

Desempenho diagnóstico do Freelite® para detecção de Mieloma Múltiplo em uma população brasileira

Edvan de Queiroz Crusoe ¹, Ana Lucia Peres², Fabiana Higashi, Priscila Cury ¹, Ana Luiza Dias, Maria Rossato¹, Carolina Moraes Hungria¹, Marcia Desiato ¹, Elyara Maria Soares⁴, Vania T de Moraes Hungria¹

¹*Disciplina de Hematologia e Oncologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São*

Paulo; ²Serviço de Hematologia da Santa Casa de São Paulo; ³Graduando da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; ⁴The Binding Site Brazil

Contato: hungria@dialdata.com.br ; elyara.soares@bindingsite.com.br

Resumo

O diagnóstico do mieloma múltiplo continua sendo um desafio para os médicos devido aos sintomas não específicos (anemia, dor óssea e infecções recorrentes) que são comuns especialmente na população idosa. No entanto, o diagnóstico precoce está associado a uma doença menos grave, incluindo menos pacientes que apresentam lesão renal aguda, fraturas patológicas e anemia grave. Desde 2006, o teste de cadeia leve livre de soro Freelite® foi incluído juntamente com testes laboratoriais tradicionais (eletroforese de proteínas e imunofixação séricas e urinárias) como método auxiliar na identificação de proteínas monoclonais, que são a base para o diagnóstico de Mieloma. O ensaio da cadeia leve livre do soro reconhece a superfície exposta da imunoglobulina em sua forma livre com alta sensibilidade. Outros ensaios que medem cadeias leves nas formas de imunoglobulina livre e intacta são sensíveis, mas infelizmente, devido à nomenclatura utilizada, estes ensaios (cadeias leves totais) são por vezes utilizados no lugar do ensaio de cadeia leve livre. Além disso, nesse estudo avaliamos dados de 61 pacientes diagnosticados com Mieloma Múltiplo. O objetivo do mesmo é auxiliar na diferenciação deste dois ensaios e fornecer informações a médicos e técnicos de laboratório, para que possam utilizar as diretrizes do International Myeloma Working Group.

Abstract

The diagnosis of Multiple Myeloma is a challenge to the physician due to the non-specific symptoms (anemia, bone pain and recurrent infections) that are commonplace in the elderly population. However, early diagnosis is associated with less severe disease, including fewer patients presenting with acute renal injury, pathological fractures and severe anemia. Since 2006, the serum free light chain test Freelite® has been included alongside standard laboratory tests (serum and urine protein electrophoresis, and serum and urine immunofixation) as an aid in the identification of monoclonal proteins, which are a cornerstone for the diagnosis of Multiple Myeloma. The serum free light chain assay recognizes the light chain component of the immunoglobulin in its free form with high sensitivity. Other assays that measure light chains in the free and intact immunoglobulin forms are sensitive, but unfortunately, due to the nomenclature used, these assays (total light chains) are sometimes used in place of the free light chain assay. This paper reviews the available literature comparing the two assays and tries to clarify hypothetical limitations of the total assay to detect Multiple Myeloma. In addition, in this study we evaluated data from 61 patients diagnosed with Multiple Myeloma. The purpose of this study is to assist in the differentiation of these two tests and provide information to physicians and laboratory technicians so that they can use the guidelines of the International Myeloma Working Group.

Introdução

As gamopatias monoclonais podem ser de diferentes subtipos, incluindo condições pré malignas, chamada de Gamopatia Monoclonal de Significado Indeterminado (GMSI), Mieloma Múltiplo Sintomático e Assintomático, dentre eles citamos Plasmocitomas Solitários, Mieloma Múltiplo (MM), Amiloidose de cadeia leve (AL) ou Macroglobulinemia de Waldenstrom (MW) por exemplo. Estes distúrbios são caracterizados pela produção de proteínas monoclonais que podem ser de imunoglobulinas intactas, cadeias leves livres no soro (CLLs), uma combinação de ambas, ou apenas de cadeias pesadas^{1,2}. Uma baixa porcentagem desses distúrbios se apresenta sem a produção de qualquer proteína monoclonal.

Os distúrbios assintomáticos são identificados através de investigações laboratoriais de rotina. Embora o diagnóstico dos distúrbios sintomáticos possa apresentar dificuldades consideráveis, uma vez que os sintomas (anemia, infecções recorrentes, fadiga e dor óssea) podem ser comuns em uma população idosa e não específicos da doença³⁻⁶. No entanto, há uma necessidade de diagnóstico oportuno, pois os atrasos podem levar a um aumento da gravidade da doença, incluindo insuficiência renal aguda e fratura patológica, o que pode levar a uma menor sobrevida global.

Os ensaios policlonais da cadeia leve livre do soro (CLLs) identificam epítomos no componente da cadeia leve Kappa (κ) ou Lambda (λ) da imunoglobulina que estão apenas expostos quando não ligados ao seu par de cadeia pesada. Desde 2006, os ensaios foram incluídos nas Diretrizes Internacionais para detecção de gamopatias monoclonais (MGs).

Introdução ao Freelite®

O exame Freelite® é um imunoenensaio específico e sensível para a determinação de cadeias leves livres (CLLs) no soro. Os anticorpos policlonais do teste, reagem apenas com as formas livres das cadeias leves proporcionando uma medição quantitativa de κ e λ livres no soro, que podem ser utilizados para o diagnóstico, monitoramento e prognóstico de pacientes com Mieloma Múltiplo e outras Gamopatias Monoclonais. A quantificação das CLLs em soro é recomendada pelas diretrizes do Grupo Internacional de Trabalho sobre Mieloma (International Myeloma Working Group - IMWG) para o diagnóstico de mieloma múltiplo. As recomendações atualizadas definem que a relação entre a cadeia envolvida e não envolvida deve ser ≥ 100 , e que a mesma é um novo biomarcador maligno para mieloma. Isto significa que se um paciente apresenta células clonais na medula óssea $\geq 10\%$ (comprovada por biópsia por exemplo) e a cadeia leve livre produzida pelo tumor (envolvida) é ≥ 100 mg/L e a relação entre a envolvida/não envolvida é ≥ 100 o médico será capaz de diagnosticar o mieloma múltiplo neste paciente, mesmo na ausência de critérios de CRAB⁶. Além das diretrizes internacionais, a quantificação das cadeias leves livres pelo ensaio de anticorpos policlonais também está incluídas nas nacionais⁷ e na portaria para diagnóstico de Mieloma Múltiplo do Ministério da Saúde, publicada em agosto de 2015.

A alta concentração de CLL monoclonal no soro está associada à proliferação maligna de células plasmáticas na maioria dos gamopatias monoclonais. A proporção de CLL no soro (κ/λ) é um indicador sólido de monoclonalidade. A produção de uma das cadeias leves livres alterada sobre a outra será refletida em uma proporção κ/λ anormal ($< 0,26$ ou $> 1,65$)⁸. Este parâmetro, utilizado como um

marcador tumoral, é muito valioso para diferenciar patologias monoclonais das patologias com elevações policlonais de cadeias leves livres (CLLs) (disfunção renal, infecções, etc). A sensibilidade do ensaio de cadeias leves livres no soro faz com que seja possível quantificar κ e λ livre, em concentrações muito baixas, mesmo quando os níveis de proteínas monoclonais são indetectáveis por eletroforese de proteínas e imunofixação (sensibilidade de 1000 mg/L e 150 mg/L, respectivamente). Isto significa que o mieloma múltiplo pode ser detectado precocemente.

A especificidade do ensaio de cadeia leve livre no soro (apenas reage com as formas livres de κ e λ) possibilita a determinação exata e confiável de proteínas monoclonais em comparação com a determinação de cadeias totais κ e λ , que não distinguem as quantidades de CLLs dentro da grande concentração de cadeias leves ligadas a cadeias pesadas como parte da estrutura das imunoglobulinas.

A amostra de urina não representa fonte confiável para avaliar os níveis de κ e λ livre por diferentes motivos. O rim tem uma alta capacidade de metabolização e somente quando a capacidade de produção tumoral de CLLs excede a reabsorção renal, é que se pode detectar proteína de Bence Jones (CLL urinária)⁹. Diversas dificuldades técnicas e de interpretação acompanham este tipo de amostra, fazendo com que tanto pela sensibilidade quanto confiabilidade, se utilize a análise em soro e não em urina para quantificação destas cadeias leves livres.

Diferenças entre o teste de Cadeia Leve Livre e de Cadeia Leve Total

O uso do Freelite® (quantificação de cadeias leves livres) no diagnóstico de gamopatias monoclonais já está bem estabelecido¹⁰⁻¹³. No entanto, muitas vezes ainda existe dúvida no momento da solicitação e interpretação do mesmo. O ensaio da cadeia leve total mede a concentração de todos os anticorpos e também das cadeias leves livres, ou seja, IgG-kappa, IgA-kappa, IgM-kappa, IgD-kappa, IgE-kappa e kappa livre. O Freelite® quantifica apenas a forma livre da cadeia leve kappa ou lambda como pode ser observado na figura 1.

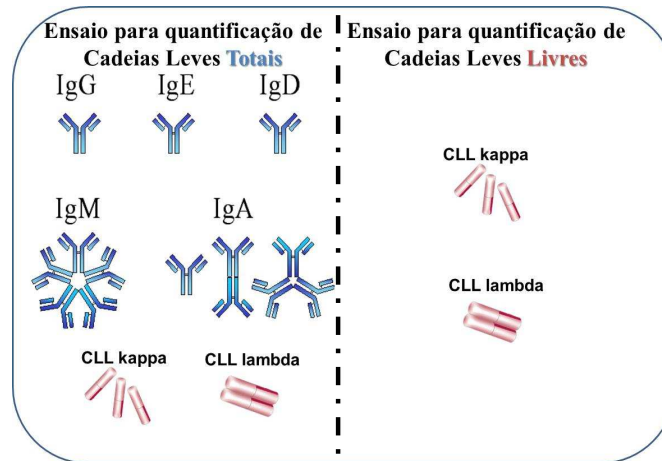


Figura 1. Quantificação das cadeias kappa e lambda em testes para cadeias leves livres e totais. Os ensaios de cadeia leve total medem as cadeias leves quando ligadas às cadeias pesadas em imunoglobulinas intactas juntamente com as cadeias leves livres (CLL). O ensaio de cadeia leve livre (Freelite®) mede apenas as cadeias leves livres. Figura adaptada do plano Beckman Coulter Image Systems, novembro de 2007.

Objetivo

O objetivo deste estudo foi comparar os resultados de amostras de pacientes já diagnosticados com Mieloma Múltiplo em uma população brasileira, utilizando o Freelite® e o teste de cadeia leve total; e com isso, contribuir com informações complementares aos médicos e laboratoristas.

Métodos

Foram analisados os históricos clínicos de 61 pacientes provenientes da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo com Mieloma Múltiplo ao diagnóstico, e os mesmos utilizados para descrição de características demográficas, étnicas, o componente monoclonal e estadiamento de cada um, e 56 amostras dos mesmos foram submetidas à quantificação e análise das cadeias leves livres e totais através da utilização do Freelite® para quantificação das cadeias leves livres (The Binding Site- Reino Unido) e o teste de cadeia leve total, para níveis de cadeias totais (Siemens Healthineers). Os testes de Freelite® foram realizados na plataforma SPA Plus® (The Binding Site- Reino Unido) e os testes de cadeia leve total foram realizados pelo laboratório Diagnósticos do Brasil (DASA). Os testes foram realizados de acordo com as instruções dos fabricantes e os valores de referência para o **Freelite®** foram:

Cadeia leve livre kappa	3.3-19.4 mg/L
Cadeia leve livre lambda	5.7-26.3 mg/L
Relação	0.26-1.65

Os intervalos de referência utilizados para o *teste de cadeia total* foram:

Imunoglobulinas kappa	1.7 - 3.7 g/L
Imunoglobulinas lambda	0.9 - 2.1 g/L
Relação	1.35 - 2.65

Resultados

Os pacientes foram avaliados retrospectivamente e a tabela 1 a seguir sumariza as características clínicas e estágio de estadiamento dos mesmos.

Tabela 1- Demografia, doença de base e características clínicas de pacientes	
Características	n (%)
Idade	
Mediana	60 (28-87)
Sexo	
Masculino	34 (56)
Feminino	27 (44)
Etnia	
Branco	47 (77)
Outros	14 (23)
Subtipo do componente monoclonal	
IgG	38 (62)
IgA	12 (20)
Cadeia leve livre	8 (13)
IgM	1 (2)
ND	2 (3)
DSS	
IA	3 (5)
IIA/B	7 (11)
IIIA/B	43 (70)
ND	8 (13)
ISS	
I	16 (26)
II	16 (26)
III	17 (28)
ND	12 (20)
<i>DSS- Estadiamento de Durie e Salmon; ISS- Sistema Internacional de Estadiamento</i>	

Para complementar a análise retrospectiva do soro dos pacientes, cujas amostras foram utilizadas para comparação da quantificação com Freelite® e cadeia leve total, a tabela 2 a seguir mostra a quantidade de pacientes que foram classificados com Mieloma Múltiplo dos subtipos: IgG kappa, IgG lambda, IgA kappa, IgA lambda, cadeia leve livre kappa e cadeia leve livre lambda.

Gamopatia Monoclonal	Amostras (n)	IgG kappa (n)	IgG Lambda (n)	IgA Kappa (n)	IgA Lambda (n)	CLL kappa (n)	CLL lambda (n)
Mieloma Múltiplo	56	24	12	8	4	5	3

Tabela 2. Análise retrospectiva do soro e características da proteína monoclonal dos pacientes diagnosticados com Mieloma

Em seguida, avaliamos os valores de kappa, lambda e da relação obtida após a quantificação das cadeias leves livres e totais, nas amostras de soro dos 56 pacientes com Mieloma Múltiplo. Como podemos observar na figura 1 abaixo, a relação de CLLs obtida após realização do Freelite® foi anormal em 52 pacientes, enquanto que a relação anormal de cadeias leves totais foi detectada em 48 dos mesmos pacientes avaliados.

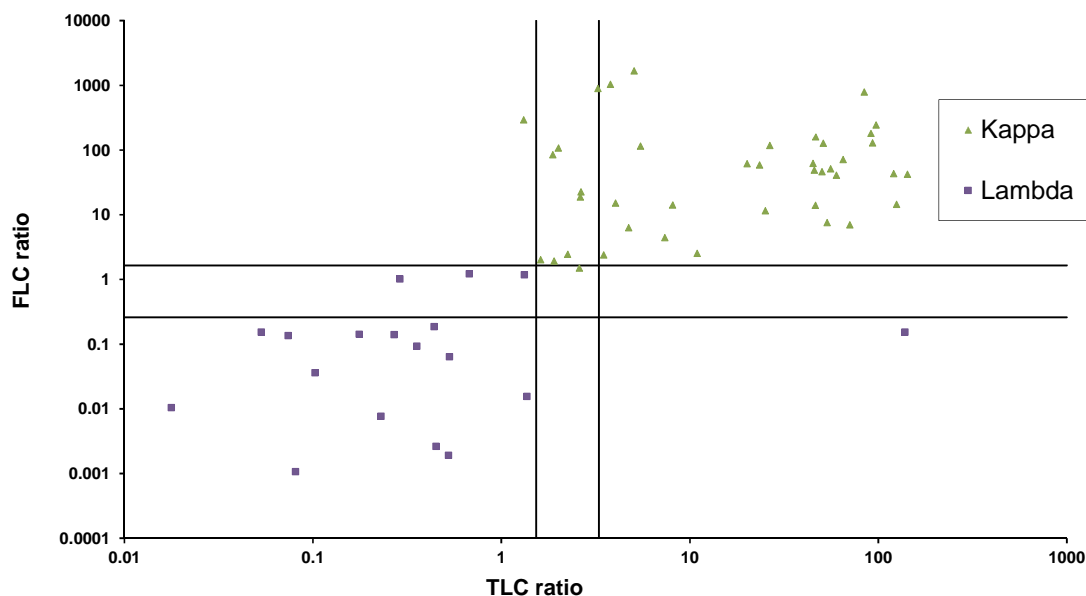


Figura 1: Relação anormal detectada pelo Freelite em comparação com o ensaio de cadeia leve total.

O Freelite® foi capaz de detectar todos os pacientes corretamente.

Conclusão

A detecção precoce de pacientes com mieloma múltiplo é fundamental para a redução de comorbidades que podem afetar a qualidade de vida. O ensaio da cadeia leve livre do soro, mas não o ensaio da cadeia leve total, é parte importante do quadro diagnóstico utilizado na rotina de testes laboratoriais e que contribui para o diagnóstico, monitoramento e prognóstico de pacientes com gamopatias monoclonais, incluindo o mieloma múltiplo. Nosso grupo demonstrou previamente outros dados onde o ensaio de cadeia leve total não foi eficiente ¹².

Neste trabalho, o teste de cadeia leve total mais uma vez não detectou os pacientes corretamente quando comparado ao teste de CLLs. Com isso, sugerimos que os médicos e laboratoristas estejam cientes dessas diferenças, e procurem seguir as Diretrizes Internacionais as quais recomendam a inclusão da análise de CLLs (Freelite®) ao painel de testes convencional para diagnóstico e monitoramento do Mieloma Múltiplo.

Referências Bibliográficas

1. Gertz MA. Immunoglobulin light chain amyloidosis: 2014 update on diagnosis, prognosis, and treatment. *Am J Hematol.* 2014;89(12):1133–40.
2. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Dispenzieri A, et al. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc.* 2003;78(1):21–33.
3. Bridgen ML, Webber D. Clinical Pathology Rounds: the case of the anaplastic carcinoma that was not – potential problems in the interpretation of monoclonal proteins. *Lab Med.* 2000;31(12):661–5.
4. van Zaanen HC, Diderich PP, Pegels JG, Ruizeveld de Winter JA. Renal insufficiency due to light chain multiple myeloma. *Ned Tijdschr Geneeskd.* 2000;144(45):2133–7.
5. Chaves Lameiro P, Lazaro de la Osa J, Gonzalez J. Difficulties identifying a monoclonal component in a Bence-Jones multiple myeloma, a clinical case. *Biochim Clin.*
6. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2014; **15**: e538–48.
7. Guidelines on the diagnosis and management of multiple myeloma treatment: Associação Brasileira de Hematologia e Hemoterapia e Terapia Celular. Vânia Tietsche de Moraes Hungria, Edvan de Queiroz Crusoe, Adriana Alvarez Quero, Manuella Sampaio, Angelo Maiolino, Wanderley Marques Bernardo. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2013;35(3):201-17
- 8 -Serum free light chain assessment in monoclonal gammopathy and kidney disease Colin A. Hutchison, Kolitha Basnayake and Paul Cockwell. Hutchison, C. A. et al. *Nat. Rev. Nephrol.* advance online publication 29 September

9-Clinical Chemistry 48:9 1437–1444 (2002) Serum Reference Intervals and Diagnostic Ranges for Free and Free Immunoglobulin Light Chains: Relative Sensitivity for Detection of Monoclonal Light Chains Jerry A. Katzmann, Raynell J. Clark, Roshini S. Abraham, Sandra Bryant, James F. Lymp, Arthur R. Bradwell, and Robert A. Kyle

10- Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G, Miguel JS, Ludwig H, Hajek R, et al. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia*. 2009; 23 (2):215–24.14

11- Hungria VT, Kampanis P, Drayson MT, Plant T, Crusoe EQ, Peres AL, et al. Comparison of kappa and lambda Freelite to total kappa and lambda immunoassays for the detection of monoclonal gammopathies, both as standalone tests and alongside serum protein electrophoresis. *Blood*. 2014; 124 (21):5705.21.

12- Serum free light chain assays not total light chain assays are the standard of care to assess Monoclonal Gammopathies Vania Tietsche de Moraes Hungria, Syreeta Allen, Petros Kampanis, Elyara Maria Soares. *Rev bras hematol hemoter*. 2016;3 8(1):37–43

13- Serum free light chains in clinical laboratory diagnostics. Ellen Jenner. The Binding Site Group Ltd., 8 Calthorpe Road, Edgbaston, Birmingham B15 1QT, UK *Clinica Chimica Acta* 427 (2014) 15–20