

Dal meeting

"Le proteine dal Laboratorio alla clinica"

X edizione - Castrocaro, 24 - 26 ottobre 2001

Organizzato da: CEFAR – Centro Europeo per la Formazione e la Ricerca in Scienze Sanitarie e in Biotecnologie
Patrocinio di: SIBioC – Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica

Determinazione ImmunoNefelometrica delle Catene Leggere Libere delle Immunoglobuline nelle urine per la ricerca delle Proteine di Bence Jones e confronto con l'Immunofissazione

Marzia Quinzanini

Servizio di Reumatologia Immunologia ed Allergologia – Azienda Ospedaliera “Spedali Civili” di Brescia

Indice

- ❑ Abbreviazioni non standard
- ❑ Parole chiave
- ❑ Sommario
- ❑ Introduzione
- ❑ Obiettivi, Metodologia, Campioni
- ❑ Materiali e Metodi
- ❑ Valutazione Performance analitiche
- ❑ Valutazione dei Campioni e confronto IN-FLC / IFE
- ❑ Conclusioni
- ❑ Bibliografia
- ❑ Tablelle
- ❑ Figure

Abbreviazioni non standard

BJP	(Bence Jones Proteins) Proteine di Bence Jones
EF	(Electrophoresis) Elettroforesi
FLC	(Free Light Chains) Catene Leggere Libere
FRK	(Kappa Free Light Chains) Catene Leggere Libere kappa
FRL	(Lambda Free Light Chains) Catene Leggere Libere Lambda
IFE	(Immunofixation) Immunofissazione
IN-FLC	(FLC ImmunoNephelometry) ImmunoNefelometria Catene Leggere Libere
LPIP	(Liquid Phase Immunoprecipitation) ImmunoPrecipitazione in Fase Liquida
LC(b&f)	(Total Light Chains (bound & free)) Catene Leggere Totali (libere & legate)
MC	(Monoclonal Component) Componente Monoclonale
Ig	(Immunoglobulins) Immunoglobuline
MGUS	(Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance) Gammopatia Monoclonale di significato non determinato
BDL	(Biological Detection Limit) Limite di Rilevazione Biologico
SS	(Spiked Sample) Campione "Corretto"
BS	(Blank Sample) Bianco Campione

Parole Chiave

Proteine di Bence Jones, Catene Leggere Libere kappa, Catene Leggere Libere lambda

Key Words

Bence Jones Protein, Kappa Free Light Chains, Lambda Free Light Chains

Sommario

Abbiamo valutato un kit commerciale per la determinazione immunonefelometrica diretta su urine non concentrate delle catene leggere libere kappa e lambda (FRK – FRL) delle immunoglobuline eseguita su nefelometro automatico al fine di verificare la sua utilizzazione nell'ambito dei metodi per la ricerca delle Proteine di Bence Jones (BJP).

Il kit è basato su un reagente antisiero con reattività contro gli epitopi "nascosti" – "hidden" delle catene leggere, cioè quelli che non sono espressi quando la catena leggera è legata alla catena pesante della immunoglobulina.

Abbiamo verificato anzitutto le seguenti performance analitiche:

- riproducibilità delle curve di calibrazione, linearità e parallelismo, imprecisione: molto buona
- sensibilità: limite analitico – FRK = 0,8 mg/l – FRL = 0,5 mg/l; limite biologico: FRK e FRL = 3 mg/l
- cross reazione con Ig intere: praticamente assente
- eccesso di antigene: non dimostrabile fino a oltre 30.000 mg/l

Abbiamo poi verificato la valenza qualitativa del metodo, cioè la capacità del metodo di fungere da campanello d'allarme sufficientemente affidabile

nell'individuare i campioni sicuramente negativi e quelli in cui la presenza di Catene Leggere Libere suggerisce l'esecuzione della Immunofissazione al fine di determinarne la mono o policlonalità.

Per questo obiettivo abbiamo eseguito in parallelo la determinazione nefelometrica e la Immunofissazione su tutti i campioni di urine pervenuti al nostro Laboratorio con la richiesta di ricerca Proteine Bence Jones in tre diversi periodi di tre mesi ciascuno tra il '98 e il '99 per un totale di 572 campioni appartenenti a 526 pazienti.

Complessivamente il metodo, per le sue caratteristiche di semplicità, rapidità, automazione e affidabilità si è ben collocato quale test di primo livello nella nostra procedura di routine per la ricerca qualitativa delle Proteine di Bence Jones (BJP).

Tali caratteristiche, unite alla disponibilità del metodo per i più diffusi nefelometri, consente di ipotizzare che esso possa assumere un ruolo nel processo che tenda a dare uniformità alla qualità della risposta nel campo delle ricerche delle BJP.

La valenza quantitativa del metodo potrebbe trovare utilizzo, pur con molti limiti e precisazioni, nel follow up delle Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance (MGUS), del mieloma e della gammopatie in generale.

Introduzione

La ricerca qualitativa e la determinazione quantitativa delle Proteine di Bence Jones (BJP) e delle Catene Leggere Libere (FLC), analogamente a quanto è per le altre immunoglobuline (Ig), è più complessa rispetto a quella delle altre proteine, e tale complessità è legata alla caratteristica eterogeneità delle immunoglobuline e dei loro frammenti.

Anomalia frequente delle Ig e loro frammenti è la riduzione della eterogeneità per dar luogo alla così detta Componente Monoclonale – Monoclonal Component (MC) che, nel caso delle FLC in urine, si identifica nella BJP; l'anomalia che caratterizza la BJP è la ridotta eterogeneità delle FLC presenti nelle urine.

E forse non è una mera coincidenza che, all'eterogeneità delle Ig e loro componenti e alla variabilità di tale eterogeneità, come segno patologico faccia riscontro una ampia eterogeneità di situazioni cliniche e sub-cliniche in cui non sembra al momento potersi intravedere un unico filo conduttore.

Tralasciando gli aumenti policlonali di Ig del lupus, artrite reumatoide, ecc., e soffermandoci invece sulle così dette Componenti Monoclonali – Monoclonal Component (MC), bisogna dire che esse caratterizzano da una parte situazioni cliniche molteplici e dall'altra una situazione sub-clinica la cui corrente definizione, Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance (MGUS), dà conto dell'incertezza della materia. E le BJP non fanno eccezione a quanto detto potendo trattarsi di MGUS e di mieloma, o di amiloidosi AL e di Malattia da deposito di catene leggere - Light Chain Deposition Disease (LCDD).

In questo ambito il Laboratorio è richiesto di valutare la presenza e l'entità delle anomalie delle Ig e loro frammenti, come già sopra accennato, e tra queste un posto di riguardo ha la ricerca delle BJP nelle urine. Nella valutazione di tali anomalie le tecniche separative e le tecniche immunologiche singolarmente utilizzate mostrano importanti limiti mentre l'uso combinato di entrambi i tipi di tecniche garantisce i migliori risultati. La ricerca delle BJP è resa ancor più incerta e complessa dal particolare metabolismo delle FLC che la costituiscono e che coinvolge la funzione renale e, conseguentemente, dall'essere la loro valutazione oltretutto "campione-dipendente".

Dal punto di vista qualitativo, la stessa definizione di BJP, cioè FLC monoclonali in urine, implica che la **ricerca della loro presenza** deve tenere conto di due caratteristiche:

- individualità antigenica o composizione
Si deve accertare l'effettiva presenza di FLC nel campione o nella frazione e per ciò è indispensabile una tecnica immunochimica specifica per le FLC.
- mobilità elettroforetica o distribuzione:
monoclonali, cioè omogenee, o policlonali, eterogenee.

Questa caratteristica dovrà essere indagata con tecniche elettroforetiche o che comunque prevedano l'elettroforesi.

La verifica contemporanea di entrambe le caratteristiche nella pratica attuale di Laboratorio è possibile solo con un metodo che sia al tempo stesso elettroforetico e immunologico, condizione realizzata dalla IFE che è in realtà un "protocollo" costituito da due tecniche: la tecnica separativa è l'elettroforesi, a cui segue, quale tecnica immunologica, l'ImmunoPrecipitazione su Supporto.

L'alternativa è quella di scindere il problema nelle due componenti predisponendo protocolli di due o più metodi che siano in grado di verificare "composizione" e "distribuzione" separatamente.

Il tentativo è quello di utilizzare un test di primo livello che sia di screening per una delle due caratteristiche seguito, sui campioni positivi al primo, da un test di secondo livello che verifichi la seconda caratteristica, disgiuntamente o congiuntamente alla prima.

A seconda di quale dei due parametri viene scelto per lo screening si possono formalizzare **due tipi di protocolli**:

- parametro di screening: distribuzione - test di primo livello: Elettroforesi.
- parametro di screening: composizione - test di primo livello: ImmunoPrecipitazione in fase Liquida (LPIP) diretta - nefelometria/turbidimetria specifica per le FLC, LPIP indiretta - nefelometria /turbidimetria di LC (b&f) e Ig e relativi "indici".

Per quanto riguarda la valutazione quantitativa, cioè la concentrazione delle BJP, essa sembrerebbe avere importanza soprattutto nel follow up delle MGUS, del mieloma e delle altre gammopatie.

Similmente a ciò che è per gli altri analiti "assenti" (o quasi) nel soggetto normale e la cui presenza è, per ciò stesso, segno di "anormalità", e quindi campanello di allarme di una potenziale malattia, anche per le BJP (e le FLC) il metodo o il protocollo "perfettamente efficace" sarà quello caratterizzato da:

- a. **nessun "falso negativo"**
E' la caratteristica principale e irrinunciabile e di conseguenza per essa si richiede la massima riproducibilità intra ed inter-laboratorio; cioè è primariamente importante che il campione risulti BJP-positivo o BJP-negativo in tutti i Laboratori.
- b. **nessun "falso positivo"**
L'efficacia diminuisce man mano che aumenta il numero di "falsi positivi".
- c. **buona "precisione" e "accuratezza"**
La valenza di questo elemento dipende da quanto è sentita l'esigenza della determinazione quantitativa; ma non bisogna tralasciare che la "precisione" incide sulla riproducibilità e la "accuratezza" incide sulla possibilità di confrontare le performance delle diverse metodiche.

Ne consegue che nella valutazione dei metodi per la ricerca della BJP si dovranno tenere presenti, come per qualsiasi altro analita, i parametri:

- i) limite di sensibilità analitica: cioè la più piccola quantità di analita in un qualsiasi campione reale rilevabile con sufficiente affidabilità e riproducibilità (intra e interlaboratorio)
- ii) specificità analitica del segnale di positività
- iii) riproducibilità del segnale di positività
- iv) affidabilità dell'esecuzione:
manuale, semi-automatico, automatico;
identificazione del campione, ecc.
- v) affidabilità dell'interpretazione del risultato:
soggettiva, semi-soggettiva, oggettiva

La valutazione dei punti suddetti, escluso il iv), dovrà tener conto che la ricerca delle BJP in urine è "**campione-dipendente**":

- da una parte la concentrazione di BJP a parità di produzione è influenzata dalla diuresi,
- dall'altra le performance dei metodi potrebbero essere influenzate dalla variabilità della proteinuria, da fisiologica a mista (tipo siero diluito con l'aggiunta di componenti tubulari micromolecolari).

E' fuor di dubbio che nella ricerca delle BJP, pur così delicata, si è andata sviluppando una miriade di approcci che partono dal tipo di campione da utilizzare e del metodo e/o protocollo analitico, per arrivare all'interpretazione del risultato e alla modalità e linguaggio della refertazione. In realtà, probabilmente per la stessa natura delle BJP, non solo manca un qualsiasi standard e controllo, seppur imperfetto e provvisorio, ma mancano indicazioni chiare dei criteri di valutazione e scelta dei metodi e dei criteri di refertazione e interpretazione del risultato.

Obiettivi – Metodologia – Campioni

Da alcuni anni sono disponibili commercialmente kit per la determinazione immunonefelometrica diretta (su urine non concentrate) delle catene leggere libere kappa e lambda su nefelometro automatico. Il kit è basato su un reagente antisiero con reattività contro gli epitopi "nascosti" – "hidden" delle catene leggere, cioè quelli che non sono espressi quando la catena leggera è legata alla catena pesante della immunoglobulina.

Obiettivo generale del lavoro è valutare la correttezza dell'inserimento della determinazione nefelometrica delle FLC (IN-FLC) con il kit in questione nel protocollo di routine della ricerca delle BJP quale test di primo livello atto a individuare con sufficiente affidabilità i campioni sicuramente negativi e quelli in cui la presenza di FLC suggerisce l'esecuzione della IFE al fine di determinare la mono o policlonalità.

Più precisamente l'obiettivo era verificare se l'uso di questo protocollo potesse offrire concreti vantaggi in

termini di oggettività e uniformità del risultato finale rispetto all'uso dell'EF e della IFE notoriamente affette:

- a. da una certa mancanza di riproducibilità sia intra-laboratorio sia inter-laboratorio anche a parità di prodotto commerciale utilizzato (1);
- b. dall'esecuzione semi-automatica, almeno nella nostra realtà, e quindi con possibilità di errore nell'identificazione del campione;
- c. e infine dalla soggettività dell'interpretazione del risultato.

In altre parole, se il metodo IN-FLC si fosse dimostrato analiticamente affidabile nel rilevare la presenza di FLC nel campione, questo dato sarebbe servito da base obbiettiva e riproducibile, da punto fermo, per identificare i campioni da considerare BJP-negativi rispetto a quelli potenzialmente BJP-positivi da sottoporre ad IFE di qualità tale da evidenziare le FLC policlonali o monoclonali (BJP) rilevate dalla IN-FLC. In tal senso la IN-FLC sarebbe servita da controllo della qualità della IFE: evitare scambi di campioni e inversione di antisieri, orientare su quanto concentrare il campione, ecc.

In questa ottica abbiamo anzitutto verificato le performance analitiche del metodo IN-FLC.

Abbiamo poi verificato la valenza qualitativa del metodo come test di primo livello nel senso sopra indicato e perciò abbiamo eseguito in parallelo la IN-FLC (determinazione nefelometrica) e la IFE su tutti i campioni di urine pervenuti al nostro Laboratorio con la richiesta di ricerca Proteine Bence Jones in tre diversi periodi di tre mesi ciascuno tra il '98 e il '99 per un totale di 572 campioni appartenenti a 526 pazienti.

Si deve precisare che le richieste di ricerca della BJP che pervengono al Laboratorio di ImmunoEmatologia sono per la stragrande maggioranza "mirate", sostenute da motivazioni cliniche precise, sospetto diagnostico o follow-up.

I risultati sono stati confrontati e analizzati solo a posteriori; per tale motivo la verifica di situazioni dubbie è stata eseguita solo su pochi campioni.

Materiali e Metodi

A. Determinazione ImmunoNefelometrica delle Catene Leggere Libere (IN-FLC)

Abbiamo utilizzato il kit codice K.BNA.FRK.FRL della ditta "New Scientific Company" (New Scientific Company – Cormano (Milano) – Italia) sul nefelometro BNII della ditta "Dade – Behring" (Dade – Behring – Milano – Italia).

Le procedure di calibrazione e di analisi sono quelle proposte dal produttore.

Il kit comprende i reagenti e i calibratori per entrambe le catene leggere.

Il produttore dichiara che i calibratori sono costituiti da una opportuna diluizione di urina proveniente da paziente con Mieloma Micromolecolare e contenente solo la Bence Jones senza altre proteine.

La concentrazione del calibratore è indicata in ≈ 20 mg/dl sia per kappa sia per lambda ed è ottenuta per standardizzazione interna misurando le proteine Totali col metodo di Bradford.

Come prescritto dal produttore, le urine sono state esaminate non concentrate.

Il protocollo analitico di programmazione del BNII per l'esecuzione del test si è evoluto nel tempo e dal '99 prevede:

- l'esecuzione della "pre-reaazione" al fine di controllare il fenomeno dell'eccesso di antigene;
- la curva di calibrazione a 5 punti da 5 a 80 mg/l;
- la ripetizione automatica su campione a maggiore diluizione per i segnali che eccedono il punto più alto della curva (80 mg/l);
- la "interpolazione a zero" della curva che consente di avere risultati in concentrazione anche per valori di segnale inferiori al punto più basso della curva (5 mg/l).

B. Elettroforesi (s-EF) e Immunofissazione del siero (s-IFE)

Abbiamo utilizzato l'apparecchiatura Hydrasys della Ditta "Sebia" (Sebia ecc.) e i kit della stessa.

Il metodo è quello suggerito dal produttore.

C. Immunofissazione delle urine standard (u-IFE)

E' stata utilizzata l'apparecchiatura Hydrasys di Sebia e i kit della stessa. Gli antisieri anti Catene Leggere Libere sono di Sebia o di New Scientific Company.

La u-IFE è stata eseguita per tutte le urine sul campione concentrato 25 volte con il metodo previsto dal produttore per la IFE serica.

Su 236 urine è stata anche eseguita la IFE sul campione non concentrato secondo la relativa metodica del produttore.

D. Elettroforesi e Immunofissazione urine – Protur (u-EF-Protur, u-IFE-Protur)

In pochi casi (15 in tutto) è stato utilizzato il kit Protur-HISI e Protur Plus di Beckman-Coulter.

Valutazione Performance analitiche

Riportiamo i risultati della valutazione delle performance del metodo.

Campioni urine positivi BJP

Per alcune di tali prove abbiamo selezionato i campioni tra i 9 campioni BJP positivi: 5 BJ-kappa e 4 BJ-lambda già oggetto delle valutazioni multicentriche dei Gruppi Forlì e Liguria; ai campioni è stata assegnata come concentrazione teorica di BJP la media delle concentrazioni riscontrata nelle multicentriche (Tab. 1).

A) Curve di calibrazione e riproducibilità

Come già detto, la parametrizzazione del metodo standard prevede la curva di calibrazione a 5 punti, range 5 – 80 mg/l, e l'interpolazione a zero cioè l'estensione rettilinea dal punto più basso (5 mg/l) all'origine degli assi. (Figura 1)

Questo consente di avere valori in concentrazione anche per segnali inferiori al punto più basso della curva e quindi consente di discriminare tra un campione appena

più basso di 5 mg/l, per esempio 4,99 mg/l, e un campione decisamente più basso, per esempio 1 mg/l.

Abbiamo confrontato le sei curve di calibrazione ottenute negli ultimi otto mesi con quattro diversi lotti e quella riportata sul foglio di accompagnamento del prodotto. I risultati sono riportati in Tabella 2 e 3 e relative figure.

Il coefficiente di variazione complessivo è risultato più che accettabile, essendo compreso per FRK tra 7,6% e 24,2% e per FRL tra 8,6% e 21,8%.

B) Limite di Linearità e Parallelismo

Pur non essendo obiettivo di questo lavoro la valutazione delle performance della IN-FLC per il dosaggio quantitativo delle BJP e il confronto con quelle degli altri metodi, abbiamo ritenuto opportuno affrontare l'argomento sia per completezza della valutazione sia per l'influenza che questi parametri possono avere sulla sensibilità.

Una delle critiche frequentemente mosse alla determinazione immunochimica delle BJP (e più in generale delle Ig-monoclonali) è la mancanza di parallelismo tra andamento della reazione del calibratore e andamento della reazione del campione (2, 3). Poiché le FLC o le BJP del Calibratore possono essere antigenicamente diverse dalle FLC o BJP del Campione, esse possono reagire in maniera diversa, non proporzionale, con gli anticorpi anti FLC dell'antisiero. La mancanza di parallelismo si esprime con una imprevedibile mancanza di accuratezza, che sarebbe caratteristica specifica della singola BJP, e teoricamente potrebbe arrivare a dare risultati falsi-negativi lì dove una particolare BJP non reagisca affatto con l'antisiero in uso.

Bisogna premettere che il BNII, nel caso il segnale della reazione del campione ecceda quello del punto più alto della calibrazione, pari a 80 mg/l, esegue opportune diluizioni successive fino a rientrare nell'ambito della curva. Pertanto, linearità e parallelismo possono ricercarsi solo nell'ambito di estensione della curva di calibrazione.

Abbiamo diluito in PBS 6 dei campioni BJP dei Gruppi di Studio come sopra definiti, 3 BJP-K e 3 BJP-L, in modo da ottenere una soluzione madre con una concentrazione teorica compresa tra 50 e 60 mg/l; quindi abbiamo ottenuto dalla madre diluizioni scalari in PBS. Sulle diluizioni è stata eseguita la IN-FLC in doppio.

Le curve di tutte le determinazioni sono riportate nella Tabella 4.

Conclusioni: i coefficienti di correlazione ottenuti tra il valore teorico assegnato alle diluizioni in base al valore ottenuto sulla diluizione più bassa (100%) e il valore medio delle misurazioni di ciascuna diluizione dimostrano la linearità e il parallelismo tra andamento della reazione del calibratore e andamento della reazione dei campioni. Questo non esclude che un particolare campione possa avere andamento non parallelo e quindi dare una concentrazione imprecisa.

ma ove ciò sia sospettato si potrà verificarlo eseguendo una serie di diluizioni.

C) Cross-Reazione con Catene Leggere Legate – Ig Intere

La cross-reazione tra antisiero anti FLC e le Catene Leggere Legate alle Immunoglobuline (Ig), cioè le Ig intere, è uno dei motivi addotto per sconsigliare, nella ricerca delle BJP in urine, l'uso di tali antisieri sia nella IFE sia nelle tecniche immunochimiche (2, 3). In realtà tale cross-reazione sarebbe minima e ininfluyente a meno che non si tratti di urina con proteinuria glomerulare poco selettiva e quindi con una importante concentrazione di Ig.

Per questa verifica abbiamo eseguito tre prove:

- Siero standard di riferimento "Strategic Biosolution", cod. "CA4"

La concentrazione di Ig-kappa e Ig-lambda è stata misurata con il reagente anti Catene Leggere Totali (LC(b&f)) sul nefelometro BNII.

La concentrazione di FLC è stata misurata in doppio su 4 diluizioni del "CA4": i risultati sono riportati nella Tabella 5.

- Siero standard di riferimento "Dako" – Valori alti
Il siero standard è stato diluito 1:20 e quindi ultrafiltrato per membrana da 30.000 MWCO al fine di allontanare le eventuali FLC presenti.

La concentrazione di Ig è stata misurata in doppio sul BNII con i relativi reagenti e così pure è stata misurata in doppio la concentrazione di FLC.

I risultati sono riportati nella Tabella 6.

- 10 sieri con Componente monoclonale (MC): 5 tipo kappa e 5 tipo lambda

Su questi 10 sieri abbiamo misurato le Ig e le FLC sull'intero e sulle diluizioni 1:2, 1:5, 1:10. I risultati sono riportati nella Tabella 7.

Conclusioni: tutti i risultati concordano nell'escludere la cross-reazione tra i reagenti FLC utilizzati e le Ig intere.

D) Valutazione della "sensibilità"

Dal punto di vista teorico, nel caso delle BJP la definizione precisa (riproducibile intra e inter laboratorio) e generale (valida per qualsiasi campione, per qualsiasi BJP) del "limite di sensibilità" è cosa molto difficile, se non impossibile, qualsiasi sia il metodo: Nefelometria, Elettroforesi, ImmunoFissazione. E' lo stesso problema della determinazione quantitativa delle MC nel siero: quale è il "limite di sensibilità" della IFE per l'analita MC IgA nel siero? e quale quello della EF e della nefelometria?

Tale difficoltà è legata alle caratteristiche intrinseche dell'analita e, per le BJP in urine, è aggravata dalla variabilità del campione in cui quella BJP è presente sia in termini di diuresi, che a parità di produzione influenza la concentrazione, sia per la presenza di proteinuria che, a seconda del metodo, può interferire o mascherare la BJP, potendosi andare dalla proteinuria fisiologica fino a quella mista, tipo siero diluito, con importanti componenti tubulari e con la frequente presenza di beta-2 micro.

Per avere un'idea, seppur imperfetta, della sensibilità abbiamo valutato il Limite di Sensibilità Biologico "Biological Detection Limit" (BDL) in "campioni corretti" "Spiked Sample" (SS).

Per ottenere gli "SS" abbiamo utilizzato come "Blank Sample" (BS) il siero standard di riferimento – valore alto – di Dako diluito 1:40 al fine di riprodurre il caso di una proteinuria glomerulare non selettiva. Il BS è stato ultrafiltrato per membrana da 30.000 MWCO al fine di allontanare le eventuali FLC presenti.

Il BS è stato utilizzato per eseguire diluizioni scalari dei Calibratori del kit in valutazione e di 2 campioni BJP-positivi, 1 BJP-kappa e 1 BJP-lambda selezionati tra quelli della multicentrica 2001 dei Gruppi Forlì e Liguria, e ciò al fine di disporre di un minimo "valore di consenso" circa la loro composizione e concentrazione.

I risultati hanno confermato quanto già prevedibile teoricamente.

- La IN-FLC non è influenzata dalla composizione proteica del campione (vedi paragrafo cross-reazione), e ugualmente la IFE con antisieri anti FLC (Figura 3).

- Sono invece influenzati, in modo imprevedibile, dalla composizione proteica del campione sia l'EF (co-migrazione della BJP con Transferrina, altre proteine a banda omogenea, emoglobina, Ig policlonali) (Figura 2) sia la IFE con antisieri anti CL(b&f) (co-migrazione della BJP con la Ig intera monoclonale, mascheramento per Ig policlonali) (Figura 3)

Per questi metodi l'aumento di sensibilità è evidentemente solo controproducente poiché finisce per agire anche sulle "proteine interferenti".

Conclusioni: per la IN-FLC abbiamo trovato:

- Limite minimo di sensibilità (Lower Detection Limit – LDL): FRK = 0,8 mg/l – FRL = 0,5 mg/l.

- Limite di sensibilità biologico (Biologic Detection Limit – BLD): FRK e FRL = 3 mg/l

Bisogna sottolineare che, come accennato a proposito delle curve di calibrazione, ove lo si ritenga necessario, si ottiene un notevole aumento della "sensibilità" della IN-FLC utilizzando la procedura così detta ad "Alta Sensibilità". Inoltre si potrebbe sempre ricorrere all'uso di campione concentrato.

E) Imprecisione - Ripetibilità

Abbiamo utilizzato i Campioni Bence Jones positivi che le Commissioni Forlì e Liguria hanno selezionato quali "controlli provvisori" e denominati: BJ-kappa Lavagna, BJ-lambda Bellaria.

Sono state eseguite 9 repliche per 2 giorni di 6 diluizioni dei suddetti campioni. I risultati sono nella Tabella 8.

Conclusione: l'imprecisione è molto buona e simile a quella delle altre determinazioni nefelometriche di proteine specifiche.

F) Cross-Reazione con Catene Leggere Libere del tipo opposto

Abbiamo misurato il Calibratore kappa con il Reagente lambda e viceversa e il risultato è stato inferiore al Limite di Sensibilità del metodo.

La mancanza di questo tipo di cross-reazione è confermata dai risultati ottenuti sui campioni con la presenza esclusiva di BJ-kappa con il reagente lambda e viceversa.

G) Eccesso di antigene

L'applicazione del metodo IN-FLC sul BNII prevede il controllo dell'eccesso di antigene per mezzo della così detta "pre-reazione"; in pratica l'entità della reazione viene prima provata con una piccola quantità di campione; se il risultato non eccede un determinato limite l'analizzatore prosegue nella determinazione aggiungendo la parte mancante di campione, se invece il risultato eccede il limite l'analizzatore segnala un allarme e riprova con una diluizione più alta.

Per valutare in pratica l'efficacia di tale controllo abbiamo concentrato i Campioni Multicentrica K-B e L-G così da avere nel concentrato un valore di BJP teoricamente molto elevato. Abbiamo quindi eseguito il dosaggio ottenendo una misurazione corretta per valori superiori a 38.000 mg/l per entrambi i campioni - Tabella: 9.

H) Effetto Matrice – Bianco campione dinamico – Determinazione IN-FLC nel siero

Abbiamo utilizzato, oltre ai Calibratori del kit, gli SS di cui sopra e 10 sieri interi con CM: 5 kappa e 5 lambda. Il test IN-FLC è stato effettuato sostituendo il Reagente Antisiero con il PBS.

I risultati ottenuti sono tutti ampiamente inferiori al BDL sopra riportato.

Il risultato ottenuto sui sieri interi rileva al fine di valutare una possibile applicazione del metodo alla determinazione delle FLC nel siero.

Valutazione dei campioni e confronto IN-FLC / IFE

Abbiamo eseguito in parallelo la IN-FLC (determinazione nefelometrica) e la IFE con antisieri anti FLC su tutti i campioni di urine pervenuti al nostro Laboratorio con la richiesta di ricerca Proteine Bence Jones in tre diversi periodi di tre mesi ciascuno tra il '98 e il '99 per un totale di 572 campioni appartenenti a 526 pazienti. Le ricorrenze dei pazienti sono state: 31 pazienti presenti 2 volte, 6 pazienti presenti 3 volte, 1 paziente presente 4 volte.

Si deve precisare che le richieste di ricerca della BJP che pervengono al Laboratorio di ImmunoEmatologia sono per la stragrande maggioranza "mirate", sostenute da motivazioni cliniche precise, sospetto diagnostico o follow-up. Nel nostro Ospedale infatti opera un Laboratorio Centralizzato con una sezione di protidologia.

Segnale di Positività

La IFE di base è stata interpretata dal lettore abituale e, nei casi dubbi, da una seconda persona; i casi rimasti dubbi per entrambi sono stati classificati come tali, cioè "dubbi".

La IN-FLC è stata considerata positiva se una delle due FLC ha concentrazione > 5 mg/l.

Analisi dei risultati e verifiche

I risultati della IFE di base e della IN-FLC sono stati confrontati e analizzati nei loro complesso solo a posteriori e pertanto la verifica di situazioni dubbie è stata eseguita solo su pochi campioni, 15 in tutto, tra quelli più recenti; per tale verifica è stata utilizzata la EF su Protur HISI e la IFE su Protur Plus con antisieri anti LC(b&f) e anti FLC e i campioni sono stati opportunamente concentrati o diluiti in modo da ottenere un risultato per quanto possibile sicuro.

Componenti Monoclonali siero e IFE standard urine

I risultati complessivi in termini di MC ottenuti con la IFE siero e IFE standard delle urine sono riportati nella tabella 10.

Gli elementi di rilievo sono:

- Frequenza totale di BJP: 91 casi su 572 IFE urine (16%)
- Frequenza di BJP-K e BJP-L: 8% per entrambe
- Frequenza di urine BJP-positive senza MC nel siero: 10 casi (0,9% del totale IFE urine)
- Un caso di BJP-K in urine con MC siero IgG-L
- Due casi di BJP in urine doppia: BJP-K+BJP-L e in entrambi nel siero MC doppia IgM-K + IgM-L

Confronto risultati IFE standard urine e ImmunoNefelometria FLC

Per una più agevole esposizione del confronto IFE standard rispetto a IN-FLC, i risultati sono stati raggruppati in base al risultato della IFE standard e sono esposti nei punti seguenti. Tabella 11.

A) IFE standard – BJP-kappa positiva

Alla IFE sono risultati positivi 42 campioni (7,3% del totale) e di questi 2 sono risultati negativi al test IN-FLC.

Alla IFE su campione non concentrato, uno di questi campioni è risultato negativo e l'altro dubbio.

Non è stata possibile la verifica di tale discrepanza tra IFE standard e IN-FLC che peraltro è l'unica riscontrata.

B) IFE standard – BJP-kappa sospetta

Sono 3 campioni tutti positivi alla IN-FLC. Su 2 di tali campioni è stato possibile eseguire la IFE di verifica su Protur Plus ed entrambi sono risultati BJP positivi.

Uno di questi campioni è di un paziente presente in casistica con due ricorrenze:

- settembre '98 - IN-FLC FRK = 62 mg/l – IFE standard = BJP-kappa positivo
- maggio '99 - IN-FLC FRK = 27 mg/l – IFE standard = BJP-kappa dubbio

C) IFE standard – BJP doppia: kappa + lambda

Due campioni entrambi positivi alla IN-FLC.

Entrambi i campioni, appartenenti a due diversi pazienti, hanno nel siero una doppia MC IgM-K +

IgM-L che peraltro sono le uniche MC di questo tipo della casistica.

- D) IFE standard – BJP-lambda positiva
Sono 40 campioni (7% del totale) tutti positivi alla IN-FLC.
- E) IFE standard – BJP-lambda sospetta
Quattro campioni tutti positivi alla IN-FLC
Su nessuno di questi è stato possibile eseguire ulteriori verifiche.
- F) IFE standard – policlonali e ladder kappa e lambda
Sono 51 campioni (9% del totale) tutti positivi alla IN-FLC
- G) IFE standard – negativa
Sono risultati negativi alla IFE standard 430 campioni (75% del totale); di questi, 284 (66% di IFE negativi) sono negativi anche alla IN-FLC, mentre 146 (34% di IFE negativi) sono risultati positivi.
E' stata eseguita IFE di verifica con Protur Plus di 12 di tali campioni scelti tra quelli con valori di IN-FLC maggiormente sospetti ed è risultato che 3 sono BJP-kappa positivi e 4 sono positivi per FLC-policlonali.

In conclusione, la IFE standard ha rilevato, comprendendo le sospette, 91 campioni BJP positivi (16%) e di questi 2 sono risultati negativi alla IN-FLC (2,2% delle IFE positive).

Per altro, la IN-FLC ha ben segnalato tutti i campioni BJP sospetti alla IFE, di cui i due casi controllabili si sono confermati BJP positivi.

Inoltre la IN-FLC ha segnalato 146 campioni sospetti tra i negativi alla IFE standard e, dei 12 controllati con la IFE Protur, 3 sono risultati BJP positivi, sono cioè "falsi negativi" alla IFE standard.

Analisi delle ricorrenze

Come si è detto nella casistica le ricorrenze dei pazienti sono state: 31 pazienti presenti 2 volte, 6 pazienti presenti 3 volte, 1 paziente presente 4 volte.

Nella tabella 12 sono riportati i risultati di una selezione di casi notevoli.

L'analisi delle ricorrenze esula dagli obiettivi di questo lavoro, anche per l'esiguità dei dati, ma sembra possibile ipotizzare che la IN-FLC potrebbe avere un ruolo anche sotto questo profilo.

Prendiamo alcuni esempi:

- a) Paziente B.G.
- 2 campioni a distanza di 7 giorni
 - IFE urine: BJ-L in entrambi
 - IN-FLC: riduzione significativa (circa 3 volte delle FRL)
 - Conclusione: possibile effetto della terapia.
- b) Paziente P.A.
- 2 campioni a distanza di 7 mesi
 - IFE urine: primo campione negativo, secondo BJ-K
 - IN-FLC: FRK primo campione: 13 mg/l (sospetto), secondo: 38 mg/l

- Conclusione: la IN-FLC ha dato segnale di positività già sul primo campione mentre la IFE era ancora negativa.

In generale la valutazione dei risultati delle poche ricorrenze disponibili evidenzia il "senso" anche quantitativo della IN-FLC e, almeno in questi casi, la sua maggiore sensibilità come campanello di allarme rispetto alla IFE.

Conclusioni

La IN-FLC ha dimostrato di poter essere ben collocata come test di primo livello nel protocollo di routine per la ricerca delle Proteine di Bence Jones e potrebbe assumere un ruolo nell'uniformare la qualità della risposta in tale ambito.

La IFE dovrà sempre essere utilizzata quale test per rilevare la mono o policlonalità delle FLC evidenziate dalla IN-FLC, ma quest'ultima dovrebbe per così dire "pilotare" la qualità e sensibilità della IFE.

In altri termini, se un campione sospetto alla IN-FLC risulta "negativo" alla IFE standard si dovrebbe ricorrere ad una IFE con maggiore sensibilità, per esempio concentrando ulteriormente il campione.

Bibliografia

1. Pallotti G. et altri – Commissione InterRegionale "Forlì" su Proteine di Bence Jones e Catene Leggere Libere
Valutazione Multicentrica di Metodi e protocolli per le Catene Leggere Libere e Proteine di Bence Jones in urine - Primi Risultati.
Biochim Clin 1995;19: 410-425
2. Graziani MS, Merlini GP, Petrini C.
Linee guida per la ricerca della proteina di Bence Jones
Gruppo di Studio Proteine – Società Italiana di Biochimica Clinica
Biochim Clin 2001; 25:23-32
3. Graziani MS, Merlini GP
Measurement of Free Light Chains in Urine – To the Editor
Clin Chem 2001; 47:2069

Tabelle

Tabella 1	Campioni Multicentrica				
Identificazione Campione	BJP-K				
	K-Lavagna	K-A	K-B	K-C	K-E
Concentrazione assegnata (*) mg/l	2000	825	2420	2200	880
Identificazione Campione	BJP-L				
	L-Bellaria	L-F	L-G	L-I	
Concentrazione assegnata (*) mg/l	900	770	5280	1760	
(*) E' la media delle concentrazioni rilevate nelle multicentriche					

Tabella 2 – FR-kappa BNII – Ripetibilità Curve Calibrazione

Confronto calibrazioni FR-kappa BNII		
Metodo	Standard	
Cal. mg/l	Media raw data	CV%
5	57	24,2%
10	235	13,3%
20	764	7,6%
40	1945	12,2%
80	4056	10,9%

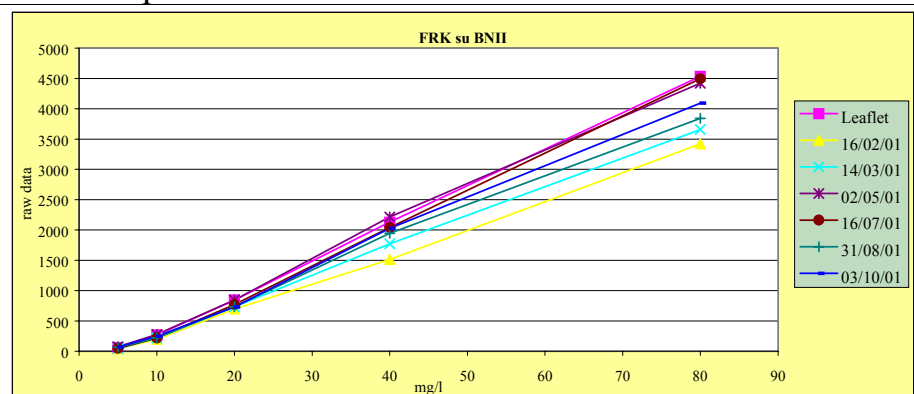


Tabella 3 – FR-lambda BNII – Ripetibilità Curve Calibrazione

Confronto calibrazioni FR-lambda BNII		
Metodo	Standard	
Cal. mg/l	Media raw data	CV%
5	166	21,8%
10	607	14,5%
20	1753	13,1%
40	3984	9,3%
80	6807	8,6%

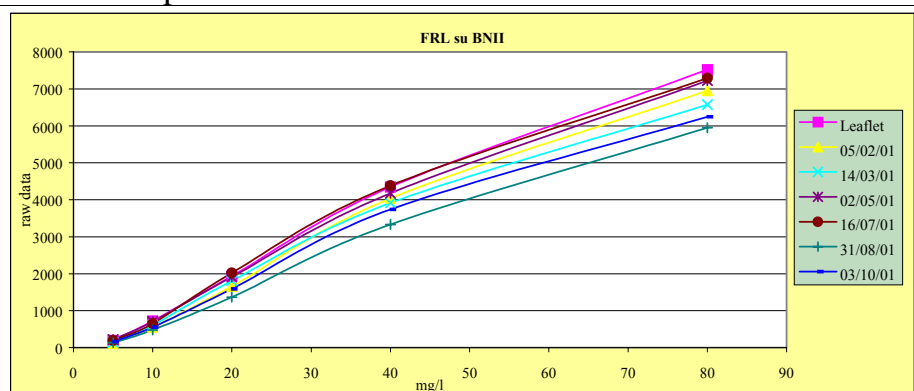
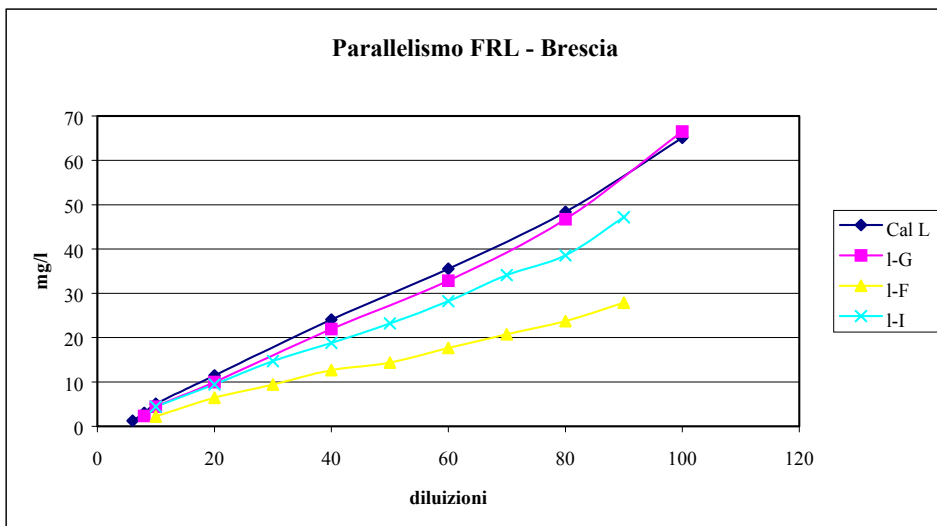
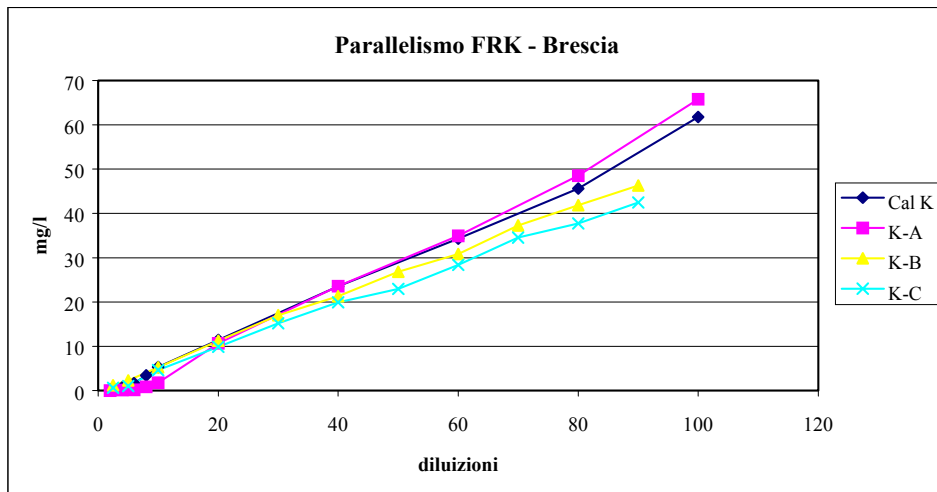


Tabella 4

Linearità e parallelismo

Correlazione

Cal K	0,999
K-A	0,997
K-B	0,999
K-C	0,999
Cal L	0,999
I-G	0,995
I-F	0,998
I-I	0,996



Siero standard riferimento Strategic Biosolution (ex ATAB) cod. CA4 Lotto: A003-3	Dil. 1:	Leggere B&F		Catene Leggere Libere								Rapporti		
		Ig-K	Ig-L	Free Kappa				Free Lambda				Media Free-K / Ig-K	Media Free-L / Ig-L	Somma B&F /somma Free
				1 test	2 test	Media	CV	1 test	2 test	Media	CV			
		mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	%	mg/l	mg/l	mg/l	%			
5	553	249	0,59	0,38	0,49	30,62	1,62	1,41	1,52	9,80	0,09%	0,61%	0,25%	
10	280	135	0,19	0,14	0,17	21,43	1,50	1,79	1,65	12,47	0,06%	1,22%	0,44%	
20	138	69	0,33	0,16	0,25	49,06	0,61	0,59	0,60	2,36	0,18%	0,88%	0,41%	
40	72	37	0,57	0,47	0,52	13,60	0,16	0,24	0,20	28,28	0,72%	0,55%	0,66%	

Il rapporto tra la concentrazione di CLL e quella della rispettiva Catena Leggera legata alle Ig è < 1% tranne che per le CLL-Lambda della diluizione 1:10 i cui risultati però non concordano con la sequenza delle diluizioni.
Tutti i valori ottenuti sono inferiori a 2 mg/l (Limite Sensibilità Biologica - BLD = 3 mg/l)

Tabella 6		Valutazione Cross reazione tra reagente CLL e Ig intere in sieri standard										
Siero standard riferimento Dako Valori Alti cod. X0940 Lotto: 117(901)	Dil. 1:	IgG (BNII)		Catene Leggere Libere								Rapporto Media IgG /somma Free
				Free Kappa				Free Lambda				
		1 test	2 test	1 test	2 test	Media	CV	1 test	2 test	Media	CV	
		mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	%	mg/l	mg/l	mg/l	%	
	20	1040	1010	0,45	<0,0	0,45	n.c.	3,01	2,45	2,73	14,50	0,21%

Il rapporto tra la concentrazione di CLL e quella delle IgG è < 1%

Tabella 7		Valutazione Cross reazione tra reagente CLL e Ig intere in sieri con CM																			
Campioni	IFE		BNII-Ig		Dil. 1:	IN-CLL					Campioni	IFE		BNII-Ig		Dil. 1:	IN-CLL				
	Siero CM	Urine	Siero			Urine		Siero				Siero CM	Urine	Siero			Urine		Siero		
			Classe	mg/dl		F-K	F-L	F-K	F-L	F-K+F-L				Classe	mg/dl		F-K	F-L	F-K	F-L	F-K+F-L
						mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	/Ig-tot							mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	/Ig-tot
1	G-K	BJ-K	Ig-G	3230	1	10	0	65	51	0,4%	6	Free L	BJ-L	Ig-G	641	1	5	104	71	233	4,4%
			Ig-A	<22,5	2	3	0	24	22	0,3%				Ig-A	27	2	1	55	43	114	4,5%
			Ig-M	24	5	0	0	8	8	0,2%				Ig-M	22	5	0	21	15	45	4,3%
			Totale	3254	10	0	0	3	1	0,1%				Totale	690	10	1	11	8	18	3,7%
2	G-K+ A-K?	no BJ	Ig-G	899	1	62	20	55	40	0,7%	7	A-L	BJ-L	Ig-G	1170	1	27	12	60	68	0,6%
			Ig-A	503	2	29	9	16	13	0,4%				Ig-A	852	2	11	5	42	44	0,8%
			Ig-M	36	5	12	2	5	6	0,4%				Ig-M	38	5	3	1	11	13	0,6%
			Totale	1438	10	4	0	1	0	0,1%				Totale	2060	10	1	0	5	5	0,5%
3	A-K	n.e.	Ig-G	1180	1	0	0	24	21	0,3%	8	G-L	n.e.	Ig-G	899	1	0	0	15	13	0,3%
			Ig-A	190	2	0	0	10	12	0,3%				Ig-A	110	2	0	0	7	8	0,3%
			Ig-M	<18	5	0	0	3	6	0,3%				Ig-M	41	5	0	0	2	5	0,3%
			Totale	1370	10	0	0	2	1	0,2%				Totale	1050	10	0	0	0	1	0,1%
4	A-K	BJ-K	Ig-G	298	1	66	0	199	26	1,3%	9	G-L	n.e.	Ig-G	1990	1	1	0	37	38	0,2%
			Ig-A	1430	2	32	0	99	12	1,3%				Ig-A	1610	2	0	0	12	14	0,1%
			Ig-M	<18	5	13	0	44	2	1,3%				Ig-M	32	5	0	0	3	5	0,1%
			Totale	1728	10	6	0	15	0	0,9%				Totale	3632	10	1	0	0	1	0,0%
5	M-K	n.e.	Ig-G	1290	1	0	0	49	72	0,4%	10	G-L	no BJ	Ig-G	1710	1	3	0	37	35	0,4%
			Ig-A	830	2	0	0	24	21	0,3%				Ig-A	67	2	2	0	13	16	0,3%
			Ig-M	918	5	0	0	8	9	0,3%				Ig-M	58	5	0	0	3	5	0,2%
			Totale	3038	10	0	0	2	5	0,2%				Totale	1835	10	0	0	0	2	0,1%

n.e non eseguita

Nel siero, il rapporto tra la somma delle concentrazioni delle CLL misurate alle diverse diluizioni e quella delle Ig misurate sul campione intero e rapportate alle diluizioni è < 1% in tutti i campioni tranne il n. 4 (siero CM IgA-K, urine BJ-K) e il n. 6 (siero CM Free L, urine BJ-L).

Nel siero, alla diluizione 1:10, la concentrazione misurata di CLL è < 2 mg/l (Limite di Sensibilità Biologico - BDL = 3 mg/l) in tutti i campioni tranne il n. 4 e il n. 6 che sono BJP-positivi.

Tabella 8	Ripetibilità - 9 repliche per 2 giorni					
Campione	BJ-K Lavagna					
Diluizione %	100%	80%	60%	50%	30%	10%
Media mg/l	5,56	4,46	3,43	2,84	1,78	0,50
CV	3,04%	1,92%	1,35%	1,87%	0,93%	4,29%
Campione	BJ-L Bellaria					
Diluizione %	100%	80%	60%	50%	30%	10%
Media mg/l	7,94	5,03	4,03	3,23	2,21	0,77
CV	3,19%	1,68%	1,74%	1,44%	1,79%	1,65%

Tabella 9	Eccesso di antigene	
Campioni Multicentrica		
Campione BJP-K - B		
Concentrazione Assegnata (*) - mg/l	Concentrato circa	Concentrazione ottenuta BNII - mg/l
2420	18 volte	39400
Campione BJP-L - G		
Concentrazione Assegnata (*) - mg/l	Concentrato circa	Concentrazione ottenuta BNII - mg/l
5280	10 volte	50400
(*) E' la media delle concentrazioni rilevate nelle multicentriche		

Tabella 10	IFE siero - Componenti Monoclonali (CM)																																	
IFE Urine conc. 25x	Totale eseguite	A-K	A-K+M-K	A-L	A-L+G pesanti	A-L+G-K	A-L+M-L sosp	D-K+G-K	D-L + Free L	G-K	G-K+A-K	G-K+C-L	G-K+G-L+M-K	G-K + Free K	G-K+K poli	G-K+M-K	G-L	G-L+A-K	G-L+G-K sosp	G-L+M-K	G-L+M-L	Free K	Free L	M-K	M-K+G-K min	M-K+M-L	M-L	no cm	Ig-Kappa	Ig-Lambda	Doppie Ig-K+Ig-L	Free Kappa	Free Lambda	Ig-K&L + Free K&L
		Totale IFE urine	572	446	17	1	16	1	1	1	1	88	4	4	1	1	1	3	80	1	1	2	1	4	6	40	1	2	13	154	157	113	12	4
%	100	78	4	0	4	0	0	0	0	20	1	1	0	0	0	1	18	0	0	0	0	1	1	9	0	0	3	35	35	25	3	1	1	0
Negativi	430	338	11	0	9	0	0	0	0	71	3	3	1	0	1	1	64	0	1	2	1	0	0	29	1	0	8	132	117	82	7	0	0	0
%	75	76	65	0	56	0	0	0	0	81	75	75	100	0	100	33	80	0	100	100	100	0	0	73	100	0	62	86	75	73	58	0	0	0
BJ-K	45	39	3	0	0	0	0	0	1	0	13	0	1	0	1	0	2	1	1	0	0	4	0	10	0	0	0	2	30	1	2	4	0	1
%	8	9	7	0	0	0	0	0	2	0	29	0	2	0	2	0	4	2	2	0	0	9	0	22	0	0	0	4	19	1	17	100	0	50
BJ-L	44	36	0	0	7	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	11	0	0	0	0	6	0	0	0	0	5	3	0	26	1	0	6	1
%	8	8	0	0	16	2	2	2	0	2	0	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	14	0	0	0	11	7	0	23	8	0	100	50	
BJ-K+BJ-L	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0
%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	17	0	0	0
Totale BJP	91	77	3	0	7	1	1	1	1	13	0	1	0	1	0	2	12	1	0	0	0	4	6	10	0	2	5	5	30	27	5	4	6	2
%	16	17	3	0	8	1	1	1	1	14	0	1	0	1	0	2	13	1	0	0	0	4	7	11	0	2	5	5	19	24	42	100	100	100
Ladder e poli	51	31	3	1	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	17	10	4	0	0	0	0
%	9	7	6	2	0	0	0	0	0	8	2	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	33	6	4	0	0	0	0

Tabella 11			Confronto risultati IFE e Nefelometria										
Campioni 572			Nefelometria Catene Leggere Libere			IFE Urine Hydragel non conc.				IFE Urine Protur Verifica			
IFE Urine Base conc. 25 volte			tipo risultato	num. camp.	% su gruppo	eseg	BJ-	BJ+	BJ-?	eseg	BJ-	BJ+	BJ-?
Tipo	Num	% su totale											
BJ-K	42	7,34%	K<,L<	2	4,8%	19	1			0			
			sosp.	40	95%		1	15	2				
BJ-K sosp	3	0,5%	K<,L<	0	0%	3				2			
			sosp.	3	100%		2		1		2		
BJ-K+BJ-L	2	0,3%	K<,L<	0	0%	1				0			
			sosp.	2	100%			1					
BJ-L	40	7,0%	K<,L<	0	0%	24				0			
			sosp.	40	100%			23	1				
BJ-L sosp	4	0,7%	K<,L<	0	0%	2				0			
			sosp.	4	100%		1		1				
poli e ladder κ e λ	51	8,9%	K<,L<	0	0%	23				1			
			sosp.	51	100%		5	0	18			1	
negativi	430	75%	L<,K<	284	66%	236				12			
			sosp.	146	34%			235			1	5	3
Totale BJP e BJP sosp	91	16%	K<,L<	2	2,2%	49	1						
			sosp.	89	97,8%		4	39	5				

Tabella 12		Valutazione ricorrenze						
Ident.	Data	FRK	FRL	F-K/F-L	u-IFE	s-IFE	Note	
B.G.	11/05/99	18	4960	0,0037	BJ-L	micro L	Intervallo: 7 giorni s-IFE e u-IFE: uguale	
	18/05/99	6	1650	0,0035	BJ-L	micro L	IN-CLL: variazione significativa dosaggio Rapporto F-K / F-L: invariato	
C.R.	02/04/98	<5	11	n.c.	BJ-L	no cm	Intervallo: 1 anno s-IFE: Variata - u-IFE: Invariata	
	13/05/99	7	365	0,018	BJ-L	micro L	IN-CLL: dosaggio variazione significativa Rapporto F-K / F-L: invariato	
C.G.	24/09/98	<5	7	n.c.	BJ-L	A-L	Intervallo: 5 giorni e 7 giorni	
	29/09/98	17	43	0,404	BJ-L	A-L	s-IFE e u-IFE: invariata	
	06/10/98	19	58	0,324	BJ-L	A-L	IN-CLL: dosaggio varia	
D.A.	04/09/98	52	17	3,041	BJ-K	G-K+G-L	Intervallo: 14 giorni	
	18/09/98	10	<2.5	n.c.	neg	G-K+G-L	u-IFE e IN-CLL: varia	
M.B.	21/03/98	78	48	1,603	BJ-K	M-K	Intervallo: 3 giorni	
	24/03/98	17	8	2,024	neg	M-K	u-IFE e IN-CLL: varia	
M.GF.	28/09/98	62	<2.5	n.c.	BJ-K	M-K	Intervallo: 8 giorni	
	27/05/99	27	<5	n.c.	BJ-K sosp	M-K	u-IFE e IN-CLL: varia	
P.A.	12/05/98	13	<2.5	n.c.	neg	M-K	Intervallo: 7 giorni	
	14/12/98	38	<2.5	n.c.	BJ-K	M-K	u-IFE e IN-CLL: varia	
T.D.	12/10/98	<5	5	n.c.	BJ-L	no cm	Intervallo: 3 giorni	
	15/10/98	<5	<2.5	n.c.	neg	no cm	u-IFE e IN-CLL: varia	
Z.T.	20/10/98	9	4	2,261	BJ-L	A-L	Intervallo: 3 giorni	
	23/10/98	12	5	2,192	neg	A-L	u-IFE e IN-CLL: varia	

Figure

