

# Stanovení volných lehkých řetězců imunoturbidimetrií a metodou ELISA

Vávrová J.<sup>1</sup>, Friedecký B.<sup>1</sup>, Tichý M.<sup>1</sup>, Holečková M.<sup>1</sup>, Maisnar V.<sup>2</sup>, Hájek R.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ústav klinické biochemie a diagnostiky LF UK a FN Hradec Králové

<sup>2</sup>OKH, II. interní klinika LF UK a FN Hradec Králové

<sup>3</sup>Interní hematologická klinika FN a LF MU, Brno-Bohunice

## SOUHRN

*Cíl:* Ověření základních vlastností analýzy volných lehkých řetězců v séru.

*Metody:* Imunoturbidimetrické stanovení s použitím diagnostické soupravy FreeLite firmy The Binding Site, adaptované na analyzátor Modular Roche. Metoda ELISA, použitá v soupravě firmy BioVendor.

*Výsledky:* Hodnoty stanovené u souboru dárců krve mužů a žen. Index kappa/lambda imunoturbidimetrií 0,53–1,92; metodou ELISA 0,24–1,17.

Přesnost měření kappa imunoturbidimetrií 5,6–6,9 %, metodou ELISA 6,6–11,0 %, lambda imunoturbidimetricky 6,1 až 9,2 %, metodou ELISA 7,3–8,6 %.

Studovali jsme vliv ředění vzorků na výsledky analýz a potvrdili jsme potřebnost ověřování stupně ředění u každého patologicky změněného vzorku.

Regresní analýzou byla určena rovnice  $y = -9,84 + 1,53 x$  a korelační koeficient  $r = 0,73$ .

U imunoturbidimetrie bylo ve sledované populaci nalezeno 58,9 % výsledků hodnocených jako patologických, metodou ELISA 45,5 %. U 4,5 % patologických výsledků byla nalezena neshoda mezi oběma metodami. U výsledků uvnitř referenčního intervalu byly nalezeny neshody u 17,8 % pozorování.

*Diskuse:* Hlavními problémy úspěšného použití stanovení volných lehkých řetězců jsou validita referenčních intervalů, ředění vzorků individuálních pacientů, difference v diagnostické klasifikaci při použití různých metod.

*Závěr:* Stanovení volných lehkých řetězců v séru nelze prozatím považovat za úplně rutinní záležitost, vyžaduje pečlivou přípravu vzorků a analýzu výsledků podmíněnou nadstandardní úrovní odbornosti laboratorního personálu.

*Klíčová slova:* volné lehké řetězce v séru, ELISA, imunoturbidimetrie.

## SUMMARY

**Vávrová J., Friedecký B., Tichý M., Holečková M., Maisnar V., Hájek R.: The determination of free light chains by immunoturbidimetry and ELISA**

*Objective:* Verification of measurement procedures for serum free light chains analysis.

*Methods:* Immunoturbidimetric measurement with using the FreeLite kit (The Binding Site), adapted on the Modular P (Roche). ELISA method performed by kit BioVendor.

*Results:* The ratio kappa/lambda of blood donors values in men and women was from 0.53 to 1.92 by use FreeLite kit and from 0.24 to 1.17 by ELISA method. We obtained measurement precision as follows: kappa (FreeLite) 5.6–6.9%, 6.6–11.0% (ELISA), lambda 6.1–9.2% by FreeLite and 7.3–8.6% by ELISA kit.

We assessed the influence of sample dilution on the results. It is necessary to verify dilution in each pathologically changed sample.

Regression analysis is expressed by equation  $y = -9.84 + 1.53 x$  and Pearson regression coefficient is  $r = 0.73$ .

We found 58.9% results obtained with immunoturbidimetry, but only 45.5% of results obtained by ELISA method out of reference limit. Four and a half % of pathologic results showed disagreement frequency in paired results while in results inside reference interval there was a disagreement frequency even 17.8%.

*Conclusion:* It is unsuitable to consider the measurement of free light chains in serum as a routine event. This determination requires careful work and high professional level of laboratory personal.

*Key words:* serum free light chains, ELISA, immunoturbidimetry.

## Úvod

Volné lehké řetězce v séru (dále VLŘ) slouží jako jeden z nástrojů diagnostiky a sledování léčby monoklonálních gamapatií. Význam tohoto vyšetření výrazně vzrostl po zveřejnění rychlé automatizované metody stanovení v roce 2001 [1]. V současné době je použití stanovení VLŘ k diagnóze a sledování léčby vybraných chorob asociovaných s monoklonální gamapatií předmětem některých významných lékařských doporučení – guidelines [2, 3].

Nejpropracovanější závěry pro diagnostické a terapeutické použití VLŘ jsou založeny na použití jediné diagnostické soupravy FreeLite firmy The Binding Site.

Naproti tomu kolektiv japonských autorů publikoval od roku 2003 soubor prací zabývajících se metodou stanovení VLŘ v séru, založenou na principu ELISA [4].

Zkušenosti ukazují, že vliv rozdílných metod stanovení, založených na imunoanalytických principech, může být velmi významný zejména pro získané diagnostické a terapeutické závěry.

Seznámení se základními parametry, problémy a rozdíly mezi dvěma principiálně rozdílnými analytickými metodami stanovení VLŘ jsou předmětem tohoto sdělení. Jde o metody FreeLite, používající imunoturbidimetrického měření (výrobce The Binding Site), a metodu ELISA (výrobce BioVendor).

## Materiál a metody

### Měřicí systémy

Pro měření koncentrace volných lehkých řetězců byly použity diagnostické soupravy Human Immunoglobulin Free Light Chains Kappa and Lambda ELISA (BioVendor Laboratory Medicine, Inc., Česká republika) a soupravy FreeLite Human Kappa Free kit For use on the Hitachi 911/912/917/Modular P a FreeLite Human Lambda Free kit For use on the Hitachi 911/912/917/Modular P firmy The Binding Site Ltd. (Velká Británie). Imunoturbidimetrická měření byla prováděna na analyzátoru Modular P firmy Roche, SRN. Metoda používá polyklonální monospecifické protilátky a měří vzniklý komplex antigenu a protilátky při vlnové délce 600 nm. Metoda ELISA představuje sendvičovou enzymoimunoanalýzu využívající monoklonální protilátky určené pro stanovení koncentrace volných lehkých řetězců v séru, plazmě, nebo moči. Imunoreakce byla vyhodnocována fotometricky přístrojem PowerWave XS (Biotek Instruments, SRN) při vlnové délce 450 nm.

### Materiál

Vzorky sér byly získány od dárců transfuzního oddělení FN Hradec Králové (20 mužů ve věku od 41 do 64 let, 20 žen ve věku od 42 do 59 let) a od pacientů nemocniční populace, u nichž bylo v souvislosti s kontrolou terapie požadováno rutinní vyšetření průkazu paraproteinu imunofixací. Vzorky byly do doby analýz sér uloženy při -20 °C.

Pro vnitřní kontrolu kvality byly použity kontrolní materiály fyziologických a patologických hladin dodá-

vané výrobcí jako součást měřicích systémů. Ke statistickému zpracování výsledků byl použit program MedCalc (Belgie).

## Výsledky

V tabulce 1 jsou uvedeny referenční intervaly pro hodnoty koncentrací volných lehkých řetězců kappa, lambda a indexu kappa/lambda. Tento index je hlavním údajem pro klinickou interpretaci výsledků. Tabulka 1 konfrontuje údaje uváděné výrobcí obou použitých diagnostických souprav v jejich pracovní dokumentaci a data získaná v naší laboratoři analýzou menšího souboru dárců krve. Z dat je zřejmé, že patrně existují difference mezi hodnotami získanými různými měřicími systémy a také závislost hodnot na pohlaví referenčních jedinců. Nejméně patrné rozdíly mezi metodami a skupinami jsou u indexů kappa/lambda.

Mezilehlá přesnost měření sledovaných diagnostických kitů byla vyhodnocena měřeními kontrolních materiálů dodaných výrobcí jako součást měřicích systémů na dvou koncentračních hladinách (tab. 2). Hodnoty přesnosti dosažené v našem experimentu byly podobné hodnotám uváděným oběma výrobcí v jejich pracovní dokumentaci. Kontrolní materiály výrobců nejsou navzájem zaměnitelné (komutabilní). Vzájemný vztah oběma měřicími postupy paralelně naměřených hodnot (vyjádřených indexem kappa/lambda) vyjadřuje rovnice regresní přímky:  $y = -9,84 + 1,53 x$ , kde hodnoty  $x$  odpovídají měření FreeLite,  $y$  ELISA postupem při počtu měření  $n = 210$ . Korelační koeficient byl  $r = 0,73$ .

Table 1. Reference intervals

	ELISA			Immunoturbidimetry		
	$\kappa$ [mg/l]	$\lambda$ [mg/l]	$\kappa/\lambda$	$\kappa$ [mg/l]	$\lambda$ [mg/l]	$\kappa/\lambda$
<b>Manufacturer</b>						
Mean	10.73	16.89	0.665	8.36	13.43	0.630
SD	5.98	8.29	0.295	-	-	-
Estimation of reference interval	3.44–28.84	7.50–42.20	0.230–1.852	3.3–19.40	5.71–26.30	0.260–1.650
<b>Blood donors, n = 40</b>						
Mean	11.50	17.40	0.707	14.19	12.14	1.225
SD	3.74	6.93	0.236	3.43	3.55	0.355
Estimation of reference interval	4.17–18.82	3.81–30.98	0.244–1.170	7.46–20.93	5.18–19.10	0.530–1.921
<b>Blood donors – men, n = 20</b>						
Mean	12.24	18.19	0.731	14.66	11.73	1.336
SD	3.31	7.08	0.255	3.75	3.69	0.450
Estimation of reference interval	5.75–18.74	4.31–32.06	0.231–1.232	7.32–22.00	4.50–18.95	0.454–2.218
<b>Blood donors – women, n = 20</b>						
Mean	10.75	16.60	0.683	13.76	12.54	1.121
SD	4.06	6.86	0.219	3.14	3.46	0.191
Estimation of reference interval	2.79–18.70	3.15–30.06	0.254–1.114	7.60–19.92	5.76–19.32	0.747–1.494

**Table 2.** Precision measurement

	Kappa		Lambda	
	low	high	low	high
<b>ELISA</b>				
Interval of target value [mg/l]	5.38–8.06	20.60–31.00	8.46–12.70	47.20–70.80
n	20	22	20	22
Mean [mg/l]	6.68	26.24	10.19	54.74
SD [mg/l]	0.73	1.74	0.74	4.69
CV [%]	10.98	6.63	7.28	8.57
<b>Immunoturbidimetry</b>				
Interval of target value [mg/l]	12.00–18.00	23.9–35.9	26.20–39.30	50.3–75.5
n	15	15	15	15
Mean [mg/l]	12.80	30.36	28.39	62.55
SD [mg/l]	0.89	1.69	1.74	5.77
CV [%]	6.93	5.57	6.11	9.22

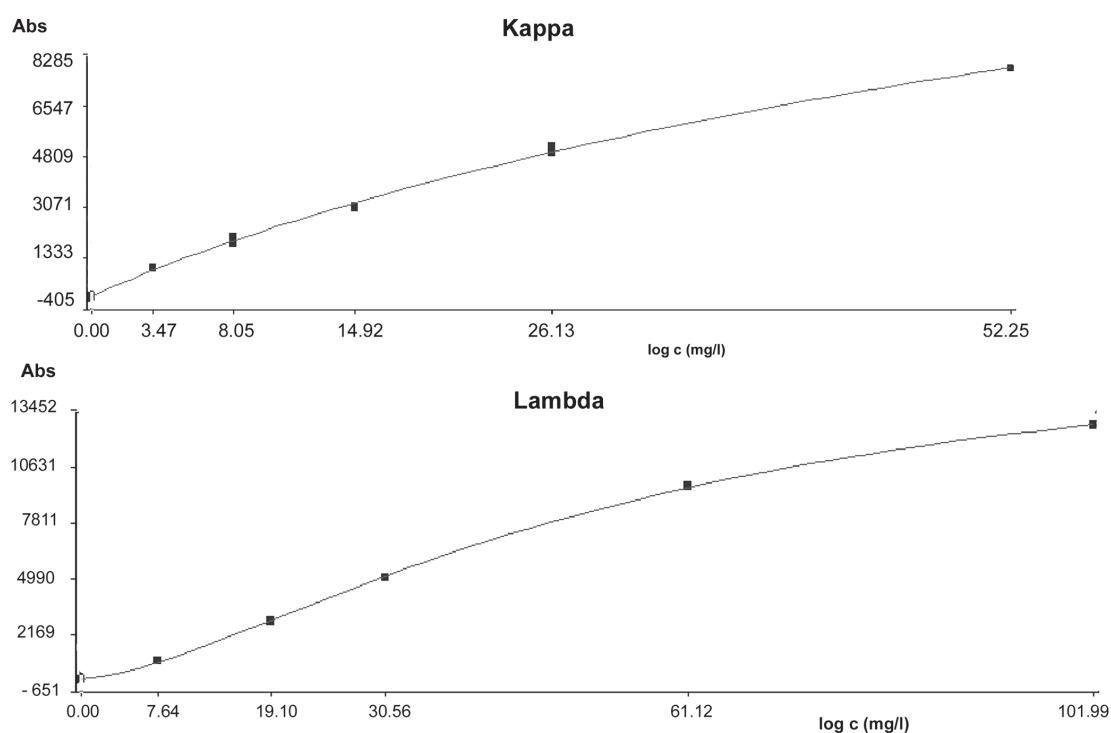
**Table 3.** Influence of used measurement systems on the diagnostic classification

Total number of classified results n = 202	Positive		Negative		Disagreement frequency in paired results	
	n	%	n	%	Both positive	Both negative
					%	%
ELISA (0.230–1.852)	92	45.5	110	54.5	4.5	17.8
Immunoturbidimetry (0.260–1.650)						

Classified by means of manufacturer cut-off values the kappa/lambda index

Počty pozitivních a negativních nálezů byly vyhodnoceny pomocí indexů kappa/lambda [5, 6] podle výrobcí uváděných rozhodovacích limitů. Obě diagnostic-

ké soupravy se hodnocením podle těchto kritérií významně liší (tab. 3). Rozdílná klasifikace pozitivních a negativních nálezů byla pozorována v cca 14 % při-

**Fig. 1.** Calibration curves for FreeLite (The Binding Site)

padů. Asi u 5 % výsledků s hodnotami nad cut-off u obou metod byla nalezena neshoda diagnostických klasifikací. V případě, že byly vzorky klasifikovány jako negativní oběma metodami, byla zaznamenána neshoda diagnostické klasifikace u téměř 18 % případů. Pokud byly oběma metodami klasifikovány jako pozitivní, bylo neshodných cca 5 % párových výsledků.

Klíčovým problémem stanovení VLŘ je ředění vzorků. V případě příliš vysokých koncentrací VLŘ dochází k přebytku antigenu v reakční směsi [7], pokud jsou koncentrace příliš nízké, dochází ke snížení citlivosti. V obou případech to vede k nesprávným výsledkům se závažnými důsledky pro diagnostiku a monitorování. K spolehlivému určení hodnoty indexu kappa/lambda je přitom nezbytné správné stanovení hodnot VLŘ jak v oblasti snížených, tak i zvýšených koncentrací. Ředění vzorku u metody FreeLite na Modularu je naprogramováno a provedeno automaticky v rozsahu 9–81krát pro stanovení lambda a 6–51krát pro stanovení kappa. Vychází z dat pracovního rozsahu měření. Pokud je nutné použít vyšší nebo nižší ředění, dosáhne se ho manuálním postupem. U metody ELISA doporučuje pracovní návod výrobce počáteční ředění vzorku 200krát a v případě vysokých koncentrací VLŘ ředění 2000krát a konfirmační ředění 20000krát. Při výsledcích měření pod pracovní rozsah je nutné použít nižší ředění 100krát. Ředí se manuálně. Obrázek 1 zobrazuje kalibrační závislost stanovení VLŘ metodou FreeLite, Modular. Pracovní rozsah měření je pro základní ředění (9krát pro lambda a 6krát pro kappa) 7–93 mg/l (lambda), respektive 3,7–56,2 mg/l (kappa). Obrázek 2 představuje kalibrační závislost měření kappa a lambda metodou ELISA pro základní ředění 200krát. Pracovní

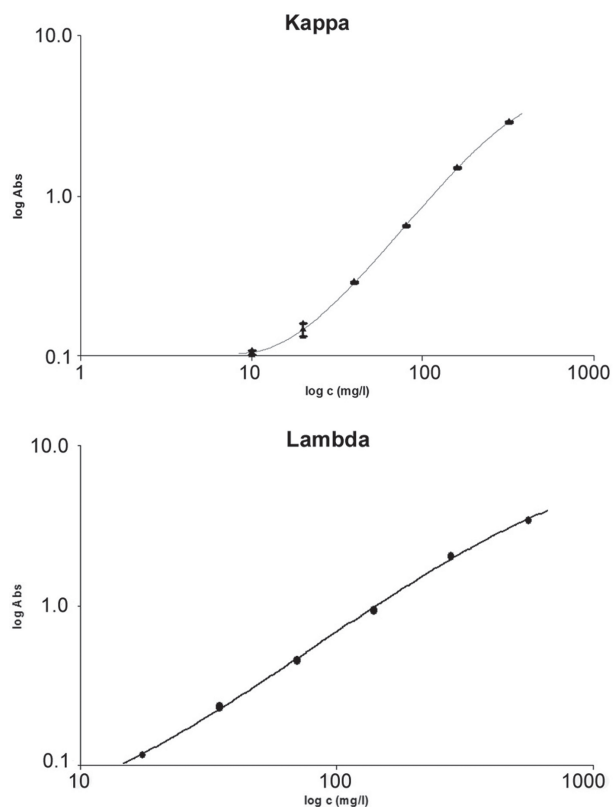


Fig. 2. Calibration curves for ELISA (BioVendor)

rozsah měření je pro kappa 2–64 mg/l a 3,5–172 mg/l pro lambda řetězce. Obrázek 3 zobrazuje výsledky dilučních pokusů u metody ELISA.

Výsledky demonstrují potřebu individuálního přístupu ke každému patologickému vzorku. Pokud se nezvolí u každého vzorku relevantní ředění, je nemožné dosáhnout relevantních výsledků. U většiny patologicky zvýšených vzorků vystačíme postupem ELISA s ředěním vzorku 200 a 2000krát, u extrémně vysokých koncentrací je výrobcem doporučeno ředění 20000krát. Z našich výsledků však plyne, že by pro tyto vzorky bylo vhodnější ředění 10000krát, jak je patrné ze srovnání v obrázcích 3a) a 3b).

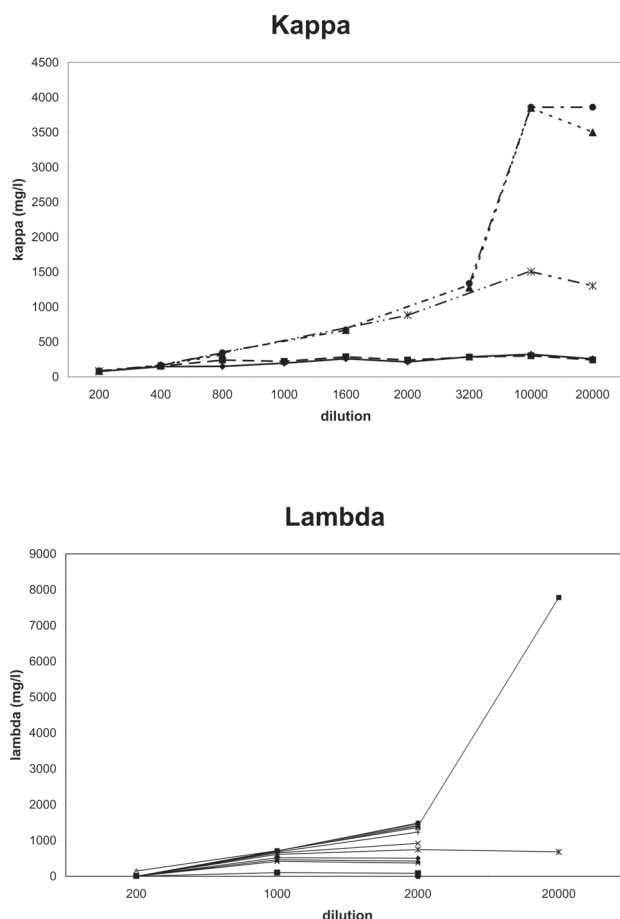


Fig. 3. Dilution curves for ELISA method

## Diskuse

Místo referenčních intervalů [8] jde opravdu o očekávané hodnoty, jak uvádí výrobce kitu FreeLite ve své pracovní dokumentaci. V nedávné době bylo publikováno, že diagnostická souprava FreeLite poskytuje významně odlišné hodnoty dokonce podle toho, na kterém přístroji byla adaptována, a že obecné referenční intervaly pro tuto soupravu neexistují [9]. Nejlepší shoda je v hodnotách indexů kappa/lambda, čemuž odpovídá skutečnost, že jde o rozhodující parametr.

Údaje obou výrobců o přesnosti byly poněkud příznivější, než jsme stanovili v experimentu (viz tab. 2). U FreeLite uvádějí rozmezí 4,1–7,3 % pro kappa a 6,3

až 9,5 % pro lambda. BioVendor uvádí pro kappa 6,9–7,0 % a pro lambda 5,9–6,8 %.

U obou diagnostických souprav je zapotřebí věnovat pozornost každému vzorku individuálně. U řady z nich se dospěje k použitelnému výsledku až po několikerém opakování při různých ředěních. Nelze tedy dost dobře předem odhadnout počet vyšetření, které lze provést z jednoho balení diagnostických kitů.

## Závěr

Podle našeho názoru není stanovení VLŘ úplně rutinní záležitostí, protože vyžaduje pečlivou přípravu vzorků a analýzu výsledků individuálních pacientů podmíněnou nadstandardní úrovní odbornosti laboratorního personálu.

## Literatura

1. **Bradwell, A. R., Carr-Smith, H. D., Mead, G. P., Tang, X. L. et al.** Highly sensitive automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine. *Clin. Chem.*, 2001, 47, p. 673–680.
2. **Bradwell, A. R.** *Serum free light chain analysis*. 4<sup>th</sup> Edition, Birmingham, UK: The Binding Site Ltd. 2006.
3. USA NACB guidelines for the use of tumor markers in monoclonal gammopathies <http://www.nacb.org> 2006 (Draft guidelines).
4. **Nakano, T., Nagata, A.** ELISA for free light chains of human immunoglobulin using monoclonal antibodies: improvement-comparison of their specificity with available polyclonal antibodies. *J. Immunol. Methods*, 2003, 275, p. 9–17.
5. **Katzmann, J. A.** Serum free light chain specificity and sensitivity: A reality check. *Clin. Chem.*, 2006, 52, p. 1638–1639.
6. **Hill, P. et al.** Serum free light chains: An alternative to the urine Bence Jones proteins screening test for monoclonal gammopathies. *Clin. Chem.*, 2006, 52, p. 1743–1748.
7. **Daval, S. et al.** Risk of antigen excess in serum free light chain measurements. *Clin. Chem.*, 2007, 53, p. 1985–1986.
8. **Katzmann, J. A. et al.** Serum reference intervals and diagnostic ranges for free and free immunoglobulin light chains: Relative sensitivity for detection of monoclonal light chains. *Clin. Chem.*, 2002, 48, p. 1437–1444.
9. **Pattenden, R. J., Rogers, S. Y., Wenhan, P. R.** Serum free light chain: the need to established local reference intervals. *Ann. Biochem.*, 2007, 44, p. 512–515.

Do redakce došlo 20. 2. 2008.

Adresa pro korespondenci:  
Ing. Jaroslava Vávrová, Ph.D.  
ÚKBD LF UK a FN  
Sokolská 581  
500 05 Hradec Králové  
e-mail: [vavrovaj@lfhk.cuni.cz](mailto:vavrovaj@lfhk.cuni.cz)