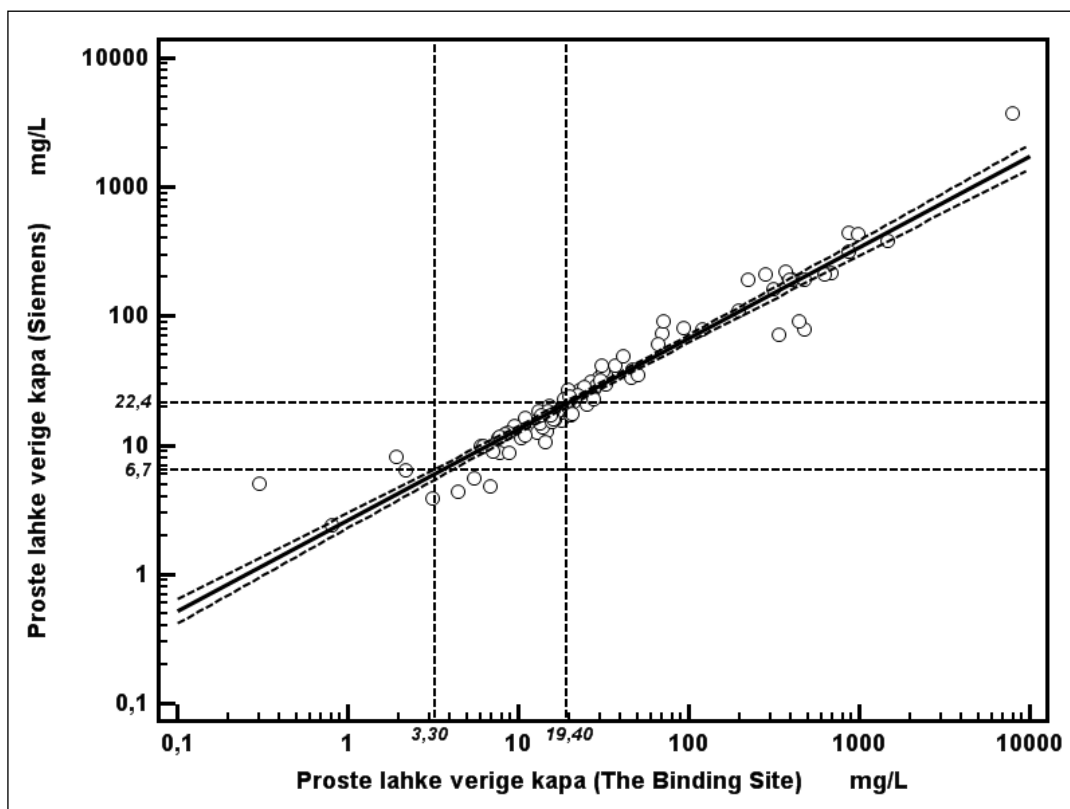
R	κ TBS	λ TBS	κ/λ TBS
κ SIM	0,969		
λ SIM		0,873	
κ/λ SIM			0,792

Spearmanov korelacijski koeficient se je malenkostno izboljšal pri prostih verigah kapa in lambda, pri količniku je koeficient nižji.

Med izvajanjem diplomskega dela je proizvajalec Siemens spremenil protokol izdelave reagentov, saj je bilo še posebno za PLV λ večje odstopanje od rezultatov, zato smo ponovno izvedli meritve. Težave se kažejo predvsem, kadar so v vzorcu večje količine polimeriziranih PLV λ , saj takrat epitopi niso na voljo protitelesom, ali pa pride celo do navzkrižne reakcije z večjim kompleksom polimeriziranih verig λ . Zaradi tega je tudi korelacija količnika slabša, saj se napake seštevajo.

Rezultate smo ovrednotili tudi grafično (slike 20, 21 in 22) in z nadaljnjo statistično obdelavo (preglednica X).

a) PROSTE LAHKE VERIGE KAPA



Slika 20: Grafični prikaz regresijske premice Passing Bablok ($y = 5,245 + 0,762x$) za reagente The Binding Site in Siemens za parameter PLV kapa v serumu.

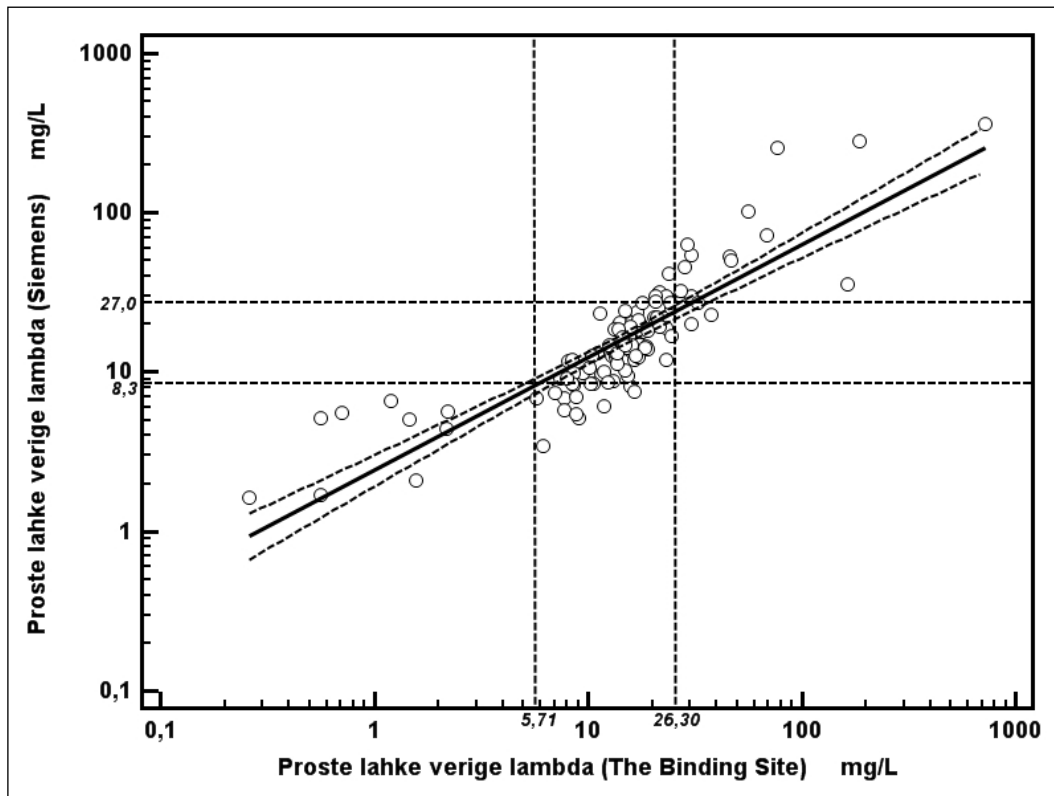
(Črtkane črte na grafu pomenijo orientacijske referenčne vrednosti za posamezen reagent.)

Podatek t-testa parov po Wilcoxu: $p = 0,747$ (ni signifikantna razlika).

Točke so lepo razpršene okrog premice, korelacija je zelo dobra, mediani sta primerljivi, kar potrjuje tudi t-test, zato lahko opredelimo dobro primerljivost med metodama.

Vrednosti obeh metod se ujemajo v celotnem koncentracijskem območju. Opaziti je težavo okrog orientacijskih referenčnih vrednosti obeh metod, zaradi česar lahko pride do različnih interpretacij rezultata (količnika).

b) PROSTE LAHKE VERIGE LAMBDA



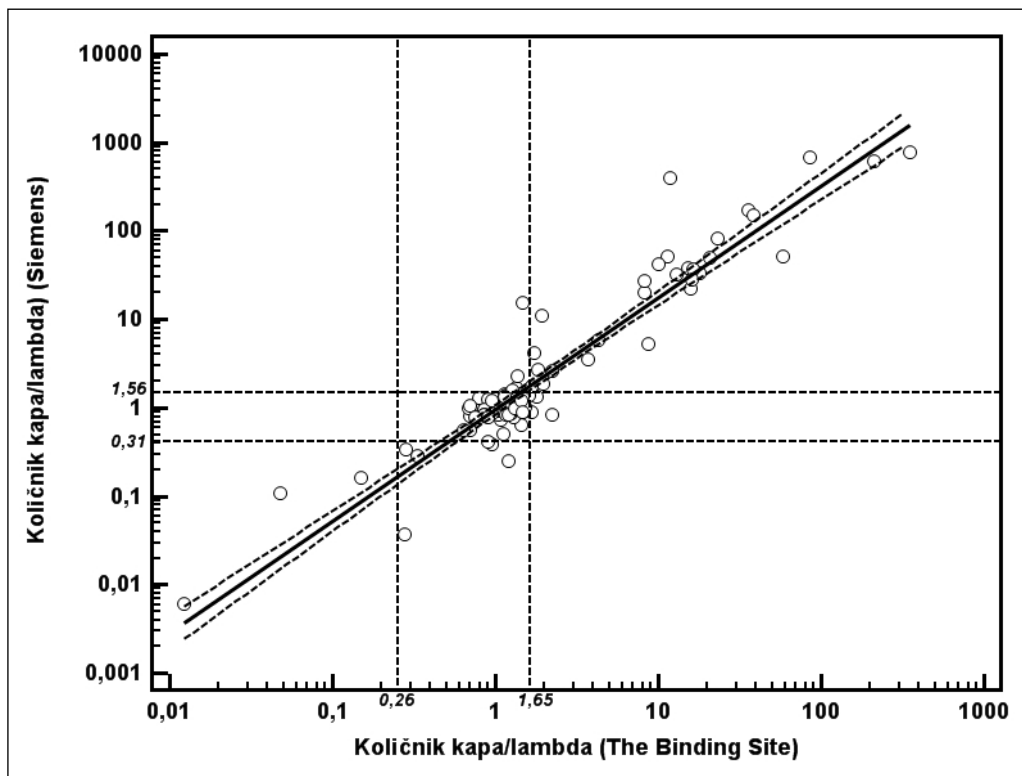
Slika 21: Grafični prikaz regresijske premice Passing Bablok ($y = -2,620 + 1,225x$) za reagente The Binding Site in Siemens za parameter PLV λ v serumu.

(Črtkane črte na grafu pomenijo orientacijske referenčne vrednosti za posamezen reagent.)

Podatek t-testa parov po Wilcoxu: $p < 0,05$ (signifikantna razlika)

Točke na grafu so neenakomerno porazdeljene okrog premice, korelacija ni tako dobra, mediani sta sicer primerljivi, vendar t-test nakazuje na signifikantno razliko. Razlike opazimo v območju orientacijskih referenčnih vrednosti, zaradi česar lahko pride do različnih interpretacij rezultata (količnika) pri obeh metodah.

c) KOLIČNIK KAPA / LAMBDA



Slika 22: Grafični prikaz regresijske premice Passing Bablok ($y = 0,460 + 0,548x$) za reagente The Binding Site in Siemens za količnik kapa / lambda.

(Črtkane črte na grafu pomenijo orientacijske referenčne vrednosti za posamezni reagent.)

Podatek t-testa parov po Wilcoxu: $p = 0,243$ (ni signifikantna razlika).

Točke so zaradi vpliva lambda na izračun količnika neenakomerno porazdeljene, zato tudi korelacija ni zadovoljiva, kar kaže na razliko med obema metodoma. Da bi lahko ugotovili, kaj je vzrok različni korelaciji, smo pogledali še ujemanje medsebojnih rezultatov po koncentracijskih območjih (preglednica XIII).

4.3 PRIMERJAVA REZULTATOV

Preglednica X: Statistična preglednica zbranih rezultatov.

N = 114	κ TBS	κ SIM	λ TBS	λ SIM	κ/λ TBS	κ/λ SIM
Srednja vrednost	173,12	85,82	25,88	25,77	9,52	25,88
Standardna deviacija	770,57	355,63	70,25	48,35	39,01	119,13
Mediana	18,70	15,44	19,95	14,70	1,31	1,10
Minimum	0,30	2,39	0,26	1,64	0,1488	0,1654
Maximum	7960,00	3740,00	725,00	364,00	349,53	788,12
t-test parov po Wilcoxu (p)	0,747		Pod 0,05		0,243	
Spearmanov koeficient korelacije (r)	0,969		0,873		0,792	

Kot opazimo glede na primerjavo srednje vrednosti in mediane, dobljene vrednosti rezultatov za PLV niso normalno porazdeljene, zato rezultate ne moremo obravnavati na podlagi Gaussove porazdelitvene krivulje. Za neparametrično obliko rezultatov smo uporabili zato Spearmanov koeficient korelacije in t-test parov po Wilcoxu. Ujemanje median je zadovoljivo, vendar rezultati t-testa pri λ pa kažejo na neujemanje metode.

Da bi lažje opredelili diagnostično ujemanje metod, smo rezultate medsebojno primerjali z komentarji diagnoz Laboratorija in tako določili odstotek ujemanja.

Preglednica XI: Primerjava števila analiziranih vzorcev PLV kapa glede na referenčno območje proizvajalca TBS.

Metoda SIM \ Metoda TBS	< 6,7 mg/L	6,7 – 22,40 mg/L	> 22,40 mg/L	Skupaj (N)
< 3,30 mg/L	4	1	0	5
3,30 – 19,40 mg/L	3	50	3	56
> 19,40 mg/L	1	5	47	53
Skupaj (N)	8	56	50	114

V preglednici XI se skupno ujema, glede na podane referenčne vrednosti proizvajalcev TBS in SIM, 101 vzorec: štiri od osmih se ujemajo v merilnem območju pod referenčno vrednostjo, 50 od 56 se ujema znotraj referenčnih vrednosti in 47 od 50 se jih ujema nad referenčnimi vrednostmi. Od skupno izmerjenih 114 vzorcev znaša odstotek ujemanja 88,60 %.

Preglednica XII: Primerjava števila analiziranih vzorcev PLV lambda glede na referenčno območje proizvajalca TBS.

Metoda SIM \ Metoda TBS	< 8,3 mg/L	8,3 – 27,00 mg/L	> 27,00 mg/L	Skupaj (N)
< 5,71 mg/L	9	0	0	9
5,71 – 26,30 mg/L	12	68	8	88
> 26,30 mg/L	0	2	15	17
Skupaj (N)	21	70	23	114

V preglednici XII se skupno ujema, glede na podane referenčne vrednosti proizvajalcev TBS in SIM, 92 vzorec: 9 od 21 se jih ujema v merilnem območju pod referenčno vrednostjo, 68 od 70 se ujemajo znotraj referenčnih vrednosti in 15 od 23 se jih ujema nad referenčnimi vrednostmi. Od skupno izmerjenih 114 vzorcev, znaša odstotek ujemanja 80,70 %.

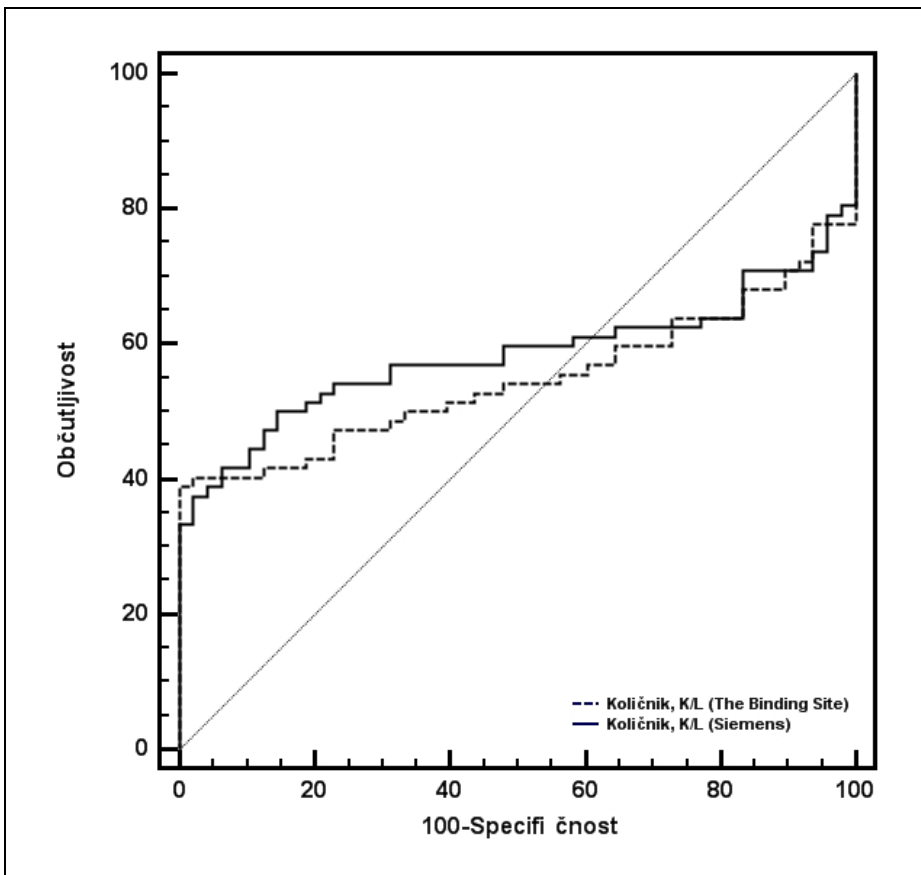
Preglednica XIII: Primerjava izmerjenih količnikov med PLV kapa in lambda glede na referenčno območje proizvajalca TBS.

Metoda SIM \ Metoda TBS	< 0,31	0,31 – 1,56	> 1,56	Skupaj (N)
< 0,26	5	1	0	6
0,26 – 1,65	1	71	6	78
>1,65	0	3	27	30
Skupaj (N)	6	75	33	114

V preglednici XIII se skupno ujema, glede na podane referenčne vrednosti proizvajalcev TBS in SIM, 103 vzorcev: 5 od šestih se jih ujema v merilnem območju pod referenčno vrednostjo, 71 od 75 se jih ujema znotraj referenčnih vrednosti in 27 od 33 se jih ujema nad referenčnimi vrednostmi. Od skupno izmerjenih 114 vzorcev, znaša odstotek ujemanja 90,35 %.

Preglednica XIV: Podroben pregled rezultatov vzorcev, katerih količniki se medsebojno ne ujemajo.

Diagnoza	TBS_K	TBS_L	SIM_K	SIM_L	Q_TBS	Komentar TBS	Q_SIM	Komentar SIM
0	13,60	9,40	16,60	9,84	1,4468	N	1,6870	MZ
0	20,30	15,30	17,00	9,55	1,3268	PO	1,7801	MZ
0	16,20	11,50	15,80	9,78	1,4087	N	1,6155	MZ
0	36,90	21,50	42,10	31,60	1,7163	M	1,3323	PO
1	7,65	9,04	11,40	5,12	0,8462	N	2,2266	MZ
1	9,39	10,30	14,20	8,54	0,9117	N	1,6628	MZ
1	69,90	30,40	73,50	54,10	2,2993	MO	1,3586	PO
1	23,70	30,50	23,40	29,80	0,7770	PO	0,7852	M
1	19,20	18,60	20,10	14,60	1,0323	N	1,3767	M
1	1,93	7,75	8,24	6,92	0,2490	MZ	1,1908	N
1	13,30	13,70	15,00	11,30	0,9708	N	1,3274	MZ
1	15,60	46,00	15,10	53,30	0,3391	PO	0,2833	M
1	10,20	9,25	8,80	4,89	1,1027	N	1,7996	MZ
?	93,20	36,60	45,40	53,80	2,5464	MZ	0,8439	PO
1	446,00	29,10	92,30	62,90	15,3265	MO	1,4674	PO
1	865,00	30,50	319,00	20,00	28,3607	MO	15,9500	Z
1	6,66	8,17	5,18	656,00	0,8152	N	0,0079	MZ



Slika 23: Grafični prikaz primerjave površin pod krivuljama (ROC) med rezultati količnikov κ/λ proizvajalca Siemens in The Binding Site ($AUC_{SIM}=0,583$, $AUC_{TBS}=0,547$). Med površinama ni opaziti statistično signifikantne razlike ($p = 0,292$).

Graf na sliki 23 prikazuje soodvisnost specifičnosti in občutljivosti metod. Zaželjena je tako dobra specifičnost kot tudi dobra občutljivost, v čemer pa se metodi med seboj izključujeta, saj nimamo rezultatov za določanje občutljivosti in specifičnosti, zato lahko določanje PLV služi samo kot dodatek drugim metodam.

Odstotek ujemanja je primerljiv s primerjavami, ki so bile narejene v laboratorijih po Evropi (20, 28). Da bi zagotovili sledljivost in primerljivost rezultatov, bi moralo biti razvidno, s kakšnimi protitelesi so bile PLV izmerjene.

5 ZAKLJUČEK

1. Korelacija in ujemanje PLV κ sta zadovoljivi (0,969; 88,60 %).
2. Korelacija in ujemanje PLV λ nakazuje na njuno slabšo primerljivost (0,873; 80,70 %). Vzorok temu so lahko različen izbor protiteles (monoklonalna, poliklonalna), specifične reakcije polimeriziranih oblik verig λ s protitelesi, različna uporaba omakal v reagentu in pomožnega reagenta.
3. Korelacija količnikov je slabša (0,792), kar je lahko vzrok težavam pri merjenju PLV λ . Ujemanje količnika κ/λ je zadovoljivo (90,35 %) in je primerljivo z izsledki primerjav, ki so bile opravljene v kliničnih laboratorijih po Evropi.
4. Okvare ledvic so pri reagentu TBS klinično ovrednotene, imajo lastne orientacijske referenčne vrednosti, medtem ko reagent SIM nima lastnih orientacijskih referenčnih vrednosti za ledvična obolenja.
5. Ključni del analize PLV je grafični prikaz količnika in pripadajoč komentar. Grafični prikaz in komentarji so bili razviti pod okriljem proizvajalca TBS. Rezultati analize proizvajalca Siemens zaenkrat še ne vsebujejo grafičnega prikaza in pripadajočega komentarja, zato je interpretacija rezultatov osiromašena.

Primerjava obeh reagentov nakazuje na večni problem v proteinski diagnostiki - različni epitopi, različna uporaba protiteles in omakal, posledica tega so različni, tudi neprimerljivi rezultati, različne cut-off in orientacijske referenčne vrednosti.

Za lažjo in popolnejšo sledljivost je priporočljivo uporabljati v laboratorijih klinične kemije le enega izmed reagentov. Morebitna standardizacija in harmonizacija na tem področju v bližnji prihodnosti bi izboljšala primerljivost in s tem sledljivost rezultatov pri pacientih, ne glede na to kje bi bile pacientom izmerjene vrednosti PLV in s katerim reagentom.

Za zapletene primere plazmocitoma in amiloidoze je pri reagentih Siemens še objavljeno premalo strokovne literature za njihovo rutinsko uporabo (na trgu je reagenčni kit dobro leto dni), kar je razvidno tudi iz naših rezultatov primerjave (ujemanje količnika: 90,35 %).

6 LITERATURA

1. Boyer R. *Temelji biokemije*. Ljubljana: Študentska založba, 2005. 70-90, 98-120.
2. Štiblar Martinčič D, Cor A, Cvetko E, Marš T. *Anatomija, histologija, fiziologija*. 1. izdaja. Ljubljana: Medicinska fakulteta, 2007. 143-149.
3. BN°II System. *Addendum to the Instruction Manual*. GmbH: Siemens Healthcare Diagnostics Products, 2008. 17-38.
4. Just Svendsen P, Blirup-Jensen S. *Basic Principles and DAKO's Optimized Test System for Quantitative Protein Determinations on Automated Instrument: Determination of Human Plasma Proteins by Turbidimetry and Nephelometry*. Copenhagen, Denmark: DAKO A/S, 1991. 8-10.
5. Plazar N, Pahor V, Berce K. *Priporočeni postopki za osnovno analizo urina*. Zbirka priporočeni postopki. Ljubljana: Slovensko združenje za klinično kemijo, 2004. 8-9.
6. Krivec Š, Kramberger M, Korman-Frangeš M. *Seminar za tehnike laboratorijske medicine*. Zbornik predavanj. Ljubljana: Slovensko združenje za klinično kemijo, 2001.
7. Kuzma J. Diplomsko delo: *Določanje beljakovin z metodo imunofiksacije na agaroznem delu – primerjava dveh postopkov priprave urinskega vzorca*. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, 2008. 7-21.
8. Bratušek A. *Proteinurije pri imunoproliferativnih boleznih*. Ljubljana: Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo, 2006. 1-10, 13-15.
9. Flisar Ž. *SOP PLL S-Proste kapa in Lambda VI*. Ljubljana: UKC, SOE Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo, Proteinsko lipidni laboratorij, 2010.
10. Bradwell AR. *Serum free light chain analysis*. 6th Edition. UK: The Binding Site Ltd., 2010. 293-251, 301-304.
11. Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Koželj M, Černelč P. *INTERNA medicina*. 4. izdaja. Ljubljana: Slovensko medicinsko društvo, Littera picta, 2011. 1636-1638.
12. i76rv7ifrv5. *Protitelesa*. <http://chrtowsky.wordpress.com/2010/02/04/protitelesa-1-del-zgradba/>
13. Roche. *Zgradba in delovanje ledvic*. http://www.onkologija.si/portal/oncoslov/kidney:_anatomy_and_physiology
14. Mlakar U, Andoljšek D, Fikfak N et al. *Smernice za odkrivanje in zdravljenje diseminiranega plazmocitoma*. Ljubljana: Zdravniški vestnik, 2006. 75: 3-8.
15. Medeno srce. *Imunologija*. <http://www.medenosrce.net/pogled.asp?ID=121>
16. The Binding Site Group Ltd. *Freelite™ Human Kappa Free kit for use on the Dade Behring Nephelometer™ II*. UK: 2009. 1-14.

17. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. Brošura. USA: 2008.
18. The Binding Site Group Ltd. *Freelite™ Human Kappa Free kit for use on the Dade Behring Nephelometer™ II*. UK: 2010. 1-14.
19. Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH. *BN ProSpec N Latex FLC kappa and N Latex FLC lambda*. Germany: 2010. 1-2.
20. Gruyter W. *Clinical comparison of new monoclonal antibody – based nefelometric assays for free light chain kappa and lambda to polyclonal antibody-based assays and immunofixation electrophoresis*. Berlin, Boston: 2011. 1-7.
21. Bradwell AR. *Serum free light chain analysis*. 4th Edition. UK: The Binding Site Ltd., 2006. 1-23, 195-197.
22. Stopar D. Predavanje: *Patogeneza Imunologije*. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, 2005.
23. Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH Global Marketing. Presentation: *N Latex FLC kappa & lambda*. Germany, 2011.
24. Shiel W.C. JR.: <http://www.medicinenet.com/amyloidosis/article.htm>
25. NCCLS. *Method Comparison and Bias Estimation Using Pa tient Samples*. Approved Guideline. Second Edition . NCCLS document EP9-A2.
26. Siemens:
<http://www.medical.siemens.com/webapp/wcs/stores/servlet/ProductDisplay?storeId=10001&langId=-111&catalogId=-111&productId=182048&catTree=1023065,1028115>
27. Freelite: http://www.clpmag.com/issues/articles/2008-09_09.asp
28. Gruyter W. *Clinical comparison of new monoclonal antibody – based nefelometric assays for free light chain kappa and lambda to polyclonal antibody-based assays and immunofixation electrophoresis*. Berlin, Boston: 2012. 1-2.