

Referências Bibliográficas

- 1 Dispenzieri A, et al. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia* 2009;23:215-224.
- 2 Jefferis R, Lefranc, MP Human immunoglobulin allotypes: possible implications for immunogenicity. *MAbs* 2009;1:332-338
- 3 Hutchison CA, et al. Diagnostic accuracy of monoclonal antibody based serum immunoglobulin free light chain immunoassays in myeloma cast nephropathy. *BMC Clin Pathol* 2012;12:12
- 4 Bradwell AR, et al. Serum test for assessment of patients with Bence Jones myeloma. *Lancet* 2003;361:489-491
- 5 Drayson MT, et al. Prospective study of serum FLC and other M-protein assays: when and how to measure response? *Clin Lymphoma Myeloma* 2009;9:A346a
- 6 Harding SJ, et al. Serum free light chain immunoassay as an adjunct to serum protein electrophoresis and immunofixation electrophoresis in the detection of multiple myeloma and other B-cell malignancies. *Clin Chem Lab Med* 2009;47:302-304
- 7 Hutchison CA, et al. Serum free light chain measurement aids the diagnosis of myeloma in patients with severe renal failure. *BMC Nephrol* 2008;9:11
- 8 Kang SY, et al. Clinical usefulness of free light chain concentration as a tumor marker in multiple myeloma. *Ann Hematol* 2005;84:588-593
- 9 Mösbauer U, et al. Monitoring serum free light chains in patients with multiple myeloma who achieved negative immunofixation after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2007;92:275-276
- 10 Nowrousian MR, et al. Serum free light chain analysis and urine immunofixation electrophoresis in patients with multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2005;11:8706-8714
- 11 Piehler AP, et al. Quantitation of serum free light chains in combination with protein electrophoresis and clinical information for diagnosing multiple myeloma in a general hospital population. *Clin Chem* 2008;54:1823-1830
- 12 van Rhee F, et al. High serum-free light chain levels and their rapid reduction in response to therapy define an aggressive multiple myeloma subtype with poor prognosis. *Blood* 2007;110:827-832
- 13 Wolff F, et al. Assessment of the analytical performance and the sensitivity of serum free light chains immunoassay in patients with monoclonal gammopathy. *Clin Biochem* 2007;40:351-354
- 14 Park JW, et al. Combined analysis using extended renal reference range of serum free light chain ratio and serum protein electrophoresis improves the diagnostic accuracy of multiple myeloma in renal insufficiency. *Clin Biochem* 2012;45:740-744.
- 15 Barchiesi V, Cerasuolo, D, Cuomo, M et al. A particular case of lambda chain multiple myeloma. *Biochimica Clinica* 2013;37:428-430
- 16 Hoedemakers RM, Pruijt, JF, Hol, S et al. Clinical comparison of new monoclonal antibody-based nephelometric assays for free light chain kappa and lambda to polyclonal antibody-based assays and immunofixation electrophoresis. *Clin Chem Lab Med* 2011;50:489-495
- 17 Lock R, et al. A multicentre study comparing two methods for serum free light chain analysis. *Ann Clin Biochem* 2013;50:255-261
- 18 Pretorius CJ, et al. Evaluation of the N Latex FLC free light chain assay on the Siemens BN analyser: precision, agreement, linearity and variation between reagent lots. *Ann Clin Biochem* 2012;49:450-455
- 19 Schneider N, et al. Comparative analysis of immunoglobulin free light chains quantification by Freelite (The Binding Site) and N Latex FLC (Siemens) methods. *Ann Biol Clin (Paris)* 2013;71:13-19
- 20 Harding S, et al. Comparison of the analytical performance of polyclonal and monoclonal antibody based FLC assays in refractory multiple myeloma patients. *Clin Chem* 2013;59:A22a
- 21 Tate J, et al. Clinical comparison of the Freelite and N latex serum free light chain assays in the diagnosis and monitoring of AL amyloidosis. *Biochimica Clinica* 2013;37:W286a
- 22 Hutchison CA, et al. The pathogenesis and diagnosis of acute kidney injury in multiple myeloma. *Nat Rev Nephrol* 2011;8:43-51
- 23 Burden JM, et al. Comparison of Freelite and N Latex FLC utilising diagnostically relevant samples. *Clin Chem* 2012;58:C44a
- 24 Basu S, et al. Response to Pretorius: 'Evaluation of the N Latex FLC free light chain assay on the Siemens BN analyser'. *Ann Clin Biochem* 2013;50:278-279
- 25 Sharrod-Cole H, et al. Serum free light chain assessments: Comparison of precision and linearity. *Biochimica Clinica* 2013;37:T390a
- 26 Jacobs JF, et al. Effect of sample dilution on two free light chain nephelometric assays. *Clin Chim Acta* 2012;413:1708-1709
- 27 te Velthuis H, et al. N Latex FLC - new monoclonal high-performance assays for the determination of free light chain kappa and lambda. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:1323-1332

Na Europa e nos EUA, o **Freelite®** & **Hevylite®** são marcas registradas da The Binding Site Group Ltd, Birmingham, Reino Unido.

BN™II é marca registrada da Siemens Healthcare Diagnostics Inc.

Distribuidor: **SG Tecnologia Clínica** • Rua Avandava, 675 - Bela Vista • São Paulo - SP • Tel/Fax: (11) 3218-1700

São Paulo - SP - Brasil:
Binding Site do Brasil
Brasil
Tel: +55 16 98173 6436
info@bindingsite.com.br

Alemanha, Áustria, Suíça:
The Binding Site GmbH
Alemanha
Tel: +49 (0)6202 9262 -0
office@bindingsite.de

República Tcheca, República Eslovaca:
The Binding Site s.r.o.
República Checa
Tel: +420 223 013 988-9
info@bindingsite.cz

Escritório central:
The Binding Site Group Ltd
Reino Unido
Tel: +44 (0)121 456 9500
info@bindingsite.co.uk

França:
The Binding Site France
França
Tel: 04.38.02.19.19
info@bindingsite.fr

Bélgica, Países Baixos, Luxemburgo:
The Binding Site SPRL/BVBA
Bélgica
Tel: +32 (0)3 242 88 21
info@bindingsite.be

EUA, Canadá:
The Binding Site Inc.
EUA
Discagem gratuita: 800 633 4484
info@thebindingsite.com

Espanha:
The Binding Site Spain
Espanha
Tel: 902027750
info@bindingsite.es

Itália:
The Binding Site Italy
Itália
Tel: +39 035 0951500
info@bindingsite.it



Agosto 2015
INC262.1

Teste policlonal Freelite®

Padrão de excelência na quantificação precisa de cadeias leves livres.

Informe

Josie Evans, PhD; Fiona Kilvington, MSc; Stephen Harding, PhD.
The Binding Site Group Ltd, Birmingham, UK.

Teste policlonal Freelite®

O desenvolvimento de testes de cadeias leves livres (CLL) no soro baseado em antissoros policlonais, Freelite®, mudou o paradigma de tratamento de pacientes com transtornos de célula B. Como resultado de mais de 1.500 publicações identificando a utilidade do Freelite, os testes foram reconhecidos pelo Grupo Internacional de Trabalho sobre Mieloma e incorporado em suas diretrizes [1].

Tais diretrizes internacionais recomendam os testes Freelite nas seguintes situações:

- como ferramenta para detectar transtornos de células plasmáticas (junto com eletroforese de proteínas séricas) [1],
- monitorar vários pacientes com mieloma múltiplo que não têm doença mensurável (por eletroforese sérica ou de urina) [1],
- ajudar na estratificação de risco de pacientes com gamopatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS) e mieloma múltiplo latente (SMM)[1],
- determinar a intensidade da resposta ao tratamento e definir uma resposta completa e estrita [1].

Os testes baseiam-se na quantificação precisa tanto de CLL kappa (κ) e lambda (λ) com a respectiva relação entre elas. A relação é essencial para a utilidade desses ensaios, já que possui sensibilidade de imunoensaio geralmente alta e fornece avaliação quantitativa de clonalidade de CLL. Além disso, o cálculo da diferença entre o CLL envolvido e não envolvido (dCLL, p.ex., κ CLL - λ CLL para um paciente κ) é recomendado para medições em

série [1]. Os testes de CLL são respaldados por centenas de artigos internacionais especializados há mais de uma década. Recentemente, os testes de CLL baseados em antissoro monoclonal foram disponibilizados para venda. Existem diferenças inerentes entre os dois testes sobre as quais os usuários precisam saber. Aqui apresentamos uma comparação do desempenho do Freelite baseado em antissoro policlonal e de testes de CLL baseados em antissoros monoclonais.

Freelite é o único exame sérico das cadeias leves livres recomendado por nome nas Diretrizes Internacionais [1].

"A introdução do teste de cadeia leve livre em soro revolucionou nossa capacidade de avaliar respostas hematológicas em pacientes com baixa carga tumoral"

Dr Angela Dispenzieri,
Mayo Clinic, Rochester, EUA

Os testes baseados em antissoros policlonais são melhores do que testes com antissoros monoclonais para a identificação de cadeias leves livres no soro

Todos os testes nefelométricos e turbidimétricos para a quantificação de imunoglobulinas totais (IgG, IgA e IgM) usam antissoro policlonal devido à variabilidade inerente nessas moléculas. Do mesmo modo, CLL sérico κ e λ são altamente polimórfico. Os testes de CLL baseados em antissoro policlonal são necessários para garantir o reconhecimento completo e medições precisas.

Os genes que codificam o CLL reúnem-se em células B agregando segmentos de gene individuais variáveis (V), juncionais (J) e constantes (C) (Figura 1). Existem várias cópias de vários segmentos genéticos, e uma seleção aleatória de segmentos genéticos individuais contribui para a diversidade de moléculas de CLL.

Enquanto o domínio constante de κ é geralmente codificado por um segmento genéticos C único, o domínio constante λ é codificado por um de vários segmentos genéticos C. Na Figura 1, quatro segmentos C funcionais contribuem para a diversidade estrutural de moléculas CLL λ . A diversidade do CLL κ e λ é auxiliada pela variação isotípica e alotípica e por modificações pós-translacionais. [2] Isso significa que um teste CLL baseado em anticorpos monoclonais provavelmente não reconheça todas as formas de CLL λ , enquanto que um teste baseado em antissoro policlonal consegue reconhecer várias moléculas CLL λ .

Para ter eficácia no diagnóstico e monitoramento de pacientes, qualquer imunoensaio de CLL sérico precisa poder reconhecer todas as várias formas de proteínas de CLL sérico. Os testes de Freelite usam vários antissoros policlonais de ovelhas cultivados para vários CLL monoclonais diferentes. Por isso o Freelite irá reconhecer a mais ampla variedade de epítomos de CLL. Por outro lado, os testes de CLL baseados em anticorpos anticlonais irão reconhecer uma variedade muito mais limitada de epítomos de CLL. Esses testes baseados em antissoro monoclonal nem sempre conseguem reconhecer todas as formas de CLL κ e λ . Se um paciente não consegue fazer um teste monoclonal, esse problema não pode ser corrigido por lotes subsequentes contendo os mesmos anticorpos monoclonais.

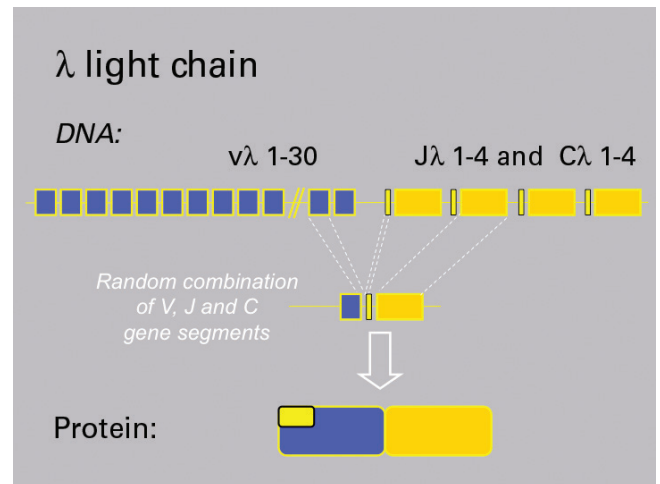


Figura 1. Organização da linhagem germinativa do locus λ da cadeia leve de imunoglobulina humana no cromossomo 22.

A região contém aproximadamente 30 segmentos genéticos V funcionais e 4 pares de segmentos genéticos J e C funcionais. Uma seleção aleatória de segmentos V, J e C é combinada para codificar uma proteína CLL λ .

Diferenças na performance clínica entre testes antissoro policlonais e monoclonais respaldam o uso de testes policlonais

Até hoje, em 17 estudos que incorporam mais de 700 pacientes com mieloma múltiplo de cadeia leve (LCMM), o CLL monoclonal foi detectado pelo Freelite na apresentação em todos os casos, ou seja, com 100% de sensibilidade diagnóstica [4-14].

Em um total de 5 estudos publicados até hoje, que incorporaram números limitados de pacientes com LCMM, os testes Siemens N Latex CLL falharam na detecção de CLL em um total de 6 pacientes com λ LCMM e 1 κ LCMM (Tabela 1) [15-19].

Os maiores grupos de pacientes com casos bem descritos e confirmados de LCMM foram incluídos nos estudos por Schneider e Hoedemakers, e neles 11,5% (3/26) de todos os casos confirmados de LCMM não foram identificados pelos testes N Latex CLL.

Em comparação, os mesmos 5 estudos relataram que todos esses pacientes com LCMM foram identificados corretamente pelos testes Freelite (Tabela 1).

Devido a essas diferenças inerentes, as diretrizes internacionais baseadas no teste Freelite policlonal não podem ser aplicadas ao teste N Latex CLL monoclonal para doença mensurável em mieloma múltiplo e amiloidose AL.

“É esperado que o teste de cadeias leves livres no soro identifique todos os pacientes com Mieloma Múltiplo de Cadeia Leve”

Frase atribuída a
Prof Jerry Katzmann

Siemens N Latex Symposium EML 2013

Estudo	Número total de pacientes com LCMM	Pacientes não classificados	Resultados Freelite			Resultados N Latex CLL		
			κ CLL	λ CLL	Taxa κ/λ	κ CLL	λ CLL	Taxa κ/λ
Barchiesi [15]	1 λ LCMM	λ LCMM	9,1	818,8	0,01 (Anormal)	16,4	23,0	0,71 (Normal)
Hoedemakers [16]	3 κ LCMM 6 λ LCMM	λ LCMM	n.s.	n.s.	n.s. (Anormal)	n.s.	n.s.	n.s. (Normal)
Lock [17]	n.s. (189 MM)	λ LCMM	4,66	6070	<0,01 (Anormal)	19,5	59,7	0,33 (Normal)
		λ LCMM	7,9	422	0,02 (Anormal)	12,8	40,2	0,32 (Normal)
Pretorius [18]	n.s.	λ LCMM	18	464	0,04 (Anormal)	29	84	0,35 (Normal)
Schneider [19]	17 LCMM	λ LCMM	n.s.	n.s.	0,02 (Anormal)	n.s.	n.s.	0,8 (Normal)
		κ LCMM	n.s.	n.s.	1,89 (Anormal)	n.s.	n.s.	0,8 (Normal)

Tabela 1. Comparação do desempenho diagnóstico de testes Freelite e N Latex CLL para identificar CLL monoclonal em LCMM. Os pacientes foram categorizados como não classificados se os testes N Latex CLL relataram taxa normal de κ/λ (n.s. = não especificado).

Os valores absolutos são significativamente diferentes

Os valores absolutos dos resultados dos testes Freelite e N Latex CLL não são os mesmos. Estudos demonstraram que a performance do teste baseado em antissoro monoclonal não atende às diretrizes do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) quanto à equivalência (a correlação $[R^2]$ entre os dois testes deve ser maior que 0,95) [3,16,17,20]. A especificidade dos testes monoclonais precisa ser mais bem caracterizada para explicar porque tais diferenças são observadas.

Em um estudo feito por Harding *et al*, os valores de R^2 para Freelite e N Latex CLL foram 0,79 para κ CLL e 0,20 para λ CLL em pacientes com mieloma múltiplo (MM) (Figura 2) [20].

Tate *et al*, comparou os resultados do Freelite e do N Latex CLL em 62 amostras diagnósticas de pacientes com amiloidose AL [21]. O estudo concluiu que houve diferenças significativas entre as concentrações de CLL envolvidas medidas pelos dois testes e os critérios de consenso desenvolvidos usando testes Freelite não são aplicáveis aos testes N Latex CLL.

Isso significa que as diretrizes internacionais baseadas nos dados do Freelite não podem ser aplicadas aos testes N Latex CLL. Isso inclui as seguintes definições:

- Doença mensurável em MM (definido como 100 mg/l) [1],
- Critérios de resposta parcial muito boa em AL amiloidose (definido como valor absoluto da diferença entre concentrações de sCLL envolvidos e não envolvidos de < 40 mg/l) [1].

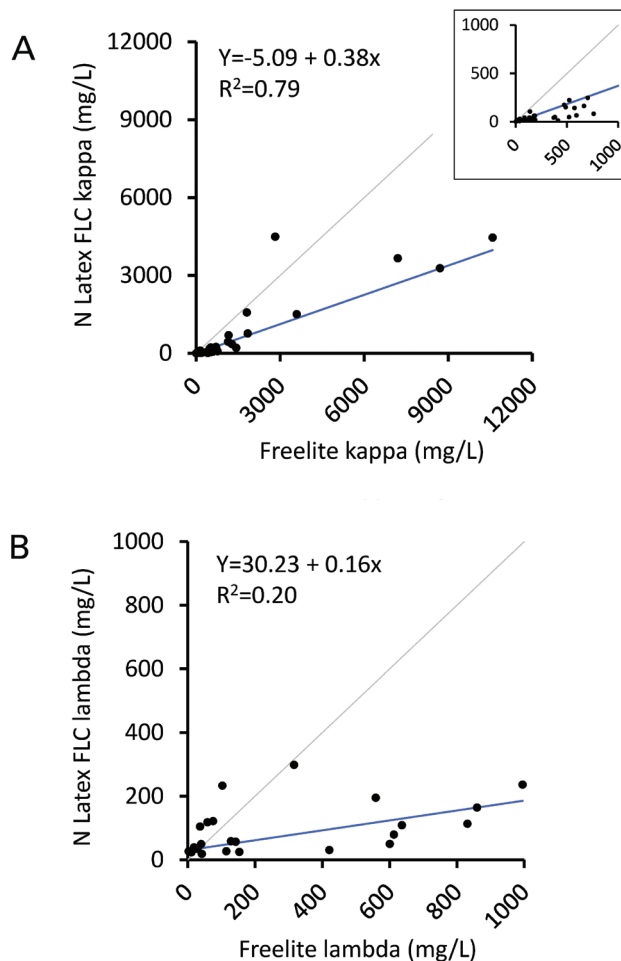


Figura 2. Comparação de medições CLL κ e λ por testes Freelite e N Latex CLL em pacientes com mieloma múltiplo refratário [20].

Análise de regressão Passing-Bablok dos resultados de pacientes com:

- (A) CLL κ monoclonal (n=47) e
(B) CLL λ monoclonal (n=23).

concentrações séricas de CLL podem ser usadas para identificar nefropatias decorrentes do Mieloma Múltiplo

Em caso de lesão renal aguda (AKI), o International Kidney and Monoclonal Gammopathy Research Group (IKMGRG) recomenda um algoritmo de triagem para doença monoclonal que incorpora análise de CLL sérico. Os pacientes com concentração nefrotóxica de CLL > 500 mg/l e uma taxa anormal de κ/λ podem ser considerados portadores de AKI secundário ao mieloma múltiplo [22].

O único estudo feito até agora usando testes N Latex CLL da Siemens no contexto de AKI concluiu que as recomendações de IKMGEG não podem ser aplicadas [3]. Neste estudo, cinco dos 28 pacientes (18%) com AKI secundário ao mieloma múltiplo não foram classificados pelos testes N Latex CLL (Figura 3). Os resultados desses cinco pacientes estão exibidos na Tabela 2. Em um caso (paciente 7) o teste N Latex CLL relatou uma concentração de CLL λ de 1 mg/l, enquanto que o teste Freelite relatou 1810 mg/l. Isso sugere que o clone CLL λ monoclonal não foi detectado pelo teste baseado em anticorpo monoclonal.

O caso não detectado de monoclonalidade de CLL λ indica a limitação do uso de anticorpos monoclonais, já que possuem um número restrito de epítomos que podem identificar; a miríade de variações estruturais no CLL monoclonal significa que haverá casos em que o teste baseado em anticorpos monoclonais não irá detectar a clonalidade de CLL; este caso é uma demonstração prática deste princípio [3].

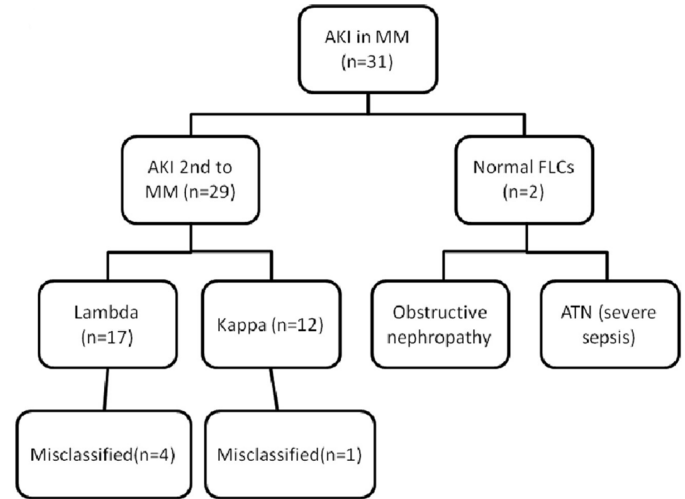


Figura 3. Comparação dos testes Freelite e N Latex CLL em pacientes com mieloma múltiplo e lesão renal aguda [3].

Os pacientes foram categorizados como não classificados quando os testes N Latex CLL não identificaram os níveis nefrotóxicos de CLL monoclonal definidos como CLL monoclonal >500 mg/l.

Table 2 Demographics of the 5 patients missed by the Siemens FLC assay

Patient	MM type	Freelite			Siemens			Missed FLC*	Misclassified FLC as <500 mg/L**
		κ	λ	Ratio	κ	λ	Ratio		
2	Free λ	2	7010	0.0003	1	322	0.003	No	Yes
7	IgA λ	8	1810	0.0044	4	1	8.058	Yes	Yes
10	IgG λ	8	1080	0.0078	9	64	0.134	No	Yes
13	IgG λ	9	572	0.0162	9	225	0.041	No	Yes
23	IgG κ	796	6	125.7	493	17	29.6	No	Yes

*Patients were classified as missed FLC if the new assays did not identify a monoclonal FLC.

**Patients were classified as misclassified if their monoclonal FLC level was reported as less than the nephrotoxic level of 500 mg/L (5 of 28 patients).

A detecção do excesso de antígeno exige diluições maiores das amostras nos testes Freelite e N Latex CLL

Os níveis de CLL em pacientes com gamopatia monoclonal podem variar de <1 mg/l a >10.000mg/l. Esta ampla variedade de proteína, além da natureza exclusiva de proteínas monoclonais, significa que a concentração de CLL em um pequeno número de amostras de pacientes pode ser subestimado devido ao excesso de antígenos. As informações são fornecidas no folheto do Freelite para permitir o teste de excesso de antígeno usando um protocolo padrão de diluição. O teste N Latex CLL da Siemens usa um protocolo de pré-reação automática e o folheto do produto afirma fornecer "segurança de excesso de antígenos" de até 23.000 mg/l e 57.000 mg/l para testes CLL κ e λ respectivamente.

Dois estudos recentes compararam a incidência de excesso de antígenos nos testes Freelite e N Latex CLL da Siemens no BNTMII analisando amostras em diluições de amostras mais altas (Tabela 3) [20,23]. O excesso de antígenos não foi observado em nenhum dos estudos nos testes de CLL λ Freelite. Harding *et al* demonstrou que, embora o teste Freelite κ tenha exibido excesso de antígenos em 3% das amostras, todos os casos foram identificados corretamente pelo protocolo de diluição do fabricante [20].

Nos testes N Latex CLL κ e λ um número significativo de amostras exibiu excesso de antígenos. Tais amostras mostraram valores entre cinco e nove vezes mais altos que os valores obtidos na diluição inicial (Figura 4). Esses dados demonstram a necessidade de diluições adicionais para identificar amostras em excesso de antígenos por testes N Latex CLL da Siemens, apesar da alegação do fabricante de "segurança contra excesso de antígenos".

Devido à natureza do CLL monoclonal, todos os testes CLL podem ter excesso de antígenos. As proteínas monoclonais ausentes podem ter sérias implicações no bem-estar do paciente. É impossível haver proteção perfeita contra o excesso de antígenos.

Excesso de antígeno Freelite		
Monoclonal Tipo de CLL	Incidência	Proporção detectada pelo protocolo do fabricante
κ	3%	100%
λ	0%	n/a
Excesso de antígeno N Latex CLL		
Monoclonal Tipo de CLL	Incidência	Proporção detectada pelo protocolo do fabricante
κ	4%	0%
λ	3%	0%

Tabela 3. Comparação da incidência de excesso de antígenos nos testes Freelite e N Latex CLL no soro de 91 pacientes com mieloma múltiplo com doença refratária.

Testes feitos com Siemens BNTMII. O excesso de antígenos foi definido como uma diferença de >4 vezes nos resultados entre 1/100 e 1/2000 diluições [20].

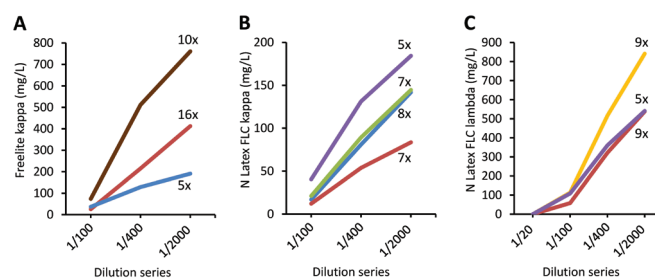


Figura 4. Amostras de pacientes individuais exibindo excesso de antígenos em testes Freelite ou N Latex CLL [20].

O excesso de antígenos foi observado no (A) teste Freelite κ CLL (3 amostras), (B) teste N Latex CLL κ (4 amostras) e (C) teste N Latex CLL λ . O teste Freelite λ CLL não mostrou excesso de antígenos em nenhuma das amostras testadas. As amostras foram medidas na diluição padrão e em outras duas diluições. O excesso de antígenos foi definido como uma diferença de >4 vezes nas medições de CLL entre 1/100 e 1/2000 diluições. (A diferença nas medições de CLL está indicada no final de cada linha).

Desempenho do teste: precisão

Como os intervalos de medição dos testes Freelite e N Latex CLL são diferentes, as amostras selecionadas para estudos de precisão devem ser escolhidas com cuidado para garantir uma comparação justa dos dois testes.

Pretorius *et al.* comparou a precisão dos testes N Latex CLL e Freelite usando amostras cujas concentrações estavam em locais distintos dos intervalos de medição [24]. Este desenho de estudo não permitiu uma comparação justa dos dois testes.

Sharrod-Cole *et al.* mediu a precisão dos testes Freelite e N Latex CLL usando soro contendo CLL monoclonal ou policlonal em concentração correspondente a 140-200% do valor mais baixo do calibrador ou 80-95% do valor mais alto do calibrador no BN™II [25]. A precisão mostrou-se comparável nos dois testes CLL (Tabelas 4a e 4b).

Um estudo de precisão de Lock *et al.* incluiu amostras selecionadas para estarem no intervalo de referência ou moderadamente elevadas. Os autores concluíram que a reprodutibilidade dos testes Freelite e N Latex CLL foi "aceitável" (Tabela 5) [17].

Tabela 4a. Precisão do CLL Kappa

Tipo de amostra	Nível de precisão	% CV N Latex CLL	% CV Freelite
Policlonal	Baixo	1,3	5,1
Monoclonal	Baixo	2,3	4,4
Monoclonal	Alto	3,3	4,1

Tabela 4b. Precisão do CLL Lambda

Tipo de amostra	Nível de precisão	% CV N Latex CLL	% CV Freelite
Policlonal	Baixo	3,8	6,3
Monoclonal	Baixo	7,8	6,5
Monoclonal	Alto	1,9	3,5

Tabelas 4a e 4b. Precisão analítica dos testes Freelite e N Latex CLL

A precisão foi medida em 140-200% do menor valor de calibração ou 80-95% do maior valor de calibração na diluição de amostra padrão. Devido aos diferentes intervalos de medição dinâmica dos testes Freelite e N Latex CLL, as concentrações do CLL medido foram:

Freelite baixo $\kappa = 8,75-12,5$ mg/l e $\lambda = 7,1-10,1$ mg/l, alto $\kappa = 160-190$ mg/l e $\lambda = 130,24-154,7$ mg/l;

N Latex CLL baixo $\kappa = 5,36-7,66$ mg/l e $\lambda = 2,62-3,75$ mg/l, alto $\kappa = 48-57$ mg/l e $\lambda = 98-116,4$ mg/l [25].

	Cadeias leves livres de soro kappa		Cadeias leves livres de soro lambda	
	Média (SD) (mg/l)	Coefficiente de variação (%)	Média (SD) (mg/l)	Coefficiente de variação (%)
No lote				
Freelite	11,17 (1,09)	9,76	9,06 (0,69)	7,64
N Latex CLL	13,29 (0,29)	2,17	13,39 (0,25)	1,84
Entre os lotes				
Freelite	16,96 (1,21)	7,12	27,42 (1,92)	7,02
Freelite	30,37 (1,75)	5,76	54,36 (3,49)	6,4
N Latex CLL	13,93 (0,71)	5,09	12,20 (0,44)	3,57
N Latex CLL	36,57 (2,34)	6,39	35,50 (2,00)	5,63

Tabela 5. Dados de reprodutibilidade baseados em dez réplicas, exceto N Latex CLL entre lotes, nos quais somente três réplicas foram possíveis.

Desempenho do teste: não linearidade

O CLL monoclonal são proteínas altamente variáveis e pode, às vezes, produzir uma resposta não linear. A linearidade foi avaliada comparando a concordância entre os resultados obtidos em diferentes padrões de diluição de amostra (Tabela 6) [26]. A maioria das amostras contendo CLL monoclonal teve resultado de linearidade discordante entre as diluições de amostra usando testes Freelite ou N Latex CLL κ ou λ . Os exemplos são exibidos abaixo (Tabela 6). Resultados semelhantes foram relatados em amostras contendo CLL policlonal (Tabela 6).

Sharrod-Cole *et al.* [25] avaliou a linearidade dos testes Freelite e Siemens N Latex CLL usando diluições seriadas de amostras contendo CLL monoclonal. Após a análise de linearidade, os valores de R^2 no Freelite κ e λ foram 0,9881 e 0,9929, respectivamente. No Siemens N Latex CLL, os valores R^2 foram 0,9429 e 0,94. Os autores calcularam a diferença máxima entre as medições observadas e esperadas em diferentes diluições. O Freelite mostrou maior linearidade com diferença máxima de -18,3% comparado ao teste Siemens N Latex CLL, que teve diferença máxima de 38,3% (Figura 5).

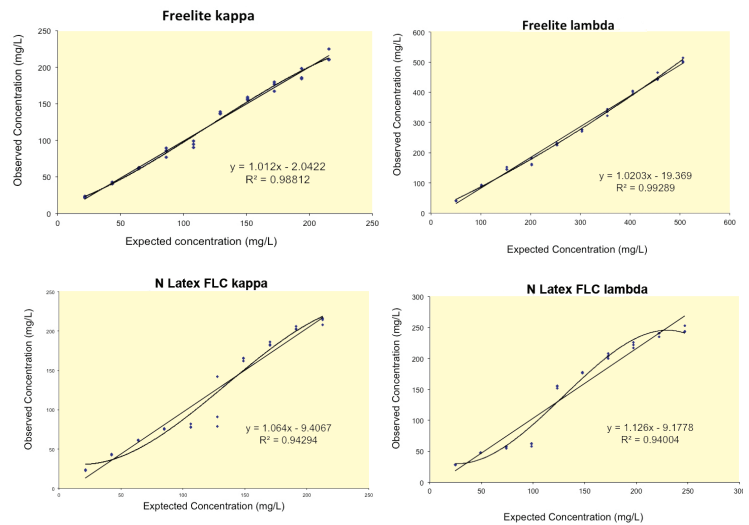


Figura 5. Comparação da linearidade dos testes Freelite e N Latex CLL feitos em nefrolômetro BN™II.

Amostras monoclonais foram analisadas em seus estados não diluídos em triplicados e foram repetidas conforme necessário (o início das diluições no Freelite κ e λ foram 1/100 e N Latex CLL κ e λ foram 1/100 e 1/20, respectivamente). As diluições foram feitas com Siemens N Diluent para atingir uma série de diluição de 0-100%. Os testes Freelite oferecem melhor linearidade quando comparados ao N Latex CLL.

Amostra		Freelite								N Latex CLL						
		1/20	1/100	1/400	1/2000	1/8000	1/40.000	1/160.000	% dif	1/20	1/100	1/400	1/2000	1/8000	1/40.000	% dif
1	Policlonal	4,64	10,9						235%	9,84	20,1					204%
2	Policlonal	3,72	7,69						207%	11,4	14,3					125%
15	Monoclonal κ CLL		>203	>811	3340	2290			69%	>110	>438	987	1210			123%
16	Monoclonal κ CLL		>203	>811	>4056	>16224	21400	17900	84%	>110	>438	>2189	7280	12400		170%

Tabela 6. Comparação dos valores de linearidade CLL κ medidos em duas diluições diferentes para amostras contendo CLL policlonal ou monoclonal.

Os resultados na primeira diluição que deram um resultado relatável foram comparados aos obtidos na próxima diluição. A diferença de porcentagem (%dif) entre os valores é exibida. [26]

Performance do teste: consistência entre os lotes

A consistência entre os lotes com Freelite é geralmente avaliada durante a produção comparando-se um conjunto de resultados de teste de cada novo lote de antissoro com resultados de lotes anteriores. Este painel de amostras inclui soro normal, soro com CLL policlonal elevado e soro de mieloma múltiplo.

O local de ligação usa grupos de rolamento grande de antissoro policlonal contendo 200 imunizações por agrupamento com < 5% de variação no antissoro constituinte entre dois lotes consecutivos. A Figura 6 mostra a consistência entre 4 lotes de reagentes Freelite kappa e lambda. Os valores de R^2 de regressão linear são > 0,98 tanto para testes kappa quanto lambda.

A reprodutibilidade entre lotes de testes Freelite e N Latex CLL foi avaliada independentemente por Lock *et al.*, que selecionou duas amostras contendo concentrações de CLL normal ou moderadamente elevadas [17]. A reprodutibilidade dos testes Freelite e N Latex CLL foi de 5,76-7,12% e 3,57-6,39%, respectivamente, e isso foi considerado aceitável pelos autores.

A boa reprodutibilidade entre lotes e a precisão em baixos níveis sustentam a inclusão do Freelite nas diretrizes internacionais.

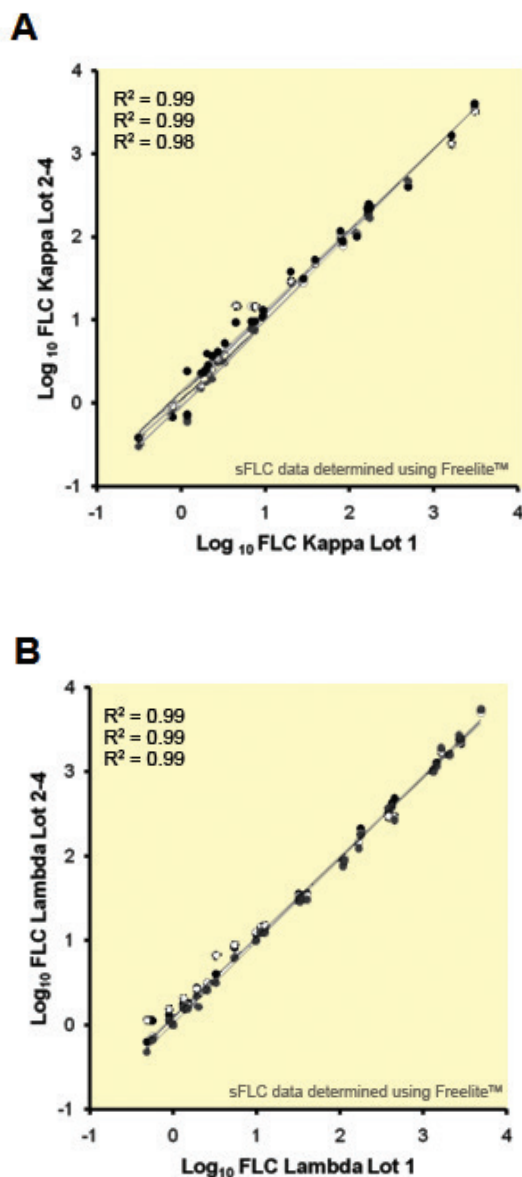


Figura 6. Comparação do Freelite entre lotes

A. Quatro lotes dos kits Freelite κ .

B. Quatro lotes dos kits Freelite λ .

32 amostras usadas para comparação (intervalo κ : 0,4-3500 mg/l; intervalo λ : 0,4-2800 mg/l). Valores obtidos de um lote atribuído foram comparados com valores de três kits separados; as medições foram repetidas três vezes e os valores médios foram apresentados. As linhas contínuas indicam as linhas de melhor adequação.

Conclusão

É lógico pensar que qualquer teste calibrado em função de outro teste deva ter características semelhantes de desempenho, especialmente com respeito à quantificação [27]. Entretanto, conforme demonstrado neste resumo, este não é o caso nos imunoenaios de CLL. Como os valores obtidos por testes baseados em monoclonais não correspondem aos valores obtidos pelos testes Freelite, as diretrizes do Grupo Internacional de Trabalho sobre Mieloma não podem ser consideradas aplicáveis.

O Freelite ganhou suporte do Grupo Internacional de Trabalho sobre Mieloma por satisfazer uma necessidade ainda não atendida de diagnóstico e monitoramento de todos os pacientes com mieloma múltiplo de cadeia leve (LCMM) e a grande maioria dos pacientes oligosecretores.

Existe falta de evidência que sugira que os testes baseados em anticorpos monoclonais terão o mesmo desempenho clínico. Nas poucas publicações que existem até o momento, uma grande proporção de pacientes com LCMM não foram identificados pelos testes monoclonais. O problema parece estar associado principalmente com pacientes com LCMM λ . A importância dos pacientes não identificados não pode ser subestimada; um rápido diagnóstico preciso é essencial para permitir o início do tratamento específico para a doença e prevenir o desenvolvimento de complicações, incluindo insuficiência renal, associado com redução na sobrevida geral.

Para informações atualizadas sobre as cadeias leves livres séricas Freelite e sua utilidade clínica, escaneie este código QR para baixar nosso aplicativo informativo gratuito:



ou acesse www.wikilite.com

