

**Stanovení párů těžkých/lehkých řetězců  
imunoglobulinu u monoklonální  
gamapatie nejistého významu - pilotní  
projekt CMG**

Pika T., Klincová M., Lochman P., Maisnar V., Tichý M.,  
Ščudla V., Hájek R.

*Olomouc, Brno, Hradec Králové  
2012*

# MGUS – historické rizikové faktory transformace

*Baldini, Blood, 1996:*

- kvantita M-proteinu, % PB v KD, BJ-urie, suprese polyklonálních Ig

*Cesana, J Clin Oncol, 2002:*

- kvantita a izotyp M-proteinu, % PB v KD, BJ-urie, suprese polyklonálních Ig

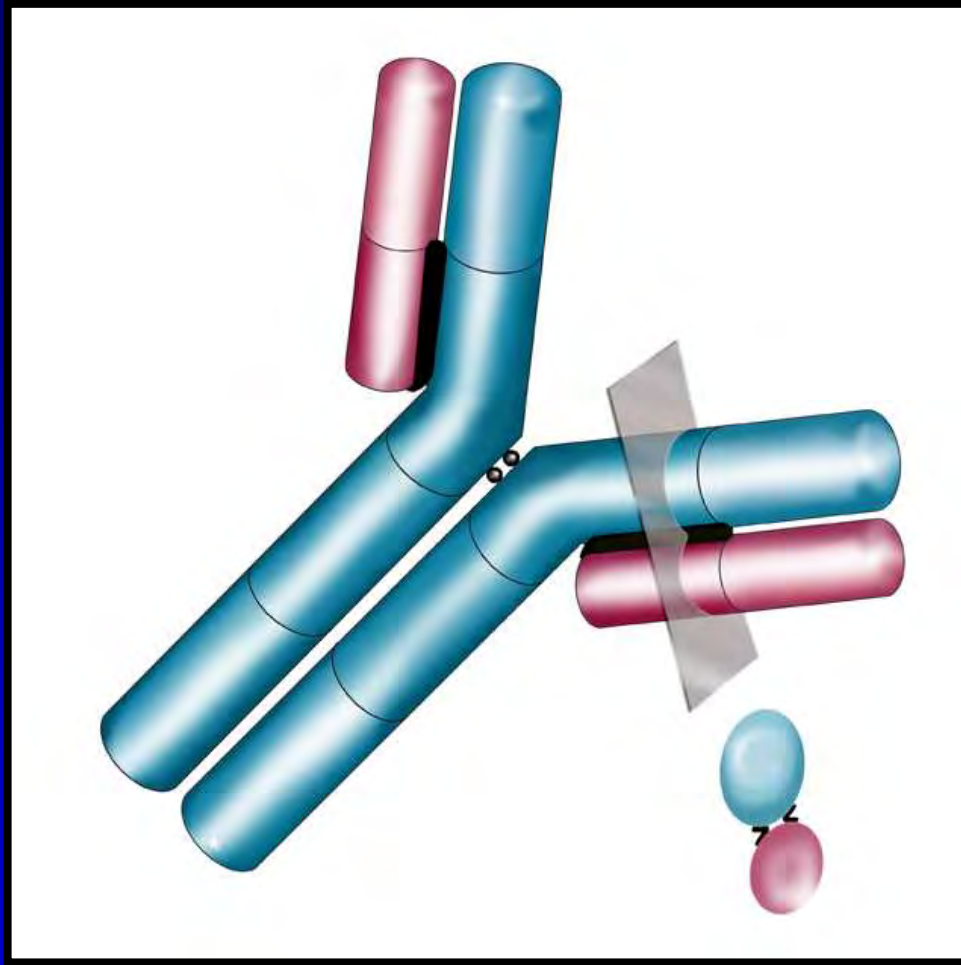
*Kyle RA, NEJM, 2002:*

- kvantita a izotyp M-proteinu

*Perez-Persona, Blood, 2007:*

- kvantita M-proteinu, % PB v KD, BJ-urie, suprese polyklonálních Ig

# HevyLite™



Bradwell AR: Serum Free Light Chain Analysis, 6th edition.

- junkční epitopy mezi konstantními doménami lehkého a těžkého řetězce imunoglobulinu
  - stanovení v páru: Igκ a Igλ (dominantního/alternativního izotypu) → se stanovením poměru Igκ/Igλ
  - nefelometrie, turbidimetrie
- možné limitace: nízká kvantita M-proteinu bez imunoparesy

# HevyLite – MGUS

*Katzmann, Bath, Blood, 2010:*

IgG izotyp:

- suprese alternativního HLC páru je prediktorem transformace
- suprese alternativního HLC páru je častější a citlivější ukazatel než suprese polyklonálních imunoglobulinů
- transformace je spojena s ↑ četnosti a míry suprese HLC páru nežli polyklonálních imunoglobulinů

IgA izotyp:

- míra suprese HLC páru a polyklonálních imunoglobulinů srovnatelná

# **Implementace a optimalizace stanovení HLC (heavy/light chain) v diagnostickém a prognostickém algoritmu monoklonálních gamatií nejistého významu (MGUS) – pilotní projekt České myelomové skupiny**

**Hlavní řešitel:** Hájek R.

**Koordinátor:** Pika T.

**Spoluřešitelé:** Klincová M., Maisnar V., Lochman P., Sandecká V., Tichý M.,  
Ščudla V.

**Centra:** FN Brno, FN Olomouc, FN Hradec Králové

**Podpora:** The Binding Site Ltd.

**Zahájení:** 8-9/2011

# Cíle projektu:

- implementace HLC stanovení na nefelometru SPA<sub>plus</sub> s mezilaboratorní kontrolou – FN Olomouc, FN Hradec Králové
- srovnání výsledků analýzy vybraných sér mezi platformami SPAplus a BN II
- analýza ~ 300 sér jedinců s MGUS (RMG, sérové banky Brno, Olomouc, Hradec Králové) se stanovením hladin HLC, FLC, izotypů imunoglobulinů a hladiny beta<sub>2</sub>m – vše na platformě SPAplus
- snaha o maximální definici imunitní parézy tříd polyklonálních imunoglobulinů
- korelace vybraných získaných výsledků s dalšími parametry onemocnění – imunofenotypizace plazmocytů, cytogenetická, FISH a arrayCGH analýza
- opakované stanovení HLC hladin u vybraných jedinců se stigmaty maligní transformace, či významnou patologií výsledku HevyLite s cílem definice dynamického parametru nemoci
- snaha o definici a nalezení optimálního algoritmu pro implementaci HLC do běžného algoritmu vyšetření MG

Stav k 1/2012:

- otestováno 211 vzorků sér

**Referenční meze:**

**IgA HevyLite:**

- IgA $\kappa$ : 0,57 - 2,08 g/l
- IgA $\lambda$ : 0,44 – 2,04 g/l
- poměr IgA $\kappa$ /IgA $\lambda$ : 0,78 – 1,94

**IgG HevyLite:**

- IgG $\kappa$ : 3,84 – 12,07 g/l
- IgG $\lambda$ : 1,91 – 6,74 g/l
- poměr IgG $\kappa$ /IgG $\lambda$ : 1,12 – 3,21

**IgM HevyLite:**

- IgM $\kappa$ : 0,19 – 1,63 g/l
- IgM $\lambda$ : 0,12 – 1,01 g/l
- poměr IgM $\kappa$ /IgM $\lambda$ : 1,18 - 2,74

**Total IgG: 7 – 16 g/l**

**Total IgA: 0,7 – 4 g/l**

**Total IgM: 0,4 – 2,3 g/l**

**Kappa Free: 3,3 – 19,4 mg/l**

**Lambda Free: 5,71 – 26,3 mg/l**

**poměr  $\kappa/\lambda$ : 0,26 - 1,65**

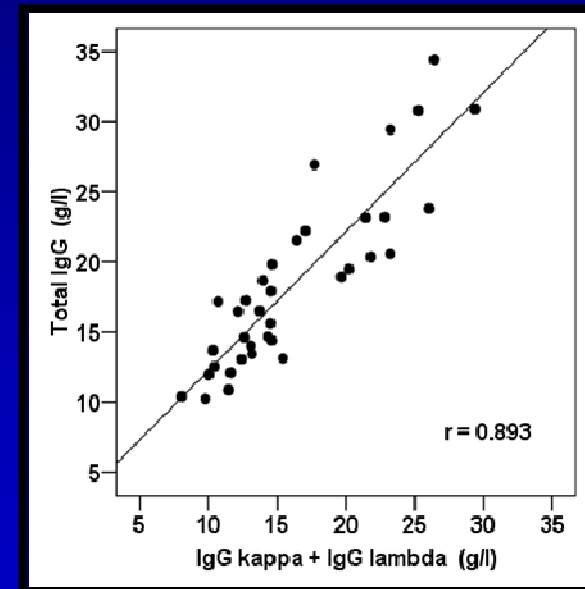
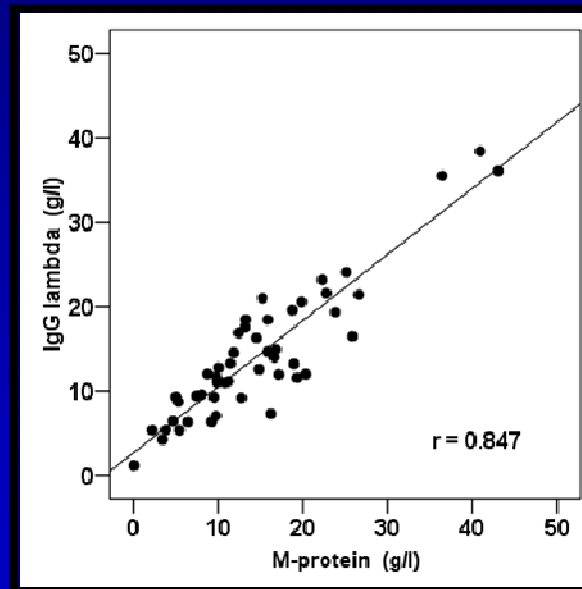
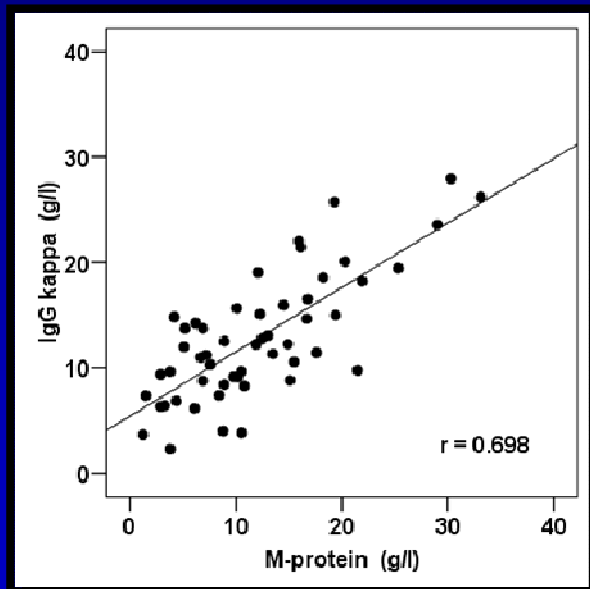
**$\beta_2$  mikroglobulin: 0 – 2,5 mg/l**

Výsledky 1:

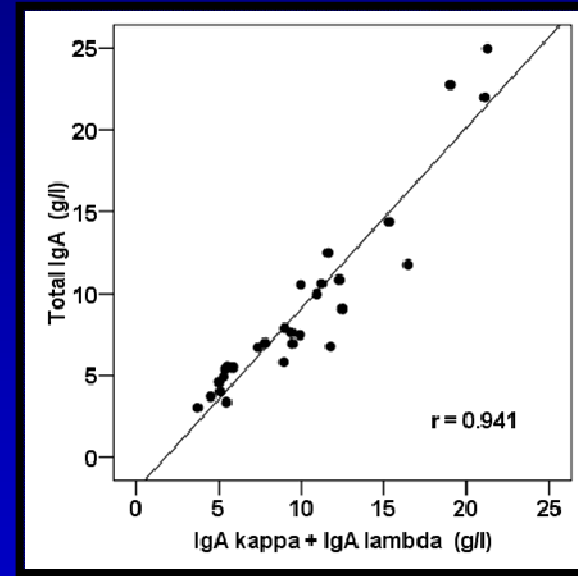
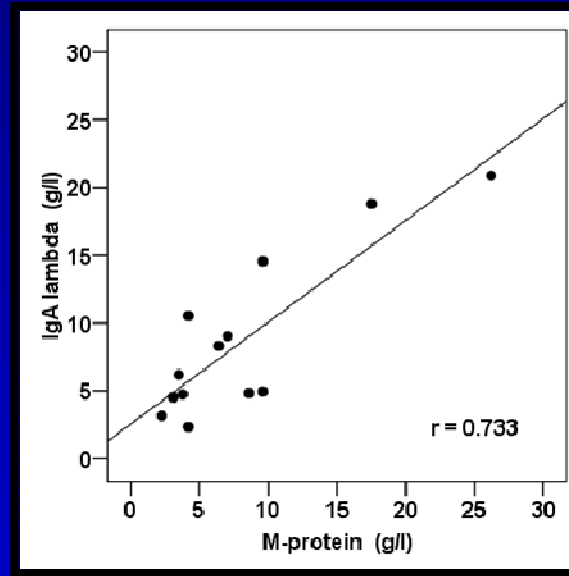
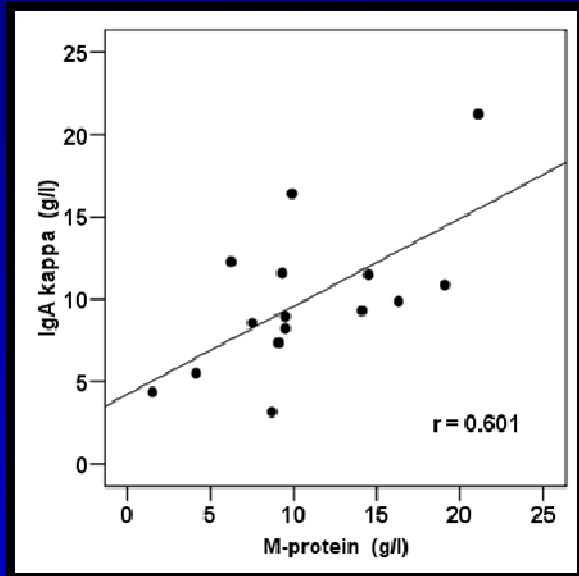
**HLC vs. SPE/IFIX**



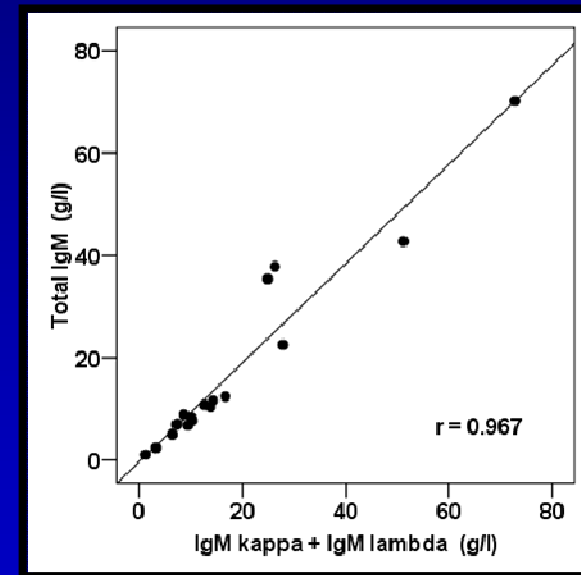
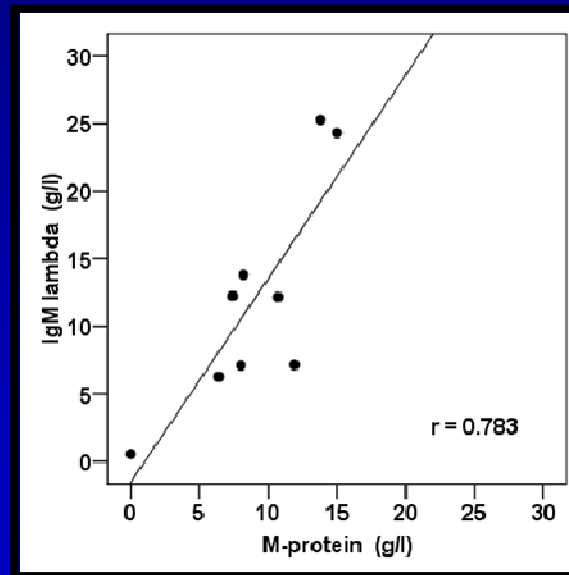
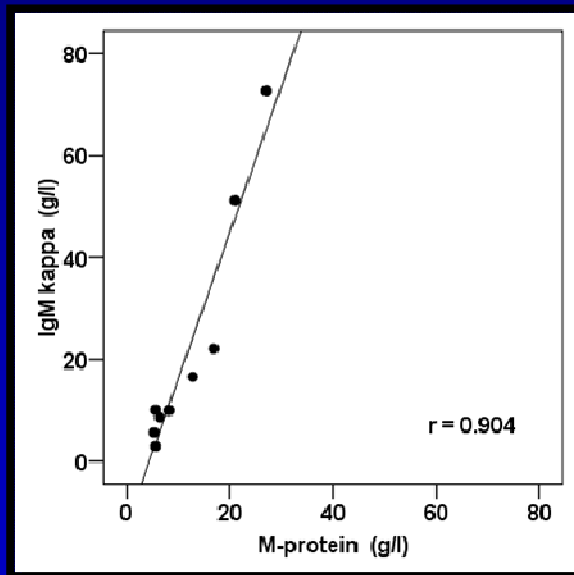
# IgG HevyLite™ vs. SPE, IFE



# IgA HevyLite™ vs. SPE, IFE



# IgM HevyLite™ vs. SPE, IFE



# Výsledky 2:

**BN II, Radim Delta, Immage,  
Immulite 2000**

**vs.**

**SPAplus**

# První zkušenosti s analyzátořem SPA Plus – srovnání a verifikace metod

Lochman Pavel<sup>1</sup>, Heřmanová Zuzana<sup>2</sup>, Pika Tomáš<sup>3</sup>, Študla Vlastimil<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Oddělení klinické biochemie FN Olomouc; <sup>2</sup>Ústav imunologie FN Olomouc a Lékařské fakulty UP Olomouc; <sup>3</sup>III. interní klinika FN Olomouc a Lékařské fakulty UP Olomouc.

## Předmět sdělení

Předmětem sdělení je seznámení s postupem a dosavadními výsledky zavádění metod k laboratorní diagnostice mnohočetného myelomu a dalších monoklonálních gamapatií na automatickém imunoturbidimetrickém analyzátořu SPA Plus firmy The Binding Site (Velká Británie). Prvním zaváděným vyšetřením bylo stanovení volných lehkých řetězců (VLR) kappa a lambda v séru soupravami řady FreeLite, do té doby prováděné na nefelometru Delta firmy Radim (Itálie). Následovala stanovení polyklonálních imunoglobulinů tříd IgG, IgA a IgM, prováděná dosud na nefelometru Immage 800 firmy Beckman Coulter (USA) a stanovení beta-2-mikroglobulinu (B2M) v séru, prováděné dosud na analyzátořu Immulite 2000 firmy Siemens. Posledními v současné době zaváděnými vyšetřeními jsou dříve rutinně neprováděná párová stanovení intaktních imunoglobulinů tříd G, A a M zvláště pro lehké řetězce kappa a lambda pomocí diagnostických souprav řady Hevylite. Všechny jmenované diagnostické soupravy jsou vlastními produkty firmy The Binding Site.

## Metody

Srovnání a verifikace převáděných vyšetření bylo koncipováno jako analýza sérií reálných vzorků provedená na stávajícím a zaváděném přístroji, kdy byly výsledky obou postupů vyhodnoceny metodou lineární regrese vyneseními sérií hodnot proti sobě s vyčíslením koeficientu spolehlivosti a sestrojením Bland – Altmanova grafu pro sledování rozdílů mezi metodami v závislosti na koncentraci analytu. U souprav řady Hevylite byly pro porovnání metod použity výsledky měření z nefelometru BNII (Siemens), kde byly tyto metody testovány v rámci pilotní studie firmy The Binding Site a výše uvedených pracovišť FN Olomouc. Na analyzátořu SPA Plus dále následovaly analýzy sérií vzorků validovaných kontrolních materiálů (v případě jejich existence) pro vyčíslení analytických parametrů stanovení opakovatelnosti, mezilehlé preciznosti a pravdivosti a jejich porovnání s údaji, uváděnými výrobcem.

## Výsledky

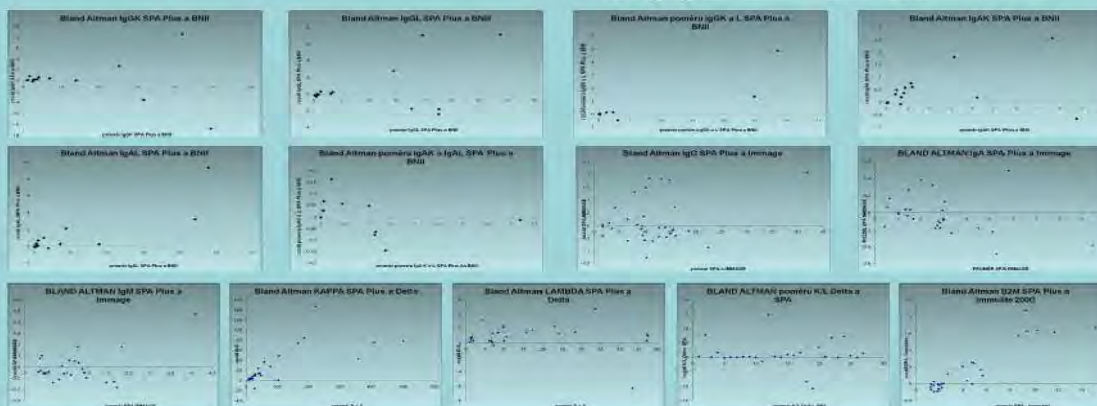
Výsledky provedených měření jsou uvedeny v následujících tabulkách. Dále jsou zobrazeny Bland – Altmanovy grafy znázorňující rozdíly mezi metodami v závislosti na koncentraci analytu.

### Opakovatelnost a mezilehlá preciznost

Vyšetření	Dosažená opakovatelnost (CV %)	Dosažená mezilehlá preciznost (CV %)	Deklarovaná opakovatelnost (CV %)	Deklarovaná mezilehlá preciznost (CV %)
FreeLite kappa (κ)	3,18 n=11	4,47 n=10	1,8–3,3	8,6–11,2
FreeLite lambda (λ)	1,30 n=11	2,55 n=10	2,4–3,4	4,4–7,2
IgG	2,01 n=20	2,71 n=10	1,5–2,5	1,91–7,0
IgA	0,98 n=20	2,25 n=10	0,7–1,0	3,1–4,9
IgM	2,25 n=20	3,07 n=10	0,8–2,3	1,8–4,9
Beta-2-mikroglobulin	0,95 n=15	4,66 n=10	0,6–2,0	2,4–5,6
Hevylite IgG κ	1,83 n=10	5,32 n=5	1,2–2,3	4,4–5,7
Hevylite IgG λ	2,02 n=10	7,43 n=5	0,7–2,1	5,2–8,7
Hevylite IgA κ	2,25 n=10	9,41 n=5	1,2–3,1	9,2–11,1
Hevylite IgA λ	1,83 n=10	6,44 n=5	1,4–3,2	8,0–8,9
Hevylite IgM κ	1,91 n=10	4,59 n=5	1,8–2,4	4,8–4,9
Hevylite IgM λ	1,54 n=10	4,75 n=5	1,7–2,0	4,4–5,4

### Srovnání metod

Vyšetření	Srovnávaná technika	Koeficient spolehlivosti R
FreeLite kappa (κ)	Nefelometr Delta	0,98
FreeLite lambda (λ)	Nefelometr Delta	0,99
Poměr κ/λ		0,86
IgG	Nefelometr Immage	0,99
IgA	Nefelometr Immage	0,99
IgM	Nefelometr Immage	0,98
Beta-2-mikroglobulin	Immulite 2000	0,99
Hevylite IgG κ	Nefelometr BNII	0,98
Hevylite IgG λ	Nefelometr BNII	0,97
Poměr IgG κ/IgG λ		0,99
Hevylite IgA κ	Nefelometr BNII	0,96
Hevylite IgA λ	Nefelometr BNII	0,99
Poměr IgA κ/IgA λ		0,98



## Závěr

Na základě získaných základních údajů byly jmenované metody uvolněny do provozu, dále však probíhá sledování jejich analytických parametrů za účelem kompletní verifikace. Vzhledem k využití těchto stanovení v laboratorní diagnostice mnohočetného myelomu a dalších monoklonálních gamapatií přináší jejich sjednocení na společnou analytickou platformu výhody jak po stránce analytické a provozní, tak i z hlediska interpretace nálezů a pružné komunikace s klinickými partnery.

Tato práce je podpořena grantem IGA MZ ČR NT 12451. Kontakt: RNDr. Pavel Lochman, Ph.D., Oddělení klinické biochemie, FN Olomouc, IP Pavlova 6, 775 20 Olomouc, e-mail: pavel.lochman@fnol.cz

## Výsledky 3:

**Suprese alternativního páru  
imunoglobulinu koreluje  
s mírou rizikovosti MGUS  
výrazněji nežli suprese hladin  
polyklonálních imunoglobulinů  
– dílčí výsledky vyšetření  
HevyLite™ u MGUS**

## **Vyšetřený soubor MGUS:**

**IgG:** n = 102, 32% nízké, 46% nízké-střední a 22% vysoké-střední riziko.

**IgA:** n = 28, 54% nízké-střední, 29% vysoké-střední a 17% vysoké riziko.

# PIG, HLC vs. Risk (IgG, IgA)

<b>Risk:</b>	<b>Suppression of polyclonal IgA</b>	<b>Suppression of polyclonal IgM</b>	<b>Suppression of uninvolved IgG HLC pair</b>
Low (n = 33)	6% (2/33)	9% (3/33)	39% (13/33)
Low-intermediate (n = 47)	25% (12/47)	10% (5/47)	45% (21/47)
High-intermediate (n = 22)	45% (10/22)	41% (9/22)	100% (22/22)

<b>Risk:</b>	<b>Suppression of polyclonal IgG</b>	<b>Suppression of polyclonal IgM</b>	<b>Suppression of uninvolved IgA HLC pair</b>
Low-intermediate (n = 15)	27% (4/15)	0% (0/15)	27% (4/15)
High-intermediate (n = 8)	75% (6/8)	38% (3/8)	63% (5/8)
High (n = 5)	60% (3/5)	60% (3/5)	100% (5/5)



# Závěr:

Předběžné pozorování potvrzuje, že systém HevyLite™ nadějně doplňuje soubor vyšetření, běžně používaných při sledování MG, zejména pak v případech velmi nízkých koncentrací MG či jen pouhé positivity imunofixační analýzy.

V případě MGUS analýza alternativního HLC páru představuje další, měřitelný ukazatel, umožňující hlouběji pochopit patofyziologii procesu a je otázkou, zda obohatí spektrum prognostických ukazatelů.



**Děkuji za pozornost...**