

Srovnání stanovení koncentrace volných lehkých řetězců na analyzátoru Spa_{PLUS} a Immage 800

Bořecká K.¹, Sečník P.^{2,3}, Jabor A.^{2,3}, Granátová J.¹, Bolková M.¹

¹ Oddělení klinické biochemie, Thomayerova nemocnice, Praha

² Pracoviště laboratorních metod, IKEM, Praha

³ 3. lékařská fakulta UK, Praha

SOUHRN

Cíl studie: Cílem experimentu bylo porovnat stanovení koncentrace volných lehkých řetězců kappa a lambda (FLC κ , FLC λ) turbidimetricky na analyzátoru Spa_{PLUS} (The Binding Site) a Immage 800 (Beckman Coulter), včetně srovnání indexu κ/λ .

Typ studie:

Název a sídlo pracoviště: Oddělení klinické biochemie Thomayerovy nemocnice Praha a Pracoviště laboratorních metod IKEM Praha

Materiál a metody: Vybrali jsme nehemolytická séra ($n = 73$) zdravých osob a pacientů s různou diagnózou, tj. zdravých osob, s MGUS (monoklonální gamapatie nejasného významu) i MM (mnohočetným myelomem). Změřili jsme koncentraci FLC- κ a FLC- λ simultánně na analyzátoch Immage 800 a Spa_{PLUS}. K měření byly použity diagnostické soupravy The Binding Site. Vypočetli jsme index κ/λ a výsledky statisticky zpracovali. Měřením kontrolních materiálů a kalibračních standardů jsme vyhodnotili vybrané analytické charakteristiky obou metod.

Výsledky: Zjistili jsme statisticky významný rozdíl hodnot FLC- κ , FLC- λ i indexu κ/λ . Koncentrace FLC- κ i FLC- λ měřené na Immage 800 byly obecně nižší v porovnání se Spa_{PLUS}. Rozdíl hodnot FLC- κ byl výraznější než FLC- λ , u FLC- κ nebyl ve všech případech shodný trend (u některých vzorků s vysokými koncentracemi byly hodnoty na Immage 800 vyšší). Mezi-lehlá preciznost a opakovatelnost se lišily od údajů výrobců, nicméně klinickým účelům vyhovovaly.

Závěr: Ačkoliv se potvrdil očekávaný rozdíl hodnot měřených různými analytickými systémy, klinická relevance rozdílu je diskutabilní. Pouze v několika případech došlo k posunu indexu κ/λ vůči cut-off (patologická hodnota κ/λ u shodného pacienta na druhém analyzátoru v ref. rozmezí).

Klíčová slova: volné lehké řetězce, index κ/λ , monoklonální gamapatie, turbidimetrie.

SUMMARY

Bořecká K., Sečník P., Jabor A., Granátová J., Bolková M.: Comparison of Measurement Free Light Chains by SPA_{PLUS} and Immage 800

Objective: Comparison of turbidimetric measurement of FLC concentrations by Spa_{PLUS} (The Binding Site) and Immage 800 (Beckman Coulter), including index κ/λ , was the aim of this experiment.

Design:

Settings: Department of Clinical Biochemistry, Thomayer's Hospital and Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague

Materials and Methods: We simultaneously measured FLC- κ and FLC- λ concentrations in serum samples ($n = 73$) by Immage 800 and Spa_{PLUS}. We chose non-haemolytic samples with different FLC concentration, both from healthy probands, and from patients with MGUS (Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance) and MM (Multiple Myeloma). We calculated index κ/λ and statistically processed results. We also measured FLC concentration in control samples and assessed repeatability and intermediate precision.

Results: We found significant difference for FLC- κ , FLC- λ , and κ/λ ratio. Concentrations measured by Immage 800 were generally lower in all parameters in comparison with Spa_{PLUS}. FLC- κ difference was more pronounced than FLC- λ difference. Minority of samples ($n = 15$), predominantly with high concentrations of FLC- κ , showed inversed trend and FLC- κ results were clearly higher when measured on Immage 800. Measurement precision (CV%) was slightly different in comparison to manufacturer's data, nevertheless satisfactory for clinical purposes.

Conclusion: Although we confirmed the expected difference of values measured by different devices, we do not consider the difference clinically relevant. We observed the shift in interpretation of κ/λ ratio using standard reference range (pathological value of κ/λ on the first analyzer, and κ/λ in reference range on second analyzer when measuring identical sample) only in limited number of cases.

Keywords: Free Light Chains (FLC), κ/λ ratio, monoclonal gammopathy, turbidimetry.

Úvod

Měření koncentrace volných lehkých řetězců a především stanovení indexu κ/λ patří k základním vyšetřením u pacientů, u nichž je v diferenciální diagnostice zvažována monoklonální gamapatie. Stanovení koncentrace FLC se využívá nejen pro diagnostiku a moni-

torování terapeutické odpovědi u pacientů s mnohočetným myelomem, ale i pro sledování průběhu nemoci [1-6]. V roce 2006 se stanovení volných lehkých řetězců stalo součástí doporučení NACB [7] a je také součástí kritérií odpovědi na léčbu mnohočetného myelomu (MM) IMWG (International Myeloma Working Group) [8]. Stanovení FLC je také doporučováno jako jeden

z prognostických faktorů pro rizikovou stratifikaci pacientů s MGUS [4]. Dalším využitím je rozpoznání remise nemoci (kompletní remise je provázena obvykle normalizací hladin a indexu κ/λ), délky trvání stabilní fáze („plateau“) i včasné zachycení progresu nebo relapsu onemocnění (vzestup hladin FLC, trend indexu κ/λ). K uvedeným změnám dochází mnohem dříve než k nárůstu počtu plazmocytů v kostní dřeni nebo vzestupu koncentrace monoklonálního imunoglobulinu v případě sekrečního typu gamapatie [2, 9, 10]. Stanovení FLC má velký význam jak v diagnostice, tak při sledování průběhu onemocnění i hodnocení terapeutické odezvy u primární amyloidózy (AL) a u tzv. nesekretorického myelomu [5, 6].

Vzhledem k principu rutinního stanovení FLC imunoturbidimetricky nebo imunonefelometricky jsou výsledky významně závislé na použitém analytickém systému. Jedním z problémů stanovení je možná zkřížená reakce s lehkými řetězci navázanými v intaktních imunoglobulinových molekulách a stále ještě nedostatečná standardizace tohoto vyšetření [12], což se odráží v odlišných výsledcích měření různými analytickými systémy [13]. Při interpretaci výsledků je také nutné počítat s několika možnými zdroji analytické variability (nelinearita metody a problematika ředění, polymerizace, nadbytek antigenů) [14].

Materiál a metody

Mezilehlá preciznost byla vypočtena z výsledků opakovaného měření materiálů určených pro interní kontrolu kvality (Binding Site Freelite Controls). Ke zjištění opakovatelnosti byl použit kalibrační standard a vzorek séra pacienta s mnohočetným myelomem.

Srovnání metod mezi různými analytickými systémy bylo provedeno na vzorcích pacientů s primárním podezřením na gamapatii nebo dlouhodobě pro toto onemocnění sledovaných, jako součást komplexního vyšetření (zahnuje elektroforézu proteinů séra a moče, stanovení koncentrace IgG, IgA, IgM a FLC- κ a FLC- λ). Vybrali jsme vzorky nehemolytických sér zdravých probandů a pacientů s různou diagnózou (MGUS, maligní monoklonální gamapatie), a tedy i předpokládanými koncentracemi

FLC v širokém rozsahu hodnot. Po odběru a separaci byla séra zamrazena na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a po rozmražení bylo simultánně provedeno měření koncentrace FLC- κ a FLC- λ na analyzátoru Immage 800 (Beckman Coulter) soupravami Freelite® Human Kappa Free Kit a Freelite® Human Lambda Free Kit for use on the Beckman Coulter IMMAGE/IMMAGE 800 (The Binding Site Ltd.) a na analyzátoru Spa_{PLUS} (The Binding Site Ltd.) soupravami Freelite® Human Kappa Free Kit a Freelite® Human Lambda Free Kit (The Binding Site Ltd.). Principem testu je v obou případech turbidimetrie, design metody je ale rozdílný (rozdílná vlnová délka, čas měření, ředění).

Vypočetli jsme index κ/λ a výsledky statisticky zpracovali pomocí programu MedCalc (Bland-Altmanovy diferenční grafy, Passing-Bablokova regresní analýza, box and whiskers grafy, Spearmanův korelační koeficient, Wilcoxonův test).

Výsledky a diskuse

Design testů a zjištěnou opakovatelnost a mezilehlou přesnost shrnují Tabulky 1 a 2. Relativní nevýhodou analyzátoru Immage 800 pro rutinní použití je nutnost manuálního ředění vzorku u koncentrací nad základní měřící rozsah, které analyzátor Spa_{PLUS} provádí automaticky.

Zjištěná opakovatelnost je mírně horší než udává výrobce. Mezilehlá preciznost naměřená v našich podmínkách je překvapivě lepší, než je výrobcem deklarováno v příbalovém letáku. Ačkoli v tabulce uvádíme mezilehlou preciznost pro malý počet měření, naše další data za období šesti měsíců (v Tabulce 2 neuvádíme) jsou podobná preciznosti uvedené v Tabulce 1. Interpretaci dále komplikuje nejasnost metodiky určení „přesnosti mezi běhy stanovení“ která je uvedena výrobcem kitů pro analyzátor Immage a kterou jsme použili jako zástupnou hodnotu za mezilehlou preciznost v Tabulce 1. Opakovatelnost stanovení FLC- κ je lepší na analyzátoru Immage 800, opakovatelnost FLC- λ je naopak výrazně lepší na Spa_{PLUS}.

Vzhledem k poměrně nízké intraindividuální biologické variabilitě FLC- κ ($CV_i = 8,1\%$) i FLC- λ ($CV_i = 7,0\%$) se zjištěná mezilehlá preciznost významnou mírou podílí na celkové chybě měření.

Table 1: Test design (declared by manufacturer)

Test characteristics	Spa _{PLUS}		Immage 800	
	FLC- κ	FLC- λ	FLC- κ	FLC- λ
Measurement time	20 min		10 min	
Principle	Immunoturbidimetry		Immunoturbidimetry	
Wave-length [nm]	600		940	
Calibration	6 point		6 point	
Limit of Detection [mg/l]	0.4	0.45	3.0	2.4
Measuring range [mg/l]	0.4 – 1 800.0	0.45 – 1 650.0	3.0 – 180.0	2.4 – 162.0
Intermediate precision* CV %	11.2 – 9.0 – 6.6	7.2 – 4.4 – 6.8	15.0 – 5.8 – 7.2	7.2 – 7.2 – 11.7
Repeatability* CV %	3.3 – 1.6 – 1.8	3.4 – 2.4 – 2.0	8.1 – 5.4 – 4.0	2.2 – 2.0 – 6.8

*declared values for three levels of samples

Table 2: FLC – Spa_{PLUS} vs. Immage 800 IQA: Intermediate precision and repeatability (Intermediate precision was calculated from internal quality control data; date range: 1 month. For assessment of repeatability Binding Site Freelite Calibrator 6 was used as a low sample, and multiple myeloma patient serum was used as high sample.)

		Spa _{PLUS}				Immage 800			
		FLC-κ		FLC-λ		FLC-κ		FLC-λ	
		high	low	high	low	high	low	high	low
Intermediate precision	N	4	4	5	5	4	4	6	6
	Mean	26.9	14.5	53.6	27.0	34.4	18.6	48.9	22.6
	% bias (from decl. mean)	-1.6	+1.1	-7.1	-2.4	+1.8	+6.4	-6.9	-7.6
	CV %	5.6	2.2	4.9	5.6	1.97	5.7	8.4	8.1
Repeatability	N	7	7	7	7	7	7	7	7
	Mean	2 259	18.4	1 296	18.8	2 839	19.7	1 584	14.5
	CV %	4.55	7.93	3.66	1.42	4.74	3.13	12.98	4.08
	Difference % (Spa as reference)	n/a	n/a	n/a	n/a	+25.7	+6.7	+22.3	-23.2

Table 3: Results of Passing-Bablok regression and Bland-Altman analysis (SPA = Spa_{PLUS} analyzer, IMM = Immage 800 analyzer)

	Medians of measured values		Passing-Bablok regression Equation	Significance of intercept and slope ¹		Average relative difference ² (95% CI)
	SPA	IMM		Intercept	Slope	
FLC-κ	35.3	24.7	IMM=-3.17+0.842×SPA	Yes	Yes	27.5 (-40.3 to 95.2)
FLC-λ	15.6	14.2	IMM=0.898+0.797×SPA	No	Yes	9.3 (-51.8 to 70.4)
Ratio κ/λ	1.53	1.19	IMM=-0.091+0.862×SPA	No	Yes	19.4 (-49.6 to 88.3)

¹Significance of intercept and slope being different from 0 and 1.0, respectively

²Average relative difference from Bland-Altman analysis, calculated as (SPA IMM)/average (%)

Výsledky měření vzorků sér pacientů ukazuje Tabulka 3.

Naměřené koncentrace FLC z obou analyzátorů spolu poměrně dobře statisticky korelovaly (Spearmanův korelační koeficient je 0,964, 0,965 a 0,956 pro FLC-κ, FLC-λ a index κ/λ). Koncentrace FLC-κ i FLC-λ měřené na Immage 800 byly ve většině případů nižší v porovnání se Spa_{PLUS}, je patrný systematický posun i proporcionální odchylka. Zjištěné rozdíly mezi analyzátory jsou statisticky významné FLC-κ ($p < 0,0001$), FLC-λ ($p = 0,0024$), index κ/λ ($p < 0,0001$, vše Wilcoxonův test). Z primárního souboru dat jsme následně oddělili pouze hodnoty FLC-κ a FLC-λ menší než 100,0 mg/l a index κ/λ menší než 3,0 (uvedené hodnoty jsou v praxi nejčastější a z klinického hlediska zajímavé). Také v tomto sekundárním souboru je zřetelný rozdíl měření s nižšími hodnotami FLC-κ i FLC-λ na analyzátoru Immage 800.

Pro posouzení vlivu rozdílů měření FLC mezi analyzátory na klinické hodnocení výsledků jednotlivých pacientů jsme rozdělili soubor na jednotlivé diagnostické skupiny (MM, MGUS, oligoklonální syntéza imunoglobulinů, polyklonální hyperimmunoglobulinémie, sekundární paraproteinémie u hematologických nebo systémových onemocnění a ostatní). Ve skupinách jsme sledovali výskyt patologických a fyziologických hodnot

indexu κ/λ (ref. rozmezí: 0,260 - 0,650). Pro pacienty s glomerulární filtrační funkcí sníženou pod 0,5 ml/s (4. až 5. stadium dle KDOQI, hodnoceno pomocí eGFR dle Lund-Malmö) bylo použito renální referenční rozmezí (0,370 - 3,100) pro index κ/λ (viz Tabulka 4).

Přestože porovnání hodnot FLC měřených oběma analyzátory ukazuje statistické rozdíly, na klinické hodnocení výsledků jednotlivých pacientů nemá ve většině případů významný vliv. Rozdílné zařazení do skupiny fyziologických vs. patologických hodnot vůči referenčním mezím jsme našli v cca 11 % případů. Vzhledem k využití sledování dynamiky koncentrací volných lehkých řetězců v monitoraci průběhu onemocnění a terapeutického efektu je vhodné měření provádět na stejném analytickém systému.

Závěr

Ačkoliv výsledky měření oběma analytickými systémy spolu dobře korelovaly, potvrdili jsme očekávaný rozdíl hodnot měřených různými analytickými systémy, resp. na analyzátoru Spa_{PLUS} a Immage 800. Rozdíly všech měřených parametrů byly statisticky významné, nejvyšší rozdíl jsme zjistili u FLC-κ a indexu κ/λ. Tyto rozdíly přesto vzhledem k zařazení do fyziologických

Table 4: Pathological ratio κ/λ in dg. groups – Spa_{PLUS} vs. Immage 800 (MM = Multiple Myeloma, MGUS = Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance, SPA = Spa_{PLUS} analyzer, IMM = Immage 800 analyzer)

	N	MEAN κ/λ		Pathological κ/λ (number of cases)	
		SPA	IMM	SPA	IMM
MM (incl. M. Waldenström)	14	55.43	81.51	13	11
MGUS	25	11.26	8.54	13	11
Oligoclonality in gamma-globulins	6	3.04	2.57	3	3
Polyclonal hyperimmunoglobulinemia	8	1.82	1.66	4	2
Secondary paraprotein in haematol. or systemic diseases	3	62.55	136.93	3	3
Physiological electrophoretic findings	9	1.44	1.04	2	0
Transient paraprotein or unknown status	8	6.72	11.74	0	0

vs. patologických hodnot u jednotlivých klinických tříd nepovažujeme za zřetelně klinicky významné, pouze u několika případů došlo k rozdílnému hodnocení indexu κ/λ vůči ref. rozmezí (patologická hodnota κ/λ u shodného pacienta na druhém analyzátoru v ref. rozmezí). Preciznost měření se mírně lišila od údajů poskytnutých výrobcí, nicméně vyhovovala klinickým účelům.

Literatura

1. Špička, I. et al. Mnohočetný myelom a další monoklonální gamapatie. *Praha: Galén*, 2005, 128 s. ISBN 8072623303.
 2. Šumná, E., Nováčková, L., Martínek, A., Ščudla, V. Význam hodnocení sérových hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinů u monoklonálních gamapatií. *Interní Med.*, 2006, 8 (11), p. 502 - 504.
 3. Ščudla, V., Vytřasová, M., Minařík, J. et al. Klinický význam hodnocení sérových hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinů u monoklonálních gamapatií. *Trans Hemat dnes*, 2005, 2, p. 47 - 53.
 4. Bradwell, A. R., Carr-Smith, H. D., Mead, G. P., Drayson, M. T. Serum free light Chain immunoassays and their clinical application. *Clin. Applied Immunol. Rev.*, 2002, 3, p. 17 - 33.
 5. Bradwell, A. R., Mead, G. P., Carr-Smith, H. D. Serum free light Chain analysis (plus Hevylite). 6th Edition *Birmingham, The Binding Site Ltd.*, 2010.
 6. Drayson, M. T., Tang, L. X., Drew, R., Mead, G. P., Carr-Smith, H. D., 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. Gupta, S., Comenzo, R. L., Hoffman, B. R., et al. National Academy of Clinical Biochemistry Guidelines for the Use of Tumour Markers in Monoclonal Gammopathies. *NACB LMPG*, 2006, www.nacb.org.
 8. 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 (2), p. 215 - 224.
 9. Ščudla, V., Minařík, J., Schneiderka, P., et al. Význam sérových hladin monoklonálních volných lehkých řetězců imunoglobulinu v diagnostice a hodnocení aktivity mnohočetného myelomu a vybraných monoklonálních gamapatií. *Vnitř. Lék.*, 2005, 51, p. 1249 - 1259.
 10. Lachmann, H. J., Gallimore, R., Gilmore, J. D. et al. Outcome in systemic free immunoglobulin light chains following chemotherapy. *Brit. J Haematol*, 2003, 122 (1), p. 78 - 84.
 11. Hutchison, C. A., Plant, T., Drayson, M. et al. Serum free light chain measurement aids the diagnosis of myeloma in patients with severe renal failure. *BMC Nephrol.*, 2008, 9(11), <http://doi.org/10.1186/1471-2369-9-11>.
 12. Tichý, M., Vávrová, J., Friedecký, B., Maisnar, V. Přehled metod na stanovení volných lehkých řetězců. *Klin. Biochem. Metab.*, 16 (37), 2008, No. 2, p. 93 - 96.
 13. Vávrová, J., Tichý, M., Friedecký, B. et al. Mezilaboratorní studie stanovení volných monoklonálních lehkých řetězců imunoglobulinů. *Klin. Biochem. Metab.*, 18 (39), 2010, No. 2, p. 73 - 76.
 14. Tate, J., Bazeley, S., Sykes, S., Mollee, P. Quantitative serum free light chain assay – analytical issues. *Clin Biochem Rev.*, 30 (3), 2009, p. 131 - 140.
 15. příbalové letáky souprav.
- Práce byla podpořena grantem Ministerstva zdravotnictví České republiky, číslo AZV MZ 15-27579A. Autoři také děkují za technickou spolupráci firm The Binding Site, s.r.o. a Beckman Coulter.*

Do redakce došlo 27. 4. 2017

Adresa pro korespondenci
MUDr. Klára Bořecká
Oddělení klinické biochemie
Thomayerova nemocnice
Videňská 800, 140 59 Praha 4 - Krč
e-mail: klara.borecka@ftn.cz