

Validace stanovení volných monoklonálních lehkých řetězců v České republice

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., Zima, T., Benáková, H., Spáčilová, J., Palička, V.

LF UK a FN Hradec Králové, FN Brno, FN KV Praha, VFN Praha, FN Olomouc, FN Plzeň



Česká myelomová skupina, 24.4.2010, Mikulov

FLC (VLŘ)

- Technologicky rutinně dostupný parametr aplikací imunochemické metody
 - metoda kvantifikace se potýká s problémy mezilaboratorní srovnatelnosti a následné interpretace výsledků
 - *Criteria for diagnosis of multiple myeloma from IMWG, 2003*
 - *USA NACB guidelines for the use of tumor markers in monoclonal gammopathies <http://www.nacb.org> 2006 (Draft guidelines)*
-

Otevřené „laboratorní“ otázky

- metodické problémy implikují problémy s interpretací

- standardizace
 - protilátky
 - kalibrátory, kontrolní materiály
 - ...
- ředění vzorků

závislost na metodě
závislost na použité technologii
závislost na optimalizaci ředění

Limitace shrnul Katzmann

- zkřížená reakce s vázanými lehkými řetězci,
- chybějící standardizace vyšetření,
- stanovení poměru kappa/lambda u biklonálních gamapatií (asi 2–4 % MG),
- část vzorků pozitivních na paraprotein imunofixací je při stanovení VLR negativní

Katzmann, J. A. Quantitative free light chain assays for the diagnosis and monitoring of monoclonal gammopathies. *Journal of Clinical Ligand Assay*, 2004/2005, 27, 4, p. 246–255.

Realita

- 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.
-

FLC - validace vyšetření souvisejících s diagnostikou mnohočetného myelomu



- 6 center ČR
 - ÚKBLD VFN LF1 UK Praha
 - ÚKBH LF UK a FN Plzeň
 - OKB FN Olomouc
 - Lab. klin. imunologie FNKV Praha
 - OKBH FN Brno-Bohunice
 - ÚKBD LF UK a FN Hradec Králové

FLC - validace vyšetření souvisejících s diagnostikou mnohočetného myelomu

- 12 nativních vzorků sér pacientů
 - informace o typizaci paraproteinu
 - požadavek na měření v duplikátech
 - dotazník
-

Jakou metodou stanovujete lehké řetězce (FLC)?

- 6x kitů Binding Site
 - 1x ELISA BioVendor

 - 3x turbidimetrie
 - 3x nefelometrie
 - 1x ELISA
 - Všichni originální postup popsany výrobcem
-

Přístroj, na kterém měříte FLC

- 2x Immage 800
 - 1x nefelometr BN II
 - 1x Modular
 - 1x Olympus AU400
 - 1x Radim Delta
 - 1x ELISA reader BioTek
-

Pracovní rozsah měření

| rozsah | kappa | lambda |
|--|---|---|
| Základní celkový | 6 – 150 6 - 7500 <i>automaticky</i> - 150000 <i>manuálně</i> | |
| Základní (1:10) Celkový | 6 – 168 ?? | 6 – 204 ?? |
| Základní Celkový | ?? 0,3 – 15200 | ?? 0,3 – 15200 |
| Základní (1:100) Celkový | 6,34 – 203 0,06 - 4060 | 5,5 – 176 0,06 - 3520 |
| Základní Celkový | 6,0 – 180 3,0 - 4500 | 8,0 – 270 4,0 - 6750 |
| Základní (1:8) Celkový | 3,7-56,2 0,9- 5620 <i>automaticky</i> - 56200 <i>manuálně</i> | 7,0-93,3 0,9- 9300 <i>automaticky</i> - 93000 <i>manuálně</i> |
| Základní (1:200) Celkový (ELISA) | 2,0 – 64 1,0 – 6400 | 3,5-172 1,8 - 17200 |



Nejednotnost ředění – zdroj problémů

- ❑ dle doporučení výrobce, nepodředují
 - ❑ 1:100, dále 1:400, 2000, 8000
 - ❑ 1:100, max 1:2000
 - ❑ ruční ředění max 1:25 (k,L), 1:10 základní (ředí přístroj), nízké podřadí 1:5
 - ❑ Základní 1:8 přístroj, 1:800, 1:8000
 - ❑ Základní 1:200, nízké 1:100, dále 1:2000, 1:10000, 1:20000
-

Používané referenční intervaly

Shodné pro FreeLite

- kappa 3,3 - 19,4 mg/l
- lambda 5,71 - 26,30 mg/l
- K/L 0,26 - 1,65

1 laboratoř K/L neuvádí

ELISA

- kappa 3,4 - 28,8 mg/l
- Lambda 7,5 - 42,2 mg/l
- K/L 0,23 - 1,85

1 laboratoř specifikovala hodnoty u renálních chorob

Opakovatelnost

| Laboratoř | CV % | | | |
|---------------|-------------|------------|-------------|--------|
| | kappa | lambda | k/l | Metoda |
| 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 |
| Celkem | 11,3 | 8,8 | 26,5 | |
| Údaj výrobce | ≤8,0 | ≤ 4,0 | | |

Reprodukovatelnost - kappa

| Vzorek | průměr | CV% |
|--------|--------|-------------|
| 1 | 7,0 | 12,3 |
| 2 | 7,4 | 11,4 |
| 3 | 7,8 | 13,8 |
| 4 | 10,9 | 20,6 |
| 5 | 11,3 | 28,6 |
| 6 | 32,2 | 25,3 |
| 7 | 52,2 | 50,0 |
| 8 | 56,1 | 43,8 |
| 9 | 67,1 | 40,9 |
| 10 | 293,1 | 41,1 |
| 11 | 299,5 | 43,4 |
| 12 | 344,6 | 54,0 |
| Průměr | | 32,1 |

Reprodukovatelnost - lambda

| Vzorek | průměr | CV% |
|--------|--------|-------------|
| 1 | 3,3 | 102,4 |
| 2 | 5,7 | 46,0 |
| 3 | 6,6 | 32,5 |
| 4 | 10,3 | 19,6 |
| 5 | 10,6 | 11,7 |
| 6 | 10,9 | 22,5 |
| 7 | 52,9 | 9,3 |
| 8 | 232,1 | 23,7 |
| 9 | 334,1 | 19,2 |
| 10 | 2610 | 27,5 |
| 11 | 11283 | 9,9 |
| 12 | 13912 | 20,4 |
| Průměr | | 28,7 |

Reprodukovatelnost -Kappa/Lambda

| Vzorek | průměr | CV% |
|--------|--------|-------|
| 1 | 0,0028 | 29,6 |
| 2 | 0,0041 | 62,3 |
| 3 | 0,0067 | 153,4 |
| 4 | 0,0224 | 28,1 |
| 5 | 0,049 | 18,1 |
| 6 | 1,1 | 23,5 |
| 7 | 1,25 | 34,7 |
| 8 | 1,7 | 59,0 |
| 9 | 9,44 | 73,2 |
| 10 | 27,7 | 40,0 |
| 11 | 29,6 | 53,6 |
| 12 | 353,1 | 100,7 |
| Průměr | | 56,4 |

K 32,1 % L 28,7 %

Výsledky reprodukovatelnosti
velmi podobné výsledkům NEQAS

| FLC | Dade Behring | Beckman |
|--------------------------------|---------------------|--------------------------------------|
| (Freelite assay) CV% | | |
| 2009 | 15.1 | 33.6 |
| 2008 | 95.6 | 61.0 <i>ANTIGEN EXCESS</i> |
| | (κ) 21.8 | (κ) 24.1 (normal serum) |
| | 13.2 | 14.3 |
| | 31.3 | 24.4 |

SEKK –gamapatie GP1/10 - FLC

- 30 laboratoří
 - IMT, IMN – 28, EIA – 1, ?? - 1
 - Kappa – 18/30 úspěšných (TMU 33 %)
 - Lambda – 16/30 úspěšných (TMU 33 %)
 - K/L – 19/28 úspěšných (TMU 50 %)
-

Projekt **IFCC Committee on Plasma Proteins**

- Serum-free light chain analysis: works in progress**
 - Clin. Chem. Lab. Med. 2009 47(9)
 - Screening
 - Prognóza
 - Marker orgánové dysfunkce
 - Přístup k poměru K/L
-

Realita

- 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.
-

