



FAKULTET FOR NATURVITENSKAP

Institutt for bioingeniørfag

Norges teknisk- naturvitenskapelige universitet
Norwegian University of Science and Technology (NTNU)

Frie lette kjeder i serum hos myelomatose pasienter –
metodesammenlikning av Freelite fra The Bindingsite, N Latex FLC
og ELISA fra Sebia

Free light chain in serum within multiple myeloma patients –
method comparison of Freelite from the Bindingsite, N Latex FLC
and ELISA from Sebia

Av / by

Heirmon Sebahtu Tesfamichael og Eyob Debretsen Tesfamariam

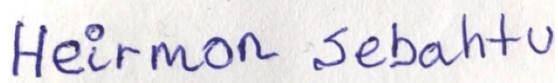
Trondheim, 2020

Forord

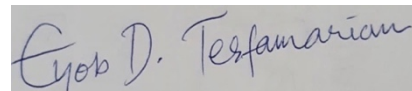
Denne bacheloroppgaven ble skrevet som en avsluttende del av bioingeniørutdanning ved Institutt for bioingeniørfag, NTNU, Trondheim. Oppgaven ble gitt av Avdeling for Medisinsk biokjemi ved St. Olavs Hospital og ble gjennomført i perioden mars til mai 2020. Etter ønske fra laboratoriet ble tre metoder sammenlignet for å finne ut om rutinemetoden ved avdelingen, er god nok eller om den skal erstattes av en ny metode som er tilgjengelig i markedet. Som en konsekvens av Covid19-pandemien ble alt av praktisk laboratoriearbeid utført av avdelingen.

Det rettes en stor takk til fagansvarlig Mari Meslo Lien for praktisk og faglig veiledning, Arne Åsberg for statistikkveiledning i forbindelse med bearbeidelse og framstilling av resultatene og universitetslektor og prosessveileder, Ragnhild Bach for sin tid og veiledning i skriveprosessen.

Trondheim, 17.05.2020



Heirmon Sebahtu Tesfamichael



Eyob Debretsion Tesfamariam

Sammendrag

Målet med denne oppgaven var å gjennomføre en metodesammenlikning mellom tre immunologiske metoder som benyttes for måling av frie, lette immunglobulinkjeder. Riktig kvantitering av frie, lette immunglobulinkjeder er viktig i diagnostisering og oppfølging av myelomatose-pasienter. Blant de immunologiske metodene som benyttes mest i dag er Freelite og N Latex FLC, men en ny ELISA-metode fra Sebia er nå tilgjengelig på markedet. Den sistnevnte hevder å ha løst de analytiske utfordringene med både Freelite og N Latex FLC. I denne oppgaven er det lagt mest vekt på metodesammenlikning mellom N Latex FLC-metoden (rutinemetoden) og ELISA-metoden (ny metode). Freelite-metoden var også med i undersøkelsen etter ønske fra laboratoriet, selv om den er skiftet ut.

For metodesammenlikningen ble det samlet pasientprøver med myelomatose. Halvparten av pasientprøvene ble analysert for frie, lette kappa immunglobulinkjeder, og resten for frie, lette lambda immunglobulinkjeder. Disse prøvene ble analysert med Freelite, N Latex FLC og ELISA, og de pasientprøvene som overskred 1 g/L med disse metodene, ble videre analysert med kapillærelektroforese for å undersøke om resultatene var riktig eller om de ble overestimert. For å gjøre metodesammenlikningen, ble det utført differanseplott i form av Bland-Altman plot og regresjonsanalyser i form av Passing and Bablok. I tillegg til dette ble det også utført beregning av upresisjon i form av repeterbarhet på ELISA-metoden.

Resultatene fra metodesammenlikningene viste en lineær sammenheng mellom metodene. Metodesammenlikningen mellom ELISA og Freelite viste en proporsjonal forskjell uten systematisk forskjell ved måling av frie, lette kappa immunglobulinkjeder, og både systematisk- og proporsjonal forskjell ved måling av lambda-kjeder. Mellom N Latex FLC-metoden og ELISA-metoden var det både proporsjonal- og systematisk forskjell ved måling av både kappa- og lambda-kjeder. Metodesammenlikningen mellom N Latex FLC-metode og Freelite-metode viste bare en proporsjonal forskjell ved måling av kappa-kjeder, og ingen proporsjonal- eller systematisk forskjell ved måling av lambda-kjeder. Repeterbarhetens resultater for ELISA-metoden var innenfor presisjonskravet fra produsenten.

Det konkluderes med at resultatene oppnådd i denne undersøkelsen, tyder på at den nye ELISA-metoden fra Sebia kan med fordel erstatte dagens rutinemetode, N Latex FLC. Samtidig er en utvidet undersøkelse av metodesammenlikning nødvendig for metodeverifisering.

Abstract

The objective of this bachelor thesis was to carry out a method comparison between three immunological methods which are used for measuring free light immunoglobulin chains. Correct quantitation of free light immunoglobulin chains is important in diagnosing and follow-up of myeloma patients. Among the immunological methods which are widely used today are Freelite assay and N Latex FLC assay, but a new ELISA assay from Sebia is now available in the market. The latter claims to have solved the analytical limitations in Freelite and N Latex FLC. In this research, a great emphasis has been put on method comparison between the N Latex FLC (routine method) and the ELISA method (new method). The Freelite method was also included in this research, due to a request from the laboratory, even though it has been replaced.

In this method comparison, samples from myeloma patients were used. Half of those samples were analyzed for free light kappa immunoglobulin chains and the rest for free light lambda immunoglobulin chains. The samples were analyzed using Freelite, N Latex FLC and ELISA assay, and the patient samples whose concentration surpassed 1 g/L, were analyzed further using capillary electrophoresis to investigate if the results were correct or overestimated. To do the method comparison, a difference plot (Bland-Altman plot) and Passing and Bablok regression analysis were performed. In addition, imprecision tests for the ELISA assay were assessed by calculating repeatability.

The results from the method comparisons showed a linear relationship between all the methods. The method comparison between ELISA and Freelite showed a proportional difference without a systematic difference when measuring free light kappa chains, and both systematic and proportional differences when measuring lambda chains. Between N Latex FLC assay and ELISA assay, both proportional and systematic differences were shown when measuring both free light immunoglobulin chains. Method comparison between N Latex FLC assay and Freelite assay showed only a proportional difference when measuring free light kappa chains, and no proportional or systematic difference when measuring free light lambda chains. The repeatability results for ELISA assay were within the precision requirement from the producent, Sebia.

It is concluded that the results achieved in this research indicate that the new ELISA assay from Sebia can advantageously replace the existing routine method, N Latex FLC. At the same time, an extended method comparison study is needed for method verification.

Innholdsfortegnelse

FORORD.....	I
SAMMENDRAG.....	II
ABSTRACT.....	III
1.0 INNLEDNING.....	1
1.1 IMMUNOLOGI.....	2
1.1.1 Antistoffer.....	2
1.1.2 Myelomatose.....	4
1.2 KLINISK NYTTE AV KAPPA- OG LAMBDA-KJEDER.....	6
1.3 METODER FOR ANALYSERING AV FRIE, LETTE IMMUNGLOBULINKJEDER.....	7
1.3.1 Nefelometri og turbidimetri.....	8
1.3.2 ELISA.....	9
1.3.3 Elektroforese.....	10
1.4 METODESAMMENLIKNING.....	11
1.4.1 Presisjon.....	12
1.4.2 Riktighet.....	12
1.5 PROBLEMSTILLING.....	15
2.0 MATERIALE OG METODE.....	16
2.1 PRØVEMATERIALE.....	16
2.2 UTSTYR OG REAGENSER.....	16
2.2.1 Atellica NEPH 630-system/BN-systemer.....	17
2.2.2 Freelite fra The Binding site.....	19
2.2.3 Capillaries2.....	20
2.2.4 ELISA-metoden fra Sebia.....	22
2.2.5 Kalibrator, kontroller og reagenser.....	23
2.3 SPORBARHET.....	26
2.3.1 Freelite-metoden.....	26
2.3.2 N Latex metoden.....	26
2.3.3 ELISA-metoden.....	26
2.4 METODE.....	27
2.4.1 Metodesammenlikning.....	27

3.0 RESULTATER	28
3.1 IMPRESISJON (REPETERBARHET) TIL ELISA-METODEN.....	30
3.2 METODESAMMENLIKNING.....	31
3.2.1 Sammenlikning mellom ELISA-metoden og Freelite-metoden	31
3.2.2 Sammenlikning mellom ELISA-metoden og N Latex FLC-metoden.....	36
3.2.3 Sammenlikning mellom N Latex-metoden og Freelite metoden.....	42
4.0 DISKUSJON	47
5.0 KONKLUSJON	53
6.0 LITTERATURLISTE	54
FIGURKILDER:.....	55
7.0 VEDLEGG	57
VEDLEGG 1: OPPGAVEN GITT AV AMB	57
VEDLEGG 2: PROSEDYRE FOR TILLAGING AV M-KOMPONENT KONTROLL.....	58
VEDLEGG 3: PROSEDYRE FOR TILLAGING AV FLC SERUMPOOL.....	59
VEDLEGG 4: OVERSIKT OVER IMPRESISJONSKRAVET FOR ELISA-METODEN FRA SEBIA	60
VEDLEGG 5: ALLE ANALYSERESULTATER AV FRIE, LETTE KJEDEN, KAPPA.....	61
VEDLEGG 6: ALLE ANALYSERESULTATER AV FRIE, LETTE KJEDEN, LAMBDA.....	62
VEDLEGG 7: UTREGNING AV STANDARDAVVIK OG %CV AV KAPPA-KJEDER, ANALYSERT MED ELISA	63
VEDLEGG 8: UTREGNING AV STANDARDAVVIK OG %CV AV LAMBDA-KJEDER, ANALYSERT MED ELISA.....	64
VEDLEGG 9: PRØVERESULTATER AV KAPPA-KJEDER MED KAPILLÆRELEKTROFORESE	65
VEDLEGG 10: PRØVERESULTATER AV LAMBDA-KJEDER MED KAPILLÆRELEKTROFORESE	68

1.0 Innledning

Denne oppgaven er gitt av Avdeling for Medisinsk biokjemi ved St. Olavs Hospital. Oppgaven er gitt med bakgrunn i at Avd. for Medisinsk biokjemi ønsker å undersøke konsentrasjon av frie, lette immunglobulinkjeder i serumprøver fra pasienter med unormal høy konsentrasjon av disse lette kjedene. Til dette vil det benyttes 3 ulike immunologiske målemetoder. I 2012 ble Freelite-metoden fra The Binding Site byttet ut av laboratoriet med N Latex FLC, hvor det ble forventet at den nye rutinemetoden skulle løse de problemene som Freelite-metoden hadde. Utfordringen med Freelite-metoden var at den ga falskt forhøyet resultater hos enkelte pasienter som har myelomatose. Senere ble det også oppdaget at N Latex FLC hadde samme problemet, men i noe mindre grad. En ny ELISA-basert metode fra Sebia har nylig kommet ut på markedet, hvor Sebia hevder å ha løst utfordringene med Freelite-metoden og N Latex FLC (1). I tillegg til de nevnte metodene skal prøvene også undersøkes med kapillærelektroforese for å avdekke eventuelle falskt forhøyede verdier på Freelite-metoden og N Latex FLC. Hos mange av pasientprøvene er det ikke påvisbare mengder av frie, lette kjeder ved kapillærelektroforese. Hvis da Freelite-metoden eller/og N Latex FLC viser betydelige konsentrasjoner (over 1g/L), tyder det på at Freelite-metoden eller/og N Latex FLC tar feil.

Riktighet av analyseresultatene har stor betydning for både diagnostikk og kontroll av behandling. Derfor har laboratoriet samlet prøver fra myelomatose-pasienter med unormalt høy konsentrasjon av frie, lette kjeder, for å undersøke riktigheten av de ulike metodene, spesielt ELISA-metoden fra Sebia og N Latex FLC (rutinemetoden). Freelite-metoden fra The Binding Site er skiftet ut, men er tatt med i studiet allikevel for å sammenligne riktigheten med den nye ELISA-metoden.

Det er et ønske fra avdelingen å undersøke riktigheten av disse metodene, og samtidig vise om rutinemetoden ved laboratoriet er god nok, eller om den eventuelt skal erstattes av den nye ELISA-metoden.

1.1 Immunologi

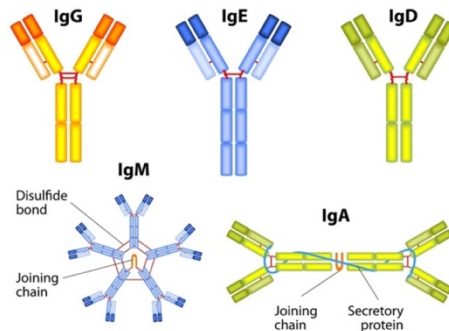
Immunologi er læren om den biologiske mekanismen som utgjør de cellulære, molekulære og funksjonelle egenskapene av immunsystemet. Hensikten med immunsystemet er å beskytte mot fremmede substanser/elementer, for eksempel som bakterier, virus, støvpartikler og sopp som kan forårsake infeksjoner, allergier eller andre sykdommer. Dette skjer ved at immunsystemet produserer cellulære og molekulære komponenter som kan bekjempe skadelige mikrober eller andre skadelige substanser, ofte ved at disse komponentene binder seg direkte til disse. Binding av disse komponentene vil ofte føre til at mikrobene eller substansene blir drept eller uskadeliggjort. Slike komponenter omfatter blant annet antistoffer. (2)

1.1.1 Antistoffer

Antistoffer (Ab), også omtalt som immunglobuliner (Ig), er glykoproteinstrukturer som produseres og utskilles av B-lymfocytter (B-celler) og plasmaceller. B-celler er hvite blodceller av type lymfocytter, og modne B-celler kan utvikle seg til plasmaceller. Immunglobuliner forekommer både i løselige form og bundet til membranen på B-cellene (B-cellerreseptorer, BCR). De løselige ubundne immunglobulinene finnes i blodet og slimhinneoverflater i luftveier, mage-tarm og urogenitalia. Den primære funksjonen til immunglobuliner er å binde seg til fremmede substanser. Fellesbetegnelsen for alle disse fremmede substansene er antigen (Ag). (2) Som immunglobuliner, kan antigener forekomme fritt i kroppsvæsker (såkalt løselige antigener) og bundet til overflaten av en celle eller et vev. Antigener består av proteiner, karbohydrater, lipider og andre molekyler. Delen av antigenstrukturen som immunglobulinene binder seg til kalles en epitop, mens delen av immunglobulinstrukturen som binder en epitop kalles en paratop. (3) Når immunglobuliner binder seg til antigener, dannes det antigen-antistoff komplekser. Slike komplekser omtales også som immunkomplekser. Dannelse av immunkomplekser induserer immunsystemet som da responderer ved å drepe eller nøytralisere antigenet. (4)

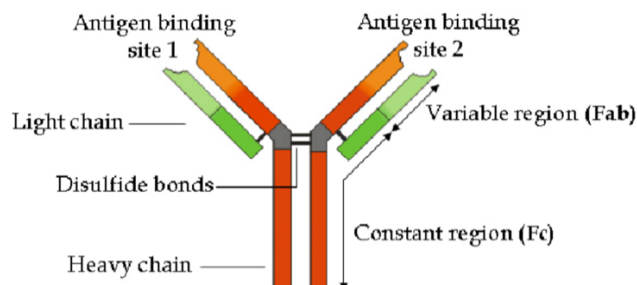
Immunglobuliner er bygd opp av fire polypeptidkjeder: to lette kjeder (Light chain (L)) og tunge kjeder (Heavy chain (H)). Disse kjedene som også kan omtales som korte kjeder og tunge kjeder, er parvis identiske. Til sammen har de to lette – og to tunge kjedene en molekylær-masse på 150-200 kDa (kiloDalton). De to lette kjedene kan enten være av type κ (kappa) eller λ (lambda), mens de to tunge kjedene kan enten være av type α (alfa), δ (delta), ϵ

(epsilon), μ (my) eller γ (gamma). Det er disse ulike typer tunge kjedene som bestemmer immunglobulinenes egenskaper og hvilken klasse de tilhører. Dermed finnes det fem ulike klasser av immunglobuliner; IgA, IgD, IgE, IgM og IgG. (3)



Figur 1: Skjematisk framstilling av de fem ulike klassene av immunglobuliner. (1)

For å danne et fullstendig Ig-molekyl, bindes de to tunge kjedene sammen med en disulfidbinding. Hver tung kjede har en lett kjede bundet ytterst til den med en annen disulfidbinding (se figur 2). Binding av de to tunge – og to lette kjedene gir Ig-molekylet en Y-form. (3) Halen på Ig-molekylet omtales som Fc-delen (fragment crystallizable) da dette kan krystalliseres, mens de to armene omtales som Fab-delen (fragment antigen binding). Fab-delen er paratopen av immunglobulinet og fungerer som epitopens bindingssete. Fc-delen, derimot, har ingen oppgaver knyttet til gjenkjennelse av antigener. Den har som funksjon å binde seg til Fc-reseptorer som er uttrykt på overflaten av andre viktige celler, eksempelvis monocytter, makrofager og NK-celler (Natural Killing cells). Dessuten deltar Fc-delen også i regulering av immunglobulinenes evne til å aktivere komplementsystemet, et kaskadesystem i det medfødte infeksjonsforsvaret. (5)



Figur 2: En skjematisk framstilling av immunglobulinmolekylets oppbygning. (2)

1.1.2 Myelomatose

Myelomatose (MM) er en av de mest hyppigste og maligne blodkreftsykdommer som vanligvis rammer personer rundt 70 år. Risikoen øker ofte med alder, og studier har tidligere vist at det er litt flere menn enn kvinner som rammes av myelomatose. I Norge er det ca. 450 personer som får diagnosen hvert år (6).

Det som karakteriserer myelomatose er abnormal proliferasjon av plasmaceller, og i flesteparten av pasientene er det produksjon av monoklonale immunoglobuliner, tunge kjeder (M-protein) og lette kjeder. Utviklingen av myelomatose foregår som oftest i benmargen i ryggraden, bekkenet, i skallen, brystkassen samt i skuldre og hofter. Sykdommen kan opptre som et område med beintap og/eller som en svulst, og i begge tilfeller kalles det en lesjon. Det foreligger ikke kjente årsaker til myelomatose, og prosessen om hvordan en plasmacelle omformes til en myelomcelle er ikke helt avklart. Omdanningen fra plasmacelle til en myelomcelle foregår ved at det skjer mange genetiske forandringer. De genetiske forandringene skyldes enten kromosomale (translokasjoner og delesjoner) eller enkelte mutasjoner i enkeltgener. Translokasjoner er omstokking av kromosomer ved at et stykke av et kromosom heftes til et annet og blir med dette i den videre celledelingen, og delesjon er kromosommutasjon der bruddstykker på minst ett basepar mistes fra kromosomet og mindre eller større del av DNA-sekvensen kan gå tapt under replikasjonen av DNA (7,8).

Translokasjoner kan oppstå på genområdet som koder for den tunge kjeden av immunoglobulinmolekylet, mens mutasjoner er ofte i gener som koder for proteiner som er essensielle for celledvekst, celledifferensiering og celledød. (9) Faktorer som kan fremkalle mutasjoner i plasmacellene er eksponering av giftige kjemikalier, atomstråling, virale infeksjoner som fremkaller kreft og andre faktorer som virker undertrykkende og forstyrrende på immunforsvaret. Blant de giftige kjemikaliene er benzen, dioksiner, noen landbrukskjemikalier, løsemidler, drivstoff, motoreksos og rengjøringsmidler. Flere virus, inkludert HIV (AIDS-viruset), hepatitt, og herpesvirus kan også være kreftfremkallende som trigger myelomatose. Myelomatose er ikke en arvelig sykdom, men i enkelte tilfeller kan det forekomme hos flere personer som er beslektet, noe som viser at noen familier er mer disponert enn andre. (10)

Det er ulike stadier av myelomatose før det utvikler seg til å bli malignt. Det første stadiet, såkalt MGUS (monoklonal gammopati av usikker betydning), er benignt og det er assosiert med inflammasjoner og infeksjoner. Mange pasienter med MGUS dør vanligvis av andre sykdommer, men MGUS kan likevel utvikle seg til malignt monoklonal gammopati hvis pasienten ikke følges av helsevesenet. Stadiet mellom MGUS og aktiv myelomatose, kalles SMM (Smoldering Multiple Myeloma eller ulmende myelomatose på norsk). I dette stadiet vil nivå av monoklonalt protein og innholdet av plasmaceller i beinmargen øke, og bli høyere enn MGUS men lavere enn aktiv myelomatose. Risikoen for å utvikle aktiv myelomatose er dermed mye høyere for pasienter med SMM, og hvis dette går uoppdaget over lenger tid, vil pasientene oppleve symptomer som viser malignitet. (10)

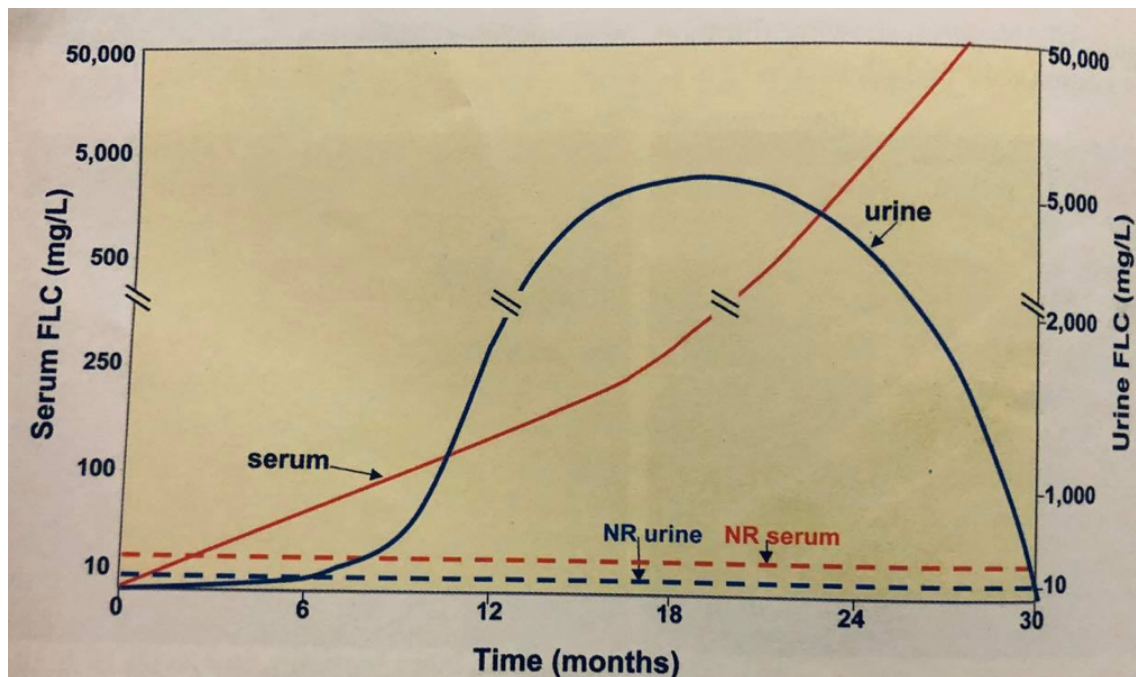
Diagnostisering av myelomatose er basert på opphopning av monoklonale plasmaceller i beinmargen, monoklonale proteiner i serum og/eller urin og andre underliggende funn som hyperkalsemi, nedsatt nyrefunksjon, anemi og benlesjoner. Ved normale tilstander utgjør plasmaceller 1% av hele beinmargen, mens ved aktiv myelomatose er innholdet av plasmaceller større enn 30% og i noen tilfeller kan plasmacellene utgjøre mer enn 90% av beinmargen. De abnormale plasmacellene vil fortrenge og inhibere produksjon av normale blodceller og antistoffer i beinmargen. Reduksjon i antall hvite blodceller kan forårsake infeksjoner, mens lite antall røde blodceller kan føre til anemi. (11)

Det er ulike typer av myelomatose hvor pasientene grupperes etter hva slags immunoglobulin de produserer. Over halvparten av pasientene produserer IgG med enten kappa eller lambda lette immunoglobulinkjeder og dette kalles IgG-myelomatose. Andre pasienter har IgA-myelomatose med enten lette kappa eller lambda kjeder. IgD-, IgE- og IgM-myelomatose er svært sjeldne. Hos noen pasienter produserer myelomcellene bare lette kjeder og ingen tungkjeder, og denne type myelomatose kalles lettkjede-myelomatose eller Bence Jones myelomatose. (12)

1.2 Klinisk nytte av kappa- og lambda-kjeder

Kvantitering av frie, lette immunglobulinkjeder i serum er svært viktig i klinikken, både til diagnostikk og kontroll av myelomatose-pasienter. Resultatene fra kappa-kjeder, lambda-kjeder og kappa/lambda-ratio benyttes til å vurdere prognosen hos pasienter som nylig har fått påvist myelomatose og til kontroll av pasienter med lettkjede-myelomatose. Alle pasienter med lettkjede-myelomatose har økt konsentrasjon av enten kappa- eller lambda-kjeder i serum, og unormalt kappa/lambda-ratio. Normalt blir frie, lette immunglobulinkjeder utskilt og metabolisert av nyrene, avhengig av størrelsen. Kappa-kjeder skilles ut i løpet av 2-4 timer, mens lambda immunglobulinkjeder blir skilt ut i løpet av 3-6 timer. Hos friske personer blir 1-10 mg frie, lette immunglobulinkjeder utskilt gjennom urinen per dag. Pasienter med lettkjede-myelomatose skiller ut høyere konsentrasjoner med frie, lette kjeder. Når syntese av frie, lette immunglobulinkjeder når 10-30 g/dag (30 ganger større enn normal), vil det være proteinuri og store mengder frie, lette kjeder skilles ut gjennom urinen. Overproduksjon av frie, lette immunglobulinkjeder vil etterhvert forstyrre absorpsjonsmekanismene til proksimale tubuli, og forårsake inflammasjoner ved å entre distale tubuli. Resultatet kan bli blokkering av urin hvor nefronene ødelegges. Ettersom urinproduksjon avtar gradvis, vil konsentrasjonen av frie, lette immunglobulinkjeder i serum øke (se figur 3). (11)

Denne økningen i serum indikerer at sykdomsbildet blir verre, mens hvis konsentrasjon av frie, lette kjeder i urin synker, vil dette gi et falskt bilde på om sykdomsbildet er stabilt eller bedre. Derfor foretrekkes serum framfor urin for måling av frie, lette kjeder, men urin kan også benyttes i noen spesielle tilfeller. I dag er det utviklet mange målemetoder for frie, lette kjeder, og det har gjort det enklere å følge opp myelomatose-pasientene og stabilisere sykdomsbildet. (11)



Figur 3: Konsentrasjonsendring av frie, lette kjeder i urin og serum og sammenheng mellom dem over en tidsperiode. Konsentrasjonen av frie, lette kjeder i serum øker kontinuerlig, mens urin når det en topp og synker ned etterhvert. (3)

1.3 Metoder for analysing av frie, lette immunglobulinkjeder

Til måling av monoklonale frie, lette immunglobulinkjeder blir ulike metoder benyttet, avhengig av hvilke kriterier som er viktigst for laboratoriene. Blant de metodene som brukes i dag, er immunfiksering ved gel-elektroforese, automatisert kapillærelektroforese og immunoassay. Hver av de nevnte metodene har sine fordeler, men samtidig har de også noen utfordringer med hensyn på sensitivitet, begrenset målområde, altfor høy deteksjonsgrense og ikke kvantitativ-analyser. Immunfiksering ved gel-elektroforese er en veletablert metode med god sensitivitet for både serum og urin, men ulempen er at den ikke er en kvantitativ-analyse og er uegnet for måling av monoklonale frie, lette kjeder i serum innen referanseområdet (3-25 mg/L). Automatisert kapillærelektroforese er en kvantitativ metode som er mindre sensitiv enn immunfiksering ved gel-elektroforese. Deteksjonsgrensen for kapillærelektroforese er omtrent 400 mg/L, mens for immunfiksering ved gel-elektroforese er det 150 mg/L. Kapillærelektroforese er heller ikke egnet for måling av monoklonale frie, lette kjeder innenfor referanseområdet og opptil 400 mg/L. (11)

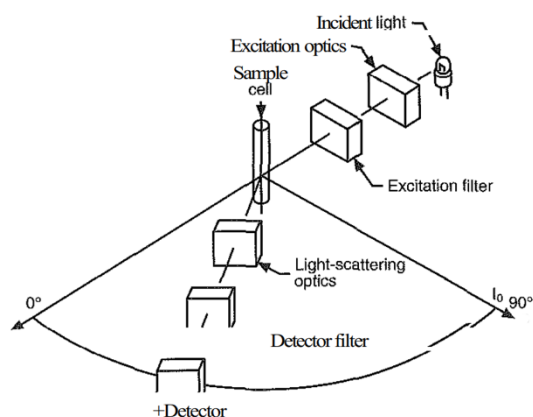
De mest brukte metodene i dagens laboratorier er automatiserte immunoassay som måler total konsentrasjon av kappa- og lambda immunglobulinkjeder i serum og kappa/lambda-ratio. Sensitiviteten er god og dekker et bredt måleområde, inkludert referanseområdet, noe immunfiksering ved gel-elektroforese og kapillærelektroforese ikke klarer. Det er allikevel noen utfordringer med immunoassay som oppstår hos enkelte pasienter ved at metodene gir falskt forhøyet verdier. Årsaken er muligens at de lette kjedene polymeriserer og lager mer turbiditet enn konsentrasjon skulle tilsi. For å løse denne utfordringen, kommer det stadig nye metoder som baserer seg på andre analyseprinsipper. De nye metodene må oppfylle noen viktige kriterier før de kan tas i bruk i diagnostisk lab. Metoden må være sensitiv og kunne dekke hele målområdet for pasienter som produserer monoklonale frie, lette immunglobulinkjeder., lette kjeder. Kvantitativ-måling av frie, lette kjeder og kappa/lambda-ratio er viktig for overvåking av pasienter. Det er også viktig at metoden har høy spesifisitet med lite interferens av andre intakte immunglobuliner. En ny ELISA-metode fra Sebia hevder å ha løst utfordringene med de andre immunoassay og oppfylle kriteriene. (11)

1.3.1 Nefelometri og turbidimetri

Andre analytiske teknikker som benyttes ved måling av frie, lette immunglobulinkjeder, lette immunoglobulinkjeder er nefelometri og turbidimetri. Både de nefelometriske - og turbidimetriske metodene måler lysspredning. Freelite-assay fra Binding Site og N Latex FLC baserer seg på disse analyseprinsippene for måling av monoklonale frie, lette immunglobulinkjeder.

Nefelometri defineres som deteksjon av lys spredt eller reflektert mot en detektor som ikke er i direkte retning av det transmitterte lyset, mens turbidimetri defineres som måling av turbiditet eller blakking forårsaket av for eksempel immunkompleks-dannelse. (13)

Konsentrasjon og partikkelstørrelse minker lysintensiteten når lyset trenger gjennom en løsning med partikler og konsentrasjonsmålingen av partiklene i løsningen gjøres ved en spektrofotometer. I nefelometri spres lyset av partiklene og måles i en vinkel mot det innkommende lyset på kuvetten, det vil si ved 30° eller 90° vinkel (se figur 4). (14) Ved 30° vinkel utnyttes lysspredningsintensitet forårsaket av lys spredt fra større partikler, eksempelvis immunkomplekser. (13)



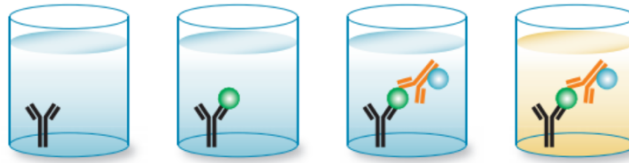
Figur 4: En skjematisk framstilling av lysspredning. Ved 0° måles turbidimetrisk lysspredning, mens ved vinkel 30° og 90° skjer måling av nefelometrisk lysspredning. (4)

Det er visse utfordringer de nefelometriske – og turbidimetriske metodene møter ved måling av lysspredning ved immunanalyser; antigenoverskudd (Antigen excess) og polymerisering. Antigenoverskudd får immunanalyser til å underestimere svært høye konsentrasjoner av proteiner. En del instrumenter gir beskjed og vil forslå fortynning dersom de oppdager antigenoverskudd. Ved polymerisering fungerer frie, lette immunglobulinkjeder som flere antigenmål som akselererer dannelsen av aggregater og fører til overestimering av antigenkonsentrasjon, det vil si gi falskt forhøyede konsentrasjoner. (11)

1.3.2 ELISA

ELISA-metoden (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) er en annen viktig immunologisk metode som benyttes for deteksjon og konsentrasjonsmåling av frie, lette immunglobulinkjeder.

ELISA-metoden er en heterogen metode, det vil si at immunkompleksdannelsen mellom antistoffer (Ab) og antigener (Ag) skjer når en av reaksjonskomponentene, Ab, er bundet uspesifikt til en stasjonær fase, for eksempel i brønner på mikrotiterplater. Reaksjonen skjer i to trinn der Ag bindes til Ab, deretter må alt ubundet Ag vaskes vekk. Etter vasking, tilsettes et enzymmerket konjugat. Et enzymmerket konjugat er et annet antistoff som er bundet til en markør. Det enzymmerkete konjugatet binder seg til immunkomplekset og gir en fargeendring i brønnene på mikrotiterplaten (se figur 5). (13) Fargeendringens absorbans måles deretter fotometrisk ved en bestemt bølgelengde. (15)



Figur 5: En skisse som viser de ulike trinnene som foregår i ELISA-metoden. En Ab bundet til den stasjonære fasen binder Ag (grønn kule) i prøven. Tilsetning av det enzymerket konjugatet (oransj Ab) gir en fargeendring som måles fotometrisk.

(5)

1.3.3 Elektroforese

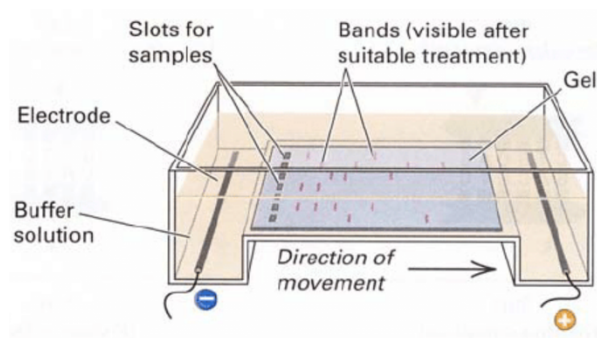
Elektroforese er en av metodene som benyttes for kvantitativ måling og deteksjon av frie, lette κ og λ immunglobulinkjeder.

Elektroforese er en separasjonsprosess hvor ladede komponenter/partikler i en løsning påvirkes av et elektrisk felt. Generelt i et elektroforetisk system, vandrer ladede analytter eller partikler i et væske-medium mot en katode (negativ elektrode) eller en anode (positiv elektrode) basert på den type ladningen de har. Positive ioner/partikler vandrer mot katoden og negative ioner/partikler vandrer mot anoden. Amfolytter, som opptrer som både positive eller negative partikler, får en positiv ladning i en sur løsning og vandrer mot katoden. Dersom løsningen er alkalisk, får amfolytten en negativ ladning og vandrer mot anoden. Proteiner er også amfolytter. De inneholder ioniserbare aminogrupeer ($-NH_2$) og karboksylgrupper ($-COOH$). Immunglobuliner består av proteiner, og vil oppføre seg som amfolytter i en løsning. De vil derfor vandre under påvirkning av et elektrisk felt ved elektroforese.

Et elektroforesesystem består av to elektroder (en katode og en anode), et støttemedium og en bufferløsning. Bufferløsning har mange funksjoner i elektroforesen. Funksjonene omfatter blant annet ledning av strøm, opprettholdelse av pH og bestemmelse av partiklens totallading. Støttemediet er hvor prøvene appliseres og separasjonen av de løste, ladede partikler finner sted. Det kan være en agarosegel eller polyakrylamid. Agarosegelen brukes ved agarosegel-elektroforese og er egnet for proteiner og DNA fragmenter med en lengde mellom 0,5 til 20 kbp. Polyakrylamid, en polymer som framstilles ved å varme opp akrylamid, er egnet for DNA fragmenter (< 1 kbp) og denaturerte proteiner. Ved gel-

elektroforese skjer visualiseringen av prøvematerialets komponenter ved at gelen fikseres, farges og så avfarges. Disse tre trinnene er essensielle for å hindre diffusjon av prøvematerialets komponenter, for farging av komponenter i prøvematerialet og fjerning av fargeoverskudd. Etter de tre trinnene er fullført, kvantifiseres prøvematerialets komponenter, for eksempel proteiner, som prosentdel av ved hjelp av direkte densitometri. Elektrodene er laget av enten platina eller karbon og er koblet til en strømkilde. De løste ladede partiklene i prøvematerialet skal separeres og vandre mot henholdsvis katoden eller anoden, avhengig av deres ladning. Dessuten produserer strømkilden varme. Elektroforesekarer er derfor dekket for å minimalisere fordampning av bufferen og for å beskytte hele systemet.

Vandringshastigheten er avhengig av visse faktorer. Slike faktorer inkluderer blant annet temperatur, elektrisk feltstyrken og partiklene (størrelse, ladning og form). (13)



Figur 6: En skisse som viser et gel-elektroforese-oppsett. Oppsettet består av en bufferløsning, en gel og to elektroder, en katode og en anode. (6)

1.4 Metodesammenlikning

Metodesammenlikning er en vanlig prosedyre som gjennomføres på medisinske laboratorier. Ved sammenlikning av to ulike analysemetoder vil man finne ut om de gir systematisk forskjellig resultat. Dette kan være aktuelt i mange ulike situasjoner hvor man sammenligner to metoder for å finne ut om den ene metoden kan erstatte den andre. Ofte er laboratorier interessert i å vite om den rutinemethoden de har, er like god eller bedre enn en ny metode som har kommet ut i markedet. Da tas det et utvalg med pasientprøver og analyseres med begge metodene. Ideelt skal differansen mellom de to metoderesultatene være lik null. Deretter brukes differansene til å finne ut om måle metodene gir systematisk forskjellig resultat. For å vurdere metodene mot hverandre, må resultatene framstilles statistisk. (16)

1.4.1 Presisjon

Presisjon er et kvalitativt begrep som viser graden av overensstemmelse mellom uavhengige måleresultater oppnådd med en måleprosedyre. Kvantitativt måles *impresisjonen* som et uttrykk for tilfeldige feil, og dette uttrykkes som standardavvik (SD) og/eller variasjonskoeffisient (CV). En analyses impresisjon kan undersøkes på flere måter, men de vanligste og viktigste er repeterbarhet (intra-assay) og reproduserbarhet (inter-assay). (17)

Repeterbarhet (intra-assay)

Repeterbarhet til en analyse er grad av overensstemmelse mellom resultatene av påfølgende målinger av samme prøve. Målingene skal være utført under samme målebetingelser for å kunne bestemme repeterbarheten til analysen. Det vil si samme operatør, måleinstrument og bruksbetingelser. Ved vurdering av repeterbarhet beregnes det variasjonskoeffisient. Man kan også bruke resultater fra analyser utført in duplo med samme metode, til å beregne variasjonskoeffisient for analysen. Da gjør man parvise målinger og ser på differansene i hvert tallpar. Beregning av variasjonskoeffisient in duplo kan utføres ved hjelp av formel 1.1 hvor %CV er variasjonskoeffisient i prosent, d er differansen i hvert tallpar, m er middelverdien av tallpar og n er antall tallpar. Denne formelen brukes når det er forventet at variasjonskoeffisient skal være konstant i hele konsentrasjonsintervallet.

$$\text{Formel 1.1} \quad \%CV = \left(\sqrt{\frac{\sum \left(\frac{d}{m}\right)^2}{2n}} \right) * 100\% \quad (18)$$

%CV (variasjonskoeffisient) viser hvor mye måleverdiene avviker fra middelverdien. Laboratorier/produsentene av metodene har sine egne krav for %CV, og hvis beregnede %CV er innenfor det oppgitte presisjonskravet, kan det sies at analysens repeterbarhet er god. (17)

1.4.2 Riktighet

Riktighet er overensstemmelse mellom gjennomsnittsverdien oppnådd fra en stor serie måleresultater og en sann verdi. Det uttrykkes kvantitativt av *bias* og *systematiske feil* (19). Riktighet kan undersøkes på ulike måter, og en av måtene er sammenligning av oppnådde resultater med resultater av en referansemetode. Ved metodesammenlikning er det viktig å benytte pasientprøver som spenner seg over et relevant måleområde, og samtidig bruke statistiske metoder som er egnet til formålet. (17)

Sporbarhet

Etablering av sporbarhet er nødvendig for å sikre at laboratoriet måler en analytt/flere analytter riktig. Hensikten med sporbarhet er at målingene med rutinemetoden refererer seg til et standardmateriale eller en målemetode så langt oppe i sporbarhetskjeden som mulig. En sporbarhetskjede refererer tilbake til SI-enheten for analytten, men dette er vanskelig i praksis. Derfor er det vanlig å bare lage sporbarhet til et primært referansemateriale eller en primær referansemetode. Et referansemateriale har gode egenskaper som brukes til å kalibrere måleinstrumenter, vurdere målemetoder eller fastlegge verdier på andre materialer. En kalibrator benyttes til å lage en standardkurve/kalibratorkurvekalibreringskurve for en metode ved bruk av standarder på ulike nivåer i måleområdet. Disse bruksstandardene for kalibreringen må kunne spores tilbake og tilfredsstillende kravene til et referansemateriale. Kalibreringskurve fra kalibratorresultatene brukes dermed til å beregne målestørrelsen fra et målesignal. Det er ikke alltid laboratorier har mulighet til å kjøpe referansemateriale som er på toppen av sporebarhetskjeden. Vanligvis kjøper de bruksstandarder som er levert av andre metodeleverandører, og dermed bør de kreve at usikkerheten på bruksstandarden blir angitt, slik at sporbarhetskjeden blir ubrutt og laboratoriet til slutt kan finne måleresultatets samlede usikkerhet. Til slutt vil måleresultatet av en analytt/flere analytter bli sporbart til et primært referansemateriale og primær referansemetode når måleusikkerheten angis sammen med måleresultatet. (20)

Differanseplot

Blant de statistiske metodene som brukes for å vurdere riktighet, er differanseplot. Det er et diagram som gir et visuelt inntrykk av avvik mellom analysemetodene. Som oftest tegnes Bland-Altman plot hvor middelverdiene av de to metodene plottes på X-aksen og differansen på Y-aksen. Dette er en spesiell utforming av differanseplot som viser om enkelte områder gir ulikheter på grunn av ikke-linearitet til en av metodene, eller om forskjellen skyldes konsentrasjonsavhengighet (21). Det må også vurderes om det er slengere (outliers) blant dataene. Slengere er datapunkter som ligger påfallende langt unna fra de andre datapunktene, og må mistenkes for ikke å være korrekte. Videre legges det inn en trendlinje gjennom punktene for å vurdere differanseplottet. Hvis trendlinjen skjærer y-aksen i 0, tyder det på proporsjonal forskjell, mens en linje som ikke skjærer y-aksen i 0 tyder det på både konstant og proporsjonal feil. Punktene fordeler seg rundt linjen $y=0$ hvis det bare er tilfeldige feil og ikke systematiske feil. En linje parallelt over linjen $y=0$ viser konstant feil og at testmetoden

er høyere, mens en linje parallelt under linjen $y=0$ viser konstant feil og at testmetoden er lavere. (16)

Regresjonsanalyser og korrelasjon

Regresjonsanalyser er gode hjelpemidler i sammenlikning av måleresultater til to ulike målemetoder. Med regresjonsanalyser undersøkes sammenhengen mellom de korresponderende måleresultatene ved å tegne en rett linje gjennom datapunktene. Det er ikke alltid sammenhengen mellom måleresultatene kan beskrives med en rett linje, og da må sammenhengen tilpasses med andre ikke-lineære metoder, logaritmisk, eksponentielt eller polynomisk. Med regresjonslinjen følger det en regresjonslikning som beskriver hvordan et resultat fra den ene analysemetoden kan brukes til å regne ut resultatet til den andre analysemetoden. Ved lineær regresjon er linjen rett og har formelen: $y = ax + b$ der a er linjenes stigningstall (slope) og b er konstantleddet (intercept). Hvis $a=1$ og $b=0$, er analysemetodene like, men siden a og b bare er et estimat av sammenhengen mellom analysemetodene, må usikkerheten i konstantene a og b bestemmes med et statistikkprogram hvor konfidensintervall (KI) for a og b beregnes. Hvis stigningstallet (a) er forskjellig fra 1 og konfidensintervall ikke omfatter 1, tyder det på at det er proporsjonalt avvik mellom metodene. Er konstantleddet forskjellig fra 0 og konfidensintervallet ikke omfatter 0, kan det hevdes at det er konstant systematisk avvik mellom metodene. (22)

Ved metodesammenlikning er det ikke nødvendigvis at den ene metoden er mer riktig enn den andre. Med vanlig lineær regresjon benyttes det minste kvadraters metode der avvik mellom X og Y skyldes Y . Hvis det er feil i en av metodene og måleresultatene er skrevet inn som x -verdier, blir regresjonslinjen misvisende. Derfor må det benyttes en annen type regresjonsanalyse som tillater avvik eller variasjon i både X - og Y -variablene. Passing and Bablok tar hensyn til avvik både i x - og y -verdier og er robust mot slengere. (16)

Vurdering av lineær sammenheng mellom analysemetodene kan støttes opp med korrelasjon. Korrelasjonen uttrykkes som korrelasjonskoeffisienten (r), og det er et tall som ligger mellom -1 og 1 , avhengig av kurvens retning. Absoluttverdien til r sier noe om hvor sterk sammenhengen er, og jo større $|r|$ er, jo sterkere sammenheng.

$|r|=1$ betyr at alle punktene ligger på en rett linje i et punktdiagram og at det er god sammenheng mellom metodene, mens $|r|=0$ betyr at det ikke er noen lineær korrelasjon

mellom metodene. Det er god korrelasjon mellom metodene hvis korrelasjonskoeffisienten er $>0,975$ eller $<-0,975$. (22)

Paret t-test

Paret t-test er en statistisk metode som kan beregnes for å finne ut om forskjellen er statistisk signifikant. Det vil si at systematisk avvik påvises. Denne metoden kan bare brukes dersom gjennomsnittsdifferansen mellom de to metodene er tilnærmet normalfordelt og er konstant over hele det aktuelle konsentrasjonsområdet. For å se om differansene er normalfordelt, kan de plottes inn i et histogram og sjekkes visuelt. Paret t-test kan utføres på et statistikkprogram, som for eksempel på EXCEL. (16)

1.5 Problemstilling

Hensikten med oppgaven er å undersøke om rutinemetoden ved laboratoriet er god nok, eller om den skal erstattes av den nye ELISA-metoden fra Sebia. Oppgaven skal gjennomføres ved metodesammenlikning av de ulike metodene. Hovedparameteren som skal undersøkes i denne oppgaven er riktighet til de ulike metodene, og samtidig se om det er noen signifikant forskjell mellom metodene, men spesielt mellom N Latex FLC-metoden (rutinemetoden) og ELISA-metoden (nye metoden). Med bakgrunn i dette ble følgende problemstilling satt: *Har laboratoriet målt konsentrasjonen av frie lette immunglobulinkjeder feil hos enkelte pasienter ved å bruke Freelite-metoden og N Latex FLC-metoden?*

2.0 Materiale og metode

Avdeling for Medisinsk Biokjemi ved St. Olavs Hospital utførte alt av det manuelle arbeidet. Prøvene ble analysert med alle metodene som er med i oppgaven, og analyseresultatene ble sendt på e-post for bearbeiding og beregning med statistiske metoder. Som konsekvens av COVID-19 utbruddet foregikk kommunikasjonen med avdelingen via Skype og e-post, og i tillegg var det også utfordrende å finne skriftlige materialer da campuset var stengt.

2.1 Prøvemateriale

Serumprøver fra 40 pasienter med varierende høye konsentrasjoner av frie, lette kjeder, som tidligere ble analysert av Avdelingen for Medisinsk Biokjemi ved St. Olavs Hospital ble benyttet til denne oppgaven. Pasientprøve 1-20 er analysert med Freelite Kappa i 2011, oppbevart ved -80°C til de ble analysert i april 2020 med de andre metodene. Pasientprøver 1-24 (unntatt prøve 2) er analysert med Freelite Lambda i 2011, oppbevart ved -80°C til de ble analysert i april 2020 med de andre metodene.

De pasientprøvene som ble analysert for Kappa-kjeder med N Latex FLC-metoden, ELISA-metoden og kapillærelektroforese, ble pasientprøve 21-24 frosset ned i 2016 i -80°C til april 2020, pasientprøve 25-36 ble frosset ned i tidsperioden fra desember 2017 til 2018 i -80°C til april 2020 og pasientprøve 37-40 er ferske prøver som er analysert samme dag.

De pasientprøvene som ble analysert for Lambda-kjeder med N Latex FLC-metoden, ELISA-metoden og kapillærelektroforese, ble pasientprøve 25-32 frosset ned fra desember 2017 til april 2018 i -80°C til april 2020, pasientprøve 2 og 33 er frosset ned i 2019 i -80°C til april 2020 og pasientprøvene 34-40 er ferske prøver analysert på samme dag. For ELISA-metoden ble det kjørt et parallell for hver pasientprøve, både for kappa og lambda.

2.2 Utstyr og reagenser

En ny metode for måling av frie, lette kjeder ble utviklet og lansert i 2000. Den nye metoden ble kalt Freelite og var utviklet for analyseinstrumentet, Siemens BN II. Da dette instrumentet kom ut i markedet ble det kjøpt av Avdeling for Medisinsk Biokjemi ved St. Olavs Hospital våren 2005. Sammen med instrumentet ble Freelite-metoden som var utviklet av The Binding Site, implementert på laboratoriet. Samme år ble BN II oppgradert, og et nytt instrument ble

lansert av Siemens, såkalte BN ProSpec, som benyttet Freelite-metoden fra The Binding Site fram til august 2012. Da ble det utviklet en ny metode av Siemens som hevdet å ha løst de utfordringene som Freelite-metoden hadde. Den nye metoden, N Latex FLC, ble brukt på BN Prospec fram til desember 2019, da BN Prospec ble skiftet ut med et nytt analyseinstrument fra Siemens, Atellica NEPH 630. Atellica NEPH 630, sammen med BN II og BN ProSpec benytter nefelometri som måleprinsipp for måling av frie, lette kjeder.

I likhet med Freelite-metoden har avdelingen opplevd utfordringer med N Latex FLC-metoden hvor noen myelomatose-pasienter får svært forhøyet resultater. For å sjekke om dette er troverdig, analyseres prøven med analyseinstrumentet, Capillarys2 fra Sebia.

Analyseinstrumentet baserer seg på kapillærelektroforese, og kan støtte eller forkaste resultatene fra N Latex FLC-metoden. I det siste har det kommet ut ny ELISA-metode fra Sebia som hevder å ha løst utfordringene med Freelite- og N Latex FLC-metoden.

2.2.1 Atellica NEPH 630-system/BN-systemer

Atellica NEPH 630-system/BN-systemer brukes for kvantitativ bestemmelse av frie, lette kjeder, type kappa og lambda, henholdsvis i humant serum, heparinisert plasma, EDTA og cerebrospinalvæsken ved Avdeling for Medisinsk Biokjemi. Analyseinstrumentet, Atellica NEPH 630, benytter N Latex FLC-metoden og måler frie kappa og lambda-kjeder med nefelometri. Polystyrenpartikler belagt med antistoffer mot humane frie, lette kjeder, henholdsvis type kappa og lambda, agglutineres når de blandes med prøver som inneholder frie, lette kjeder. Når lys sendes gjennom prøven, sprer aggregatene lysstrålen, og det målte lyset er da proporsjonalt med konsentrasjonen av frie kappa-kjeder eller frie lambda-kjeder, under forutsetning av at det er overskudd av antistoff.

Kalibreringskurve til frie kappa- og lambda-kjeder fremkommer ved 6-punktskalibrering. I 6-punktskalibreringen inngår en kalibrator med kjent konsentrasjon som blir fortynnet automatisk av instrumentet med en N Diluent til ulike nivåer. Kalibreringskurve fra kalibratorresultatene brukes til å beregne konsentrasjonen til frie kappa- og lambda-kjeder ut fra målesignalene. Kalibreringskurven gjelder for 6 uker og kan brukes utover denne tidsperioden så lenge kontrollene er innenfor sitt respektive kontrollområde. Målingen er basert på «fixed time»-måling, og analysetiden er 12 minutter. «Fixed-time»-måling er basert på avlesninger etter 7,5 sekunder og etter 6 minutter eller lengre etter tilsetning av antistoff. Det vil si før reaksjonen er startet og når antigen/antistoff reaksjonen har stabilisert seg.

Deretter blir den målte lysspredningen ved 1.avlesning trukket fra 2.avlesning. Før hovedanalysen blir en prereaksjons-test utført for å minske sjansen for at prøver med svært høyt antigeninnhold skal få et falskt lavt resultat. I prereaksjons-testen blir litt av prøvemateriale tilsatt korrekt mengde reagens. For kappa slår prereaksjons-testen inn ved den terskelen der instrumentet måler 0 bits unit, mens for lambda er terskelverdien for prereaksjons-testen, 30 bits unit. Når resultatene til prereaksjons-testen foreligger, tilsettes resten av prøvemengden og analyseringen fortsetter.

Før analysering fortynnes prøver automatisk av systemet i forholdet 1:100 med N Diluent for frie kappa-kjeder og 1:20 for frie lambda-kjeder. Den fortynnede prøven og buffer pipetteres i kyvetten sammen med reagensene N lateks FLC anti-kappa og N lateks FLC anti-lambda, henholdsvis for frie kappa-kjeder og lambda-kjeder. Deretter vil blandingen inkuberes i ca 10 min for at antigenene (kappa og lambda) skal kunne reagere med de monoklonale antistoffene og danne uløselige kompleks. De uløselige kompleksene som er antigen-antistoff-komplekser vil spre lyset hvor lyskilden er laserdiode (840 nm). Målt lysspredning er proporsjonal med konsentrasjon av frie kappa- og lambda-kjeder. (23)



Figur 7: Atellica NEPH 630 brukes til analysering av frie kappa- og lambda-kjeder. (7)

2.2.2 Freelite fra The Binding site

Freelite er en analysemetode fra The Binding Site som anvendes til kvantitativ bestemmelse av monoklonale frie, lette kappa og lambda immunglobulinkjeder. Før denne analysemetoden ble skiftet ut i 2012 av Avdeling for Biokjemi ved St. Olavs Hospital ble den benyttet av BN ProSpec, et nefelometrisk analyseinstrument fra Siemens, til konsentrasjonsmåling av frie, lette immunglobulinkjeder.

I likhet med pasientprøver i Atellica NEPH 630, blandes også pasientprøver med Latex reagens før analysering med Freelite-metoden på BN ProSpec. Dette vil da føre til en reaksjonsblanding med immunkomplekser og med antistoffer i overskudd slik at mengden av dannende immunkomplekser er proporsjonal med mengde κ eller λ immunglobulinkjeder.

Konsentrasjonsberegning av frie, lette kappa- og lambda immunglobulinkjeder i Freelite-metoden følger samme metode som i Atellica NEPH 630; to kalibratører med kjente konsentrasjonsverdier, en kalibrator for frie, lette kappa- og en for lambda immunglobulinkjeder, fortynnes til ulike nivåer med N Diluent for å lage kalibratorkurvene hvor analyttenes (frie, lette κ - og λ immunglobulinkjedene) konsentrasjoner blir beregnet ut fra. (24,25)

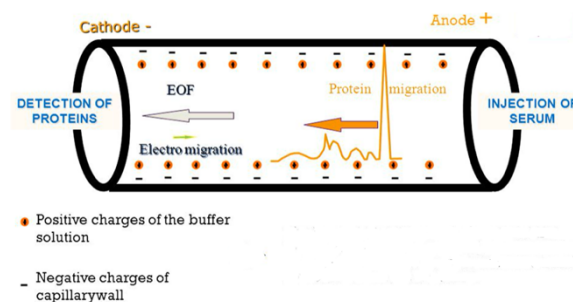


Figur 8: Analyseinstrumentet BN ProSpec som benytter analysemetoden Freelite fra The Binding Site for konsentrasjonsmåling av frie, lette immunglobulinkjeder. (8)

2.2.3 Capillaries2

Capillaries2 er et automatisert elektroforeseinstrument fra Sebia. Instrumentet benytter kapillærelektroforese, for deteksjon og separasjon av ladede, løste biokjemiske partikler av ulike størrelser, som proteiner og immunglobuliner, i både serum og urin.

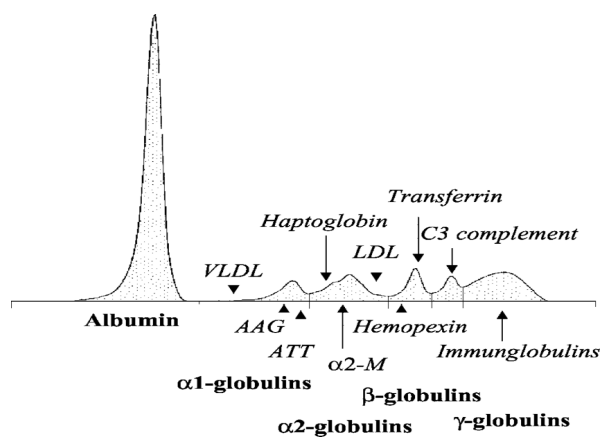
Kapillærelektroforesen baserer seg på et prinsipp hvor disse molekylene dras med av «Electro-Osmotic-Flow» (EOF). EOF er en strøm av elektriske ladede bufferioner langs en ladd kapillærvegg i et elektrisk felt med svært høy spenning. Capillaries2 benytter en alkalisk buffer med en pH på 9,9 med en bestemt ionestyrke for separasjon av proteiner i serum og urin. Kapillærveggen i Capillaries2 er negativt ladet og langs denne veggen oppstår det en bufferstrøm av positivt ladede bufferioner som beveger seg mot katoden. I motsetning til en vanlig agarosegel-elektroforese hvor mesteparten av proteinene vandrer mot anoden, vandrer alle proteinene i Capillaries2 mot katoden. Grunnen til dette er fordi ved en kapillærelektroforese blir kraften av EOF mot katoden større enn den elektriske kraften mot anoden (se figur 9).



Figur 9: En skjematisk framstilling av proteinenes vandring mot katodeenden av kapillæret i Capillaries2 på grunn av den sterke kraften av EOF. (9)

I Capillaries2 separeres de ulike serumproteinene i seks fraksjoner; albumin, alfa1, alfa2, beta1, beta2 og gamma. Ved separasjon av proteinene i fraksjoner passerer de detektoren i en slik rekkefølge: γ -, β_2 -, β_1 -, α_2 -, α_1 -globulin og albumin. Grunnen til at fraksjonene detekteres i denne rekkefølgen er at store molekyler med lite ladning, for eksempel gammaglobuliner, dras først med av EOF-kraften. Små molekyler med mest negativ ladning som albumin, derimot, blir påvirket sterkest av den elektriske kraften mot anoden og blir, derfor, dratt sist med EOF. Hver fraksjon består av ett eller flere proteiner. Albumin-fraksjonen består hovedsakelig av proteinet albumin. Alfa1 (α_1) - og alfa2 (α_2) -fraksjonene av mange proteiner, eksempelvis alfa-1-syre-glykoprotein (AAG) og alfa-1 antitrypsin (ATT) for

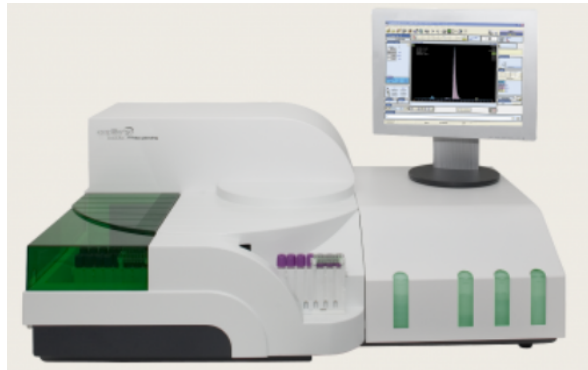
alfa1-fraksjonen og alfa2 -fraksjonen av haptoglobin og alfa2-makroglobulin (α_2 -M). Beta1 (β_1)-fraksjonen består av transferrin og hemopexin, beta2 (β_2)-fraksjonen av komplementproteiner, og gamma (γ)-fraksjonen vesentlig av immunglobuliner. Fraksjonsverdien beregnes ut ifra arealet av kurven i relativ prosent (%) og prøvens totalproteinverdi. Deteksjonen av de ulike proteinene i serum skjer i kapillærboblecelle med en diameter på 100 μm ved kapillærenes katodiske ende. Størrelsen på fraksjonene bestemmes ved direkte deteksjon av proteinenes peptidbindinger ved 200 nm og proteinmengden måles direkte som absorpsjon. (26)



Figur 10: En skjematisk framstilling av de 6 ulike fraksjonene av serumproteinene etter separasjon ved kapillærelektroforese i Capillarys2. Hver fraksjon består av ett eller flere proteiner. (10)

Deteksjon og kvantitering av immunglobuliner som IgG, IgA, IgM, og både frie og bundne κ - og λ immunglobulinkjeder i Capillarys2 kan også utføres ved immuntyping (IT) hvis serum-elektroforesen viser unormale fraksjoner. De unormale fraksjonene kan, for eksempel, være fraksjoner med to eller flere som ikke skal være på en normal serum-elektroforese. IT er en prosess som går ut på å fortynne pasientprøven med ELP (Elektroforese)-løsning i henhold til immunglobulinenes konsentrasjon og blande den med spesifikke antistoffer mot disse ulike immunglobulinene (IgG, IgA, IgM, κ - og λ immunglobulinkjeder) slik at immunkomplekser dannes. Etter separasjon av proteinene i fraksjoner ved serum-elektroforesen, detekteres de ved kapillærenes katodiske ende ved 200 nm. ELP (Elektroforese)-kurve er en referanse kurve og lages ny hver dag på grunn av drift i instrumentet. Den legger seg over de andre kurvene (IgG, IgA, IgM, kappa og lambda) for å sette riktig fraksjonsinndeling og ved hjelp til kvantitering av monoklonal komponent (M-komponent). Dersom immunglobulinkjede/ M-

komponent i en kurve blir borte ved elektroforesen, indikerer det immunkompleks-dannelse som utfelles og altså tilstedeværelse av immunglobulinkjeder. (27)



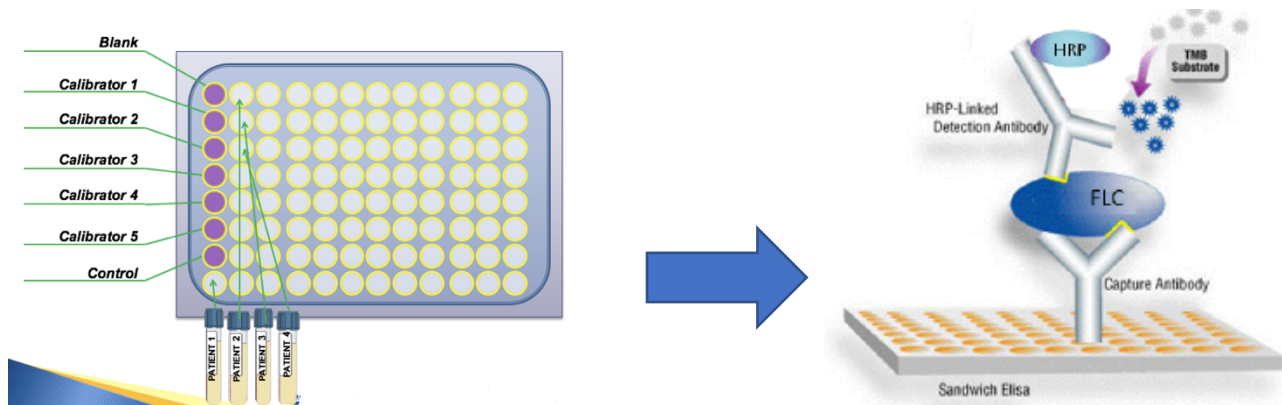
Figur 11: Capillarys2 fra Sebia benyttes for deteksjon og kvantitering av frie, lette kappa og lambda immunglobulinkjeder. (11)

2.2.4 ELISA-metoden fra Sebia

Måleprinsippet for den nye metoden fra Sebia er ELISA. Denne metoden har gjort det mulig å kvantitere frie, lette kjeder i serum. Analysen starter først med fortynning av prøvene til forholdet 1:1000 både for kappa- og lambda-kjeder med en fortynningsbuffer.

De fortynnede prøvene tilsettes deretter i brønner som er dekket med polyklonal anti kappa eller polyklonal anti lambda, avhengig av om det er kappa, lambda eller både kappa og lambda som skal analyseres. Blank, fem kalibratorer, kontroll og pasientprøvene fordeles på de brønnene i mikrotiterplaten (se figur 10). Når de fortynnede prøvene tilsettes i brønnene og inkuberes, skjer det en immunreaksjon mellom kappa og anti-kappa eller lambda og anti-lambda. Vasketrinn etter inkubasjonen sørger for å vaske bort anti kappa eller anti lambda som ikke har reagert. Deretter tilsettes et HRP (Horseradish peroxidase (enzym))-merket konjugat som er et antistoff, og etter tilsetning av et substrat, vil enzymet katalysere reaksjonen og omforme substratet til et immunkompleks som gir fargeforandring. Til slutt tilsettes en stoppløsning for å stoppe reaksjonen, og fargeforandringen avleses ved 450 nm med en plateleser som heter *Tecan sunrise*.

Det benyttes fem kalibratorer med kjente konsentrasjoner for å lage en kalibreringskurve for kappa, og fem kalibratorer med kjent konsentrasjon for å lage en kalibreringskurve for lambda. Ved hjelp av kalibreringskurvene kan man beregne konsentrasjon av kappa og lambda i prøvene.



Figur 12: Bilde til venstre viser en mikrotiterplate som består av mange brønner som er dekket med anti-kappa eller anti-lambda og fordeling av prøver. Bildet til høyere viser reaksjonsprinsippet for ELISA. (12)

2.2.5 Kalibrator, kontroller og reagenser

Tabell 1: Kalibratore, kontroller, reagenser og produsent til ELISA-metoden fra Sebia, brukt til analysing av frie kappa og lambda immunglobulinkjeder.

Kalibratore, kontroller og reagens		Produsent	Kommentar
Kappa	Lambda		
Kalibrator 1, 2, 3, 4 og 5	Kalibrator 1, 2, 3, 4 og 5	Sebia	Oppbevares ved 2-8 °C
Kontroll Kappa	Kontroll Lambda	Sebia	Kappa grenseområde: 6,2-18,6 mg/l Lambda grenseområde: 22,3-66,9 mg/l Oppbevares ved 2-8 °C
Mikrotiterplate Kappa	Mikrotiterplate Lambda	Sebia	Oppbevares ved 2-8 °C
Fortynning og vaske buffer	Fortynning og vaske buffer	Sebia	Oppbevares ved 2-8 °C
Vaskeløsning	Vaskeløsning	Sebia	Oppbevares ved 2-8 °C
Anti-Kappa	Anti-Lambda	Sebia	Oppbevares ved 2-8 °C
Substrat Kappa	Lambda Kappa	Sebia	Oppbevares ved 2-8 °C
Stoppløsning	Stoppløsning	Sebia	Oppbevares ved 2-8 °C

Tabell 2: Kalibrator, kontroll, reagenser og produsent til Freelite-metoden fra The Binding Site

Kalibratører, kontroller og reagenser	Produsent	Kommentar
Human Kappa Free Standard (kalibrator)	The Binding Site	Oppbevares ved 2-8 °C
Human Lambda Free Standard (kalibrator)	The Binding Site	Oppbevares ved 2-8 °C
Human Kappa Free Control (Kontroll)	The Binding Site	Oppbevares ved 2-8 °C
Human Kappa Free High Control (Kontroll, Høy)	The Binding Site	Oppbevares ved 2-8 °C
Human Lambda Free Control (Kontroll)	The Binding Site	Oppbevares ved 2-8 °C
Human kappa/lambda Free Reagent (Reagens)	The Binding Site	Oppbevares ved 2-8 °C
Human kappa/lambda Free Supplementary Reagent (Tilleggsreagens)	The Binding Site	Oppbevares ved 2-8 °C

Tabell 3: Kalibrator, kontroll, reagenser og produsent til Capillarys2, brukt til analysering av frie κ - og λ immunglobulinkjeder

Kalibratører, kontroller og reagens	Produsent	Kommentar
Sebia Protein kontroll normal (Kalibrator)	Bergman Diagnostika AS	Oppbevares ved 2-8 °C
AN Clin Chem L-3 (kontroll)	SERO AS	Grenseområdet: 51,3-55,1 g/L Oppbevares ved 2-8 °C
M-komponent kontroll (Kappa)	Egenprodusert (Se vedlegg 2 for tillaging)	Grenseområdet: 37,5-38,9 g/L Oppbevares ved 2-8 °C
Protein(E)6 buffer	Sebia	Oppbevares ved 2-8 °C
Vaskeløsning	Sebia	Oppbevares ved 2-8 °C

Tabell 4: Kalibratorer, kontroller, reagenser og produsent til Atellica NEPH 630, brukt til analysering av frie kappa og lambda immunglobulinkjeder

Kalibratorer, kontroller og reagens	Produsent	Kommentar
N FLC Standard SL (kalibrator)	Siemens Healthcare Diagnostics	Oppbevares ved 2-8 °C
N FLC Control SL1	Siemens Healthcare Diagnostics	Oppbevares ved 2-8 °C Kappa grenseområde: 10,1-15,1 mg/l Lambda grenseområde: 9,3-13,9 mg/l
FLC Serumpool	Egenprodusert (Se vedlegg 3 for tillaging)	Oppbevares i -80 °C Kappa grenseområde: 103,2-141,8 mg/l Lambda grenseområde: 122,2-175,8 mg/l
N Diluent (felles for alle analyser på Atellica NEPH 630)	Siemens Healthcare Diagnostics	Oppbevares ved 15-25 °C
N Reaction Buffer (felles for alle analyser på Atellica NEPH 630)	Siemens Healthcare Diagnostics	Oppbevares ved 15-25 °C
N FLC Supplement reagens	Siemens Healthcare Diagnostics	Oppbevares ved 2-8 °C
Cleaner SCS	Siemens Healthcare Diagnostics	Oppbevares ved 2-25 °C
N Latex FLC kappa	Siemens Healthcare Diagnostics	Oppbevares ved 2-8 °C
N Latex FLC lambda	Siemens Healthcare Diagnostics	Oppbevares ved 2-8 °C

2.3 Sporbarhet

Sporbarhet er en viktig del av kvalitetssikring i et laboratorium, og er nødvendig for å sikre at laboratoriet måler en analytt/flere analytter riktig. Derfor skal alle metoder som brukes på et laboratorium dokumenteres med en sporbarhetskjede som viser hvordan de kalibreres og hva de kalibreres med.

2.3.1 Freelite-metoden

Freelite-metoden blir kalibrert med Human Kappa/lambda Free Standard som består av humant serum. Kalibratorene inneholder polyklonale kappa/lambda frie, lette kjeder, og leveres i stabilisert flytende form. Det er ikke internasjonal referansemateriale/referansemetode for måling av frie, lette kjeder. Derfor er det ikke mulig å spore tilbake til et referansemateriale, og siden Freelite-metoden fra The Binding Site var den første metoden for måling av frie, lette kjeder, utviklet de sine egne standarder/kalibratører i overensstemmelse med prosedyrer.

2.3.2 N Latex metoden

N Latex FLC fra Siemens kan ikke spores tilbake til et referansemateriale i likhet med Freelite, men siden Freelite-metoden var først ute, er N Latex FLC sporbar til Freelite fra The Binding Site. Kalibratorene er utviklet i tråd med Freelite-metoden, og konsentrasjonen av de frie lette kjedene, type kappa og type kappa, er kalibrert med standard referansepreparat (The Binding Site) og er lot-avhengig. N Latex FLC kalibreres med N FLC Standard SL som består av en stabilisert væske som inneholder humane proteiner av frie lette kjeder, humant serumalbumin og proteasehemmere.

2.3.3 ELISA-metoden

ELISA-metoden fra Sebia kalibreres med fem kalibratører som er hentet fra en pool av human sera. De fem kalibratorene utgjør et Kappa-fri lett kjedet konsentrasjonsområde. Denne metoden kan heller ikke spores tilbake til et referansemateriale eller referansemetode. Kalibratorene er utviklet av Sebia i overensstemmelse med prosedyrer for tillaging av kalibratører, og kalibratorene er sporbare til den første metoden, Freelite.

2.4 Metode

2.4.1 Metodesammenlikning

I denne oppgaven blir den nye ELISA-metoden fra Sebia sammenlignet med den gamle metoden, Freelite, og med rutinemetoden, N Latex FLC, for å vurdere likheter og ulikheter mellom metodene. Hvis det er svært forhøyet resultater av frie, lette kjeder på noen av metodene som overskrider 1 g/L, brukes resultater fra kapillærelektroforese for å vurdere om det faktisk er riktig.

For å gjøre metodesammenlikningen, ble det utført differanseplott i form av Bland-Altman plot og regresjonsanalyser i form av Passing and Bablok. I tillegg til dette ble det også utført beregning av upresisjon i form av repeterbarhet på ELISA-metoden. Disse beregningene ble utført ved hjelp av statistikkprogrammene MedCalc 19.2 og Microsoft Office Excel 2016.

3.0 Resultater

Ved sammenlikning av Freelite-metoden, N Latex FLC-metoden og ELISA-metoden for måling av frie, lette immunglobulinkjeder, ble 40 pasientprøver for kappa og 40 pasientprøver for lambda benyttet for å undersøke samsvar mellom resultatene eller riktigheten av målingene. Dette ble utført med statistiske metoder, Passing and Bablok analyse og Bland-Altman plot. Hvis noen av pasientresultatene, analysert med Freelite, N Latex FLC og ELISA overskred 1 g/L, skulle gjeldende pasientprøver også analyseres med kapillærelektroforese for å se om årsaken til svært høy konsentrasjon kan skyldes overestimering av konsentrasjon til kappa- og lambda-kjeder.

Tabell 2: De pasientresultatene som overskred 1 g/L-grensen for kappa-kjeder, ble videre analysert med kapillærelektroforese. Resultater er hentet og satt sammen fra vedlegg 5 og 9.

Prøve	Freelite (mg/L)	N Latex FLC (mg/L)	ELISA (mg/L)	Kapillærelektroforese (mg/L)	Immunglobulin-type
5	5200	4050	1404	300	
7	1010	737	280	Ikke påvist	
8	8810	10800	3424	1000	
9	968	1130	331	Ikke påvist	
13	5090	3730	2925	1700	IgD-kappa
14	2690	3100	1563	500	
15	6640	2720	1127	10000	IgG-kappa
17	3060	2330	1034	500	
18	1870	1410	466	Ikke påvist	
19	5280	1580	676	Ikke påvist	
20	3870	3320	860	500	
21		1940	614	Ikke påvist	
22		5180	2172	200	
23		7780	4113	Ikke påvist	
24		1290	480	40100	IgG-kappa
25		8670	3204	800	
31		3500	1510	Ikke påvist	
32		1850	1117	4900	IgA-kappa
33		5630	1780	500	
34		3890	1297	Ikke påvist	
36		4810	1491	Ikke påvist	

Tabell 5 viser at det var mange prøver, analysert med Freelite-metoden fra The Binding Site og N Latex FLC fra Siemens, som overskred 1 g/L-grensen. Videre ble disse prøvene analysert med kapillærelektroforese, og det viser seg at kappa- og lambda-konsentrasjonen til mange prøver, analysert med Freelite og N Latex FLC, ble overestimert, sammenlignet med resultatene fra kapillærelektroforesen. Selv om det ble påvist svært høye konsentrasjoner av kappa- og lambda-kjeder med Freelite og N Latex FLC i noen prøver, ble det ikke påvist

kappa- og lambda-kjeder med kapillærelektroforese. Prøve 19 i tabell 5, analysert med Freelite og N Latex FLC, viser svært høy konsentrasjon av kappa-kjeder. Når denne prøven ble analysert med kapillærelektroforese, ble det ikke kvantitert kappa-kjeder og ingen topper var registrert.

I noen få prøver har konsentrasjonen blitt overestimert av kapillærelektroforesen. Et eksempel er Prøve 15 i tabell 5 hvor konsentrasjonen til kappa-kjeder som ble analysert med kapillærelektroforesen, viste 10 g/L, mens Freelite ga 6,4 g/L og N Latex FLC ga 2,7 g/L.

Tabell 3: De pasientresultatene som overskred 1 g/L-grensen for lambda-kjeder, ble videre analysert med kapillærelektroforese. Resultater er hentet og satt sammen fra vedlegg 6 og 10.

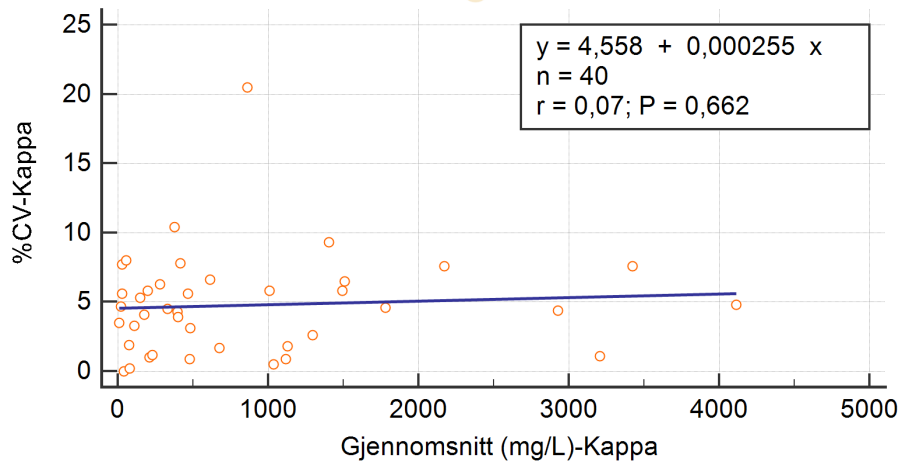
Prøve	Freelite (mg/L)	N Latex FLC (mg/L)	ELISA (mg/L)	Kapillærelektroforese (mg/L)	Immunglobulin-type
1	1150	574	493	1900	IgA-Lambda
5	7050	1570	425	1100	
6	1560	1740	463	Ikke påvist	
8	1050	1680	383	Ikke påvist	
9	1920	2270	537	Ikke påvist	
14	1060	1140	162	900	IgD-Lambda
21	7730,0	1140	297	600	
22	1440,0	316	94	Ikke påvist	
23	1660	298	142	100	
27		2180	63	700	
28		2290	569	1900	
29		3890	774	1700	
30		3030	635	1600	
31		2310	525	1600	
32		1180	709	700	

Tabell 6 viser at det også var mange pasientprøver som ble overestimert av Freelite og N Latex for lambda-kjeder, sammenlignet med kapillærelektroforese. I noen av de prøvene ble det ikke påvist lambda-kjeder med kapillærelektroforese. Flesteparten av pasientprøvene som er analysert med kapillærelektroforese, viser mye lavere konsentrasjon av lambda-kjeder enn Freelite og N Latex FLC, unntatt Prøve 1 fra tabell 6 hvor kapillærelektroforesen har overestimert konsentrasjonen av lambda-kjeder.

I noen prøver, både i tabell 5 og 6 har kapillærelektroforese klart å identifisere immunglobulintype og de immunglobulintypene som ble identifisert er IgG, IgA og IgD, fortrinnsvis av kappa-kjeder og lambda-kjeder.

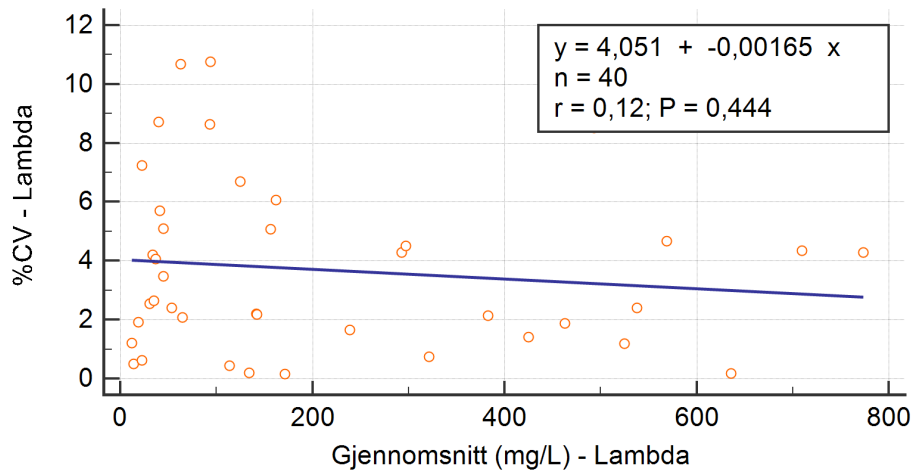
3.1 Impresisjon (repeterbarhet) til ELISA-metoden

For å undersøke ELISA-metodenes evne til å repetere prøvesvar for frie, lette kappa- og lambda immunoglobulinkjeder, ble variasjonskoeffisienten og gjennomsnittet mellom prøveparallelene som ble analysert med denne metoden tegnet i et x-y plott. I tillegg ble det også benyttet en korrelasjonsanalyse for å undersøke om korrelasjonskoeffisienten er statistisk signifikant eller ikke.



Figur 13: Punktdiagram med en korrelasjonsanalyse for frie, lette kappa immunoglobulinkjeder, med gjennomsnitt hver prøveparallel på x-aksen og %CV for hver prøveparallel på y-aksen. Prøvene er analysert med ELISA-metoden.

I figur 13 kan det observeres at sammenhengen mellom variasjonskoeffisienten (%CV) mellom parallelene for kappa-kjeder og gjennomsnitt mellom parallelene er tilnærmet konstant. Den utregnede %CV for hele oppsettet av kappa-kjeder var 6,0 % (vedlegg 7), og Sebia som har utviklet metoden, krever %CV opptil 10 % (vedlegg 4). Dette viser at oppsettet for frie, lette kappa immunoglobulinkjeder med ELISA-metoden har oppfylt impresjonkravet fra Sebia. Svært lav korrelasjonskoeffisient viser også at det er dårlig samsvar mellom %CV og gjennomsnitt for parallelene, analysert med ELISA-metoden. P-verdi for korrelasjonskoeffisient er høy, og det forteller at den ikke er statistisk signifikant.



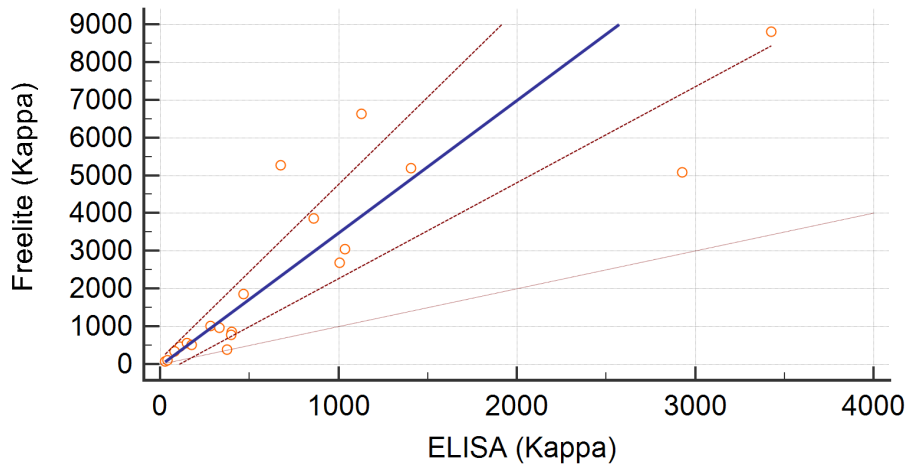
Figur 14: Punktdiagram med en korrelasjonsanalyse for frie, lette lambda immunoglobulinkjeder, med gjennomsnitt for hver prøveparallell på x-aksen og %CV for hver prøveparallell på y-aksen. Prøvene er analysert med ELISA-metoden.

Fra figur 14 kommer det fram at sammenhengen mellom %CV og gjennomsnitt av lambda-parallellene er tilnærmet konstant. %CV for lambda-oppsettet var 4,7 % (vedlegg 8), og oppfylder Sebia sitt impresisjon-krav på 10 %. Korrelasjonskoeffisienten er lav og dette viser at det er dårlig grad av samsvar mellom %CV og gjennomsnitt lambda-kjeder. P-verdi for korrelasjonskoeffisient er høy, og det forteller at den ikke er statistisk signifikant.

3.2 Metodesammenlikning

3.2.1 Sammenlikning mellom ELISA-metoden og Freelite-metoden

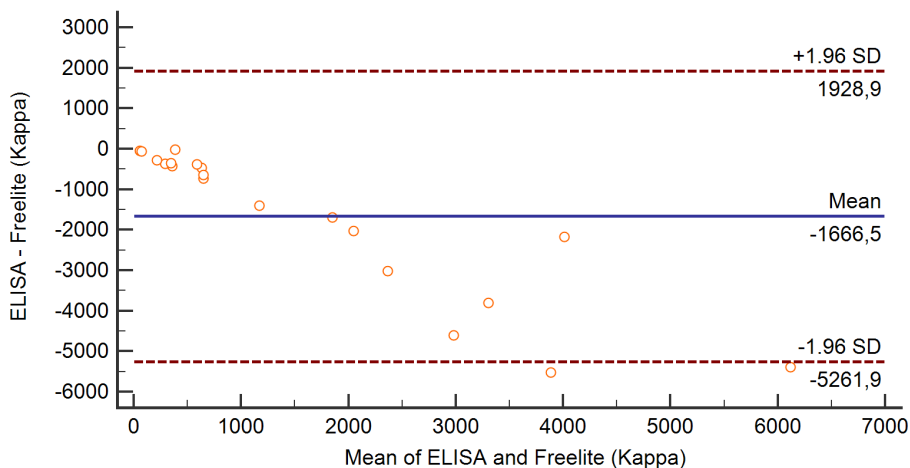
Sammenhengen mellom Freelite-metoden for frie, lette kappa immunoglobulinkjeder og ELISA-metoden for frie, lette kappa immunoglobulinkjeder er illustrert i et punktdiagram som vist i figur 15. I dette punktdiagrammet er det gjort et forsøk på å finne en lineær sammenheng mellom metodene, representert som en blå trendlinje i figuren. Den øvre grensen og den nedre grensen for den blå trendlinjens konfidensintervall er vist som to røde stiplede linjer, mens den lange røde linjen viser hvor $y = x$.



Figur 15: Et punktdiagram tatt ut fra Passing and Bablok regresjonsanalyse, med ELISA-metoden for frie, lette kappa immunglobulinkjeder på x-aksen og Freelite-metoden for frie, lette kappa immunglobulinkjeder på y-aksen.

I figur 15 ser det ut som flere av resultatene for frie, lette kappa-kjeder ligger tett til trendlinjen og i tillegg til at andre avviker noe fra trendlinjen. Dette tyder på at det er en lineær sammenheng mellom de to metodene. Linjen som viser $y = x$ ligger utenfor den øvre grensen og den nedre grensen for trendlinjens KI, noe som sier at det kan være enten en proporsjonal feil, en systematisk feil eller begge to.

Videre er det benyttet et Bland-Altman plott for å vurdere/undersøke hvor mye metodene avviker fra hverandre. Bland-Altman plottet er representert i figur 16.



Figur 16: Et Bland-Altman plott som viser forskjellen mellom ELISA-metoden for frie, lette kappa-kjeder og Freelite-metoden for frie, lette kappa-kjeder. Differansen mellom metodene er plottet langs y-aksen, mens gjennomsnittet mellom metodene er plottet langs x-aksen.

En forskjell mellom metodene er vist i figur 16. Her kommer det fram at resultatene avviker, i gjennomsnitt, med -1666,5 fra hverandre, noe som tyder på at det er en systematisk forskjell mellom metodene. Fra plottet kan det også se ut som det er variasjon i forskjell mellom metodene. For eksempel viser figuren at noen resultater avviker med ca. 2000 fra hverandre, mens noen resultater ikke avviker mellom metodene. Fra plottet observeres det at avviket mellom metodene blir større ved økende konsentrasjoner, for eksempel ved ca. 3000 mg/L.

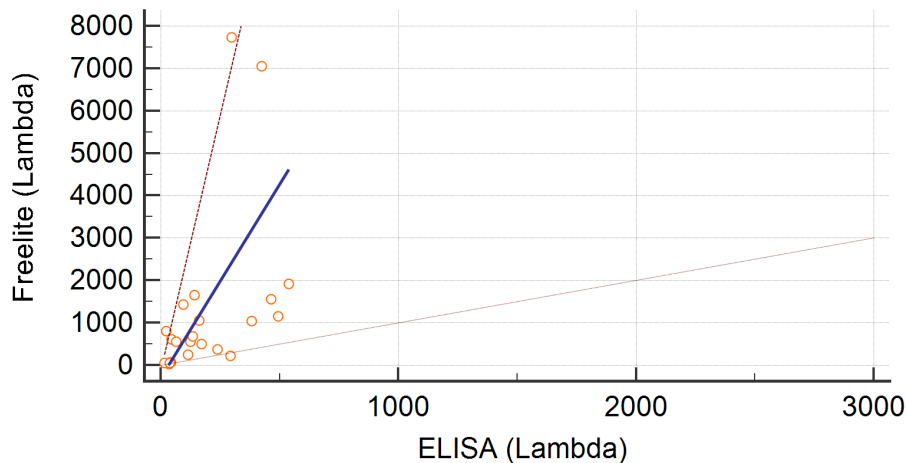
Figur 15 og 16 tyder på at det er en sammenheng mellom metodene. De sier, imidlertid, ikke noe om hvor god denne sammenhengen er. Passing and Bablok regresjonsanalyse er derfor benyttet for å teste denne sammenhengen og er vist i figur 17.

Variable X	ELISA	
Variable Y	Freelite	
Sample size	20	
	Variable X	Variable Y
Lowest value	27,5000	78,0000
Highest value	3424,0000	8810,0000
Arithmetic mean	763,9600	2430,4500
Median	399,0000	989,0000
Standard deviation	919,3776	2553,3660
Standard error of the mean	205,5791	570,9500
Regression Equation		
$y = -26,991745 + 3,510867 x$		
Systematic differences		
Intercept A	-26,9917	
95% CI	-283,0332 to 138,1780	
Proportional differences		
Slope B	3,5109	
95% CI	2,5473 to 4,6256	
Random differences		
Residual Standard Deviation (RSD)	1764,1365	
± 1.96 RSD Interval	-3457,7076 to 3457,7076	
Linear model validity		
Cusum test for linearity	No significant deviation from linearity (P=0,98)	

Figur 17: Statistiske beregninger som viser grad av sammenhengen mellom ELISA-metoden og Freelite-metoden for kappa immunglobulinkjeder. Resultatene benyttet til disse statistiske beregningene er hentet fra vedlegg 5.

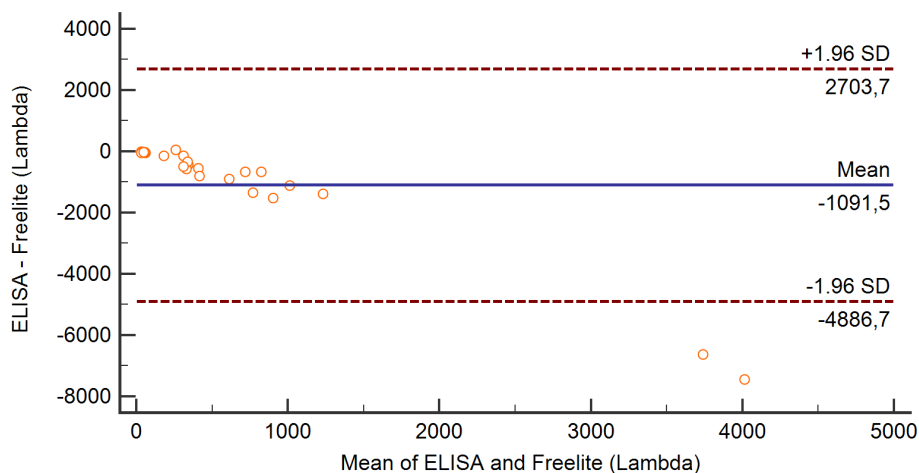
Regresjonsanalyser fra figur 17 viser at 95 % konfidensintervall (KI) for proporsjonalt avvik ikke omfatter 1. Dette tyder på at sammenhengen mellom metodene har et proporsjonalt avvik/en proporsjonal forskjell. 95 % KI for systematisk forskjell, derimot, omfatter 0, som tyder på at sammenhengen ikke har en konstant systematisk forskjell. Passing and Bablok analysen som tester validiteten av den lineære modellen viser at p-verdien er høy (=0,98). Dette betyr at hypotesen om en lineær sammenheng beholdes. Man antar derfor at det er en lineær sammenheng, og at Passing and Bablok statistikken kan benyttes for dette datasettet.

Sammenhengen mellom ELISA-metoden for frie, lette lambda immunglobulinkjeder og Freelite-metoden for frie, lette lambda immunglobulinkjeder er illustrert i et punktdiagram som vist i figur 18. I figuren ser det ut som flere av resultatene for frie, lette lambda-kjeder avviker noe fra trendlinjen. Dette tyder på at det er en lineær sammenheng mellom de to metodene. Trendlinjen avviker mye fra linjen som viser $y = x$ noe som sier at en proporsjonal feil og/eller en systematisk feil mellom metodene er sannsynlig.



Figur 18: Et punktdiagram tatt ut fra Passing and Bablok regresjonsanalyse, med ELISA-metoden for frie, lette lambda immunglobulinkjeder på x-aksen og Freelite-metoden for frie, lette lambda immunglobulinkjeder på y-aksen. Resultatene benyttet til disse statistiske beregningene er hentet fra vedlegg 6.

Videre er det benyttet et Bland-Altman plott for å undersøke hvor mye metodene avviker fra hverandre, som vist i figur 19.



Figur 19: Et Bland-Altman plott som viser forskjellen mellom ELISA-metoden for frie, lette lambda-kjeder og Freelite-metoden for frie, lette lambda-kjeder. Differansen mellom metodene er plottet langs y-aksen, mens gjennomsnittet mellom metodene er plottet langs x-aksen.

Figur 19 viser en sammenheng mellom metodene. Her kommer det fram at resultatene, i gjennomsnitt, avviker med -1091,5 fra hverandre. Dette tyder på at det er en systematisk forskjell mellom metodene. Fra plottet kan det også se ut som det er variasjon i forskjell mellom metodene ved måling av frie, lette lambda-kjeder. For eksempel viser figuren at noen resultater avviker med ca. 1090 fra hverandre, mens noen resultater ikke avviker mellom metodene. Fra plottet kan det observeres at avviket mellom metodene blir høyere når konsentrasjonen overskrider 3500 mg/L.

Selv om figur 18 og 19 tyder på at det er en sammenheng mellom metodene, er det benyttet en Passing and Bablok regresjonsanalyse for å undersøke hvor god denne sammenhengen er, som vist i figur 20.

Variable X	ELISA	
Variable Y	Freelite	
Sample size	23	
	Variable X	Variable Y
Lowest value	13,7500	28,0000
Highest value	537,4500	7730,0000
Arithmetic mean	189,8283	1281,3174
Median	133,9000	610,0000
Standard deviation	167,6353	2009,4421
Standard error of the mean	34,9544	418,9976
Regression Equation		
y = -299,903885 + 9,145394 x		
Systematic differences		
Intercept A	-299,9039	
95% CI	-2435,6242 to -74,4981	
Proportional differences		
Slope B	9,1454	
95% CI	3,7201 to 24,0226	
Random differences		
Residual Standard Deviation (RSD)	1919,7495	
± 1.96 RSD Interval	-3762,7091 to 3762,7091	
Linear model validity		
Cusum test for linearity	No significant deviation from linearity (P=0,40)	

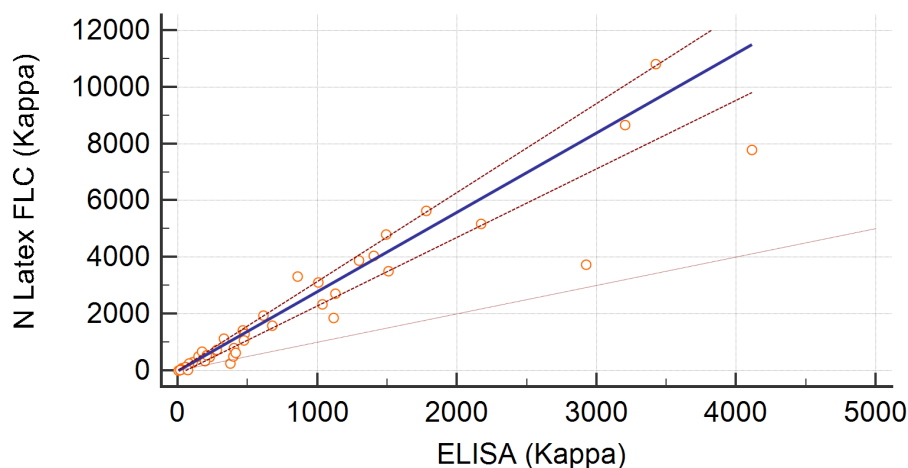
Figur 20: Statistiske beregninger som viser grad av sammenhengen mellom ELISA-metoden og Freelite-metoden for lambda immunglobulinkjeder. Resultatene benyttet til disse statistiske beregningene er hentet fra vedlegg 6.

Regresjonsanalyser fra figur 20 viser at 95 % konfidensintervall (KI) for proporsjonalt avvik ikke omfatter 1. Dette tyder på at sammenhengen mellom metodene har et proporsjonalt avvik/en proporsjonal forskjell. 95 % KI for systematisk forskjell tyder også på at sammenhengen har en konstant systematisk forskjell siden det ikke inkluderer 0. Passing and Bablok analysen som tester validiteten av den lineære modellen viser at p-verdien er høy (=0,40). Dette betyr at hypotesen om en lineær sammenheng beholdes. Man antar derfor at det

er en lineær sammenheng, og at Passing and Bablok statistikken kan benyttes for dette datasettet.

3.2.2 Sammenlikning mellom ELISA-metoden og N Latex FLC-metoden

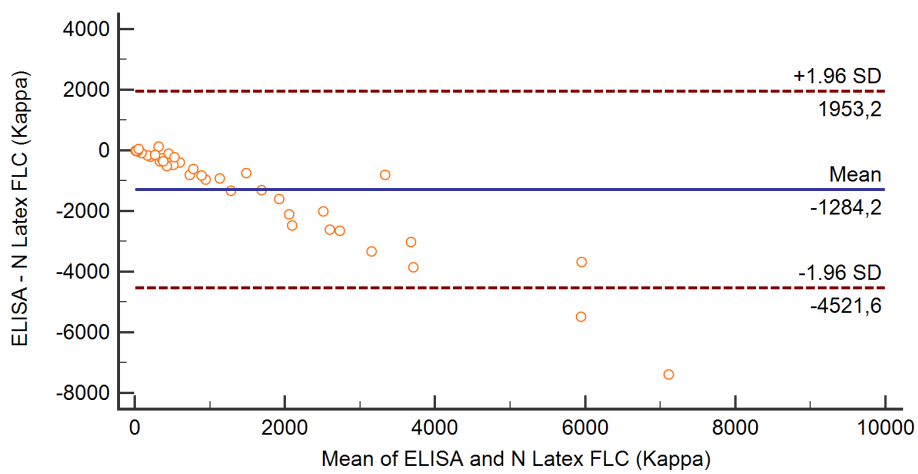
Sammenhengen mellom ELISA-metoden for frie, lette kappa immunglobulinkjeder og N Latex FLC-metoden for frie, lette kappa immunglobulinkjeder er illustrert i et punktdiagram som vist i figur 21. I dette punktdiagrammet er det gjort et forsøk på å finne en lineær sammenheng mellom metodene, representert som en blå trendlinje i figuren. De øvre- og nedre grensene for trendlinjens KI er vist som to røde stiplede linjer, mens den lange røde linjen viser hvor $y = x$.



Figur 21: Et punktdiagram tatt ut fra Passing and Bablok regresjonsanalyse, med N Latex FLC-metoden for frie, lette kappa-kjeder langs y-aksen og ELISA-metoden for frie, lette kappa-kjeder langs x-aksen. Resultatene benyttet i disse beregningene er hentet fra vedlegg 5.

I figur 21 kan det se ut som flere av resultatene for frie, lette kappa-kjeder ligger tett til trendlinjen og avviker noe fra trendlinjen. Dette tyder på at det er en lineær sammenheng mellom de to metodene. Linjen som viser $y = x$ ligger utenfor de øvre- og nedre grensene for trendlinjens KI, noe som sier at det kan være enten en proporsjonal feil og/eller en systematisk feil mellom metodene.

Videre er det benyttet et Bland-Altman plott for å undersøke hvor mye metodene avviker fra hverandre. Bland-Altman plottet er representert i figur 22.



Figur 22: Et Bland-Altman plott som viser forskjellen mellom ELISA-metoden for frie, lette kappa-kjeder og N Latex FLC-metoden for frie, lette kappa-kjeder. Differansen mellom metodene er plottet langs y-aksen, mens gjennomsnittet mellom metodene er plottet langs x-aksen.

En forskjell mellom metodene er vist i figur 22. Her kommer det fram at resultatene, i gjennomsnitt, avviker med -1284,2 fra hverandre, noe som tyder på at det er en systematisk forskjell mellom metodene. Fra plottet kan det også se ut som det er variasjon i forskjell mellom metodene. For eksempel viser figuren at noen resultater avviker med ca. 2500 fra hverandre, mens noen resultater ikke avviker mellom metodene. Fra plottet kommer det fram at avviket mellom metodene blir høyere ved økende konsentrasjon, eksempelvis ved konsentrasjoner høyere enn 5000 mg/L.

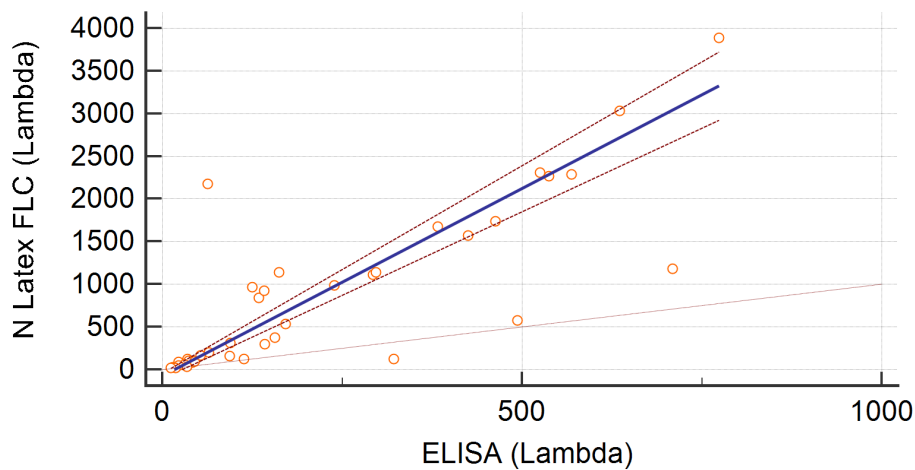
Figur 21 og 22 tyder på at det er en sammenheng mellom metodene. De sier, imidlertid, ikke noe om hvor god denne sammenheng er. Passing and Bablok regresjonsanalyse er derfor benyttet for å teste denne sammenheng og er vist i figur 23.

Variable X	ELISA	
Variable Y	N_Latex_FLC	
Sample size	40	
	Variable X	Variable Y
Lowest value	6,0500	8,2000
Highest value	4113,0000	10800,0000
Arithmetic mean	868,7950	2153,0225
Median	440,2500	1100,0000
Standard deviation	1027,5514	2576,5801
Standard error of the mean	162,4701	407,3931
Regression Equation		
y = -41,990355 + 2,806322 x		
Systematic differences		
Intercept A		-41,9904
95% CI		-161,5539 to -3,9283
Proportional differences		
Slope B		2,8063
95% CI		2,4226 to 3,1409
Random differences		
Residual Standard Deviation (RSD)		1051,5641
± 1.96 RSD Interval		-2061,0657 to 2061,0657
Linear model validity		
Cusum test for linearity	No significant deviation from linearity (P=0,53)	

Figur 23: Statistiske beregninger som viser grad av sammenheng mellom ELISA-metoden for frie, lette kappa immunglobulinkjeder og N Latex FLC-metoden for frie, lette kappa immunglobulinkjeder. Resultatene benyttet til disse statistiske beregningene er hentet fra vedlegg 5.

Regresjonsanalyser fra figur 23 viser at både 95 % KI for proporsjonal forskjell og 95 % KI for systematisk forskjell ikke omfatter 1 og 0, henholdsvis. Dette tyder på at sammenheng mellom metodene har en proporsjonal- og en konstant systematisk forskjell. Passing and Bablok analysen som tester validiteten av den lineære modellen viser at p-verdien er høy (=0,53). Dette betyr at hypotesen om en lineær sammenheng beholdes. Man antar derfor at det er en lineær sammenheng, og at Passing and Bablok statistikken kan benyttes for dette datasettet.

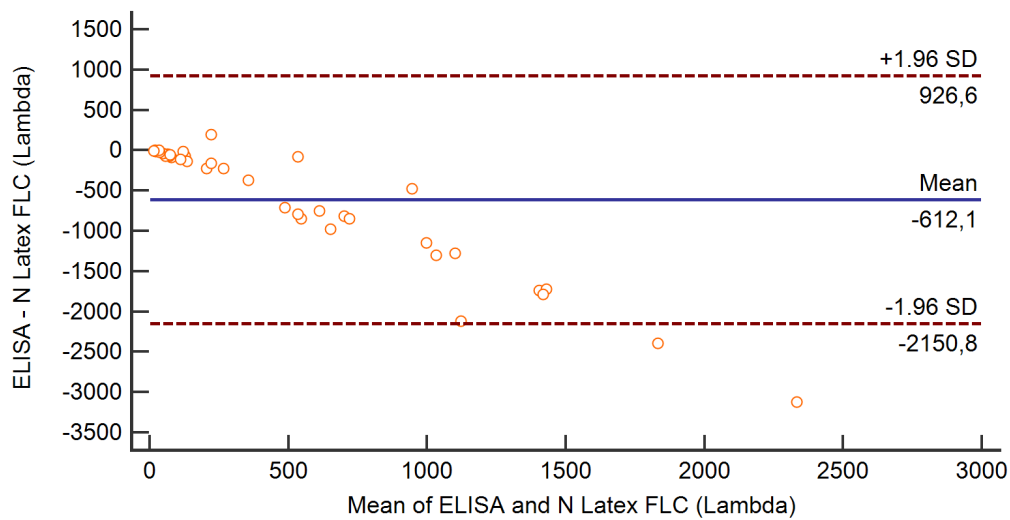
Sammenhengen mellom ELISA-metoden for frie, lette lambda immunglobulinkjeder og N Latex FLC-metoden for frie, lette lambda immunglobulinkjeder er illustrert i et punktdiagram som vist i figur 24.



Figur 24: Et punktdiagram tatt ut fra Passing and Bablok regresjonsanalyse, med N Latex FLC-metoden for frie, lette lambda-kjeder langs y-aksen og ELISA-metoden for frie, lette lambda-kjeder langs x-aksen. Resultatene benyttet i disse beregningene er hentet fra vedlegg 6.

I figuren ser det ut som flere av resultatene for frie, lette lambda-kjeder avviker noe fra trendlinjen. Dette tyder på at det er en lineær sammenheng mellom de to metodene. Linjen som viser $y = x$ ligger utenfor de øvre- og nedre grensene for trendlinjens KI, noe som sier at en proporsjonal feil og/eller en systematisk feil mellom metodene er sannsynlig.

Videre er det benyttet et Bland-Altman plott for å undersøke hvor mye metodene avviker fra hverandre, som vist i figur 25.



Figur 25: Et Bland-Altman plott som viser forskjellen mellom ELISA-metoden for frie, lette lambda-kjeder og N Latex FLC-metoden for frie, lette lambda-kjeder. Differansen mellom metodene er plottet langs y-aksen, mens gjennomsnittet mellom metodene er plottet langs x-aksen.

Figur 25 viser en sammenheng mellom metodene. Her kommer det fram at resultatene, i gjennomsnitt, avviker med -612,1 fra hverandre. Dette tyder på at det er en systematisk forskjell mellom metodene. Fra plottet kan det også se ut som det er variasjon i forskjell mellom metodene ved måling av frie, lette lambda-kjeder. For eksempel viser figuren at noen resultater avviker med ca. 500 fra hverandre, mens noen resultater ikke avviker mellom metodene. Fra plottet ser det ut det at avviket mellom metodene blir større ved økende konsentrasjoner, for eksempel ved ca. 3000 mg/L.

Videre er det benyttet et Bland-Altman plott for å undersøke hvor mye metodene avviker fra hverandre, som vist i figur 26.

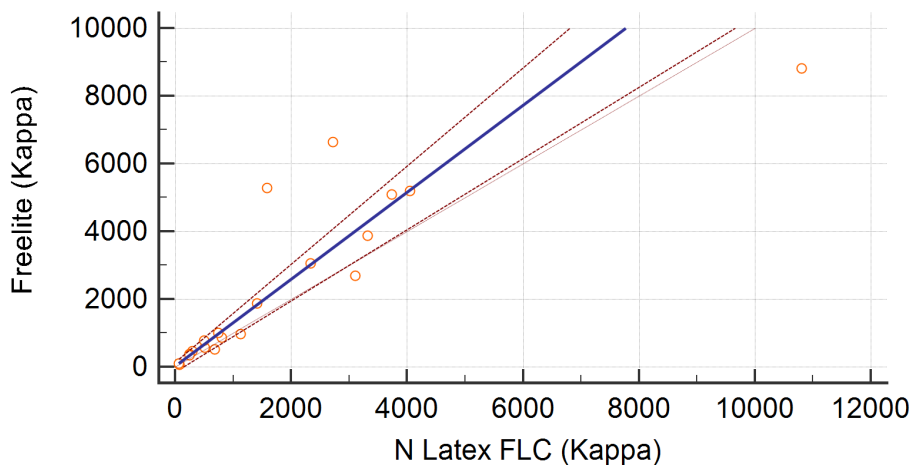
Variable X	ELISA	
Variable Y	N_Latex_FLC	
Sample size	40	
	Variable X	Variable Y
Lowest value	11,6000	18,5000
Highest value	773,5000	3890,0000
Arithmetic mean	214,1675	826,2325
Median	129,3000	346,5000
Standard deviation	219,7815	956,2257
Standard error of the mean	34,7505	151,1926
Regression Equation		
$y = -78,752266 + 4,403890 x$		
Systematic differences		
Intercept A	-78,7523	
95% CI	-117,8009 to -41,7438	
Proportional differences		
Slope B	4,4039	
95% CI	3,9259 to 4,8687	
Random differences		
Residual Standard Deviation (RSD)	579,5984	
± 1.96 RSD Interval	-1136,0129 to 1136,0129	
Linear model validity		
Cusum test for linearity	No significant deviation from linearity (P=0,53)	

Figur 26: Statistiske beregninger som viser grad av sammenhengen mellom ELISA-metoden for frie, lette lambda immunglobulinkjeder og N Latex FLC-metoden for frie, lette kappa immunglobulinkjeder. Resultatene benyttet til disse statistiske beregningene er hentet fra vedlegg 6.

Regresjonsanalyser fra figur 26 viser at 95 % konfidensintervall (KI) for proporsjonalt avvik ikke omfatter 1. Dette tyder på at sammenhengen mellom metodene har en proporsjonal forskjell. 95 % KI for systematisk forskjell tyder også på at sammenhengen har en konstant systematisk forskjell siden det ikke inkluderer 0. Passing and Bablok analysen som tester validiteten av den lineære modellen viser at p-verdien er høy (=0,53). Dette betyr at hypotesen om en lineær sammenheng beholdes. Man antar derfor at det er en lineær sammenheng, og at Passing and Bablok statistikken kan benyttes for dette datasettet.

3.2.3 Sammenlikning mellom N Latex-metoden og Freelite metoden

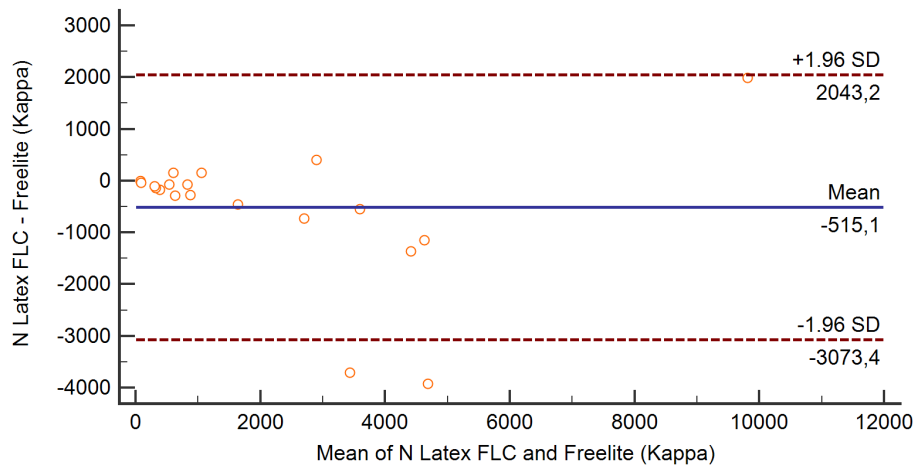
Sammenhengen mellom N Latex FLC-metoden for frie, lette kappa immunglobulinkjeder og Freelite-metoden for frie, lette kappa immunglobulinkjeder er illustrert i et punktdiagram som vist i figur 21. I dette punktdiagrammet er det gjort et forsøk på å finne en lineær sammenheng mellom metodene, representert som en blå trendlinje i figuren. Den øvre grensen og nedre grensen for den trendlinjen er vist som to røde stiplete linjer, mens den lange røde linjen viser hvor $y = x$.



Figur 27: Et punktdiagram tatt ut fra Passing and Bablok regresjonsanalyse, med Freelite-metoden for frie, lette kappa-kjeder langs y-aksen og N Latex FLC-metoden for frie, lette lambda-kjeder langs x-aksen. Resultatene benyttet i disse beregningene er hentet fra vedlegg 5.

Sammenhengen mellom Freelite-metoden for frie, lette kappa immunglobulinkjeder og N Latex FLC-metoden for frie, lette kappa immunglobulinkjeder er illustrert i et punktdiagram som vist i figur 27. I figuren ser det ut som flere av resultatene for frie, lette lambda-kjeder avviker noe fra trendlinjen. Dette tyder på at det er en lineær sammenheng mellom de to metodene. Linjen som viser $y = x$ ligger utenfor den nedre og øvre grensen for trendlinjens KI, noe som sier at en proporsjonal feil og/eller en systematisk feil mellom metodene er sannsynlig.

Videre er det benyttet et Bland-Altman plott for å undersøke hvor mye metodene avviker fra hverandre, som vist i figur 28.



Figur 28: Et Bland-Altman plott som viser forskjellen mellom N Latex FLC-metoden for frie, lette kappa-kjeder og Freelite-metoden for frie, lette kappa-kjeder. Differansen mellom metodene er plottet langs y-aksen, mens gjennomsnittet mellom metodene er plottet langs x-aksen.

Ved måling av frie, lette kappa-kjeder er det vist en forskjell mellom N Latex FLC-metoden og Freelite-metoden i figur 28. Her kommer det fram at resultatene, i gjennomsnitt, avviker med -515,1 fra hverandre, noe som tyder på at det er en systematisk forskjell mellom metodene. Fra plottet kan det også se ut som det er variasjon i forskjell mellom metodene. For eksempel viser figuren at noen resultater avviker med ca. 1000 fra hverandre, mens noen resultater ikke avviker mellom metodene. Fra plottet kan det observeres at avviket mellom metodene blir større ved noen konsentrasjoner større enn 2500 mg/L.

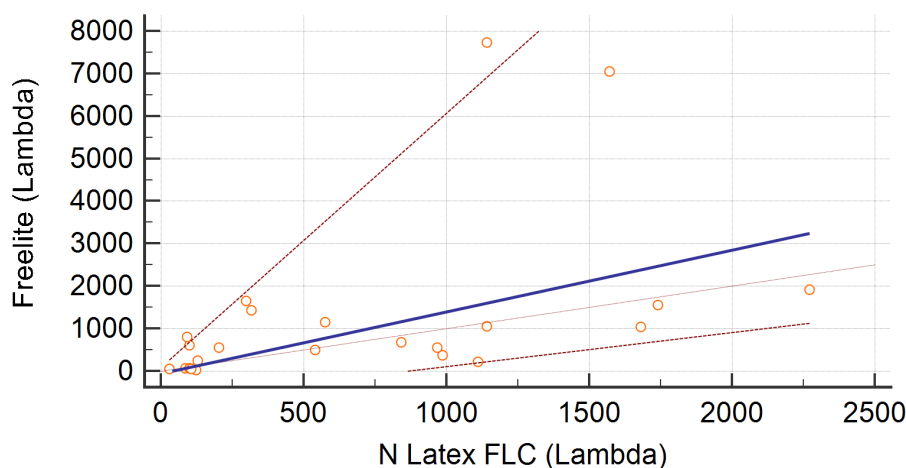
Selv om figur 27 og 28 tyder på at det er en sammenheng mellom metodene, er det benyttet en Passing and Bablok regresjonsanalyse for å undersøke hvor god denne sammenhengen er, som vist i figur 29.

Variable X	N_Latex_FLC	
Variable Y	Freelite	
Sample size	20	
	Variable X	Variable Y
Lowest value	64,1000	78,0000
Highest value	10800,0000	8810,0000
Arithmetic mean	1915,3250	2430,4500
Median	964,0000	989,0000
Standard deviation	2461,9242	2553,3660
Standard error of the mean	550,5030	570,9500
Regression Equation		
$y = 30,610045 + 1,284583 x$		
Systematic differences		
Intercept A	30,6100	
95% CI	-167,9945 to 141,6642	
Proportional differences		
Slope B	1,2846	
95% CI	1,0525 to 1,4493	
Random differences		
Residual Standard Deviation (RSD)	1641,5223	
± 1.96 RSD Interval	-3217,3838 to 3217,3838	
Linear model validity		
Cusum test for linearity	No significant deviation from linearity (P=0,98)	

Figur 29: Statistiske beregninger som viser grad av sammenhengen mellom N Latex-metoden for frie, lette kappa immunglobulinkjeder og Freelite-metoden for frie, lette kappa immunglobulinkjeder. Resultatene benyttet til disse statistiske beregningene er hentet fra vedlegg 5.

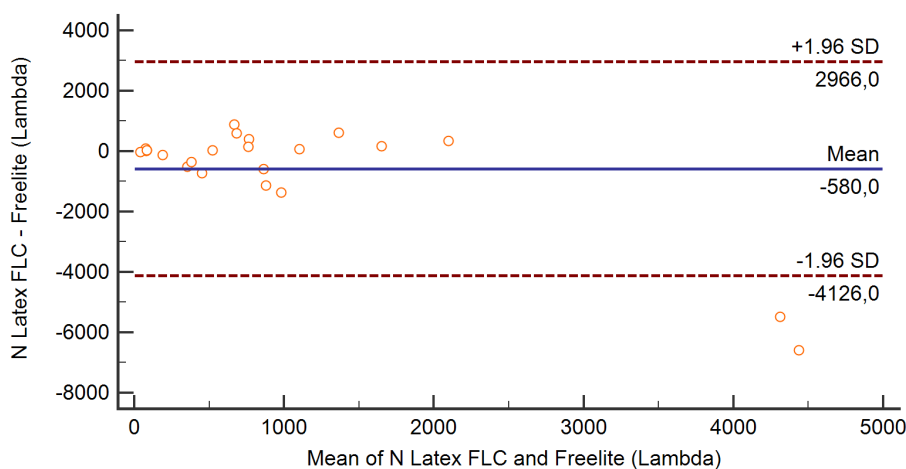
Regresjonsanalyser fra figur 29 viser at 95% konfidensintervall (KI) for proporsjonalt avvik ikke omfatter 1. Dette tyder på at sammenhengen mellom metodene har en proporsjonal forskjell. 95% KI for systematisk forskjell tyder på at sammenhengen ikke har en konstant systematisk forskjell siden det inkluderer 0. Passing and Bablok analysen som tester validiteten av den lineære modellen viser at p-verdien er høy (=0,98). Dette betyr at hypotesen om en lineær sammenheng beholdes. Man antar derfor at det er en lineær sammenheng, og at Passing and Bablok statistikken kan benyttes for dette datasettet.

Sammenhengen mellom N Latex FLC-metoden for frie, lette lambda immunglobulinkjeder og Freelite-metoden for frie, lette lambda immunglobulinkjeder er illustrert i et punktdiagram som vist i figur 30. I figuren ser det ut som flere av resultatene for frie, lette lambda-kjeder avviker noe fra trendlinjen. Dette tyder på at det er en lineær sammenheng mellom de to metodene. Linjen som viser $y = x$ ligger innenfor den øvre grensen og den nedre grensen for trendlinjens KI, noe som sier at en proporsjonal feil og/eller en systematisk feil mellom metodene ikke er sannsynlig.



Figur 30: Et punktdiagram tatt ut fra Passing and Bablok regresjonsanalyse, med Freelite-metoden for frie, lette lambda-kjeder langs y-aksen og N Latex FLC-metoden for frie, lette lambda-kjeder langs x-aksen. Resultatene benyttet i disse beregningene er hentet fra vedlegg 6.

Videre er det benyttet et Bland-Altman plott for å undersøke hvor mye metodene avviker fra hverandre, som vist i figur 31.



Figur 31: Et Bland-Altman plott som viser forskjellen mellom N Latex FLC-metoden for frie, lette lambda-kjeder og Freelite-metoden for frie, lette lambda-kjeder. Differansen mellom metodene er plottet langs y-aksen, mens gjennomsnittet mellom metodene er plottet langs x-aksen.

Ved måling av frie, lette kappa-kjeder er det vist en forskjell mellom N Latex FLC-metoden og Freelite-metoden i figur 31. Resultatene, i gjennomsnitt, avviker med -580 fra hverandre, noe som tyder på at det er en systematisk forskjell mellom metodene. Fra plottet kan det også se ut som det er variasjon i forskjell mellom metodene. Eksempelvis viser figuren at noen resultater avviker med mer 4000 fra hverandre, mens noen resultater ikke avviker mellom

metodene. Fra plottet observeres det at avviket mellom metodene er blir større ved økende konsentrasjoner, for eksempel ved konsentrasjoner høyere enn 2000 mg/L

Selv om figur 30 og 31 tyder på at det er en sammenheng mellom metodene ved måling av frie, lette lambda-kjeder, er det benyttet en Passing and Bablok regresjonsanalyse for å undersøke hvor god denne sammenhengen er, som vist i figur 32.

Variable X	N_Latex_FLC	
Variable Y	Freelite	
Sample size	23	
	Variable X	Variable Y
Lowest value	28,8000	28,0000
Highest value	2270,0000	7730,0000
Arithmetic mean	701,3174	1281,3174
Median	539,0000	610,0000
Standard deviation	658,0727	2009,4421
Standard error of the mean	137,2176	418,9976
Regression Equation		
$y = -75,343966 + 1,460345 x$		
Systematic differences		
Intercept A		-75,3440
95% CI		-701,9322 to 91,8874
Proportional differences		
Slope B		1,4603
95% CI		0,8053 to 5,9831
Random differences		
Residual Standard Deviation (RSD)		1867,1287
± 1.96 RSD Interval		-3659,5722 to 3659,5722
Linear model validity		
Cusum test for linearity		No significant deviation from linearity (P=0,78)

Figur 32: Statistiske beregninger som viser grad av sammenhengen mellom N Latex-metoden for frie, lette lambda immunglobulinkjeder og Freelite-metoden for frie, lette lambda immunglobulinkjeder. Resultatene benyttet til disse statistiske beregningene er hentet fra vedlegg 6.

Regresjonsanalyser fra figur 32 viser at 95 % konfidensintervall (KI) for proporsjonalt avvik omfatter 1. Dette tyder på at sammenhengen mellom metodene ikke har en proporsjonal forskjell. 95 % KI for systematisk forskjell tyder på at sammenhengen ikke har en konstant systematisk forskjell siden det inkluderer 0. Passing and Bablok analysen som tester validiteten av den lineære modellen viser at p-verdien er høy (=0,78). Dette betyr at hypotesen om en lineær sammenheng beholdes. Man antar derfor at det er en lineær sammenheng, og at Passing and Bablok statistikken kan benyttes for dette datasettet.

4.0 Diskusjon

Hensikten med denne oppgaven er å utføre en metodesammenlikning mellom Freelite fra The Binding Site, N Latex FLC fra Siemens og ELISA fra Sebia, og undersøke om den nye ELISA-metoden burde erstatte dagens rutinemetode ved Avdeling for Medisinsk biokjemi ved St. Olavs Hospital, N Latex FLC-metoden. Samtidig skal det også vurderes om laboratoriet har målt noen pasientprøver som er med i undersøkelsen feil, ved bruk av Freelite og N Latex FLC.

Ved analysering av frie lette immunglobulinkjeder er det viktig at konsentrasjonen av både kappa-kjeder og lambda-kjeder bestemmes nøyaktig for riktig diagnostisering og oppfølging av myelomatose-pasienter. Siden immunologiske metoder først kom ut i markedet på 2000-tallet, har kvantitering av frie, lette kjeder blitt enklere, men samtidig har de også medbrakt noen utfordringer. Siden de ulike metodene benytter varierende typer av antistoffer, har det vært utfordrende å innføre et referansemateriale og felles referanseområde for alle immunologiske metoder. Frie, lette immunglobuliner er heterogene molekyler med varierende ladning og størrelse, og konsekvensen av denne variasjonen er at det blir vanskelig å utvikle en immunologisk metode som klarer å gjenkjenne alle molekylformene og konformasjonene til de frie, lette kjedene.

Det er essensielt at de antistoffene som benyttes i Freelite, N Latex FLC og ELISA har høy spesifisitet og affinitet for frie, lette immunglobulinkjeder. Med bakgrunn i disse kriteriene har de ulike immunologiske metodene utviklet polyklonal og monoklonal antistoffer. Både Freelite fra The Binding Site og ELISA-metoden fra Sebia benytter polyklonale antistoffer, mens N Latex FLC benytter monoklonale antistoffer. Fordelen med polyklonale antistoffer er at de klarer å gjenkjenne flere epitoper, men samtidig er det vanskelig å oppnå en optimal spesifisitet og affinitet. I motsetning til polyklonale antistoffer gir bruken av monoklonale antistoffer en optimal spesifisitet og affinitet mot frie, lette kjeder. Utfordringen med disse antistoffene er at det er vanskelig å lage antistoffer som dekker hele spekteret av epitopene. N Latex FLC er sporbar til Freelite og blir kalibrert mot Freelite, men siden Freelite-metoden benytter polyklonale antistoffer og N Latex FLC benytter monoklonale antistoffer, vil ikke kalibrator-resultatene samsvare godt med hverandre.

Prøveresultatene fra Freelite og N Latex FLC som overskred 1 g/L-grensen, viser at mange pasientprøver har blitt overestimert, sammenlignet med ELISA-metoden og kapillærelektroforese. Resultatene for kappa-kjeder som er analysert med Freelite, viser generelt høyere konsentrasjon enn kappa-kjeder som er analysert med N Latex FLC. Når det gjelder lambda-kjeder, er det stor variasjon. I halvparten av pasientprøvene er konsentrasjonen av lambda-kjeder høyere med Freelite enn N Latex FLC, mens i den andre halvparten er konsentrasjonen av lambda-kjeder høyere med N Latex FLC enn Freelite. Det er ikke nok pasientprøver i denne undersøkelsen for å påstå at Freelite overestimerer kappa-kjeder mer enn N Latex FLC og at overestimering av lambda-kjeder varierer mellom Freelite og N Latex FLC. Likevel kan disse påstandene støttes av en metodesammenlikning mellom Freelite og N Latex FLC som ble gjort tidligere (28).

Både Freelite og N Latex FLC benytter nefelometri, og det er noen begrensninger ved nefelometriske målemetoder. Prøver som inneholder høye nivåer av andre sirkulerende immunkomplekser enn frie, lette kjeder, kan gi falskt forhøyet turbiditet og uspesifisert spredning av lys. Dette vil medføre at konsentrasjonen av kappa- og lambda-kjeder overestimeres. Sammenlignet med den nye ELISA-metoden og kapillærelektroforese, kan det observeres at konsentrasjon av både kappa- og lambda-kjeder, analysert med Freelite og N Latex FLC er mye høyere. Passing and Bablok for kappa-kjeder viser at trendlinjen/regresjonslinjen for Freelite og N Latex FLC, avviker fra den ideelle regresjonslinjen, $y = x$. Videre viser Bland-Altman plottet at det er god overenstemmelse mellom metodene fram til omtrent 2000 mg/L. Ved større konsentrasjon enn 2000 mg/L ble differansen mellom Freelite og N Latex FLC større. Konfidensintervall, både for skjæringspunktet (intercept) og stigningstallet (slope) viser nærmere at det ikke foreligger systematisk forskjell mellom metodene, men proporsjonale avvik er tilstede. P-verdien i regresjonsanalysen støtter også hypotesen om at en sammenheng mellom Freelite og N Latex finnes. I likhet med kappa-kjeder viser Passing and Bablok for lambda-kjeder at regresjonslinjen avviker fra den ideelle trendlinjen. Bland-Altman plottet for lambda-kjeder viser også at differansen mellom disse metodene blir større etter omtrent 2000 mg/L. Vurdering av resterende regresjonsanalyse forteller at det verken foreligger systematisk og proporsjonal forskjell mellom metodene for lambda-kjeder.

Andre studier som har sammenliknet Freelite og N Latex FLC har også vist at forskjellen mellom metodene, ble større ved høye konsentrasjoner av både kappa- og lambda-kjeder. De påpeker samtidig at årsaken til overestimeringen av Freelite og N Latex FLC, skyldes polymerisering (29). Påstanden om polymerisering kan støttes med resultatene i denne undersøkelsen. Til tross for svært forhøyet pasientresultater, analysert med Freelite og N Latex FLC, viser resultatene fra ELISA-metoden og kapillærelektroforese mye lavere konsentrasjoner, både for kappa-kjeder og lambda-kjeder. Når Freelite og/eller N Latex FLC påviser over 1 g/L av frie, lette kjeder, og både ELISA og kapillærelektroforese viser mye lavere konsentrasjoner, kan det med sikkerhet konkluderes at en eller to av de nefelometriske metodene har overestimert pasientprøvene. Dette var tilfelle i denne undersøkelsen hvor mange pasientprøver ble overestimert av Freelite og N Latex FLC, og ELISA og kapillærelektroforese viste lave konsentrasjoner. I noen prøver ga kapillærelektroforesen høyere konsentrasjon av frie, lette kjeder enn Freelite, N Latex FLC og ELISA. Årsaken til denne underestimeringen hos de nefelometriske metodene og ELISA-metoden kan være såkalte antigenoverskudd (antigen excess).

Freelite prøver å forhindre antigenoverskudd ved å fortynne prøvene automatisk flere ganger, mens N Latex FLC har en prereaksjons-fase hvor instrumentet sjekker tilstedeværelse av antigenoverskudd. Hvis det påvises antigenoverskudd, vil instrumentet automatisk utføre en høyere fortynning. Begge måter for å forhindre antigenoverskudd er effektivt, men risikoen for antigenoverskudd kan likevel ikke utelukkes i både Freelite og N Latex FLC. Studier viser at antigenoverskudd i Freelite og N Latex FLC fortsatt kan føre til underestimering av prøveresultater (30). En av de metodene som benyttes for å illustrere og visualisere antigenoverskudd er immunfiksering elektroforese (IFE), noe som ikke er gjort i denne undersøkelsen. I denne undersøkelsen ble det gjort immuntyping kapillærelektroforese, og dette utføres når serum-elektroforesen viser unormale fraksjoner.

I de pasientprøvene hvor immuntyping med kapillærelektroforese har klart å bestemme immunoglobulintype, kan det observeres at kapillærelektroforesen i mange av disse pasientprøvene, utgir mye høyere konsentrasjoner av både kappa- og lambda-kjeder enn alle de tre andre metodene. Prøve 15 og 24 på tabell for kappa kjeder og prøve 1 og 14 på tabell 6 er for lambda-kjeder er gode eksempler hvor kapillærelektroforesen har utgitt konsentrasjoner som er mye høyere enn de andre metodene. Freelite, N Latex FLC og ELISA-metoden benytter antistoffer rettet mot frie, lette kappa- og lambda-kjeder, mens ved immuntyping med

kapillærelektroforese benyttes det antistoffer rettet mot de spesifikke immunglobulintypene (IgG, IgA og IgM) og mot både ubundne og bundne kappa- og lambda-kjeder.

Elektroforesekurvene til prøve 15 og 24 for kappa-kjeder (se vedlegg 9) viser M-komponent, og det er komponent av type kappa som er bundet til immunglobulinet IgG, ikke frie, lette kappa-kjeder som er påvist. Grunnen til at kapillærelektroforesen viser høyere konsentrasjoner i disse prøvene, er at den har kvantitert kappa-kjeder som er bundet til immunglobulintype IgG, mens Freelite, N Latex FLC og ELISA kvantiterer de frie, lette kappa-kjedene i disse prøvene. Dermed blir det feil å sammenligne resultatene av disse pasientprøvene mot hverandre.

I noen av pasientresultatene for frie, lette lambda-kjeder kan det observeres at kapillærelektroforesen gir høyere konsentrasjoner enn de tre metodene. Siden immuntyping med kapillærelektroforese utføres i væskefase, kan antistoffer noen ganger kryssreagere med andre monoklonale komponenter i prøven, og dette vil gi falskt forhøyet konsentrasjon av de frie, lette kjedene. Dette skjer sjeldent, men det kan være en årsak til at immuntyping med kapillærelektroforese overestimerer noen prøver.

Intra-assay undersøkelsen av ELISA-metoden viser at repeterbarheten til metoden er god. %CV for både frie, lette kappa- og lambda-kjeder er innenfor %CV-kravet fra Sebia som er på <10%. Tolkningen av de lave %CV-verdiene er at målingene varierer lite ved parallell-analysering av pasientprøvene, under samme analyseringsbetingelser. Kurvene som viser sammenhengen mellom %CV og gjennomsnitt mellom prøveparallellene, både for frie, lette kappa- og lambda-kjeder, kan tolkes som at %CV er tilnærmet konstant. Dette kan antyde at metodens presisjon ikke vil avta eller bli dårligere ved lave eller høye konsentrasjoner av frie lette immunglobulinkjeder.

Bland-Altman plottet for frie, lette kappa-kjeder mellom ELISA og Freelite tyder på at det er en systematisk forskjell mellom metodene, og samtidig antyder plottet at det er stor variasjon i datasettet. Likevel kan det ikke konkluderes ut ifra Bland-Altman plottet at det foreligger en systematisk forskjell mellom metodene. Plottet viser også at forskjellen mellom de metodene, blir større ved økende konsentrasjon, noe som tyder på proporsjonal forskjell. Passing and Bablok regresjonsanalyse viser at det er en lineær sammenheng, og p-verdien støtter opp hypotesen om at denne sammenhengen mellom metodene for frie, lette kappa-kjeder finnes.

Regresjonslinjen avviker fra den ideelle regresjonslinjen og dette kan tyde på proporsjonal og/eller systematisk forskjell mellom metodene. Resten av regresjonsanalysen viser at det foreligger proporsjonal forskjell mellom metodene, men ikke systematisk forskjell.

Pasientresultatene fra Freelite og ELISA viser at Freelite konsekvent måler høyere konsentrasjoner enn ELISA i alle pasientprøvene. Årsaken til denne overestimeringen av frie, lette kappa-kjeder er proporsjonal forskjell mellom metodene, og den proporsjonale forskjellen kan ha blitt forårsaket av polymerisering. Den mulige forklaringen at det ikke er systematisk forskjell mellom metodene, kan være at begge metodene benytter polyklonale antistoffer.

For frie, lette lambda-kjeder viser Bland-Altman plottet at det er en systematisk forskjell mellom Freelite og ELISA, og i likhet med kappa-kjeder, blir forskjellen mellom metodene større ved økende konsentrasjon av lambda-kjeder. Dette viser at det er proporsjonale forskjell, og for å se nærmere om det er systematisk forskjell, studeres Passing and Bablok regresjonsanalyse. Det viser at 1 ikke er med i konfidensintervallet for stigningstall og at 0 ikke er med i konfidensintervallet for skjæringspunktet. Dette betyr at både systematisk og proporsjonal forskjell er tilstede mellom metodene, ved måling av frie, lette lambda-kjeder. Freelite overestimerte konsentrasjon av frie, lette lambda-kjeder i alle pasientprøvene, sammenlignet med ELISA. Årsaken til overestimering av Freelite kan igjen skyldes polymerisering.

Bland-Altman plottet for frie, lette kappa-kjeder mellom N Latex FLC og ELISA viser at det er systematisk forskjell. Forskjellen mellom metodene blir større ved økende konsentrasjoner av frie, lette kappa-kjeder, noe som tyder på at det er proporsjonal forskjell. Passing og Bablok regresjonsanalyse viser at regresjonslinjen avviker fra den ideelle regresjonslinjen. Avviket kan skyldes proporsjonal forskjell eller/og systematisk forskjell, og for å undersøke mer om dette, må vi se om 1 er innenfor konfidensintervall for stigningstallet og om 0 er innenfor konfidensintervall for skjæringspunktet. Regresjonsanalysen viser at både 1 og 0 er utenfor konfidensintervallene, noe som forteller at det er både systematisk- og proporsjonal forskjell mellom metodene. Samtidig viser både Bland-Altman plott og Passing Bablok for frie, lette lambda-kjeder at det er systematisk- og proporsjonal forskjell mellom N Latex FLC og ELISA. I likhet med kappa-kjeder viser Bland-Altman plottet at forskjellen mellom metodene blir større når konsentrasjonen av de frie, lette lambda-kjedene øker.

Pasientresultatene fra ELISA og kapillærelektroforsen for frie, lette kappa-kjeder viser at pasientresultatene fra ELISA ligger nærmest pasientresultatene fra kapillærelektroforsen, sammenlignet med Freelite og N Latex FLC. Grunnen til at ELISA kontinuerlig måler lavere konsentrasjoner enn Freelite og N Latex FLC, kan være polymerisering hos de to nefelometriske metodene som fører til overestimerte prøveresultater. I tillegg kan det også observeres at de fleste pasientresultatene fra ELISA er høyere enn pasientresultater fra kapillærelektroforsen. I noen pasientprøver med frie, lette kappa-kjeder utgir ELISA konsentrasjoner over 1 g/L, mens kapillærelektroforsen ikke klarer å detektere disse kappa-kjedene. Dette kan skyldes at kapillærelektroforsen ved måling av frie, lette kjeder i serum ikke er sensitiv nok til nøyaktig kvantitering av disse kjedene. I følge Immunology & Serology in Laboratory Medicine mister kapillærelektroforsen 5 % av positive pasientprøvene, og utgir falske negative svar (31). Det er mulig at kapillærelektroforsen har gitt falske negative svar på de pasientprøvene hvor ELISA viser over 1 g/L.

I motsetning til frie, lette kappa-kjeder viser pasientresultatene fra kapillærelektroforsen generelt at ELISA utgir lavere konsentrasjoner av frie, lette lambda-kjeder sammenlignet med kapillærelektroforsen. Denne underestimeringen hos ELISA-metoden kunne skyldes antigenoverskudd, men flere studier viser at ELISA har løst problemet med antigenoverskudd (32). Videre kan det derfor hypoteseres at det kan være polymerisering av frie, lette kjeder som muligens hindrer optimal gjenkjennelse av epitopene. Dette kan føre til at antistoffene i ELISA ikke er i stand til å binde seg til frie, lette kjeder på grunn av polymerisering, og lave konsentrasjoner i forhold til kapillærelektroforsen, kan dermed forventes.

N Latex måler kontinuerlig høyere konsentrasjoner av både frie, lette kappa- og lambda-kjeder enn ELISA-metoden, og dette skyldes proporsjonale- og systematiske forskjeller mellom metodene. Det at det foreligger både proporsjonale og systematiske forskjeller mellom N Latex FLC og ELISA, kan forklares med polymerisering og at metodene benytter ulike typer antistoffer; ELISA benytter polyklonale antistoffer, mens N Latex FLC benytter monoklonale antistoffer. ELISA fortynner også prøvene i forholdet 1:1000, og dette er essensielt for å forhindre antigenoverskudd, mens en nefelometrisk metode som N Latex FLC, fortynner frie, lette kappa-kjeder i forholdet 1:100 og frie, lette lambda-kjeder i forholdet 1:20, og de lave fortynningsforholdene hos N Latex FLC kan eksponere metoden for antigenoverskudd, selv om det har et innebygd system som skal forhindre dette.

5.0 Konklusjon

Metodesammenlikningene mellom metodene viser generelt at det ikke er store forskjeller mellom Freelite og N Latex FLC, noe som er forventet siden både Freelite og N Latex FLC benytter nefelometri som måleprinsipp. Sammenlikning mellom de nefelometriske metodene og den nye ELISA-metoden fra Sebia, viser at både Freelite og N Latex FLC konsekvent måler høyere konsentrasjoner av frie, lette kjeder. Dette kan skyldes polymerisering hos Freelite og N Latex FLC som gir overestimerte pasientresultater. Forskjellen mellom alle metodene ble større ved økende konsentrasjoner av både frie, lette kappa- og lambda-kjeder. I tillegg er både Freelite og N Latex FLC eksponert for antigenoverskudd, noe som fører til falske lave konsentrasjoner av frie, lette kjeder. Den nye ELISA-metoden har løst dette problemet ved å ha høye fortynninger. Når alle disse metodene ble sammenlignet med kapillærelektroforese, er det ELISA-metoden som ligger nærmest pasientresultatene fra kapillærelektroforesen.

I denne undersøkelsen kan det, med en viss usikkerhet, vises at Avdeling for Medisinsk biokjemi ved St. Olavs Hospital har målt noen prøver fra myelomatose-pasienter feil, sammenlignet med både ELISA-metoden og kapillærelektroforese. Usikkerheten er at ingen av disse metodene som har blitt sammenlignet, er en referansem metode. På grunn av at det ikke finnes en referansem metode for frie, lette kjeder, er det vanskelig å si hvilken av metodene som måler riktig. Likevel kan denne undersøkelsen vise at Sebia har klart å utvikle en metode som har løst utfordringene med antigenoverskudd og polymerisering. I tillegg er presisjonen til metoden god, og i tråd med andre undersøkelser som er gjort tidligere, kan det også vises at denne metoden, ved hjelp av polyklonale antistoffer, gir optimal sensitivitet og riktighet for måling av frie, lette immunglobulinkjeder.

Det konkluderes med at resultatene oppnådd i denne undersøkelsen, tyder på at den nye ELISA-metoden fra Sebia kan med fordel erstatte dagens rutinem metode, N Latex FLC. Samtidig er en utvidet undersøkelse av metodesammenlikning nødvendig for metodeverifisering.

6.0 Litteraturliste

1. Joannes F.M. Jacobs*, Corrie M. de Kat Angelino, Huberdina M.L.M Brouwers, Sandra A. Crookewit, Irma Joosten, Renate G. van der Molen. Evaluation of a new free light chain ELISA assay bringing coherence with electrophoretic methods. *Clin Chem Lab Med*. 2017;11.
2. Pier GB, Lyczak JB, Wetzler LM. Immunology, infection, and immunity. Washington: ASM Press; 2004. xxiii+718.
3. Peakman M. Basic and clinical immunology. 2nd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone Elsevier; 2009. viii+365.
4. Agger R. Immunologi. København: Munksgaard Danmark; 2011. 495 s.
5. Lea T. Basal og klinisk immunologi: prinsipper og molekylære mekanismer [Internett]. 2. utg. Bergen: Fagbokforlaget; 2000 [sitert 19. mars 2020]. xv+300. Tilgjengelig på: http://urn.nb.no/URN:NBN:no-nb_digibok_2017072007268
6. Waage A. Myelomatose [Internett]. Blodkreftforeningen. 2017 [sitert 25. mars 2020]. Tilgjengelig på: <https://www.blodkreftforeningen.no/myelomatose/>
7. Beskrivelse av svært sjeldne kromosom- eller genforandringer [Internett]. Frambu. 2019 [sitert 3. april 2020]. Tilgjengelig på: <https://frambu.no/diagnosebeskrivelse/beskrivelse-av-diagnosene-svaert-sjeldne-kromosomavvik-med-utviklingshemning/>
8. Phone BKB husBlindernvn 31 0371 ONPP 1066 B 0316 ON, fax. Delesjon - Institutt for biovitenskap [Internett]. [sitert 3. april 2020]. Tilgjengelig på: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/d/delesjon.html>
9. Årsaker til myelomatose [Internett]. [sitert 3. april 2020]. Tilgjengelig på: <http://oncolex.no/Myelomatose/Bakgrunn/Aarsaker>
10. Brian GMD. Til deg som lever med myelomatose | Amgen [Internett]. Myeloma. 2017 [sitert 19. mars 2020]. Tilgjengelig på: https://www.levmedmyelomatose.no/?utm_source=google&utm_medium=sem&utm_campaign=kunnskapstest
11. AR B. Serum Free Light Chain Analysis. 6th ed. Birmingham: The Binding Site Ltd; 2010. xx+350.
12. Nair B, Waheed S, Szymonifka J, Shaughnessy JD, Crowley J, Barlogie B. Immunoglobulin isotypes in multiple myeloma: laboratory correlates and prognostic implications in total therapy protocols. *Br J Haematol*. april 2009;145(1):134–7.
13. Tietz NW, Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Tietz fundamentals of clinical chemistry. 6th ed. St. Louis: Saunders Elsevier; 2008. xx+952.
14. Clinical Chemistry: Principles Techniques Correlations | Michael Bishop, Edward Fody, Larry Schoeff | download [Internett]. [sitert 30. mars 2020]. Tilgjengelig på: <https://book.cc/book/3651959/8a66f7?dsource=recommend>
15. DS2® Automated ELISA System Operator's Manual. 2009.
16. Bjørn J. Bolann. Riktig svar på biokjemiske analyser: en innføring i analytisk kvalitetsovervåking. Bergen: Fagbokforl; 2009. 132 s.
17. VALIDERING / VERIFISERING AV KLINISK KJEMISKE ANALYSER [Internett]. NKK (Norsk Klinisk kjemisk kvalitetskontroll); [sitert 29. mars 2020]. Tilgjengelig på: http://doc.noklus.no/handler.ashx?r=nkk&id=VAL_NKK.pdf
18. SKUP [Internett]. [sitert 4. mai 2020]. Tilgjengelig på: <https://skup.org/visartikkel.aspx?id=50>
19. handler.pdf [Internett]. [sitert 28. mars 2020]. Tilgjengelig på: http://doc.noklus.no/handler.ashx?r=nkk&id=VAL_NKK.pdf
20. Dok N. 2. Begreper, definisjoner og henvisninger. :33.
21. Bruns DE, Burtis CA. Tietz fundamentals of clinical chemistry and molecular

- diagnostics. 7th ed. St. Louis, Mo: Elsevier; 2015. xxii+1075.
22. Frigessi A. Statistiske metoder i medisin og helsefag. 2. utg. Oslo: Gyldendal akademisk; 2018. 351 s.
 23. Mari Meslo Lien, Arne Åsberg. Frie kappa- og frie lambda-kjeder, kappa/lambda-ratio, Atellica NEPH 630. AMB. 2020.
 24. Freelite Human Kappa Frie lette kit til anvendelse på Dade Behring BN ProSpec. The Binding Site Ltd; 2008.
 25. Freelite Human Lambda Frie lette kit til anvendelse på Dade Behring BN ProSpec. The Binding Site Ltd; 2008.
 26. Janne Seselie Haldaas, Mari Meslo Lien. Elektroforese av serumprøver, Capillarys2. AMB. 2019.
 27. CAPILLARYS_IMMUNOTYPING.pdf [Internett]. [sisert 7. april 2020]. Tilgjengelig på:
http://www.illexmedical.com/files/Sebia%20inserts/CAPILLARYS_IMMUNOTYPING.pdf
 28. Schieferdecker A, Hörber S, Ums M, Besemer B, Bokemeyer C, Peter A, mfl. Comparison of three different serum-free light-chain assays—implications on diagnostic and therapeutic monitoring of multiple myeloma. Blood Cancer J [Internett]. 9. januar 2020 [sisert 12. mai 2020];10(1). Tilgjengelig på:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6949235/>
 29. Jacobs JFM, de Kat Angelino CM, Brouwers HMLM, Croockewit SA, Joosten I, van der Molen RG. Evaluation of a new free light chain ELISA assay: bringing coherence with electrophoretic methods. Clin Chem Lab Med. 26 2018;56(2):312–22.
 30. Antigen excess | Wikilite [Internett]. [sisert 12. mai 2020]. Tilgjengelig på:
<http://www.wikilite.com/antigen-excess>
 31. Turgeon ML. Immunology & Serology in Laboratory Medicine - E-Book. Elsevier Health Sciences; 2017. 601 s.
 32. Pekar J-D, Schraen S, Grzych G, MANIER S, ONRAED B. Antigen excess pitfall for free light chains measurements solved by ELISA assay. Am J Hematol. 25. januar 2019;

Figurkilder:

Figur 1: Hentet 19.03.2020 fra <https://www.news-medical.net/life-sciences/Types-of-Antibodies.aspx>

Figur 2: Hentet 19.03.2020 fra https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-a-typical-Ig-molecule-In-most-cases-Ig-are-heterodimers-of-two-heavy-and_fig2_225480299

Figur 3: Hentet fra boken *Serum Free Light Chain Analysis*, s.16

Figur 4: Hentet fra boken Tietz: fundamentals of Clinical Chemistry, s.84

Figur 5: Hentet 30.03.2020 fra <https://www.bio-rad-antibodies.com/elisa-types-direct-indirect-sandwich-competition-elisa-formats.html>

Figur 6: Hentet 20.03.2020 fra <https://www.bio-rad-antibodies.com/elisa-types-direct-indirect-sandwich-competition-elisa-formats.html>

Figur 7: Hentet 08.04.20 fra <https://www.siemens-healthineers.com/plasma-protein/systems/atellica-neph-630-system>

Figur 8: Hentet 30.04.2020 fra <https://www.siemens-healthineers.com/no/plasma-protein/systems/bn-prospec-system>

Figur 9: Hentet 06.04.2020 fra <https://slideplayer.com/slide/3376321/>

Figur 10: Hentet 07.04.2020 fra https://www.researchgate.net/figure/Capillary-electropherogram-of-serum-proteins-from-a-healthy-individual_fig1_231589256

Figur 11: Hentet 28.04.2020 fra <https://www.sebia.com/en-EN/souscategorie/our-history>

Figur 12: Hentet fra powerpointen fra produsenten Sebia

7.0 Vedlegg

Vedlegg 1: Oppgaven gitt av AMB

Måling av frie, lette immunglobulinkjeder i serum – sammenlikning av 3 analyseprinsipper

Immunglobuliner består av tunge og lette kjeder. De produseres av plasmaceller, som normalt lager litt for mye lette kjeder i forhold til tunge. Overskuddet av lette kjeder utskilles i nyrenes glomeruli, og reabsorberes og nedbrytes i tubuli. Lite eller ingenting av overskuddet utskilles i urinen. Hos pasienter med myelomatose er det annerledes. Myelomatose-pasienter har en ondartet klon av plasmaceller i beinmargen, med stor produksjon av monoklonale antistoffer og utskillelse av frie, lette kjeder i urin. Ved hjelp av elektroforetiske teknikker kan vi påvise monoklonale komponenter i både serum og urin. Direkte kvantitering av frie, lette kjeder i serum har fått en viss betydning i klinikken, både til diagnostikk og til kontroll av behandling. Spesielt nyttig er slike målinger hos de ca. 20% av myelomatosepasientene som ikke lager komplette antistoff-molekyler, bare lette kjeder. Slike pasienter har som regel ikke påvisbare mengder av monoklonal komponent ved elektroforese av proteiner i serum, bare i urin, men måling av lette kjeder i serum viser unormale verdier.

Konsentrasjonsmåling av frie, lette kjeder i serum har sine problemer. Vi bruker en immunologisk-turbidimetrisk metode med nefelometrisk avlesning, Siemens BN ProSpec med reagenser fra instrumentprodusenten (N Latex FLC kappa og lambda). Både den metoden og den tilsvarende Freelite-metoden fra The Binding Site kan gi falskt svært for høye verdier hos enkelte pasienter, muligens på grunn av at de lette kjedene polymeriserer og lager mer turbiditet enn konsentrasjonen skulle tilsi. En ny ELISA-basert målemetode fra Sebia synes å kunne løse dette problemet [1].

Oppgaven består i å undersøke konsentrasjonen av frie, lette immunglobulinkjeder med 2 immunologiske målemetoder i serumprøver fra pasienter med unormal høy konsentrasjon, ca. 50 prøver (oppbevart i dypfryser). Den ene metoden er vår rutinemetode, den andre metoden er den nye ELISA-baserte metoden fra Sebia [1]. Prøvene skal også undersøkes med kapillærelektroforese, som blir å betrakte som en «fasit-metode». I mange prøver er det ikke påvisbare mengder av frie, lette kjeder ved kapillærelektroforese, men hvis en immunologisk metode i slike prøver «ser» betydelige konsentrasjoner (over 1 g/L), vet vi at den immunologiske metoden tar feil. Vi håper dette arbeidet vil vise om vår rutinemetode er god nok, eller om den bør erstattes av den nye ELISA-metoden.

Veiledere: Mari Meslo Lien (bioingeniør-faglig) og Arne Åsberg (medisinsk-faglig).

Referanser

1. Jacobs JFM, de Kat Angelino CM, Brouwers HMLM, Croockewit SA, Joosten I, van der Molen RG. Evaluation of a new free light chain ELISA assay: bringing coherence with electrophoretic methods. Clin Chem Lab Med 2018;56:312-322.

lokket tas av antisera-segmentet, pass på at det ikke er noen reagensdråper øverst i brønnene.

Dersom det finnes dråper, rist dem ned i væsken.

Hvert segment består av 7 brønner:

- buffer for analyse av ELP (gul)
- anti IgG (rosa)
- anti IgA (mørkeblå)
- anti IgM (gulgrønn)
- anti kappa, frie og bundne kjeder (lys grønn)
- anti lambda, frie og bundne kjeder (lys blå)
- spesifikk diluent til prøvefortynning (pH= 10)

Kalibrator



Sebia Protein kontroll normal brukes som kalibrant.

Sebia Protein kontroll normal	
Produsent	Sebia, Frankrike
Leverandør	Bergman Diagnostika AS, Lillestrøm
Produsent- / leverandørens artikkel nr.:	4785
Materialnummer i SAP:	4013733

Sebia protein kontroll normal består av normalt humant sera.

Løses i 1 mL rensset vann type 1, la stå 30 minutter. Bland. Løs 3 glass, fordeles i posjoner på 330 µL i polypropylenrør som merkes med medfølgende barkodeetikett. Holdbarhet: 1 uke i kjøleskap. Etter erfaring er reell holdbarhet 2-3 uker i kjøleskap. Segment med ferdigfortynnet kalibrant brukes til påfølgende kalibreringer. Etter erfaring er det holdbart 1 - 2 uker i kjøleskap.

Kontrollmateriale

Se prosedyre  Kontroller for faggruppe Protein, Seksjon spesiell biokjemi. AMB (Gyldig) 

Kontroller for faggruppe Protein, Seksjon spesiell biokjemi. AMB (Høringsrunde)

Analyseres en gang per s-elfo analysedag.


M-komponent kontroll

S-elfo: analyseres for hvert analyseoppsett.

IT: Analyseres når nytt kit taes i bruk. Anmerk på kittet at M-komp. ktr er analysert. Utskrift av IT settes i «Kontrollperm».

Tillaging: serumpool med 3 separate M-komponenter. Monoklonale komponenter av type IgA-kappa, IgM-kappa og IgG-lambda. Serum til fortynning er samlet fra prøver med lavt total protein og nedsatt polyklont gammaglobulin. Porsjoner a` 400 µL er fordelt i 0,5 mL nuncrør merket M-komp. Ktr. Oppbevaring: Fjernlager: -80 °C. Holdbarhet: +2-8 °C er etter erfaring holdbar i 2 uker. (IgA-k synker pga komplementet i β2-fraksjonen synker).

Hent ca. 5 porsjoner fra -80 fryseren når det trengs. Sett disse ved -20 °C. Analyseres 1 gang per s-elfo analysedag. Se i kontrollpermen for å se hvilke kapillær som står for tur å bli kontrollert.

Referansekurven= lagre en kurve som er uten flagg (H/L) fra dagens kjøring vha. ikon  «Save current curve as reference pattern». Kurven lages ny hver dag pga drift i instrumentet. Denne kurven kan legges over elfokurver for å sette riktig fraksjonsinndeling og ved hjelp til kvantitering av M-komp. Prøver med komponent i α - β-soner, markant økt polyklont γ-globulin i overgang mot β₂ er prøver som kan trenge justering av fraksjonsgrensene. Stå i skjermbilde med kurve av den aktuelle prøve, klikk oppe i skjermbildet på ikon for "Overlay reference pattern": Stå i "Minimum mode". Sett ny fraksjonsdeling ved å markere der fraksjonsgrensen skal settes.

Forarbeid av prøvene/arbeidlisten ELFO:

- Rekvirer kjent M-komponent.

Vedlegg 3: Prosedyre for tillaging av FLC Serumpool

Dokument «Frie kappa- og frie lambda-kjeder, kappa/lambda-ratio, Atellica NEPH 630. AM... Page 4 of 7

Ferdig til bruk, blandes forsiktig. Uåpnet kalibrator holdbart til utløpsdato. Åpnet kalibrator er holdbart i 42 dager ved 2-8 °C.

Består av stabilisert væske som inneholder humane proteiner av frie lette kjeder, humant serumalbumin og proteasehemmere. Konsentrasjonen av de frie lette kjedene (FLC), type kappa og type lambda, er kalibrert mot standard referansepreparat (Binding Site) og er lot-avhengig. Tilsatt **natrium azid** (<1 g/L).

Korreksjonsfaktor lambda-kjeder (utregningen utføres i ANP):

Periode 05.07.2019: $\lambda_{\text{korrr}} = 0,809 \times \lambda$.⁸⁾

Periode 08.07.2019 – 15.12.2019 : $\lambda_{\text{korrr}} = 0,88 \times \lambda$.⁸⁾

Nytt instrument, Atellica NEPH 630, tatt i bruk, 16.12.2019: Faktor er fjernet.

Kontrollmateriale

Nivå 1

Leverandørens artikkelnummer **N FLC Control SL1** OPJE03

Materialnummer i SAP: 4046709

Oppbevares ved 2-8 °C.

Ferdig til bruk, blandes forsiktig. Uåpnet kontroll holdbart til utløpsdato. Åpnet kontroll er holdbart i 28 dager ved 2-8 °C.

Består av stabilisert væske som inneholder humane proteiner av frie lette kjeder, humant serumalbumin og proteasehemmere. Konsentrasjonen av de frie lette kjedene (FLC), type kappa og type lambda, er kalibrert mot standard referansepreparat og er lot-avhengig.

Tilsatt **natrium azid** (<1 g/L).

Nivå 2

Egenprodusert: **FLC Serumpool** ID: 991601

Oppbevares i – 80 °C fryser. Hent ca. 4-5 stk for hver gang og lagre dem ved – 20 °C. **Ved analysering:** tines, blandes og overføres til hitachikopp. Bruk segment merket 8104 ved analysering. Kontrollglass med etikett merket FLC Serumpool, ID nr. 991601, settes foran hitachikoppen i segmentet.

Forbruk: en per uke, holder til ca. to analysedager. Refryse i mellom analysedag.


Tillaging:

- Fortynn et pasientserum med høye kappa-kjeder til ca 200 mg/L med normalserum. Lag ca. 40 mL.
- Fortynn et pasientserum med høye lambda-kjeder til ca. 200 mg/L med normalserum. Lag ca. 40 mL.
- Bruksløsning: slå sammen begge fortynningene (like volum av begge), ønsket konsentrasjon bør være ca 100 mg/L av både kappa- og lambda-kjedene.

Fryses i porsjoner på ca 400 µL ved – 80 °C, lag til forbruk i ca. 2 -3 år.

*Reagens skrevet med **rød skrift**: natriumazide er klassifisert som "meget giftig", men i stoffblanding < 0,1 % (<1 g/L) er det ikke klassifisert. Det betyr ingen krav til Sikkerhetsdatablad.*

Utførelse



- Bruk av instrumentet, se prosedyre:  Atellica NEPH 630, bruk og vedlikehold. AMB (Gyldig).
- Obs! angående Cleaner SCS, se under "Reagenser".
- Prøvevolum er 22,5 µL ved standard fortynning 1:100 (kappa) og 1:20 (lambda) (+ dødvolum: i 10*75 mm i reagensrør ca. 270 µL) og inkubasjonstid er 2 + 10 minutter.
- Evt. gå gjennom arbeidslisten "kappa" og sjekk pasienter med ekstremt høye resultat og evt. andre fortynning.
- Resultat utenfor akkreditert måleområde blir merket med blått og ? i AP. Disse resultatene krever kommentar, se under avsnittet "Måleområde".

Vedlegg 4: Oversikt over impresisjonskravet for ELISA-metoden fra Sebia

Specifications of Sebia FLC (1)

	Evaluation criteria	Specification
Assay	Antibody used	Polyclonal
	Calibration	5 RTU CAL +1 CTRL in single
	Stability	> 12 months post production
Samples	Serum stability	2-8°C up to 7 days, 1 month -20°C
	Lipemic samples	No interference*
	Ag excess	No, on tested samples
	Samples and CTRL dilution	1 standard (K and L): 1/1000 in single
	Out of range samples dilution	1/250; 1/10 000; 1/100 000*
Reproducibility	Reference values	Kappa: 5.15-15.3 mg/L Lambda: 8.23-18.1 mg/L Ratio: 0.37-1.44
	Within run	<10%*
	Between run	<15%*
	Lot-to-lot	<15%*



* Under validation by R&D


BEYOND SEPARATION 

Specifications of Sebia FLC (2)

	Evaluation criteria	Specification
Sensitivity at 1/1000	Kappa	2.5 mg/L
	Lambda	2.2 mg/L
Correlation	With Freelite	R ² >0.9*
Timing	Incubation Time	1h15 hours for 96 wells
	Handling time	Minimal
Interferences	Free Hb	No interference up to 5.5 g/L*
	Rheumatoid factor	In process *
	Bilirubin	No interference up to 347µmol/L*
Linearity	Linearity	Linear on the measurement range

* Under validation by R&D


BEYOND SEPARATION 

Vedlegg 5: Alle analyseresultater av frie, lette kjeden, kappa

Prøve	Freelite (mg/L)	N Latex FLC (mg/L)	ELISA mg/L		
			Parallell 1	Parallell 2	Gjennomsnitt av ELISA-parallellene
1	78	74,4	26	29	27,5
2	863	798	412	390	401
3	469	299	110	105	107,5
4	389	247	402	347	374,5
5	5200,0	4050	1312	1496	1404
6	568,0	504	142	153	147,5
7	1010,0	737	292	267	279,5
8	8810	10800	3241	3607	3424
9	968	1130	320	341	330,5
10	352	244	79,1	79,3	79,2
11	105	64,1	40	40	40
12	522	675	179	169	174
13	5090,0	3730,0	2834	3016	2925
14	2690,0	3100	1048	965	1006,5
15	6640,0	2720	1141	1113	1127
16	775,0	494	385	409	397
17	3060,0	2330	1030	1037	1033,5
18	1870	1410	447	484	465,5
19	5280	1580	668	684	676
20	3870,0	3320	984	735	859,5
21		1940	585	642	613,5
22		5180	2288	2055	2171,5
23		7780	4253	3973	4113
24		1290	490	469	479,5
25		8670	3178	3229	3203,5
26		631	438	392	415
27		482	229	225	227
28		127	56	50	53
29		335	188	204	196
30		549	207	210	208,5
31		3500	1440	1579	1509,5
32		1850	1110	1124	1117
33		5630	1838	1721	1779,5
34		3890	1320	1273	1296,5
35	OBS	8,2	6,2	5,9	6,05
36		4810	1430	1552	1491
37		40	25,5	27,6	26,55
38		13,9	18,6	17,4	18
39		1070	478	472	475
40		18,3	74	72	73

Vedlegg 6: Alle analyseresultater av frie, lette kjeden, lambda

Prøve	Freelite (mg/L)	N Latex FLC (mg/L)	ELISA (mg/L)		
			Parallell 1	Parallell 2	Gjennomsnitt mellom ELISA-parallellene
1	1150	574	463,6	523	493,3
2	Mangler	162	98,9	87,5	93,2
3	226	1110	301,4	283,6	292,5
4	74,6	85,3	42,6	39,3	40,95
5	7050	1570	429	420,5	424,75
6	1560	1740	456,6	468,9	462,75
7	68,5	98,5	42,2	37,3	39,75
8	1050	1680	388,4	376,8	382,6
9	1920	2270	528,3	546,6	537,45
10	28	122	35,4	34,1	34,75
11	49,1	28,8	13,8	13,7	13,75
12	61,1	106	37,5	35,4	36,45
13	377	986	235,7	241,3	238,5
14	1060	1140	168,6	154,7	161,65
15	560	967	130,6	118,8	124,7
16	610	98,2	46	42,8	44,4
17	681	840	133,7	134,1	133,9
18	501,0	539	170,7	171,1	170,9
19	245,0	128	112,9	113,6	113,25
20	812,0	91,5	23,6	21,3	22,45
21	7730,0	1140	287,5	306,5	297
22	1440,0	316	101	86,7	93,85
23	1660	298	144,4	140	142,2
24	557	202	65,2	63,3	64,25
25		123	319,5	322,9	321,2
26		377	161,7	150,5	156,1
27		2180	67,6	58,1	62,85
28		2290	587,3	549,7	568,5
29		3890	750	797	773,5
30		3030	634,5	636,2	635,35
31		2310	529,2	520,3	524,75
32		1180	731	687,4	709,2
33		927	143,6	139,2	141,4
34		64,8	30,1	31,2	30,65
35		100	45,8	43,6	44,7
36		46,7	22,5	22,7	22,6
37		18,6	18,1	18,6	18,35
38		34,4	34,6	32,6	33,6
39		167	54	52,2	53,1
40		18,5	11,5	11,7	11,6

Vedlegg 7: Utrekning av standardavvik og %CV av kappa-kjeder, analysert med ELISA

ELISA (mg/L) - Kappa									
Prøve	Parallell 1	Parallell 2	Gjennomsnitt	Differanse	Differanse^2	Varians	Standardavvik	%CV	%CV^2
1	6,2	5,9	6,1	0,3	0,1	0,0	0,2	3,5	12,3
2	18,6	17,4	18,0	1,2	1,4	0,7	0,8	4,7	22,2
3	25,5	27,6	26,6	-2,1	4,4	2,2	1,5	5,6	31,3
4	26,0	29,0	27,5	-3,0	9,0	4,5	2,1	7,7	59,5
5	40,0	40,0	40,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
6	56,0	50,0	53,0	6,0	36,0	18,0	4,2	8,0	64,1
7	74,0	72,0	73,0	2,0	4,0	2,0	1,4	1,9	3,8
8	79,1	79,3	79,2	-0,2	0,0	0,0	0,1	0,2	0,0
9	110,0	105,0	107,5	5,0	25,0	12,5	3,5	3,3	10,8
10	142,0	153,0	147,5	-11,0	121,0	60,5	7,8	5,3	27,8
11	179,0	169,0	174,0	10,0	100,0	50,0	7,1	4,1	16,5
12	188,0	204,0	196,0	-16,0	256,0	128,0	11,3	5,8	33,3
13	207,0	210,0	208,5	-3,0	9,0	4,5	2,1	1,0	1,0
14	229,0	225,0	227,0	4,0	16,0	8,0	2,8	1,2	1,6
15	292,0	267,0	279,5	25,0	625,0	312,5	17,7	6,3	40,0
16	320,0	341,0	330,5	-21,0	441,0	220,5	14,8	4,5	20,2
17	402,0	347,0	374,5	55,0	3025,0	1512,5	38,9	10,4	107,8
18	412,0	390,0	401,0	22,0	484,0	242,0	15,6	3,9	15,0
19	438,0	392,0	415,0	46,0	2116,0	1058,0	32,5	7,8	61,4
20	385,0	409,0	397,0	-24,0	576,0	288,0	17,0	4,3	18,3
21	490,0	469,0	479,5	21,0	441,0	220,5	14,8	3,1	9,6
22	478,0	472,0	475,0	6,0	36,0	18,0	4,2	0,9	0,8
23	447,0	484,0	465,5	-37,0	1369,0	684,5	26,2	5,6	31,6
24	585,0	642,0	613,5	-57,0	3249,0	1624,5	40,3	6,6	43,2
25	668,0	684,0	676,0	-16,0	256,0	128,0	11,3	1,7	2,8
26	984,0	735,0	859,5	249,0	62001,0	31000,5	176,1	20,5	419,6
27	1048,0	965,0	1006,5	83,0	6889,0	3444,5	58,7	5,8	34,0
28	1030,0	1037,0	1033,5	-7,0	49,0	24,5	4,9	0,5	0,2
29	1141,0	1113,0	1127,0	28,0	784,0	392,0	19,8	1,8	3,1
30	1110,0	1124,0	1117,0	-14,0	196,0	98,0	9,9	0,9	0,8
31	1320,0	1273,0	1296,5	47,0	2209,0	1104,5	33,2	2,6	6,6
32	1312,0	1496,0	1404,0	-184,0	33856,0	16928,0	130,1	9,3	85,9
33	1430,0	1552,0	1491,0	-122,0	14884,0	7442,0	86,3	5,8	33,5
34	1440,0	1579,0	1509,5	-139,0	19321,0	9660,5	98,3	6,5	42,4
35	1838,0	1721,0	1779,5	117,0	13689,0	6844,5	82,7	4,6	21,6
36	2288,0	2055,0	2171,5	233,0	54289,0	27144,5	164,8	7,6	57,6
37	2834,0	3016,0	2925,0	-182,0	33124,0	16562,0	128,7	4,4	19,4
38	3178,0	3229,0	3203,5	-51,0	2601,0	1300,5	36,1	1,1	1,3
39	3241,0	3607,0	3424,0	-366,0	133956,0	66978,0	258,8	7,6	57,1
40	4253,0	3973,0	4113,0	280,0	78400,0	39200,0	198,0	4,8	23,2
								%CV^2 gjennomsnitt	36,028
								%CV	6,00

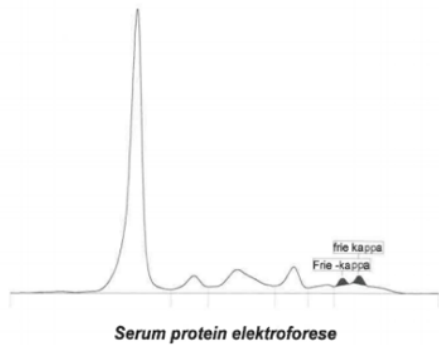
Vedlegg 8: Utrekning av standardavvik og %CV av lambda-kjeder, analysert med ELISA

Prøve	ELISA (mg/L) - Lambda								
	Parallell 1	Parallell 2	Gjennomsnitt	Differanse	Differanse^2	Varians	Standardavvik	%CV	%CV^2
1	11,5	11,7	11,6	-0,2	0,0	0,0	0,1	1,2	1,5
2	13,8	13,7	13,8	0,1	0,0	0,0	0,1	0,5	0,3
3	18,1	18,6	18,4	-0,5	0,3	0,1	0,4	1,9	3,7
4	23,6	21,3	22,5	2,3	5,3	2,6	1,6	7,2	52,5
5	22,5	22,7	22,6	-0,2	0,0	0,0	0,1	0,6	0,4
6	30,1	31,2	30,7	-1,1	1,2	0,6	0,8	2,5	6,4
7	34,6	32,6	33,6	2,0	4,0	2,0	1,4	4,2	17,7
8	35,4	34,1	34,8	1,3	1,7	0,8	0,9	2,6	7,0
9	37,5	35,4	36,5	2,1	4,4	2,2	1,5	4,1	16,6
10	42,2	37,3	39,8	4,9	24,0	12,0	3,5	8,7	76,0
11	42,6	39,3	41,0	3,3	10,9	5,4	2,3	5,7	32,5
12	46,0	42,8	44,4	3,2	10,2	5,1	2,3	5,1	26,0
13	45,8	43,6	44,7	2,2	4,8	2,4	1,6	3,5	12,1
14	54,0	52,2	53,1	1,8	3,2	1,6	1,3	2,4	5,7
15	67,6	58,1	62,9	9,5	90,2	45,1	6,7	10,7	114,2
16	65,2	63,3	64,3	1,9	3,6	1,8	1,3	2,1	4,4
17	98,9	87,5	93,2	11,4	130,0	65,0	8,1	8,6	74,8
18	101,0	86,7	93,9	14,3	204,5	102,2	10,1	10,8	116,1
19	112,9	113,6	113,3	-0,7	0,5	0,2	0,5	0,4	0,2
20	130,6	118,8	124,7	11,8	139,2	69,6	8,3	6,7	44,8
21	133,7	134,1	133,9	-0,4	0,2	0,1	0,3	0,2	0,0
22	143,6	139,2	141,4	4,4	19,4	9,7	3,1	2,2	4,8
23	144,4	140,0	142,2	4,4	19,4	9,7	3,1	2,2	4,8
24	161,7	150,5	156,1	11,2	125,4	62,7	7,9	5,1	25,7
25	168,6	154,7	161,7	13,9	193,2	96,6	9,8	6,1	37,0
26	170,7	171,1	170,9	-0,4	0,2	0,1	0,3	0,2	0,0
27	235,7	241,3	238,5	-5,6	31,4	15,7	4,0	1,7	2,8
28	301,4	283,6	292,5	17,8	316,8	158,4	12,6	4,3	18,5
29	287,5	306,5	297,0	-19,0	361,0	180,5	13,4	4,5	20,5
30	319,5	322,9	321,2	-3,4	11,6	5,8	2,4	0,7	0,6
31	388,4	376,8	382,6	11,6	134,6	67,3	8,2	2,1	4,6
32	429,0	420,5	424,8	8,5	72,3	36,1	6,0	1,4	2,0
33	456,6	468,9	462,8	-12,3	151,3	75,6	8,7	1,9	3,5
34	463,6	523,0	493,3	-59,4	3528,4	1764,2	42,0	8,5	72,5
35	529,2	520,3	524,8	8,9	79,2	39,6	6,3	1,2	1,4
36	528,3	546,6	537,5	-18,3	334,9	167,4	12,9	2,4	5,8
37	587,3	549,7	568,5	37,6	1413,8	706,9	26,6	4,7	21,9
38	634,5	636,2	635,4	-1,7	2,9	1,4	1,2	0,2	0,0
39	731,0	687,4	709,2	43,6	1901,0	950,5	30,8	4,3	18,9
40	750,0	797,0	773,5	-47,0	2209,0	1104,5	33,2	4,3	18,5
								%CV^2 gjennomsnitt	21,917
								%CV	4,68

Vedlegg 9: Prøveresultater av kappa-kjeder med kapillærelektroforese

Prøvenr : ⑧ - K
 Navn: kappa-18
 Fødselnr:
 Prøve tatt dato:
 Rekvirent

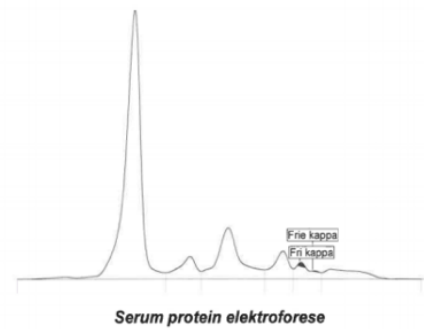
Dato : 01/04/2020
 Capillarys samplenr: 48



Peaks	%	g/L
Frie -kappa	0,8	0,4
frie kappa	1,0	0,6

Prøvenr : ⑤
 Navn: kappa-15
 Fødselnr:
 Prøve tatt dato:
 Rekvirent

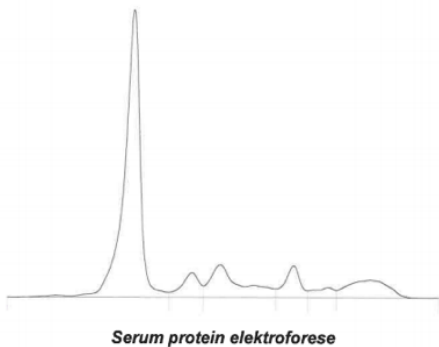
Dato : 01/04/2020
 Capillarys samplenr: 45



Peaks	%	g/L
Fri kappa	0,3	0,2
Frie kappa	0,1	0,1

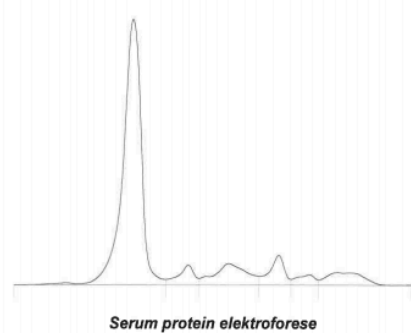
Prøvenr : ⑦ - K
 Navn: kappa-17
 Fødselnr:
 Prøve tatt dato:
 Rekvirent

Dato : 01/04/2020
 Capillarys samplenr: 47



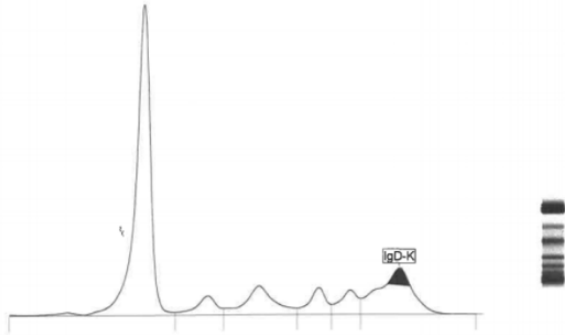
Prøvenr : ⑨ - K
 Navn: kappa-23
 Fødselnr:
 Prøve tatt dato:
 Rekvirent

Dato : 01/04/2020
 Capillarys samplenr: 49



Prøve 13

Dato : ~~02/04/2020~~
Capillary sampler: 16

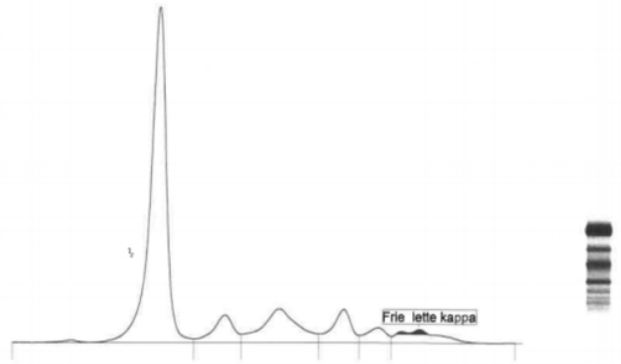


Serum protein elektroforese

Peaks	%	g/L
IgD-K	2,4	1,7

Prøve 14

Capillary sampler: 17

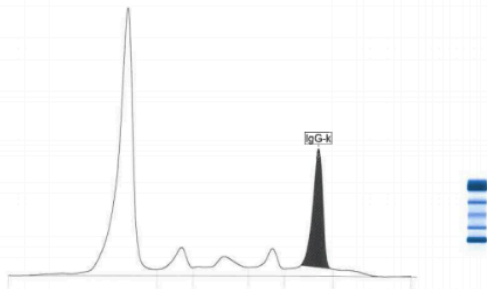


Serum protein elektroforese

Peaks	%	g/L
Frie lette kappa	0,9	0,5

Prøvenr :
 Navn: 15
 Fødselnr.:
 Prøve tatt dato:
 Rekvirent

Dato : 02/04/2020
 Capillary sampler: 13

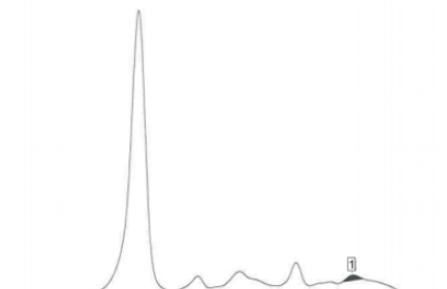


Serum protein elektroforese

Peaks	%	g/L
IgG-k	16,1	10,0

Prøvenr :
 Navn: 17
 Fødselnr.:
 Prøve tatt dato:
 Rekvirent

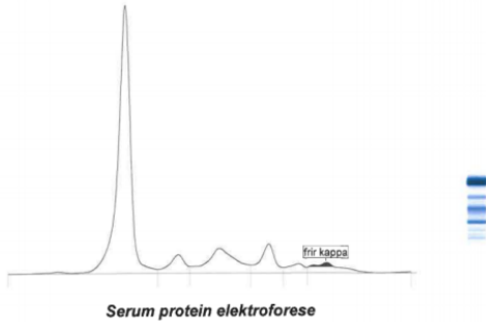
Dato : 02/04/2020
 Capillary sampler: 15



Serum protein elektroforese

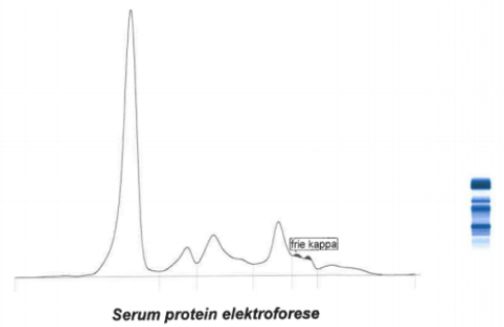
Peaks	%	g/L
1	0,8	0,5

Prøvenr: Dato: 02/04/2020
 Navn: 20 Capillarys samplenr: 18
 Fødselnr:
 Prøve tatt dato:
 Rekvirent



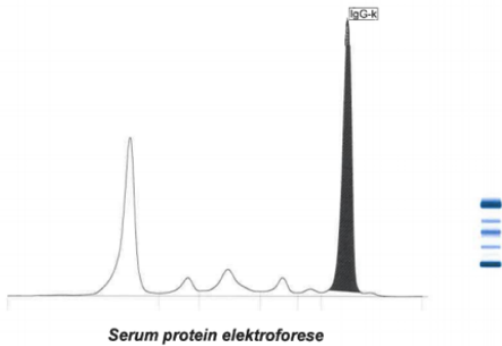
Peaks	%	g/L
frir kappa	0,9	0,5

Prøvenr: Dato: 02/04/2020
 Navn: 22 Capillarys samplenr: 20
 Fødselnr:
 Prøve tatt dato:
 Rekvirent



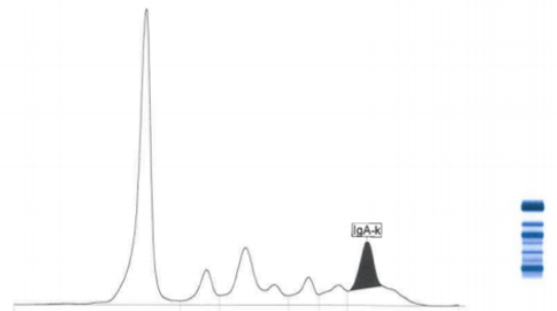
Peaks	%	g/L
frie kappa	0,4	0,2

Prøvenr: Dato: 02/04/2020
 Navn: 24 Capillarys samplenr: 22
 Fødselnr:
 Prøve tatt dato:
 Rekvirent



Peaks	%	g/L
IgG-k	40,5	40,1

Prøvenr: Dato: 02/04/2020
 Navn: 32 Capillarys samplenr: 30
 Fødselnr:
 Prøve tatt dato:
 Rekvirent



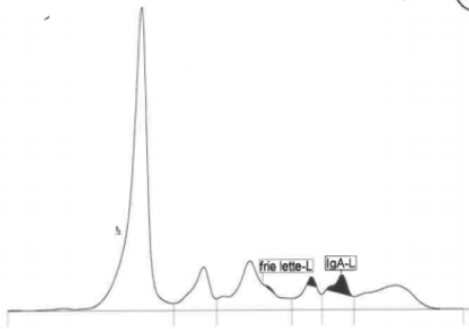
Peaks	%	g/L
IgA-k	7,5	4,9

Vedlegg 10: Prøveresultater av lambda-kjeder med kapillærelektroforese

Dato : 16/03/2011

Capillary samplenr: 33

Prøve (1)



Serum protein elektroforese

Peaks	%	g/L
frie lette-L	0,2	0,1
IgA-L	2,6	1,8

Prøvenr :

Navn: 5

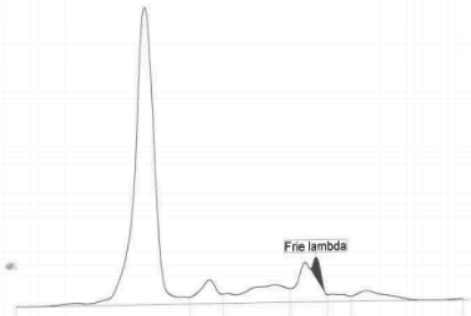
Fødselnr:

Prøve tatt dato:

Rekvirent

Dato : 23/04/2020

Capillary samplenr: 33



Serum protein elektroforese

Peaks	%	g/L
Frie lambda	1,8	1,1

Prøvenr :

Navn: 6

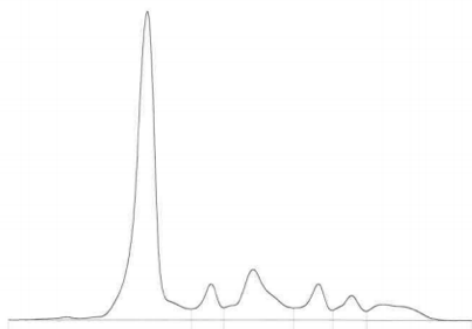
Fødselnr:

Prøve tatt dato:

Rekvirent

Dato : 15/04/2020

Capillary samplenr: 70



Serum protein elektroforese

Prøvenr :

Navn: 14-11

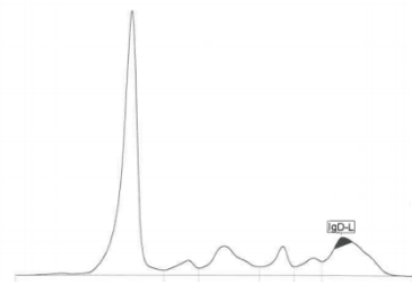
Fødselnr:

Prøve tatt dato:

Rekvirent

Dato : 15/04/2020

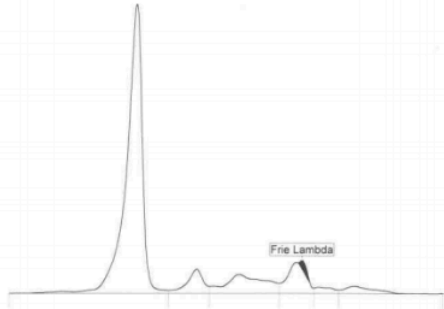
Capillary samplenr: 78



Serum protein elektroforese

Peaks	%	g/L
IgD-L	1,2	0,9

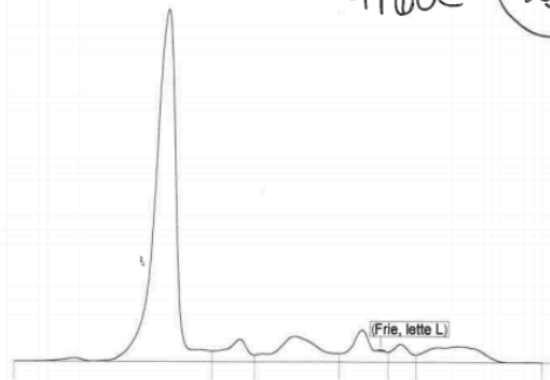
Prøvenr : Dato : 15/04/2020
 Navn: 21-14 Capillarys samplenr: 85
 Fødselnr:
 Prøve tatt dato:
 Rekvirent



Serum protein elektroforese

Peaks	%	g/L
Frie Lambda	1,0	0,6

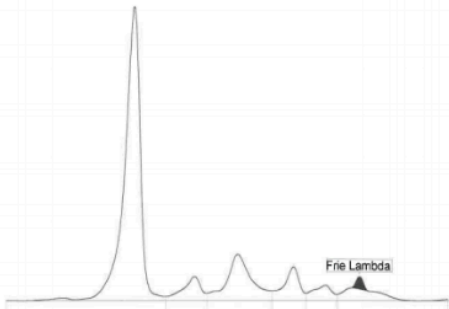
Prøve 23



Serum protein elektroforese

Peaks	%	g/L
(Frie, lette L)	0,1	0,1

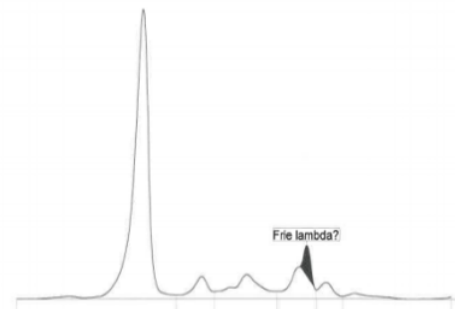
Prøvenr : Dato : 15/04/2020
 Navn: 25 Capillarys samplenr: 89
 Fødselnr:
 Prøve tatt dato:
 Rekvirent



Serum protein elektroforese

Peaks	%	g/L
Frie Lambda	1,2	0,7

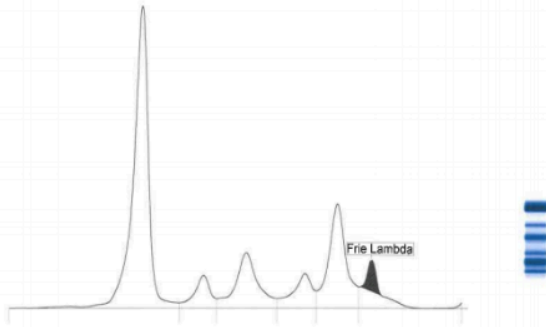
Prøvenr : Dato : 15/04/2020
 Navn: 28 Capillarys samplenr: 91
 Fødselnr:
 Prøve tatt dato:
 Rekvirent



Serum protein elektroforese

Peaks	%	g/L
Frie lambda?	3,1	1,9

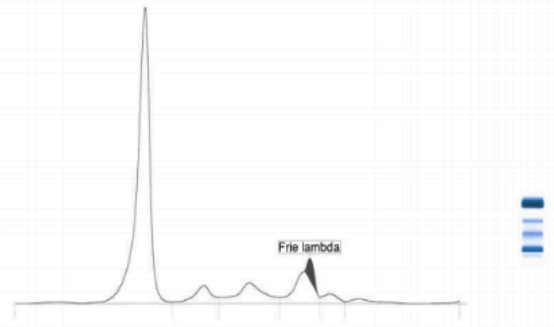
Prøvenr : Dato : 15/04/2020
 Navn: 29 Capillarys samplenr: 92
 Fødselnr:
 Prøve tatt dato:
 Rekvirent



Serum protein elektroforese

Peaks	%	g/L
Frie Lambda	2,7	1,7

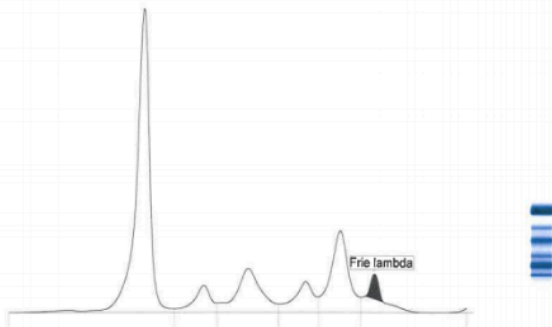
Prøvenr : Dato : 15/04/2020
 Navn: 30 Capillarys samplenr: 93
 Fødselnr:
 Prøve tatt dato:
 Rekvirent



Serum protein elektroforese

Peaks	%	g/L
Frie lambda	2,6	1,6

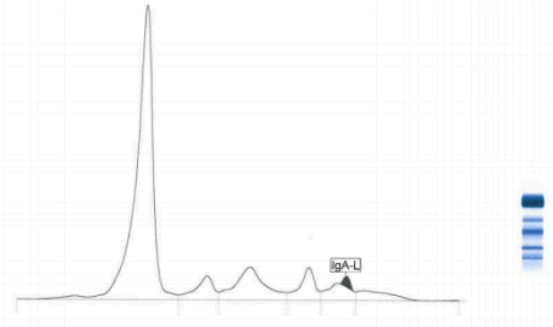
Prøvenr : Dato : 15/04/2020
 Navn: 31 Capillarys samplenr: 94
 Fødselnr:
 Prøve tatt dato:
 Rekvirent



Serum protein elektroforese

Peaks	%	g/L
Frie lambda	2,4	1,6

Prøvenr : Dato : 15/04/2020
 Navn: 32 Capillarys samplenr: 95
 Fødselnr:
 Prøve tatt dato:
 Rekvirent



Serum protein elektroforese

Peaks	%	g/L
IgA-L	1,0	0,7