

# Srovnání detekce monoklonálního proteinu pomocí současně dostupných biochemických metod

Špička I.<sup>1</sup>, Mecl J.<sup>2</sup>, Benáková H.<sup>3</sup>, Nohejlová A.<sup>1</sup>, Straub J.<sup>1</sup>, Novotová E.<sup>1</sup>, Zima T.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Klinika hematologie, I. interní klinika 1. LK UK a VFN Praha

<sup>2</sup>Oddělení biochemického inženýrství, Nemocnice Na Homolce, Praha

<sup>3</sup>Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF a VFN Praha

## SOUHRN

Klonální zralé B-lymfocyty a plazmocyty produkují monoklonální imunoglobulin, který detekujeme pomocí elektroforézy sérových bílkovin (SPE, „serum protein electrophoresis“) a IFE (imunofixační elektroforéza). Tyto metody pomáhají v diagnostice monoklonálních gamapatií, monitorování efektu léčby a aktivity choroby. U mnohočetného myelomu jsou jednoduchými markery umožňujícími omezit počet vyšetření kostní dřeně a zobrazovacích metod, které by jinak museli nemocní podstoupit. Asi 10–20 % myelomů je spojeno s produkcí pouze lehkých řetězců paraproteinu, které lze často obtížně detekovat, a u 2–3 % případů tzv. nesekretorického myelomu byla tato detekce donedávna nemožná. Novou metodou je detekce FLC (volných lehkých řetězců) v séru. V naší studii porovnáváme tyto tři metody z hlediska citlivosti zachytu paraproteinu. Ke stanovení FLC byl použit analyzátor využívající systému FreeLite (immunotech Beckman Coulter). Vyšetřeno bylo 51 pacientů s mnohočetným myelomem, níže maligními nehodgkinskými lymfomy, primární amyloidózou a monoklonální gamapatií nejasného významu. Detekce FLC může sloužit jako cenná diagnostická metoda, která zpřesňuje diagnostiku i hodnocení odpovědi na léčbu v indikovaných případech.

*Klíčová slova:* mnohočetný myelom, detekce paraproteinu, volné lehké řetězce (FLC).

## SUMMARY

**Špička I., Mecl J., Benáková H., Nohejlová A., Straub J., Novotová E., Zima T.: Comparing the detection of monoclonal protein by means of presently available biochemical methods**

Clonal mature B-lymphocytes and plasma cells make monoclonal antibodies that can be detected by serum protein electrophoresis (SPE) and immunofixation electrophoresis (IFE). These methods are used to diagnose myeloma and other monoclonal gammopathies, and to monitor treatment and disease progression. They are surrogate markers that allowed us to reduce the number of bone marrow biopsies and imaging scans that a patient would have to be subjected to. The detection is more complicated in 10–20% of myeloma patients with light chain myeloma and was impossible in 2–3% patients with „non-secretory“ myeloma. New method is a detection of free light chain (FLC) in serum. In our study we compare those three methods (SPE, IFE and FLC) from the viewpoint of sensitivity of paraprotein detection. For FLC detection was used FreeLite system analyzer (Immunotech Beckman Coulter). We examined 51 patients with diagnosis of multiple myeloma, non-Hodgkin lymphoma, primary amyloidosis and monoclonal gammopathy of undetermined significance. Detection of FLC is a valuable method which could sometimes specify diagnosis of MG and make treatment more accurate.

*Key words:* multiple myeloma, detection of paraprotein, free light chains (FLC).

## Úvod

Monoklonální gamapatie jsou stavy, respektive choroby, charakterizované proliferací B-buněčného klonu provázené produkcí monoklonálního proteinu (Mlg, M-protein, paraprotein). Jedná se o strukturálně a funkčně homogenní imunoglobulin nebo jeho fragmenty. K jeho detekci lze použít několika biochemických postupů. Základní jednoduchá a ekonomicky málo náročná metoda – elektroforéza sérových bílkovin (ELFO) – slouží k vyhledávání a kvantifikaci Mlg. Imunofixační imuno-elektroforézu využíváme k potvrzení nálezu ELFO a klasifikaci a typizaci paraproteinu. Oproti prosté imuno-elektroforéze má asi 50krát vyšší citlivost [1]. Uvedené postupy jsou však v některých případech, zvláště při produkci tzv. Bence-Jonesova proteinu, relativně málo přesné a citlivé, neumožňují také rychlé hodnocení produkce paraproteinu v čase. Příkladem je např. myelom s produkcí Mlg typu lehkých řetězců, nesekreční myelom (NSM) či primární amyloidoza (AL). Paraprotein typu leh-

kých řetězců (B-J protein) lze často lépe než v séru detekovat v zahuštěném vzorku moči, výsledek je však ovlivněn stavem renálních funkcí (jak glomerulární filtrací, tak tubulární resorpcí a katabolismem v proximálních či sekrecí v distálních tubulech), které jsou u monoklonálních gamapatií, zvláště u nejvýznamnějších z nich – mnohočetného myelomu – často alterovány [2]. Při renálním selhání a anurii je tato možnost stanovení prakticky nulová. Hodnocení Mlg v moči může ovlivnit i příměs dalších bílkovin (častá u myelomové nefropatie) nebo metodické chyby (sběr moči).

Relativně novou, ale již dobře dostupnou metodou, je stanovení volných lehkých řetězců v séru („free light chain“, „FLC“) nefelometricky systémem „FreeLite“. Výhody této metody jsou:

- vysoká citlivost a možnost zachytu Mlg i v případě negativních nálezů v ELFO,
- nezávislost na stavu renálních funkcí a výrazně menší metodická náročnost v případě Bence-Jonesovy paraproteinémie,

c) krátký poločas FLC umožňující rychlou orientaci a monitorování dynamiky hladiny Mlg.

Ve spojitosti s rozšiřujícími se zkušenostmi s touto metodou někteří autoři již identifikovali její přínos pro stanovení prognózy např. nemocných s monoklonální gamapatií nejasného významu (MGUS) [3], respektive mnohočetného myelomu [4].

Předkládáme výsledky prvotní studie věnované porovnání výše uvedených klinických laboratorních testů pro detekci monoklonálního proteinu z hlediska citlivosti a efektivity, respektive přínosu pro nemocné.

Vyšetření jsme provedli u souboru 51 pacientů s B-lymfoproliferativními chorobami.

## Soubor pacientů a metody

Hodnotili jsme vzorky 51 pacientů, 22 mužů a 29 žen, s monoklonálními gamapatiemi, respektive lymfoproliferativními chorobami ve věku 44–86 let (medián 65 let). Z hlediska základní diagnózy bylo vyšetřeno 36 pacientů s mnohočetným myelomem (MM),

Table 1. Multiple myeloma (MM)

Initials	SPE (serum protein electrophoresis)	Serum IFE (imunofixation electrophoresis)	FreeLite, results		
			kappa [mg/l]	lambda [mg/l]	ratio
B. V.	49.13	IgG – L	< 5.90	660	0.01
B. M.	negative	IgG – K	14.4	22.1	0.65
B. V.	negative	IgG – L	< 5.90	42.1	0.14
B. A.	negative	IgG – L	14.1	89.7	0.16
B. E.	negative	negative	14.2	41.7	0.34
B. E. (after 3 months)	negative	negative	12.4	52.0	0.24
C. E.	negative	negative	12.8	30.7	0.42
F. I.	negative	negative	12.5	18.8	0.66
H. N.	negative	IgA – L	8.4	29.6	0.28
H. M.	13.0	LC – L	10.3	221.0	0.05
J. D.	negative	LC – K	613	8.70	70.46
J. M.	negative	IgG – K	< 5.9	19.8	0.3
K. V.	4.53	LC – L	29.9	827.0	0.04
K. M. +	9.92	IgG – L	8.4	552.0	0.02
K. O.	negative	IgA – L	5.90	19.8	0.3
K. L.	23.3	IgA – K	106.0	8.70	12.18
K.L. (after month)	23.34	IgA – K	142.0	12.8	11.1
K.L. (after month)	12.02	IgA – K	49.4	12.2	4.05
K. V.	1.86	LC – L	19.0	569.0	0.03
M. L.	35.95	IgA – K biclon.	37.4	14.0	2.67
M. M.	22.88	IgG – L	6.1	934	0.01
M. M. (after 4 months)	4.72	IgG – L	5.90	24.0	0.25
P. M.	5.98	IgG – K	8.7	16.2	0.54
P. M.	4.54	IgG – K	7.6	13.4	0.57
P. M.	3.98	IgG – K	15.5	14.7	1.05
R. J.	15.24	IgG – K	1010.0	10.3	98.06
Ř. L.	15.24	LC – L biclon	5.90	281.0	0.02
M. A.	21.65	IgG – K	10.6	22.8	0.46
S. M.	78.93	IgA – K	738.0	18.0	41
S. M.	1.47	IgG – K+L	5.90	20.8	0.28
S.M. (after 2 months)	negative	IgG – K+L	5.90	15.6	0.38
T. J.	10.27	IgA – L + bicl. IgG – K	5.90	3080	0.001
V. J.	1.62	IgG – L	23.2	65.3	0.36
V. K.	negative	negative	11.9	23.2	0.51
Z. J.	negative	negative	11.7	27.1	0.53
Ž. M.	4.62	LC – L	5.90	29400	0.0002

**Table 2.** Amyloidosis (AL)

Initials	SPE (serum protein electrophoresis)	Serum IFE (imunofixation electrophoresis)	FreeLite, results		
			kappa [mg/l]	lambda [mg/l]	ratio
B. J.	1.63	IgG – L	24.1	39.7	0.61
F. I.	negative	negative	12.5	18.8	0.66
K. V.	1.86	LC – L	19.0	569.0	0.03
M. M.	22.88	IgG – L	6.1	934.0	0.01
M. M.	4.72	IgG – L	5.9	24.0	0.25

**Table 3.** Monoclonal gammopathy of undertermined significance (MGUS)

Initials	SPE (serum protein electrophoresis)	Serum IFE (imunofixation electrophoresis)	FreeLite, results		
			kappa [mg/l]	lambda [mg/l]	ratio
B. J.	8.95	IgA – K	5.90	10.9	0.54
J. J.	negative	IgG – L	5.90	12.4	0.48
L. V.	4.25	IgG – L	13.2	19.4	0.68
V. J.	negative	negative	75.9	53.3	1.42

**Table 4.** Nonhodgking lymphoma (NHL)

Initials	SPE (serum protein electrophoresis)	Serum IFE (imunofixation electrophoresis)	FreeLite, results		
			kappa [mg/l]	lambda [mg/l]	ratio
B. M.	negative	IgG – K	5.90	61.5	0.1
K. B.	negative	negative	32.1	11.7	2.53
L. J.	1.99	negative (ND)	5.90	8.7	0.68
M. S.	negative (ND)	negative (ND)	26.9	27.7	0.97
S. L.	1.7	IgA – K	61.6	13.5	4.56
Š. J.	6.47	negative (ND)	552.0	168.0	3.29.

5 s primární amyloidózou (AL), 6 s nehodgkinským lymfomem (NHL) a 4 s monoklonální gamapatií nejasného významu („monoclonal gammopathy of undetermined significance“, MGUS).

Ke stanovení volných lehkých řetězců bylo použito metody systému FreeLite (Immunotech, Beckman Coulter). Principem této metody je nefelometrické měření precipitátu imunokomplexů antigen-protilátka. Pro FLC lambda jsou fyziologické hodnoty v rozmezí 5,71–26,3 mg/l, pro kappa řetězce 3,3–19,4 mg/l, v případě indexu kappa/lambda 0,26–1,65. SPE a IFE bylo provedeno standardním postupem [5].

## Výsledky

Mezi 51 vzorky bylo 23 FLC lambda a 17 FLC kappa pozitivních, 5 nemocných mělo oba typy FLC – kappa i lambda, celkově je tedy 35 pozitivních výsledků s použitím FLC (68,6 %).

S použitím elektroforézy byl prokázán paraprotein u 31 pacientů (60,7 %), u 7 pacientů s negativním výsledkem byla prokázána vysoká hladina volných lehkých řetězců FLC v séru. Metoda FLC je ve zkoumané skupině o 8 % citlivější než SPE. S použitím imuno-

elektroforézy byla prokázána pozitivní hladina MIg u 39 nemocných, tj. u 76,5 %. Z hlediska celkového počtu pozitivních výsledků se tak v souboru jeví vyšetření FLC méně citlivou metodu než IFE. Toto tvrzení však nemusí být jednoznačné. Například u 7 nemocných s negativním výsledkem IFE bylo vyšetření FLC pozitivní.

Při srovnání všech postupů u jednotlivých diagnóz byl u nemocných s mnohočetným myelomem ve 22 případech detekován paraprotein pomocí SPE (61,1 %), ve 30 podle IFE (83,3 %) a ve 25 podle FLC (69,4 %) (tab. 1). Z 5 nemocných s AL byly u 4 z nich výsledky pozitivní s použitím jak SPE, tak IFE i „FLC“ v séru. U posledního pacienta nebyl prokázán paraprotein žádnou z těchto metod (tab. 2). U dvou nemocných s MGUS byl s použitím imuno-elektroforézy v séru zjištěn IgG – lambda, u jednoho IgA – kappa. Tito tři nemocní mají však negativní FLC. U čtvrtého nemocného je naopak při negativní SPE i IFE prokázána komponenta FLC – kappa i lambda (tab. 3). V rámci získání prvních zkušeností jsme vyšetřili také 6 pacientů s nízkou maligním NHL, ačkoli v tomto případě bývá produkce MIg relativně méně častá. Ve 2 případech jsme prokázali MIg pomocí IFE, 3krát pomocí SPE a 5krát metodou FLC. Jeden pacient měl pozitivní SPE při negativním FLC (tab. 4).

## Diskuse

Principem stanovení FLC v séru je průkaz pomocí protilátky proti vnitřnímu epitopu molekul lehkých řetězců IgG, který v kompletní molekule zůstává pro detekci nepřístupný. Kromě samotného stanovení FLC je v praxi využíván i poměr obou tříd lehkých řetězců (index  $\kappa/\lambda$ ), který odráží nejen nadprodukcii patologického proteinu, ale i míru suprese tvorby fyziologických řetězců. Při srovnání s používanými postupy byla metoda v úvodních studiích 50krát citlivější než SPE a 30krát citlivější než IFE [2]. Významně vyšší citlivost znamená, že např. až u 82 % NSM lze paraprotein detekovat [6]. Stejně tak u nemocných s primární amyloidózou (kdy je SPE i IFE také často negativní) byl metodou FLC prokázán paraprotein až u 97 % případů. Kromě „klasických“ typů monoklonální gamapatie navrhuji někteří autoři využití metody FLC k hodnocení aktivity u dalších B-lymfoproliferací, které mohou být provázeny produkcí IgG [7]. Nedávná analýza také prokázala možnost využití FLC k přesnějšímu odhadu prognózy nemocných s MGUS [3].

Dalším přínosem citlivější metody je přesnější hodnocení efektu léčby, respektive kompletní remise a časná detekce progresu/relapsu. Při zpětné analýze vzorků 244 nemocných léčených v rámci studií MRC V-VII („Medical Research Council Working Party for Leukaemia in Adults“) bylo kompletní remise dosaženo u 32 % pacientů podle výsledků imunoelektroforézy, ale jen u 11 % podle stanovení FLC [8]. Správné hodnocení efektu léčby má prognostický význam a je jedním z hlavních faktorů ovlivňujících další terapeutický postup. I proto je stanovení FLC zařazeno do nového systému hodnocení terapeutické odpovědi MM [9]. Stejně tak monitorování FLC u nemocných s AL prokázalo pokles koncentrace FLC u 47–99,5 % pacientů s příznivou terapeutickou odpovědí a vzestup hladin při relapsu.

V našem souboru jsme potvrdili vyšší citlivost metody FLC ve srovnání s SPE, nikoli však s IFE. Asi hlavním přínosem této úvodní studie je fakt, že v některých případech byly výsledky FLC pozitivní i přes negativitu IFE a naopak. Z našich výsledků vyplývá, že vyšetření IFE a FLC jsou komplementární a měly by být prováděny v přesně indikovaných případech současně. V blízké budoucnosti bude také zřejmě jasnější, zda rychlé hodnocení odpovědi pomocí FLC (při krátkém poločasu proti kompletním molekulám Ig) bude mít význam při stanovení léčebné strategie [10].

## Literatura

1. **Hachová, L., Jarolímková, E., Zima, T.** Detekce M proteinu, další laboratorní nálezy, jejich význam a interpretace. In Špička, I. et al. *Mnohočetný myelom a další monoklonální gamapatie*. Praha: Galén 2005, s. 50–53. ISBN 80-7262-330-3.
2. **Bradwell, A. R., Carr-Smith, H. D., Mead, G. P., Drayson, M. T.** Serum free light chain immunoassays and their clinical application. *Clinical and Applied Immunology Reviews* 3. In Bradwell, A. R. *Serum Free Light Chain Analysis*. Birmingham 2004.
3. **Rajkumar, S. V., Kyle, R. A., Therneau, T. M. et al.** Serum free light chain ratio is an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*, 2005, 106, p. 812–817.
4. **van Rhee, F., Bolejack, V., Hollmig, K., Pineda-Roman, M., Anaissie, E. et al.** High serum-free light chain levels and their rapid reduction in response to therapy define an aggressive multiple myeloma subtype with poor prognosis. *Blood*, 2007, 110, 3, p. 827–832.
5. **Hachová, L., Jarolímková, E., Zima, T.** *Laboratorní diagnostika paraproteinu*. Praha 2003.
6. **Drayson, M., Tang, L. X., Drew, R., Mead, G. P., Carr-Smith, H., Bradwell, A. R.** Serum free light-chain measurements for identifying and monitoring patients with nonsecretory multiple myeloma. *Blood*, 2001, 97, 9, p. 2900–2902.
7. **Martin, W., Abraham, R., Shanafelt, T., Clark, R. J. et al.** Serum-free light chain—a new biomarker for patients with B-cell non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Transl. Res.*, 2007, 149, 4, p. 231–235.
8. **Bradwell, A. R., Carr-Smith, H. D., Mead, G. P., Harvey, T. C., Drayson, M. T.** Serum test for assessment of patients with Bence Jones myeloma. *Lancet*, 2003, 361, 9356, p. 489–491.
9. **Durie, B. G., Harousseau, J. L., Miguel, J. S., Bladé, J., Barlogie, B. et al.** International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*, 2006, 20, 9, p. 1467–473.
10. **Ščudla, V., Vytřasová, M., Minařík, J.** Klinický význam hodnocení sérových hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinu u monoklonálních gamapatií. *Trans. Hemat. dnes*, 2005, 11, p. 47–53.

Do redakce došlo 29. 2. 2008.

Adresa pro korespondenci:  
Doc. MUDr. Ivan Špička CSc.  
I. interní klinika 1. LF UK a VFN  
U Nemocnice 2  
128 08 Praha 2  
e-mail: spicka@cesnet.cz