

Mezilaboratorní studie stanovení volných monoklonálních lehkých řetězců imunoglobulinů

Vávrová J.¹, Tichý M.^{1,9}, Friedecký B.¹, Maisnar V.^{2,9}, Hájek R.^{3,9}, Čermáková Z.⁴, Dastych M.⁴, Gottwaldová J.⁴, Kučera P.⁵, Krotká J.⁵, Racek J.⁶, Ženková J.⁶, Schneiderka P.⁷, Lochman P.⁷, Büchler T.¹⁰, Zima T.⁸, Benáková H.⁸, Spáčilová J.¹, Palička V.¹

¹ Ústav klinické biochemie a diagnostiky LF UK a FN, Hradec Králové

² II. interní klinika – OKH, LF UK a FN Hradec Králové

³ Interní hemato-onkologická klinika, LF MU a FN Brno-Bohunice

⁴ Oddělení klinické biochemie a hematologie, Fakultní nemocnice Brno

⁵ Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, Oddělení alergologie a klinické imunologie, Praha

⁶ Ústav klinické biochemie a hematologie LF UK a FN v Plzni

⁷ Oddělení klinické biochemie a imunogenetiky, FN Olomouc

⁸ Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN v Praze

⁹ Česká myelomová skupina

¹⁰ Onkologické oddělení, Fakultní Thomayerova nemocnice, Praha

SOUHRN

Stanovení FreeLite Chains (FLC) nachází v klinické praxi stále širší uplatnění. Stává se vedle elektroforézy bílkovin séra a imunofixační elektroforézy součástí diagnostiky, prognostiky a monitorování terapie u monoklonálních gamapatií. Vlastní stanovení FLC má však zatím četná metodická úskalí a je snaha o jejich postupné odstranění. Touto snahou byly také vedeny Česká myelomová skupina a Česká společnost klinické biochemie, když organizovaly studii, při které šest laboratoří center léčby mnohočetného myelomu v České republice současně vyšetřilo 12 vzorků sér od nemocných monoklonálními gamapatiemi na stanovení FLC.

Z této studie vyplývají tyto závěry: jednotlivé laboratoře sjednotí ředění sér podle pokynů výrobce, index kappa/lambda je stanovitelný s menší přesností, proto je doporučeno používat ve větší míře hodnot koncentrací FLC. Do kontrolního cyklu SEKK (www.sekk.cz) Gamapatie je od počátku roku 2010 pravidelně zařazováno stanovení FLC.

Klíčová slova: monoklonální volné lehké řetězce, monoklonální gamapatie, mnohočetný myelom, mezilaboratorní porovnání.

SUMMARY

Vávrová J., Tichý M., Friedecký B., Maisnar V., Hájek R., Čermáková Z., Dastych M., Gottwaldová J., Kučera P., Krotká J., Racek J., Ženková J., Schneiderka P., Lochman P., Büchler T., Zima T., Benáková H., Spáčilová J., Palička V.: Comparison of results of monoclonal free immunoglobulin light chains quantification in the serum in clinical laboratories in the Czech Republic

Free monoclonal immunoglobulin light chains (FLC) quantification is recommended for diagnosis assessment and monitoring therapy for patients with monoclonal gammopathy. But there are numerous uncertainties regarding the detection, interpretation and FLC quantification. Our interlaboratory study showed that kappa/lambda ratio is strongly influenced by measurement errors and therefore we recommended the preferential use of FLC concentration values. Unified protocols are needed to minimise interlaboratory variability introduced by manual dilution or volume augmentation of clinical sample.

Key words: monoclonal free light chains, monoclonal gammopathy, multiple myeloma, interlaboratory comparison.

Úvod

Monoklonální gamapatie (MG) jsou onemocnění charakterizovaná produkcí monoklonálního imunoglobulinu. K průkazu a typizaci monoklonálních imunoglobulinů v séru a v moči se jako standard používají elektroforéza a imunofixační elektroforéza [1]. K určení koncentrace paraproteinu se využívá denzitometrické vyhodnocení elektroforézy, záznam kapilární elektroforézy, případně imunonefelometrie nebo imunoturbidimetrie. U většiny nemocných jsou tato vyšetření dostačující, ale existuje skupina nemocných s nesekrečním myelomem, oligosekrečním myelomem nebo s AL-amyloidózou, kde tento klasický laboratorní vyšetřovací postup selhává [2]. Proto se hledají další, senzi-

tivnější biochemické markery; velmi nadějným markerem se jeví stanovení monoklonálních volných lehkých řetězců (FLC) imunoglobulinů. Metoda je založena na schopnosti rozpoznání epitopů volných lehkých řetězců pomocí monoklonálních protilátek. Tyto epitopy jsou v případě vazby lehkého řetězce v kompletní molekule monoklonálního imunoglobulinu skryty a jsou pro protilátku nedostupné.

Stanovení volných lehkých řetězců je i součástí nových kritérií odpovědi na léčbu mnohočetného myelomu (MM) stanovených IMWG (International Myeloma Working Group), kde je zahrnuto do definice [3] striktní kompletní remise (stringent complete remission). Ta je definována nejen negativní imunofixační elektroforézou, ale i negativním indexem lehkých řetězců v séru.

Stanovení FLC je také doporučováno jako jeden z prognostických faktorů u nemocných MGUS [4].

V metodě stanovení, v interpretaci a hodnocení koncentrace volných lehkých řetězců však zůstává řada nejasností [5]. Česká myelomová skupina společně s Českou společností klinické biochemie se proto rozhodly provést validaci vyšetření FLC v šesti centrech České republiky, která se zabývají diagnostikou, sledováním a terapií monoklonálních gamapatií, stejně jako tomu bylo u dalších biochemických vyšetření již v r. 2006 [6].

Materiál a metody

Experimentu se zúčastnilo šest laboratoří. ÚKBD LF a FN Hradec Králové, ÚKBH FN Plzeň, ÚKBD FN Brno Bohunice, OKB FN Olomouc, Oddělení alergologie a klinické imunologie FNKV Praha a ÚKB LD VFN 1. LF Praha. Současně s kontrolními vzorky byl rozesílán dotazník, který poskytl informace uvedené v této práci.

Všichni zúčastnění použili diagnostický kit Binding Site. Tři použili metodu imunoturbidimetrie (IMT) a tři metodu imunonefelometrie (IMN). Účastníci využili pět různých přístrojových platform – Roche Modular, Beckman Coulter Immage 800, Olympus AU 400, Siemens Dade BN II a Radim Delta nefelometr.

Všichni se řídili pracovními postupy návodů v protokolech výrobce bez změn. Laboratoře měly k dispozici různé šarže diagnostických kitů, lišící se poněkud rozsahy kalibračních funkcí, používaly odlišné ředění vzorků s vysokými koncentracemi analytů a různě zvýšených objemů vzorků s nízkými koncentracemi analytů. Důsledkem byly různé celkové pracovní rozsahy měření v jednotlivých laboratořích. Jsou uvedeny v tabulce 1. Laboratoře účastníci se studie jsou v tabulkách označeny čísly, aby byla dodržena důvěrnost výsledků, jak je obvyklé v mezilaboratorních studiích. Každá laboratoř analyzovala 12 nativních vzorků sér pacientů s monoklonálními gamapatiemi. Vzorky byly rozesílány v zamrazeném stavu a analyzovány v předem určeném stejném termínu, vždy v duplikátech.

Table 1. Working ranges for free light chain quantification in participating laboratories

Laboratory No.	Kappa (mg/l)	Lambda (mg/l)
1	6–150 000	6–150 000
2	1.8–2800	3.0–3750
3	3.0–4500	4.0–6750
4	0.06–4060	0.06–3520
5	0.3–15200	0.3–15200
6	6.0–4800	6.0–13440

Vnitřní kontrola kvality se prováděla dvěma kontrolními materiály, které byly součástí kitů. Referenční intervaly byly převzaty ve všech případech od výrobců. Žádná z laboratoří se v době konání pokusu neúčastnila některého z evropských programů externího hodnocení kvality.

Výsledky

V tabulce 2 jsou výsledky opakovatelnosti měření v pěti laboratořích, vypočtené z rozptylů hodnot duplikátů.

Table 2. Repeatability of measurements in individual laboratories

Laboratory No.	CV %			
	kappa	lambda	κ/λ ratio	Method
1	14.3	4.5	8.9	IMT
2	15.6	4.9	35.0	IMT
3	5.8	13.2	14.5	IMT
4	14.6	2.8	44.0	IMN
5	n. a.*	n.a.	n.a.	
6	6.3	18.6	29.9	IMN
Total value	11.3	8.8	26.5	
Producer value	≤ 8.0	≤ 4.0		

*n. a. – not assayed

Hodnota opakovatelnosti je horší než hodnoty deklarované producentem diagnostik. Výrobce však uvádí hodnoty opakovatelnosti (within-run precision) pro užší rozsah koncentrací, kdy není nutné ředění sér. Hodnoty opakovatelnosti jsou závislé více na laboratoři než na tom, zda byla použita imunoturbidimetrická nebo imunonefelometrická metoda měření. Opakovatelnost měření poměru kappa/lambda není v dokumentaci výrobce uváděna, ale je vždy nižší než opakovatelnost měření obou složek.

Reprodukovatelnost měření koncentrace FLC kappa, koncentrace FLC lambda a poměru kappa/lambda je shrnuta v tabulce 3.

Hodnoty reprodukovatelnosti (mezilaboratorní přesnosti) celkem odpovídají hodnotám, dosahovaným v kontrolních cyklech programu externího hodnocení kvality NEQAS. Tato relace je demonstrována pomocí výsledků kontrolního cyklu NEQAS ze září 2007 [7]. Reprodukovatelnost měření FLC kappa ve skupinách podle přístrojových platform kolísala v intervalu CV% = 86,5–173,9.

Z výsledků FLC kappa po úpravě pracovního protokolu (postupu ředění) v roce 2009 máme k dispozici jen reprodukovatelnost měření Dade Behring (kolísala v několika různých cyklech v intervalu CV% = 13,2–95,6) a Beckman s variacemi CV% = 14,3–61,0. Reprodukovatelnost poměru kappa/lambda je v průměru asi dvakrát horší než u výsledků stanovení koncentrací samotných kappa a lambda řetězců.

Jako součást kontrolního programu SEKK gamapatie 2/09 byla v říjnu 2009 provedena pilotní studie mezilaboratorního srovnání výsledků FLC v České republice a na Slovensku. Účastnilo se 25 laboratoří, výsledky studie jsou uvedeny na webové adrese www.sekk.cz. Od roku 2010 bude hodnocení FLC pravidelnou součástí externího hodnocení kvality v České a Slovenské republice.

Table 3. Reproducibility of kappa and lambda free light chain measurement.

Sample	kappa		lambda		κ/λ ratio	
	mean (mg/l)	CV%	mean (mg/l)	CV%	mean	CV%
1	7.0	12.3	3.3	102.4	0.0028	29.6
2	7.4	11.4	5.7	46.0	0.0041	62.3
3	7.8	13.8	6.6	32.5	0.0067	153.4
4	10.9	20.6	10.3	19.6	0.0224	28.1
5	11.3	28.6	10.6	11.7	0.049	18.1
6	32.2	25.3	10.9	22.5	1.1	23.5
7	52.2	50.0	52.9	9.3	1.25	34.7
8	56.1	43.8	232.1	23.7	1.7	59.0
9	67.1	40.9	334.1	19.2	9.44	73.2
10	293.1	41.1	2610	27.5	27.7	40.0
11	299.5	43.4	11283	9.9	29.6	53.6
12	344.6	54.0	13912	20.4	353.1	100.7
Total		32.1		28.7		56.4

Diskuse

Stanovení FLC nachází v klinické praxi stále širší uplatnění [8, 9, 10]. Je tomu tak zejména při diagnostice nesekrečního a oligosekrečního mnohočetného myelomu, AL-amyloidózy a u mnohočetného myelomu s paraproteinem tvořeným jen monoklonálními lehkými řetězci imunoglobulinů. Stanovení FLC zvyšuje citlivost diagnostiky monoklonálních gamapatií, má význam pro určení prognózy přechodu monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS) v maligní MG a má význam pro vyhodnocení úspěšnosti terapie mnohočetného myelomu. Přes tyto nesporné přínosy pro diagnostiku, prognózu a monitorování terapie monoklonálních gamapatií má zatím vyšetření FLC četná metodická úskalí [5]. Jsou to např. tyto: zkřížená reakce antisér proti FLC s vázanými lehkými řetězci, stanovení nerozliší polyklonální a monoklonální lehké řetězce, zatím chybějící standardizace vyšetření FLC, stanovení indexu kappa/lambda u biklonálních gamapatií, určité procento negativních výsledků FLC při pozitivní imunofixační elektroforéze. Také použití různých šarží kitů na stanovení FLC, různé přístrojové vybavení laboratoří a různá použitá ředění mohou ovlivnit zvýšenou variabilitu výsledků stanovení FLC. Z těchto všech uvedených důvodů se rozhodla Česká myelomová skupina spolu s Českou společností klinické biochemie provést porovnání výsledků FLC v šesti hlavních centrech léčby MM v České republice. Prakticky se navazovalo na zkušenosti se standardizací vybraných biochemických parametrů u monoklonálních gamapatií z r. 2006 [6]. Do laboratoří uvedených šesti center bylo zasláno 12 vzorků sér nemocných MG a ty byly vyšetřeny za podmínek definovaných v odstavci Materiál a metody v tomto článku.

Opakovatelnost měření jednotlivých laboratoří poskytuje horší výsledky (viz tab. 2), než uvádí pracovní protokol výrobce. Příčinou může být to, že výrobce použil ke zjištění opakovatelnosti vzorky, které není zapotřebí ředit. Tím vyloučil jednu z hlavních příčin zvýšené

variability výsledků. Přesto opakovatelnost kolem 10 % může být považována pro klinickou praxi za vyhovující. Reprodukovatelnost se pohybuje v řádech desítek procent, nicméně je srovnatelná s hodnotami, které jsou známé z kontrolního programu NEQAS [7]. Důležité je zejména zjištění, že klinicky nejvíce ceněný parametr – poměr kappa/lambda – má nejhorší přesnost měření, což je to dáno tím, že jeho výpočet kombinuje nepřesnost stanovení obou složek (kappa i lambda).

Mezi faktory, které se podílejí na nízké hodnotě reprodukovatelnosti patří především variabilita mezi kity, způsob ředění vzorků s vysokou koncentrací FLC a velká různorodost měřicí techniky [11]. Pracovní skupina IFCC pro plazmatické proteiny se proto začíná intenzivně zabývat problémy stanovení FLC [12]. V plánu její činnosti pro nejbližší období je důkladné vyhodnocení druhů a intenzit všech potenciálních zdrojů variabilit. Současně začíná práce na mezinárodním referenčním materiálu sFLC. Progres standardizace stanovení může v další aplikaci měření sFLC přinést potřebné zlepšení mezilaboratorní srovnatelnosti.

Závěry

Stanovení FLC a jejich poměrů je vhodným a v dnešní době i nezbytným doplňkovým vyšetřením u monoklonálních gamapatií spolu s elektroforézou bílkovin a imunofixační elektroforézou [13, 14]. Poměr kappa/lambda je stanovitelný s nižší přesností, proto doporučujeme ve větší míře využívat hodnot koncentrací FLC. Pro manuální ředění vysokých koncentrací FLC a zvyšování objemu vzorku u nízkých koncentrací FLC mimo měřicí rozsahy je nutné sjednocení postupů. Stanovení FLC bude od r. 2010 pravidelně zařazováno do kontrolního cyklu SEKK Gamapatie. Tato opatření by měla do budoucna umožnit srovnatelnost výsledků FLC nejen v šesti centrech léčby MM v ČR, ale i v dalších českých a slovenských laboratořích, které stanovení FLC provádějí.

Literatura

1. **Katzmann, J. A., Dispenzieri, A.** Screening Algorithms for Monoclonal Gammopathies. *Clin. Chem.*, 2008, 54, p. 1753–1755.
2. **Pratt, G.** The evolving use of serum free light chain assays in haematology. *Br. J. Haematol.*, 2008, 141, p. 413–422.
3. **Dispenzieri, A., Kyle, R., Merlini, J. S. et al.** International Myeloma Working Group guidelines for serum free-light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia*, 2009, 23, p. 215–224.
4. **Rajkumar, S. V., Kyle, R. A., Therneau, T. M. et al.** Serum free light ratio is an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*, 2005, 106, p. 812–817.
5. **Nakano, T., Miyazaki, S., Takahashi, H. et al.** Immunochemical quantification of free immunoglobulin light chains from an analytical perspective. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2006, 44, p. 522–532.
6. **Tichy, M., Maisnar, V., Palicka, V. et al.** International staging system required standardization of biochemical laboratory testing in multiple myeloma. *Neoplasma*, 2006, 53, p. 492–494.
7. **Sheldon, J.** Free light chains. *Ann. Clin. Biochem.*, 2007, 44, p. 503–505.
8. **Sthaneshwar, P., Nadarajan, V., Maniam, J. A. S. et al.** Serum free light chains: diagnostic and prognostic value in multiple myeloma. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2009, 47, p. 1101–1107.
9. **Bergón, E., Miravalles, E., Bergón, E. et al.** The predictive power of serum κ/λ ratios for discrimination between monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2005, 43, p. 32–37.
10. **Bradwell, A. R., Harding, S. J., Fourrier, N. J. et al.** Assessment of Monoclonal Gammopathies by Nephelometric Measurement of Individual Immunoglobulin κ/λ Ratios. *Clin. Chem.*, 2009, 55, p. 1646–1655.
11. **Pattenden, R. J., Rogers, S. Y., Wenham, P. R.** Serum free light chains; the need to establish local reference intervals. *Ann. Clin. Biochem.*, 2007, 44, p. 512–515.
12. **Merlini, G.** Serum-free light chain analysis: works in progress. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2009, 47, p. 1021–1022.
13. **Böer, K., Deufel, T.** Quantitation of serum free light chains does not compensate for serum immunofixation only when screening for monoclonal gammopathies. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2009, 47, p. 1109–1115.
14. **Piebler, A. P., Gulbrandsen, N., Kierulf, P. et al.** Quantitation of serum free light chains in combination with protein electrophoresis and clinical information for diagnosis multiple myeloma in a general hospital population. *Clin. Chem.*, 2008, 54, p. 1823–1830.

Tato studie byla podpořena výzkumnými projekty MZČR: MZO 00179906, IGA MZ CR: NS 10387-3/2009 a IGA MZ CR: NS 10406-3/2009.

Do redakce došlo 20. 1. 2010.

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