

System HevyLite™ u IgA monoklonálních gamapatií – první zkušenosti

Pika T.¹, Heřmanová Z.², Lochman P.³, Zapletalová J.⁴, Minařík J.¹, Bačovský J.¹, Ščudla V.¹

¹III. interní klinika, Lékařská fakulta UP a Fakultní nemocnice Olomouc

²Ústav imunologie, Lékařská fakulta UP a Fakultní nemocnice Olomouc

³Oddělení klinické biochemie a imunogenetiky, Fakultní nemocnice Olomouc

⁴Ústav lékařské biofyziky, Ústav molekulární a translační medicíny, LF Univerzity Palackého, Olomouc

SOUHRN

Cíl studie: Pro monoklonální gamapatie (MG) je typická přítomnost molekul monoklonálního imunoglobulinu (MIG) nebo jejich fragmentů v séru a/nebo v moči. Nejnovějším testem rozšiřujícím spektrum možností vyšetření MIG je systém HevyLite™, principiálně založený na užití dvojice specifických protilátek proti junkčním epitopům mezi doménami těžkého a lehkého řetězce imunoglobulinu. Cílem práce bylo zavedení systému HevyLite™ a provedení pilotní analýzy ve skupině nemocných s MG typu IgA.

Název a sídlo pracoviště: III. interní klinika, Fakultní nemocnice Olomouc.

Materiál a metody: Vyšetřený soubor tvořilo 24 nemocných s mnohočetným myelomem (MM) a 7 jedinců s monoklonální gamapatií nejistého významu (MGUS). Pro stanovení sérových hladin IgA κ , IgA λ byl použit systém HevyLite™ (The Binding Site, UK) a analyzátor BN II (Siemens Healthcare Diagnostics). Výpočtem byl určen poměr IgA κ /IgA λ .

Výsledky: U nemocných s aktivní formou MM byly zjištěny vysoce patologické hladiny dominantního MIG, se supresí hladin alternativního imunoglobulinu IgA a s výrazným ovlivněním poměru IgA κ /IgA λ . Ze 6 nemocných s dosažením kompletní remise byl u 5 zaznamenán normální poměr IgA κ /IgA λ , jeden nemocný vykazoval supresi obou IgA typů se změnou poměru IgA κ /IgA λ . U všech jedinců s MGUS byly zjištěny abnormální hladiny i poměr IgA κ /IgA λ , u jedince s low-risk typem byla hodnota poměru IgA κ /IgA λ pouze nadhraniční. Při srovnání výsledků stanovení M-proteinu metodou HevyLite™ a elektroforézou, Spearmanova korelační analýza potvrdila velmi těsnou korelaci hladin M-proteinu jak v případě IgA κ ($r = 0,946$, $p < 0,0001$), tak IgA λ ($r = 0,872$, $p = 0,0001$). Součty hladin dominantního i alternativního IgA imunoglobulinu významně korelovaly s celkovou hladinou imunoglobulinu IgA stanoveného nefelometricky ($r = 0,994$, $p < 0,0001$).

Závěr: Je patrné, že systém HevyLite™ nadějně doplňuje soubor vyšetření, používaných standardně při sledování MG, zejména pak v případech s velmi nízkou koncentrací MIG či jen pouhé pozitivitu imunofixační elektroforézy. Pro definitivní zhodnocení přínosu vyšetření pro klinickou praxi je nutné získání dalších zkušeností.

Klíčová slova: monoklonální gamapatie, mnohočetný myelom, MGUS, HevyLite, heavy/light chain.

SUMMARY

Pika T., Heřmanová Z., Lochman P., Zapletalová J., Minařík J., Bačovský J., Ščudla V.: System HevyLite™ and IgA monoclonal gammopathy – first experience

Objective: Typical features of monoclonal gammopathy (MG) include the presence of monoclonal immunoglobulin (MIG) molecules or their fragments in the serum and/or urine. The latest test which extends the range of MIG examination possibilities is the HevyLite™ system, using principally a couple of specific antibodies against junctional epitopes between the domains of heavy and light immunoglobulin chains in constant regions. The study aimed at implementing the HevyLite™ system and performing a pilot analysis in the group of IgA-type MG patients.

Settings: Department of Internal Medicine III, University Hospital Olomouc.

Material and methods: The studied group consisted of 24 patients with multiple myeloma (MM) and 7 individuals with monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS). The HevyLite™ system (The Binding Site, UK) was used to determine the serum levels of IgA κ , IgA λ as well as the BN II analyser (Siemens Healthcare Diagnostics). The ratio of IgA κ /IgA λ was determined by calculation.

Results: The patients in the active disease stage revealed highly pathological levels of the dominant MIG, with suppressed levels of the alternative IgA immunoglobulin, and significant influence on the IgA κ /IgA λ ratio. 5 out of the 6 patients who had achieved a complete remission showed a normal IgA κ /IgA λ ratio, 1 patient had suppression of both IgA with a modified IgA κ /IgA λ ratio. All individuals with MGUS revealed abnormal levels as well as ratio of IgA κ /IgA λ , one patient with a low-risk disease type had the IgA κ /IgA λ ratio value slightly above the threshold. When comparing the results of M-protein determination by the method of HevyLite™ and electrophoresis, Spearman's correlation analysis confirmed a very close correlation of M-protein levels regarding IgA κ ($r = 0.946$, $p < 0.0001$) as well as IgA λ ($r = 0.872$, $p = 0.0001$). The summations of the dominant as well as alternative IgA immunoglobulin levels substantially correlated with the general level of IgA immunoglobulin determined nephelometrically ($r = 0.994$, $p < 0.0001$).

Conclusion: It seems, that the HevyLite™ system promisingly complements the set of examinations used routinely by MG monitoring, in particular by very low concentrations of MIG, or the mere positivity of the immunofixation electrophoresis. Further experience needs to be gained in order to fully assess the benefits of this examination for clinical practice.

Key words: monoclonal gammopathy, multiple myeloma, MGUS, HevyLite, heavy/light chain.

Úvod

Pro skupinu onemocnění zvaných monoklonální gamapatie je typická přítomnost molekul monoklonálního imunoglobulinu (paraproteinu, M-proteinu) nebo jejich fragmentů (lehkých, těžkých řetězců), detekovatelných v séru a/nebo v moči [1]. Mezi základní vyšetření běžně využívaná k detekci M-proteinu v séru patří elektroforéza (gelová, kapilární zónová) dovolující kvantifikaci a imunofixace (IFE), která představuje citlivější metodu umožňující typizaci M-proteinu, avšak s možností pouze kvalitativního, nikoliv kvantitativního stanovení [2]. V posledních letech se stalo zcela dostupné vyšetření hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinu v séru pomocí souprav Freelite™. Stanovení se provádí nefelometricky nebo turbidimetricky a využívá vysoce specifických detekčních protilátek proti vnitřním epitopům volných lehkých řetězců κ a λ . Vyšetření umožňuje jejich přesnou kvantifikaci a stanovení jejich vzájemného poměru κ/λ – tedy indexu klonality lehkých řetězců a tím i klonality přítomné plazmocytární populace [3, 4]. Nejnovějším testem ve spektru vyšetření monoklonálního proteinu je systém HevyLite™, principiálně založený na užití dvojice specifických protilátek proti junkčním epitopům mezi doménami těžkého a lehkého řetězce v konstantní oblasti řetězců imunoglobulinu (HLC). V závislosti na typu použité soupravy metoda umožňuje stanovení hladin HLC u různých izotypů imunoglobulinů (IgG, IgA, IgM, IgE, IgD), poskytuje reprodukovatelné, kvantitativní výsledky i v případě pouhé imunofixační positivity M-proteinu a analogicky, jako v případě vyšetření sérových hladin volných lehkých řetězců, umožňuje výpočet poměru HLC – indexu klonality $Ig\kappa/Ig\lambda$. Metoda taktéž eliminuje omezení konvenční elektroforézy, zejména v případech změny hematokritu nebo překrytí části spektra M-proteinu transferinem, haptoglobinem či C3 složkou komplementu [5, 6, 7, 8]. Náplní předloženého sdělení jsou první zkušenosti se systémem HevyLite™ u nemocných s monoklonálními gamapatiemi s IgA typem M-proteinu.

Cílem práce bylo zavedení metody HevyLite™ pro vyšetřování sér pacientů s MG typu IgA na nefelometru BN II s následnou korelací získaných výsledků s hladinami M-proteinu, celkovými hladinami IgA imunoglobulinu a následně i s klinickým stadiem onemocnění.

Materiál a metody

Vyšetřený soubor nemocných s IgA monoklonální gamapatií tvořilo 24 nemocných s mnohočetným myelomem, splňujících SWOG a IMWG diagnostická kritéria, z nichž 4 nemocní byly vyšetřeny v době diagnózy nemoci, 6 nemocných při dosažení kompletní remise (negativní imunofixace séra) a 14 nemocných v průběhu onemocnění, tedy v aktivní fázi nemoci [9]. Dále bylo vyšetřeno 7 jedinců s monoklonální gamapatií nejistého významu, z čehož bylo 6 jedinců s high-

-intermediate a high-risk typem podle Rajkumara, vycházející z typu a hladiny M-proteinu a hodnoty indexu κ/λ volných lehkých řetězců [9]. Poměr sekrece izotypu $\kappa : \lambda$ byl v celém souboru 1,4 : 1. Pro stanovení sérových hladin HLC bylo použito nefelometru BN II (Siemens Healthcare Diagnostics) a souprav HevyLite™ IgA κ , IgA λ (The Binding Site Ltd.). Primární ředění vzorků bylo 1 : 100, v případě potřeby byly vzorky dále doředovány buď 1 : 20, nebo 1 : 400, k získání konkrétní koncentrace. Poměr HLC IgA κ /IgA λ byl získán výpočtem. Referenční rozmezí bylo vzato od výrobce souprav: HevyLite™: IgA κ (0,48–2,82 g/l), IgA λ (0,36–1,98 g/l) a indexu $Ig\kappa/Ig\lambda$ (0,8–2,04) [5]. Celkové hladiny imunoglobulinu IgA byly stanovovány rovněž nefelometricky na analyzátoru BNII s užitím diagnostického antiséra (N antiserum to Human IgA) s normálním rozmezím hodnot 0,7–4 g/l. Stanovení hladin M-proteinu bylo prováděno na přístroji Sebia Hydrasys s užitím souprav Sebia Hydragel 30 Protein(e) s následnou kvantifikací monoklonálního gradientu pomocí skeneru Epson 1680 Pro. K imunofixační analýze byly použity soupravy Hydragel 4 IF. Pro statistickou analýzu byl použit software SPSS v.15 (SPSS, Inc., Chicago, USA). Vzhledem k nenormální distribuci dat byla závislost parametrů posouzena pomocí Spearmanovy korelační analýzy.

Výsledky

U nemocných s aktivním onemocněním byly zjištěny vysoce patologické hladiny dominantního imunoglobulinu IgA κ nebo IgA λ (M-proteinu), se supresí hladin alternativního imunoglobulinu IgA κ nebo IgA λ a s výrazným ovlivněním poměru $Ig\kappa/Ig\lambda$. U pacientů, kteří dosáhli kompletní remise (negativita IFE), byl u 5 zaznamenán normální poměr $Ig\kappa/Ig\lambda$, avšak 1 nemocný vykazoval supresi obou typů IgA, zřejmě z důvodu krátkého odstupu od předchozí chemoterapie, se změnou poměru $Ig\kappa/Ig\lambda$. U všech jedinců s MGUS byly zjištěny abnormální hladiny i poměr $Ig\kappa/Ig\lambda$, u jedince s low-risk typem byla hodnota poměru $Ig\kappa/Ig\lambda$ pouze nadhraniční (obr. 1). Při srovnání výsledků stanovení M-proteinu metodou HevyLite™ a elektroforézou, Spearmanova korelační analýza potvrdila velmi těsnou korelaci hladin M-proteinu a IgA κ ($r = 0,946$, $p < 0,0001$), přičemž medián diferencí hladin IgA κ k hladině M-proteinu byl 3,5 g/l (min-max: 0,36–13,50 g/l) (obr. 2). Obdobně vyzněla analýza v případě IgA λ a M-proteinu ($r = 0,872$, $p = 0,0001$), s mediánem diferencí 1,0 g/l (min-max: -12,0 až +16,5 g/l) – obrázek 3. Nutno podotknout, že největší rozdíly v hladinách paraproteinu stanovených elektroforézou a metodou HevyLite™ byly v oblastech vysokých hladin, v případě nižších koncentrací byl vzájemný rozdíl hodnot minimální. Součty hladin dominantního i alternativního izotypu IgA imunoglobulinu významně korelovaly s celkovou hladinou imunoglobulinu IgA stanoveného nefelometricky ($r = 0,994$, $p < 0,0001$) s mediánem diferencí -0,32 g/l (min-max: -5,69 až +7,73 g/l) – obrázek 4.

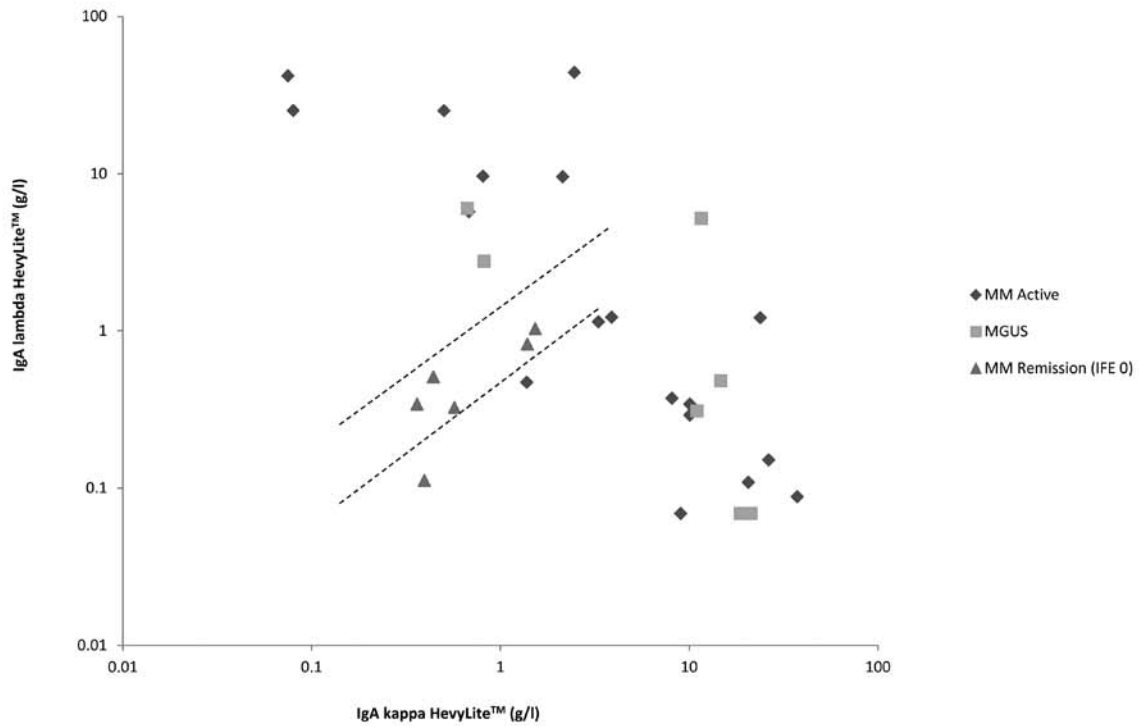


Fig. 1. IgA HevyLite™ test on 24 multiple myeloma (MM) sera and 7 monoclonal gammopathy (MGUS) sera

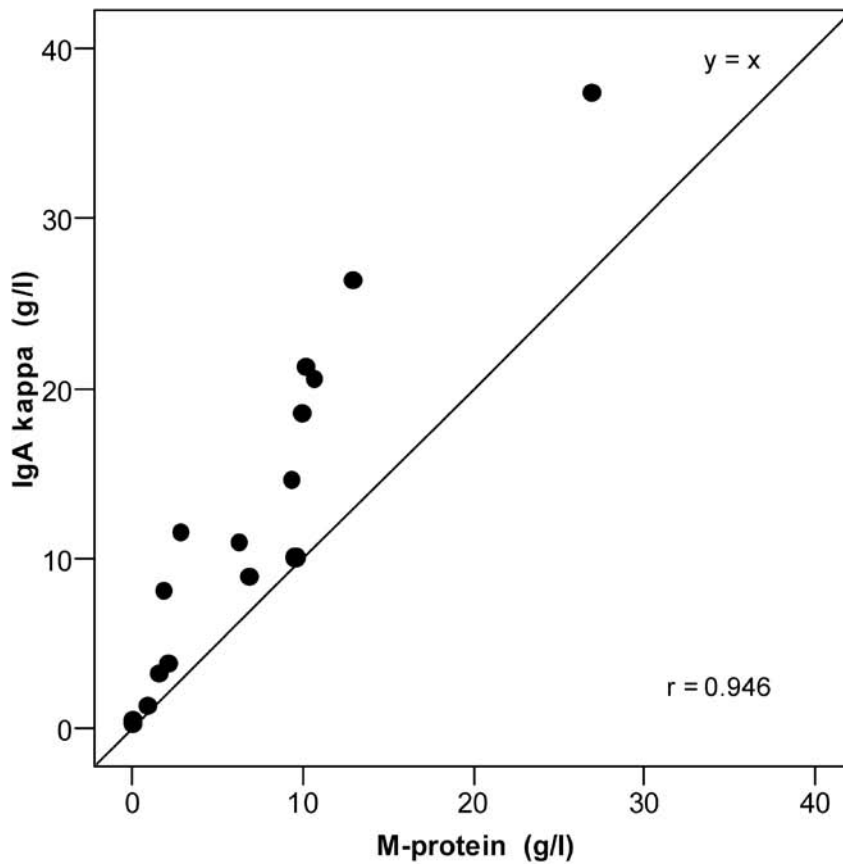


Fig. 2. Spearman's correlation between monoclonal protein (M-protein) and IgA kappa levels determined by HevyLite™ ($p < 0.0001$)

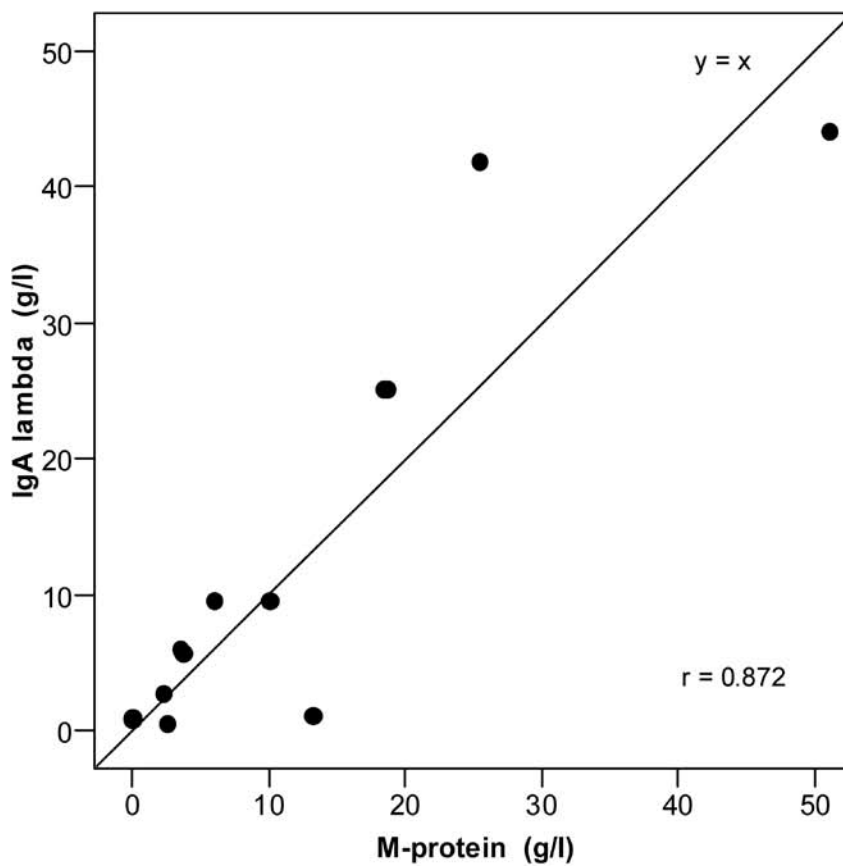


Fig. 3. Spearman's correlation between monoclonal protein (M-protein) and IgA lambda levels determined by HevyLite™ ($p = 0.0001$)

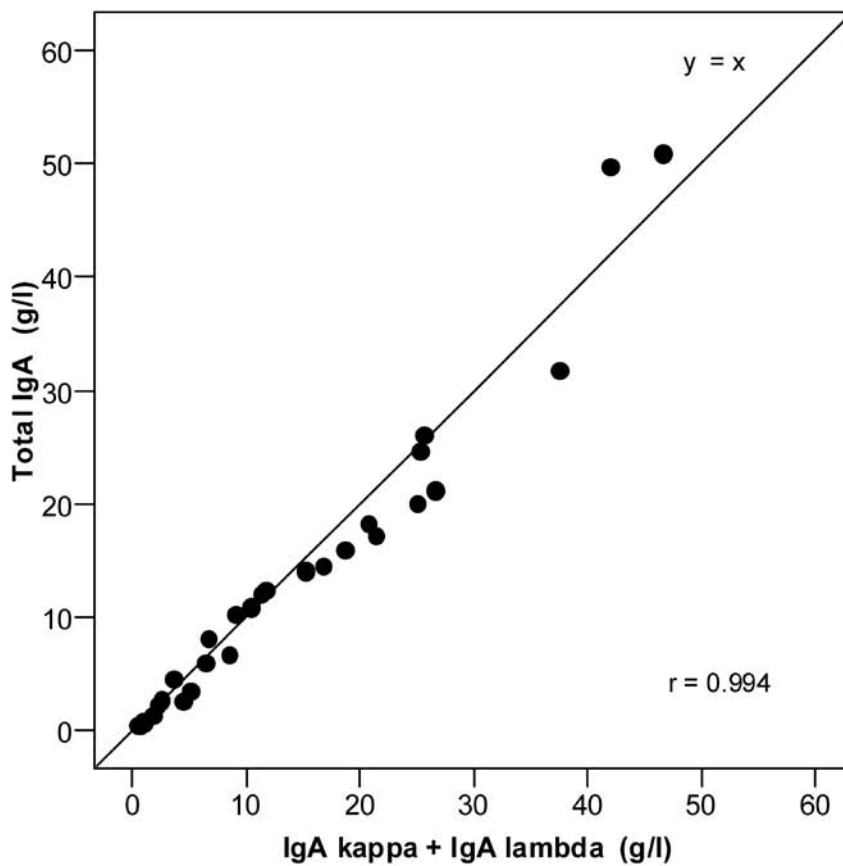


Fig. 4. Spearman's correlation of total IgA to summation of IgA HevyLite™ pairs ($p < 0.0001$)

Diskuse

Systém HevyLite™ je nepochybně novou, principiálně odlišnou metodou pro detekci a kvantifikaci monoklonálního imunoglobulinu než dosavadní zavedené elektroforetické a imunofixační techniky. Metodicky je založený na využití specifických, ovčích polyklonálních protilátek proti junkčním epitopům mezi doménami těžkého a lehkého řetězce v konstantní oblasti řetězců imunoglobulinu, následně vzniklé komplexy je možné detekovat nefelometricky či turbidimetricky. Doposud jsou soupravy koncipované pro nefelometrický systém BN II (Siemens Healthcare Diagnostics) a turbidimetrický systém SPA_{Plus} (The Binding Site). Cílem naší pilotní studie bylo zavedení vyšetření pro pacienty s MG IgA izotypu právě na platformě BN II. Samotná instalace systému, vyhotovení kalibračních křivek a zahájení sériového vyšetření vzorků se neshledala s významnějšími obtížemi, avšak vzhledem k iniciálnímu výběru vyšetřovaných vzorků (rozptyl od nulových hodnot paraproteinu po 51 g/l) bylo potřeba dalšího nařezování vzorků sér mimo základní ředění k dosažení určitých konkrétních hodnot hladin IgA κ nebo IgA λ a k následnému výpočtu indexu IgA κ /IgA λ . U všech našich analyzovaných sér od nemocných s aktivním mnohočetným myelomem, stejně tak i monoklonální gamapatií nejistého významu, byla zjištěna shoda mezi typem paraproteinu a elevací hladiny dominantního HLC páru, stejně tak i poměrem IgA κ /IgA λ . Vzhledem k tomu, že systém HevyLite™ je nejen citlivější než konvenční elektroforéza, ale taktéž poskytuje numerické výsledky u pacientů s pouhou imunofixační pozitivitou, bylo součástí našeho souboru 6 nemocných s dosažením kompletní remise po terapii, tedy s negativní imunofixační elektroforézou. U 5 pacientů byl zjištěn normální index IgA κ /IgA λ , pouze u jednoho nemocného, byla zjištěna suprese obou izotypů imunoglobulinu se změnou indexu IgA κ /IgA λ , zřejmě z důvodu krátkého odstupu od vysokodávkované chemoterapie s podporou autologního štěpu s následnou přetrvávající polyklonální supresí, doposud bez restituce imunitní parézy (viz obr. 1). Předpokládáný velký potenciál vyšetření HevyLite™ v případech pouhé positivity/negativity imunofixační analýzy je nyní na předním místě zájmu klinických pracovišť, neboť se předpokládá, že tato metoda dovoluje mnohem citlivěji detekovat nejen reziduální onemocnění, ale i časný relaps/progresi choroby, a to mnohem dříve než konvenční techniky [5, 6, 8]. Při srovnání absolutních hladin M-proteinu stanovených pomocí metody HevyLite™ a elektroforézou byla zjištěna vysoce významná, korelace obou metod ve shodě s údaji předchozích autorů. Větší rozdíl hodnot byl zaznamenán se vzrůstající hladinou paraproteinu, většinou ve prospěch nefelometrického stanovení. Vysvětlením může být dodatečná detekce skryté frakce paraproteinu, např. v β -zóně, či technická limitace jednotlivých metod; samozřejmě v potaz nutno vzít i možnou chybu vzniklou při dodatečném ředění vzorků. Podobné pozorování bylo zjištěno i jinými autory a nutno podotknout, že cílová oblast nízkých koncentrací paraproteinu byla diferencí ovlivněna zcela minimálně [10, 11, 12]. Finální částí naší

studie bylo srovnání celkových hladin IgA imunoglobulinu stanovených nefelometricky a hladin celkového IgA imunoglobulinu daných součtem hladin IgA κ a IgA λ , stanovených metodou HevyLite™, a i v tomto případě bylo dosaženo velmi významných korelací mezi oběma metodami, což bylo v souladu s pracemi, které hodnotily jak séra od zdravých dárců, tak vzorky sér od pacientů s monoklonálními gamapatiemi. Doposud publikovaná data však nezahrnují výsledky analýzy sér od nemocných s autoimunitními či chronickými zánětlivými chorobami a je možné, že v případě stavů spojených s elevací polyklonálních imunoglobulinů dojde i ke změně samotných hladin a následně i indexu Ig κ /Ig λ , i když se předpokládá, že stejně jako v případě systému FreeLite™, hodnoty vzájemného poměru Ig κ /Ig λ nebudou ovlivněny [5, 13]. Samotné hodnoty Ig κ /Ig λ indexu či v kombinaci s hladinami β_2 -mikroglobulinu vykazují jistý prognostický význam pro přežití nemocných s mnohočetným myelomem i rizikový faktor progresu monoklonální gamapatie nejistého významu do symptomatické formy myelomu, ale také je použitelný jako marker trvání období fáze nemoci do progresu (PFS). Je však nutné podotknout, že výše uvedené analýzy vyzněly přesvědčivěji pro IgG než pro IgA typ imunoglobulinu a je potřeba dalších prospektivních studií k ověření reálného přínosu indexu Ig κ /Ig λ jako prognostického ukazatele u nemocných s jednotlivými typy monoklonálních gamapatií [5, 6, 13, 14].

Závěr

Zavedení systému HevyLite™ významně obohatilo spektrum vyšetření u monoklonálních gamapatií a uvedená pilotní analýza potvrdila, že se jedná o velmi přínosné vyšetření doplňující zavedené elektroforetické a imunofixační techniky analýzy, s vysokou citlivostí zejména v nízkých hodnotách M-proteinu, kde mají klasické metody často limitovaný přínos. Uvedené výsledky poskytly základ pro další výzkumnou práci a je nutno říci, že k ověření přínosu systému HevyLite™ do každodenní praxe je potřeba získat další zkušenosti.

Literatura

1. **Kyle, R. A., Rajkumar, S. V.** Multiple myeloma. *Blood*, 2009, 111, p. 2962–2972.
2. **Tichý, M.** *Laboratorní analýza monoklonálních imunoglobulinů (paraproteinů)*. Český Těšín: FINIDR, s.r.o., 1997, ISBN 80-902022-1-7.
3. **Bradwell, A. R.** Serum free light chain measurements move to center stage. *Clin. Chem.*, 2005, 51, 5, p. 805–807.
4. **Ščudla, V., Schneiderka, P., Pika, T., Minařík, J., Bačovský, J., Farbiaková, V.** Klinický význam hodnocení sérových hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinu u monoklonálních gamapatií. *Klin. Biochem. Metab.*, 2008, 16, 37, 2, p. 76–83.
5. **Bradwell, A. R.** Analysis of immunoglobulin heavy chain/light chain pairs (HevyLite™). In *Bradwell A. R.: Serum free light chain analysis*. 6th edition. Birmingham: The Binding Site Ltd., 2010, p. 301–320.

6. **Bradwell, A. R., Harding, S., Fourier, N. J. et al.** Assessment of monoclonal gammopathies by nephelometric measurement of individual immunoglobulin kappa/lambda ratios. *Clin. Chem.*, 2009, 55, p. 1646–1655.
7. **Keren, D. F.** Heavy/light chain analysis of monoclonal gammopathies. *Clin. Chem.*, 2009, 55, p. 1606–1608.
8. **Ščudla, V., Pika, T., Heřmanová, Z.** Hevylite – nová analytická metoda v diagnostice a hodnocení průběhu monoklonálních gamapatií. *Klin. Biochem. Metab.*, 2010, 18, 39, 2, p. 62–68.
9. **International myeloma working group.** Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Brit. J. Haematol.*, 2003, 121, p. 749–757.
10. **Eckhold, J., Poenisch, W., Kratzsch, J., Thiery, J., Bruegel, M.** Analytical validation of Hevylite IgA assay for the diagnosis of monoclonal gammopathies. *Hematology Reports*, 2010, 2, s2, p. 52.
11. **Rodríguez-Molina, J. J., Navarro, J., Fernández-Cruz, E.** Quantification of IgA- κ and IgA- λ immunoglobulins in 54 serum samples with detectable IgA monoclonal component. *Hematology Reports*, 2010, 2, s2, p. 54.
12. **Assert, R., Eisele, L., Chapot, V. et al.** First experiences with measurement of IgA heavy/light chains in IgA monoclonal gammopathies. *Hematology Reports*, 2010, 2, s2, p. 52.
13. **Katzmann, J., Clark, R., Dispenzieri, A. et al.** Isotype-specific heavy/light chain (HLC) suppression as a predictor of myeloma development in monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS). *Blood*, 2009, 114, abstract 1788.
14. **Avet-Loiseau, H., Harousseau, J. L., Moreau, P. et al.** Heavy/Light Chain Specific Immunoglobulin Ratios at Presentation Are Prognostic for Progression Free Survival in the IFM 2005-01 Myeloma Trial. *Blood*, 114, abstract 1818.

S podporou grantu Vnitřní grantové agentury Univerzity Palackého LF 2010013 a VVZ MSM 619895205.

Do redakce došlo dne 12. 1. 2011.

Adresa pro korespondenci:

MUDr. Tomáš Pika

III. interní klinika, Fakultní nemocnice Olomouc

I. P. Pavlova 6

775 20, Olomouc

e-mail: tomas.pika@seznam.cz