



Original

Rangos de referencia de cadenas ligeras libres en suero de Trimer Diagnostic por turbidimetría. ¿Pueden ser universales los puntos de corte?

Serum free light chains reference ranges from Trimer Diagnostic by turbidimetry. Are the guidelines' cut-offs universal?

Luis J. Morales-García¹, María S. Pacheco-Delgado¹

Servicio de Laboratorio Clínico. Hospital Universitario de Fuenlabrada. Fuenlabrada, Madrid

Recibido: 11/12/2020
Aceptado: 25/03/2021

Correspondencia: Luis J. Morales-García. Servicio de Laboratorio Clínico. Hospital Universitario de Fuenlabrada. Camino del Molino, 2. 28942 Fuenlabrada, Madrid
e-mail: luisjavier.morales@salud.madrid.org

Palabras clave:

Rango de referencia. Intervalo de referencia. Mieloma múltiple. Cadenas ligeras libres de suero. Gammapatía monoclonal.

RESUMEN

Introducción: el análisis de cadenas ligeras libres en suero (CLL) se ha incorporado a las guías del International Myeloma Working Group para el diagnóstico y tratamiento de las gammopatías monoclonales. Estas recomendaciones se basaron únicamente en un único ensayo (Freelite) e instrumento. Aquí establecemos nuevos rangos de referencia (RR) para CLL kappa y lambda, para la diferencia y la suma kappa-lambda y un nuevo rango de diagnóstico para la ratio kappa/lambda de CLL (K/L-CLL) en un AU5800 (Beckman Coulter) con el reactivo de Trimer Diagnostic.

Material y métodos: para establecer nuevos RR se aplicó el protocolo CLSI EP28-A3C a 247 muestras de donantes de Fuenlabrada (Madrid, España) y se obtuvo la estimación del 95 % central y rango total. Se utilizaron muestras de pacientes con hipo e hipergammaglobulinemia policlonal para la evaluación de K/L-CLL como índice de proliferación monoclonal.

Resultados: los nuevos RR y el nuevo rango de diagnóstico de K/L-CLL para Trimer (0,44-1,23 mg/L) son muy diferentes a los de las guías (0,26-1,65 mg/L). Proponemos nuevos RR para la diferencia K-L y la suma K+L.

Agradecimientos: agradecemos a Trimer Diagnostic por la provisión de los reactivos y el soporte técnico.

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

DOI: 10.20960/revmedlab.00061

Morales-García LJ, Pacheco-Delgado MS. Rangos de referencia de cadenas ligeras libres en suero de Trimer Diagnostic por turbidimetría. ¿Pueden ser universales los puntos de corte?. Rev Med Lab 2021;2(1):11-20

La validación del rango diagnóstico como índice de proliferación monoclonal con muestras con hipo- e hipergammaglobulinemia confirman este nuevo rango.

Conclusiones: en este estudio presentamos RR de CLL para reactivo de Trimerio medidos en un AU5800. Estos rangos son diferentes a los proporcionados por el fabricante y a los utilizados en la mayoría de los estudios y pueden conducir a una clasificación errónea de los pacientes. Los fabricantes y los laboratorios clínicos deben esforzarse por proporcionar RR.

Keywords:

Reference range. Reference interval.
Multiple myeloma. Serum free light chain.
Monoclonal gammopathy.

ABSTRACT

Background: serum free light chain (FLC) analysis has been incorporated into the International Myeloma Working Group guidelines for diagnosis and management of monoclonal gammopathies. These recommendations were solely based on a single assay method (Freelite) and instrument. Here we establish new reference ranges (RR) for kappa and lambda FLC, for kappa-lambda difference and sum and new diagnostic range for kappa/lambda FLC ratio (K/L-FLC) in a AU5800 (Beckman Coulter) with the Trimerio Diagnostic assay.

Material and methods: to establish new RRs the CLSI EP28-A3C protocol was applied to 247 samples blood donors from Fuenlabrada, Spain and the estimation of central 95 % and total range was obtained. Samples from patients with polyclonal hypo- and hypergammaglobulinemia were used for the evaluation of K/L-FLC as a monoclonal proliferation index.

Results: the new RRs and the new K/L-FLC diagnostic range for Trimerio (0.44-1.23 mg/L) are very different to the ones on the guidelines (0.26-1.65 mg/L). We propose new RRs for K-L difference and K+L sum. Diagnostic range validation as monoclonal proliferation index with samples with hypo and hypergammaglobulinemia confirm this new range.

Conclusions: in this study we present FLC RRs for Trimerio reagents measured on a AU5800. These ranges are different from those provided by the manufacturer and from those used in most studies in the literature and these may lead to misclassification of patients. Manufacturers and clinical laboratories must strive to provide RRs for the technology they are using and for their population.

INTRODUCCIÓN

Las cadenas ligeras libres (CLL) de inmunoglobulinas se producen normalmente en un ligero exceso por las células B para proporcionar el ensamblaje correcto de inmunoglobulinas intactas. Sin embargo, solo el 60 % de las CLL se ensamblan correctamente en inmunoglobulinas recién sintetizadas, mientras que el resto se libera en la circulación sanguínea dando lugar al conjunto de CLL policlonales en suero. El exceso se elimina por la acción catabólica de las enzimas en los túbulos proximales del riñón.

En condiciones fisiológicas se producen diariamente aproximadamente 500 mg de CLL en suero (sCLL), con una vida media que varía de 2 a 6 horas. En consecuencia, dado que las concentraciones de sCLL dependen tanto de su producción como del aclaramiento renal, cualquier exceso de producción o insuficiencia renal puede contribuir a un cambio en la concentración normal de sCLL, dando lugar a concentraciones anormales de sCLL (1).

La introducción de ensayos automatizados de sCLL, que por primera vez permitió la cuantificación de sCLL en los laboratorios y la evaluación de la relación kappa/lambda de cadenas ligeras libres (K/L-CLL), cambió radicalmente el diagnóstico y la monitorización del trastorno plasmocelular.

Numerosas guías de práctica clínica incluyen las CLL tipo kappa (K-CLL) y CLL tipo lambda (L-CLL) y el ratio K/L-CLL como criterios diagnósticos y pronósticos de pacientes con gammopatías monoclonales y como respuesta al tratamiento (2,3). El grupo de trabajo internacional sobre mieloma -The International Myeloma Working Group (IMWG)- añadió estos nuevos criterios diagnósticos de laboratorio a los ya conocidos de hipercalcemia, disfunción renal, anemia y lesiones de destrucción ósea (CRAB). Estos criterios se denominaron eventos definitorios de mieloma -*myeloma defining events (MDE)*- y ahora se consideran suficientes para el diagnóstico de mieloma múltiple (MM) con o sin la presencia de criterios CRAB. Específicamente,

las sCLL constituyen un MDE cuando la ratio de CLL involucrada/no involucrada (i/u-CLL) excede de 100. Estas guías especifican que los valores propuestos se definen para las mediciones realizadas con el reactivo Freelite -The Binding Site (TBS), Birmingham, UK-, pero no indica nada sobre la tecnología utilizada ni la plataforma que se utilizó. Esos valores están basados en un estudio de Katzmann y cols. (4) en el que se definieron los rangos de referencia (RR) para valores de K-CLL y L-CLL en suero y rangos de diagnóstico para valores de K/L-CLL. Este estudio utilizó reactivos Freelite compuestos por antisueros policlonales para reconocer epítomos localizados en el dominio constante de K-CLL y L-CLL en suero. Las pruebas se realizaron en un nefelómetro BNII (Dade Behring, actualmente Siemens Healthineers). Los rangos definidos por Katzmann y cols. en este estudio son los que se citan en las guías de práctica clínica (2,3).

En los últimos años, las mediciones de K-CLL y L-CLL se han expandido a numerosas plataformas de instrumentos de varios fabricantes que utilizan metodologías nefelométricas (5) o turbidimétricas (6,7) y se ha aumentado la accesibilidad de estas pruebas en laboratorios clínicos. Otros fabricantes han lanzado sus propios reactivos para diferentes plataformas Siemens Healthineers (nefelometría) (8), Diazyme (turbidimetría) (9), Sebia (ELISA) (10), Seralite (flujo lateral) (11), Trimer Diagnostic (turbidimetría y nefelometría).

Tras la inclusión de la medición de las sCLL a los criterios de diagnóstico y respuesta al tratamiento, las sCLL se han introducido rápidamente tanto en la práctica clínica como en los ensayos clínicos. Por lo tanto, es vital que los laboratorios verifiquen o establezcan RR para K-CLL, L-CLL y rangos de diagnóstico para K/L-CLL para garantizar que la prueba satisfaga las necesidades clínicas.

Los reactivos de Trimer Diagnostic son los de más reciente aparición y no existen datos publicados de RR y de transferencia de resultados con otros reactivos. Debido a un cambio de tecnología en nuestro laboratorio, se realizó un estudio de transferibilidad de resultados y se detectó una falta de concordancia en los valores obtenidos con respecto a los de la bibliografía que podría afectar a la práctica clínica. El objetivo de este estudio es obtener RR para K-CLL, L-CLL y rangos de diagnóstico para K/L-CLL en nuestra población con los reactivos de Trimer Diagnostic en el analizador A5800 (Beckman Coulter). Como aportación original nos planteamos calcular los RR de la diferencia K-L y la suma K+L, que podrían ayudar en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población de estudio

Se realizó un estudio prospectivo con población sana para la obtención de RR de CLL. Durante los meses de octubre a diciembre de 2019 se recolectaron sueros de

255 donantes en el Hospital Universitario de Fuenlabrada, Madrid (España). Antes de la aceptación en la participación en el estudio se les realizó una encuesta de salud para confirmar su estado. Los criterios de exclusión fueron aquellos que hacen que se eleven las CLL, como haber padecido alguna infección reciente, enfermedad renal crónica (ERC), enfermedades hematólogicas, enfermedades autoinmunes o diabetes *mellitus*.

A todos los participantes se les midieron proteínas totales, albúmina, creatinina, cistatina C, inmunoglobulinas, electroforesis de proteínas e inmunotipado, y se calculó la estimación del filtrado glomerular (eFG, por la fórmula CKD EPI [12] de 2012 que incluye creatinina y cistatina C), para identificar cualquier anomalía que pudiera excluir alguna muestra. Se excluyeron 6 casos por detectarse componentes monoclonales (3 IgG, 2 IgM y 1 CLL tipo lambda) y dos *outliers*, una con CLL anormalmente altas y otra con CLL anormalmente bajas. El número total de muestras seleccionadas fue 247, 147 hombres (60 %) y 100 mujeres (40 %). La mediana de edad fue de 41 años con un rango de 18-65.

Para la validación de K/L-CLL como índice de proliferación monoclonal, se analizaron sueros de 30 pacientes con hipogammaglobulinemia policlonal y de 30 pacientes con hipergammaglobulinemia policlonal. En todos estos casos, la eFG fue $> 70 \text{ mL/min/1,73 m}^2$, el patrón de electroforesis de proteínas fue normal y el inmunotipado fue negativo.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética local y todos los participantes firmaron un consentimiento informado.

Procesamiento y almacenamiento de muestras de suero

Las muestras de sangre se dejaron coagular a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos, seguido de centrifugación de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los sueros se dividieron en alícuotas en dos tubos sin aditivos y se almacenaron a $-40 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta el análisis.

Métodos analíticos

Las pruebas bioquímicas fueron medidas en un analizador AU5800 (Beckman Coulter). Las características de las técnicas se presentan en la tabla I. La electroforesis de proteínas y el inmunotipado fueron realizados por electroforesis capilar en un instrumento V8 Nexus (Helena Laboratories) con un límite de detección de 1 mg/L para proteínas monoclonales dependiendo de la posición de la proteína monoclonal.

Las CLL se midieron por turbidimetría en el analizador AU5800 usando reactivos de Trimer Diagnostic (Barcelona, España). Este reactivo está compuesto por anticuerpos policlonales de conejo específicos contra

Tabla I.
Características de rendimiento analítico y datos de pruebas medidas en donantes de sangre

| | Mediana | Intervalo intercuartil | Método de medida | CV intraensayo (%)* | CV interensayo (%)* |
|-------------------|---------|------------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| Proteínas totales | 7,3 | 0,5 | Biuret | < 0,34 | < 0,7 |
| Albúmina | 4,4 | 0,4 | Verde bromocresol | < 1,17 | < 1,55 |
| Cistatina C | 0,77 | 0,16 | Inmunoturbidimétrico | < 0,82 | < 1,78 |
| Creatinina | 0,82 | 0,22 | Enzimático (IDMS) | < 1,2 | < 2,3 |
| eFG CreaCis | 106,2 | 18,0 | CKD-EPI 2012 | | |
| IgG | 1078 | 276 | Inmunoturbidimétrico | < 2,24 | < 4,66 |
| IgA | 234 | 117 | Inmunoturbidimétrico | < 2,18 | < 4,01 |
| IgM | 104 | 62 | Inmunoturbidimétrico | < 2,19 | < 4,08 |
| K-CLL | 8,5 | 2,6 | Inmunoturbidimétrico | < 7,6 | < 3,8 |
| L-CLL | 11,7 | 4,15 | Inmunoturbidimétrico | < 6,5 | < 4,3 |

*Proporcionado por el fabricante. Unidades: g/dL: proteínas totales, albúmina; mg/dL: cistatina C, creatinina, IgG, IgA, IgM; mg/L: K-CLL, L-CLL; mL/min/1,73 m²: eFG CreaCis.

los determinantes ocultos de las cadenas ligeras. El fabricante propone para sus calibradores tres trazabilidades diferentes ya que no existe un estándar internacional. Una es referida a los calibradores de Freelite; otra asignando un valor de 100 unidades arbitrarias (UA)/mL tanto a K-CLL como a L-CLL al calibrador internacional de proteínas ERM-DA470k/IFCC; y una tercera mediante la asignación de valores de K-CLL y L-CLL en mg/L al calibrador ERM-DA470k/IFCC. Los factores de conversión para pasar de Freelite (mg/L) a UA/mL son 14,62 para K-CLL y 9,41 para L-CLL, y para pasar de Freelite (mg/L) a los valores referidos al estándar ERM-DA470k/IFCC (mg/L) son 0,4275 para K-CLL y 0,1128 para L-CLL. En nuestro estudio hemos utilizado la referida a Freelite para poder comparar con otros estudios de la literatura. Se usó un solo lote de reactivos para cada prueba.

Análisis estadístico

Los RR se determinaron por el método no paramétrico de acuerdo con la guía EP28-A3C del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (13). Los percentiles 2,5 y 97,5 se usaron como límites inferior y superior. El análisis estadístico se realizó con MedCalc v.15.8 (MedCalc Software, Bélgica). Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes para las comparaciones realizadas en la validación del rango diagnóstico de K/L-CLL y las referidas a sexo y edad. Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Teniendo en cuenta que la función renal del individuo puede afectar al aclaramiento de las CLL del suero se realizó una evaluación de la estimación de la función renal mediante la fórmula CKD EPI que incluye cistatina C y creatinina. Ningún individuo padecía ERC y todas las estimaciones estuvieron por encima de 70 mL/min/1,73 m². Se evidenció una disminución de la eFG con la edad y diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,016$) entre hombres (mediana: 105,0 mL/min/1,73 m²) y mujeres (mediana: 108,5 mL/min/1,73 m²). También se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0001$) respecto al sexo para cistatina C (medianas hombres vs. mujeres: 0,79 vs. 0,72 mg/L) y creatinina (medianas hombres vs. mujeres: 0,91 vs. 0,70).

Según se muestra en el gráfico (Fig. 1), en los resultados de K/L-CLL y de la diferencia K-L-CLL no se observan grandes diferencias con la edad, sin embargo, sí se observa una leve tendencia a disminuir. Respecto del sexo, las diferencias no son estadísticamente significativas (diferencia medianas = 0,01 mg/L y 0,45 mg/L; $p = 0,84$ y $0,26$, respectivamente). Sin embargo, para K-CLL, L-CLL y la suma K+L si parece haber un aumento con la edad y diferencias estadísticamente significativas con el sexo: K-CLL (diferencia medianas = 0,7 mg/L; $p = 0,009$), L-CLL (diferencia medianas = 0,95 mg/L; $p = 0,03$), suma K+L-CLL (diferencia medianas = 1,30 mg/L; $p = 0,013$). Los resultados de CLL y su relación con la edad y el sexo se muestran en la tabla II.

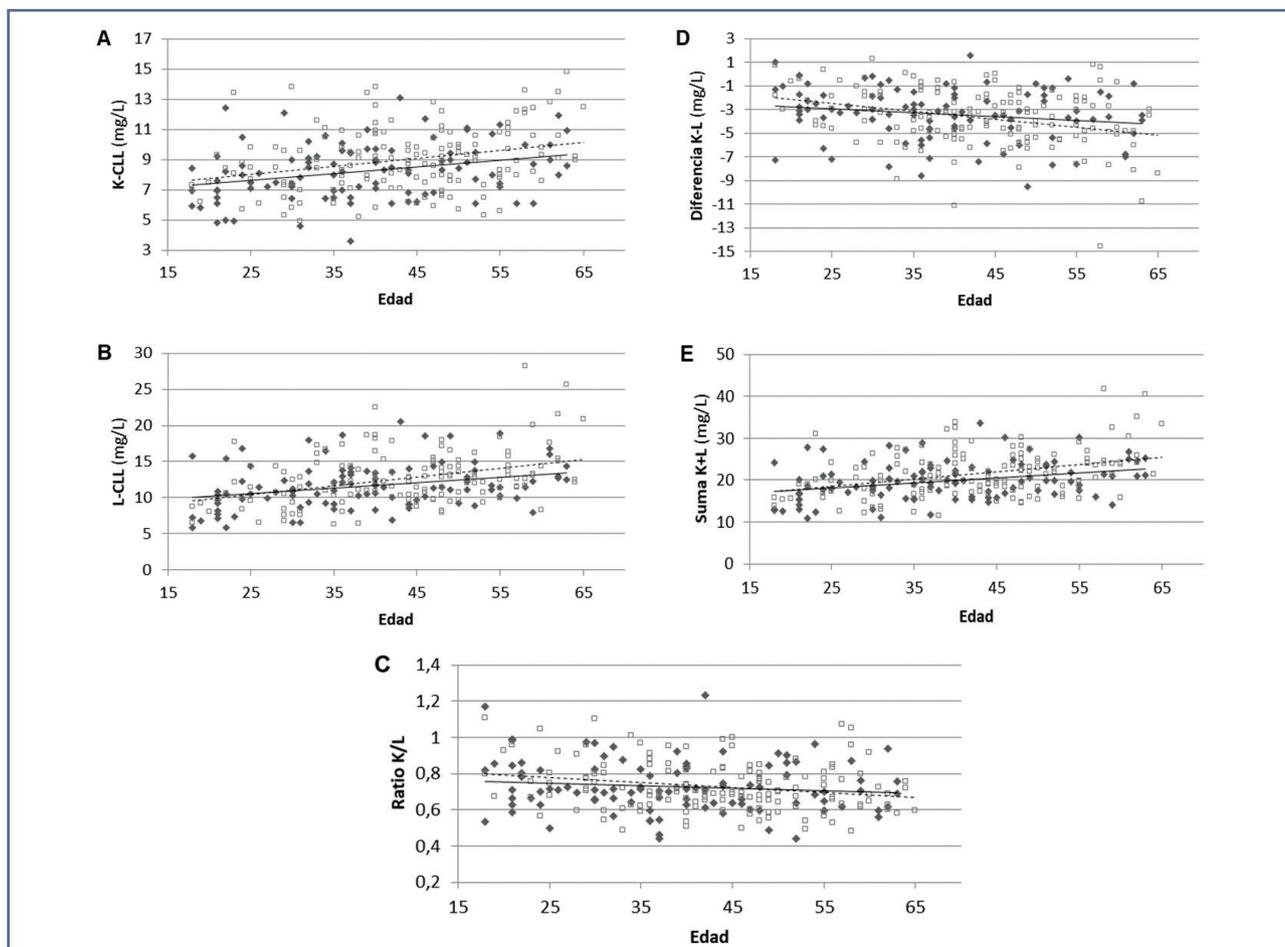


Figura 1 – Concentración de K-CLL (A), L-CLL (B), K/L-CLL (C), diferencia K-L (D) y suma K+L (E) en las 247 muestras de referencia representadas frente a la edad (años) y por sexo (K: kappa, L: lambda, CLL: cadenas ligeras libres).

◆ Mujer, □ Hombre. Línea de tendencia: — Mujer; ---- Hombre.

| Tabla II. | | | | | | |
|--|--------------|--------------|--------------|----------------------|-----------|--------|
| Valores de cadenas ligeras libres de 247 muestras de suero de donantes y su relación con la edad y el sexo | | | | | | |
| | | Media (DE) | Mediana (RI) | Percentiles 2,5-97,5 | Rango | p |
| Edad (años) | K ≤ 40 | 8,3 (2,0) | 8,1 (2,5) | 4,8-13,4 | 3,6-13,8 | 0,0023 |
| | K > 40 | 9,0 (2,0) | 8,9 (2,8) | 5,7-13,4 | 5,3-14,8 | |
| | L ≤ 40 | 11,4 (3,3) | 11,0 (4,1) | 6,3-18,7 | 5,8-22,5 | 0,0002 |
| | L > 40 | 13,0 (3,4) | 12,5 (4,1) | 8,0-21,5 | 6,9-28,2 | |
| | K/L ≤ 40 | 0,75 (0,15) | 0,71 (0,18) | 0,49-1,10 | 0,44-1,17 | 0,0284 |
| | K/L > 40 | 0,71 (0,13) | 0,69 (0,16) | 0,49-1,04 | 0,44-1,23 | |
| | Dif K-L ≤ 40 | -3,12 (2,25) | -3,0 (3,1) | -8,58-0,69 | -11,1-1,3 | 0,0034 |
| | Dif K-L > 40 | -3,96 (2,41) | -3,8 (3,1) | -9,28-0,48 | -14,6-1,6 | |
| | Sum K+L ≤ 40 | 19,7 (5,0) | 19,1 (7,0) | 11,6-32,1 | 10,8-33,9 | 0,0003 |
| | Sum K+L > 40 | 22,1 (5,1) | 21,5 (6,1) | 14,7-34,8 | 14,1-41,8 | |

(Continúa en la página siguiente)

Tabla II (Cont.)
Valores de cadenas ligeras libres de 247 muestras de suero de donantes y su relación con la edad y el sexo

| | | | | | | |
|----------------------------------|------------|-------------|-------------|-----------|-----------|--------|
| Sexo H: n = 147 M: n = 100 | K-H | 9,0 (2,1) | 8,9 (3,0) | 5,3-13,7 | 4,9-14,8 | 0,0089 |
| | K-M | 8,2 (1,8) | 8,2 (2,5) | 4,7-12,2 | 3,6-13,1 | |
| | L-H | 12,7 (3,6) | 12,2 (4,1) | 6,6-21,9 | 6,3-28,2 | 0,0279 |
| | L-M | 11,6 (3,1) | 11,2 (3,9) | 6,3-18,8 | 5,8-20,5 | |
| | K/L-H | 0,73 (0,14) | 0,70 (0,17) | 0,50-1,06 | 0,48-1,11 | 0,8425 |
| | K/L-M | 0,73 (0,15) | 0,71 (0,19) | 0,45-1,07 | 0,44-1,23 | |
| | Dif K-L-H | -3,7 (2,4) | -3,6 (3,1) | -9,5-0,6 | -14,6-1,3 | 0,2587 |
| | Dif K-L-M | -3,4 (2,2) | -3,1 (2,8) | -8,2-0,4 | -9,5-1,6 | |
| | Suma K+L-H | 21,6 (5,4) | 21,0 (6,4) | 12,6-34,3 | 11,6-41,8 | 0,0126 |
| | Suma K+L-M | 19,8 (4,6) | 19,7 (5,9) | 11,5-30,2 | 10,8-33,6 | |

Unidades: mg/L. DE: desviación estándar. RI: rango intercuartil. p: significación estadística. K: kappa CLL. L: lambda CLL. K/L: ratio kappa/lambda CLL. Dif K-L: diferencia CLL kappa-lambda. Suma K+L: suma CLL kappa+lambda. H: hombres. M: mujeres.

Se establecieron los percentiles 2,5 y 97,5 para obtener el RR sin discriminar por sexo o edad. Como en otras publicaciones, también se calculó el rango de diagnóstico de K/L-CLL que incluye al 100 % de la población de referencia. Los resultados se muestran en la tabla III. Se estableció un nuevo RR para la diferencia entre K-L-CLL de -8,6 a 0,6 mg/L (el signo menos indica que L-CLL es mayor que K-CLL) y para la suma K+L-CLL de 12,4 a 32,8 mg/L como datos adicionales que podrían ayudar en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes.

La figura 2 muestra los resultados de la validación del rango de diagnóstico obtenido para K/L-CLL (0,44-

1,23). Los valores de los sujetos estudiados con hiper e hipogammaglobulinemia estaban incluidos tanto en nuestro rango como en el propuesto por el fabricante (0,26-1,65 obtenido de la bibliografía), dado que este último es más amplio que el que proponemos en nuestro estudio. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de K-CLL y L-CLL de las muestras de los pacientes con hipergammaglobulinemia (rango: K-CLL: 6,7-56,9 mg/L; L-CLL: 9,2-66,0 mg/L) y de los pacientes con hipogammaglobulinemia (rango: K-CLL: 4,9-11,3 mg/L; L-CLL: 7,0-17,6 mg/L) respecto a los donantes de sangre (test U de Mann-Whitney $p < 0,05$ en todos los casos).

Tabla III.
Rangos de referencia de 247 muestras de suero de donantes de sangre

| | K-CLL (mg/L) | L-CLL (mg/L) | K/L-CLL | Dif K-L (mg/L) | Suma K+L (mg/L) |
|---------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------|-------------------------------|----------------------------|
| Media (DS) | 8,7 (2,0) | 12,2 (3,5) | 0,73 (0,14) | -3,5 (2,4) | 20,9 (5,17) |
| Mediana (RI) | 8,5 (2,6) | 11,7 (4,1) | 0,70 (0,18) | -3,3 (1,4) | 20,2 (6,7) |
| P 2,5 (IC 90 %) | <i>5,0</i> (4,6-5,7) | <i>6,6</i> (5,9-7,1) | 0,49 (0,44-0,53) | <i>-8,56</i> (-11,1; -7,7) | <i>12,4</i> (11,4-13,0) |
| P 97,5 (IC 90 %) | <i>13,4</i> (12,5-13,8) | <i>20,4</i> (18,5-25,6) | 1,05 (0,99-1,17) | <i>0,56</i> (-0,10 -1,3) | <i>32,8</i> (30,2-38,3) |
| Mínimo | 3,6 | 5,8 | 0,44 | -14,6 | 10,8 |
| Máximo | 14,8 | 28,2 | 1,23 | 1,6 | 41,8 |
| RR fabricante | 3,3-19,4 | 5,7-26,3 | 0,26-1,65 | | |

Los resultados en cursiva indican los límites para la interpretación de resultados. DS: desviación estándar. RI: rango intercuartil. P: percentil. IC: intervalo de confianza. K: kappa. L: lambda. CLL: cadenas ligeras libres.

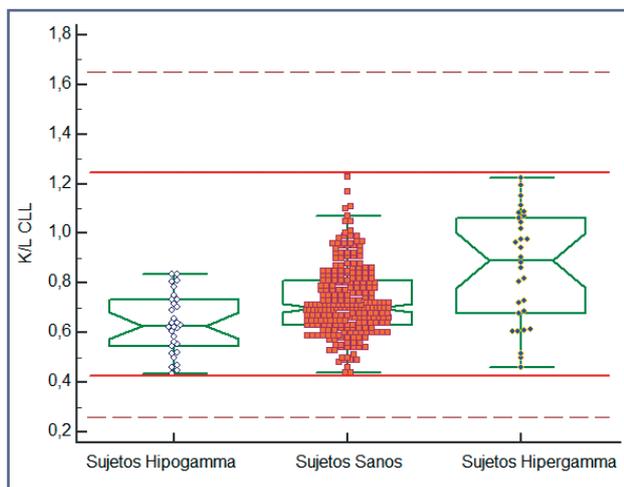


Figura 2 – Distribución de valores del cociente kappa/lambda de cadenas ligeras libres (K/L CLL) obtenidos de pacientes con hipo e hipergammaglobulinemia policlonal y donantes de sangre (línea continua: rango de diagnóstico calculado en este estudio; línea discontinua: rango de diagnóstico de la bibliografía).

DISCUSIÓN

La importancia que ha adquirido la medición de las sCLL con la inclusión en las guías del IMWG ha hecho que la industria de diagnóstico *in vitro* diseñe sus propios reactivos para diferentes plataformas. Como no existe un estándar internacional al que referenciarse, los valores que se obtienen entre las distintas tecnologías, los diferentes instrumentos e incluso con el mismo tipo de reactivos, son muy diferentes (Tabla IV).

Por eso es necesario establecer RR para cada una de esas combinaciones y para la población con la que se trabaja. El *insert* del fabricante hace alusión a los RR de la bibliografía (4), sin embargo hace un pequeño estudio y se puede comprobar que los resultados son similares en los valores centrales y tienen menos variabilidad al obtener unos rangos más estrechos. Los valores del estudio de Trimer frente a la bibliografía son: K-CLL (RR: 4,84-14,2 vs. 3,3-19,4), L-CLL (RR: 7,03-22,5 vs. 5,7-26,3) y K/L-CLL (rango diagnóstico: 0,43-1,05 vs. 0,26-1,65).

En nuestro estudio, los valores de K/L-CLL se mantienen con el incremento de la edad con una ligera tendencia descendente, mientras que en los valores de K-CLL y de L-CLL sí parece haber un pequeño aumento que podría estar causado por la disminución fisiológica del filtrado glomerular (Fig. 1). Esta misma circunstancia también se observó en el trabajo de Katzmann y cols. (4), con un aumento más acusado en edades > 60 años. Otros autores han informado de un aumento en el RR de K/L-CLL en poblaciones de edad avanzada, lo que sugería que los RR dependientes de la edad debían ser tenidos en cuenta (14,15). Otros autores no encontraron diferencias cuando compararon entre mayores y menores de 50 años (16).

Nuestros resultados indican que hay una dependencia de la edad, pero su variación cuantitativa puede considerarse clínicamente no significativa. En los gráficos de K-CLL/cistatina C y L-CLL/cistatina C, no mostrados, se observa que esa pendiente positiva disminuye considerablemente por lo que parece que ese pequeño aumento pueda ser debido a la disminución de la función renal que se produce de manera fisiológica. Cuando se compara por sexo también observamos ligeras

Tabla IV.

Rangos de referencia de diferentes ensayos de cadenas ligeras libres kappa (K-CLL, mg/L) y lambda (L-CLL, mg/L) y rangos de diagnóstico de la ratio kappa/lambda (K/L-CLL)

| | K-CLL | L-CLL | K/L CLL |
|------------------------------------|-----------|----------|-----------|
| Trimer Diagnostic (estudio) | 5,0 -13,4 | 6,6-20,4 | 0,44-1,23 |
| Trimer Diagnostic (interno Trimer) | 4,8-14,2 | 7,0-22,5 | 0,43-1,05 |
| Freelite (TBS) (2,4) (Guía IMWG) | 3,3-19,4 | 5,7-26,3 | 0,26-1,65 |
| Freelite Optilite (17) | 7,2-27,5 | 5,7-21,5 | 0,40-2,58 |
| Freelite SPA Plus (17) | 5,5-24,7 | 4,9-18,7 | 0,36-2,07 |
| Freelite Immage (17) | 5,8-17,4 | 7,4-24,5 | 0,20-1,26 |
| Freelite Cobas (17) | 8,1-29,8 | 8,6-19,9 | 0,50-2,43 |
| N Latex FLC (8) | 6,7-22,4 | 8,3-27,0 | 0,31-1,56 |
| Sebia FLC (10) | 5,2-15,3 | 8,2-18,1 | 0,37-1,44 |
| Diazyme (9) | 2,4-20,7 | 4,2-27,7 | 0,22-1,74 |
| Seralite (5-95 %) (11) | 5,2-22,7 | 4,0-25,1 | 0,48-2,49 |

diferencias y, aunque algunas son estadísticamente significativas, cuantitativamente no tienen gran trascendencia clínica. Dado que las diferencias observadas en sexo y edad no se consideran clínicamente relevantes, hemos considerado obtener un único RR, al igual que otros autores, aunque debe tenerse en cuenta esta tendencia con la edad.

En un estudio llevado a cabo por Cotten y cols. (17) en el que utilizaban reactivos Freelite en diferentes plataformas, los resultados del nefelómetro Immage (Beckman Coulter) fueron aceptables con respecto a los rangos publicados por Katzmann, sin embargo, los medidos en turbidímetros como Optilite (TBS), SPA Plus (TBS) o Cobas 6000 c601 (Roche Diagnostic) fueron significativamente más altos. Esto da una idea de la variabilidad de los resultados en función de los reactivos y la tecnología empleada (Tabla IV). En otros estudios de comparación se han detectado importantes diferencias llegando a la conclusión de que los resultados no son transferibles entre distintas plataformas.

Se han publicado estudios que utilizaban reactivos Freelite en los nefelómetros de Siemens Healtheneers (8) y Beckman Coulter (17) en los que los autores observan una alta concordancia clínica, aunque se encontraron importantes discrepancias en algunos resultados. Sin embargo, otros autores que compararon el mismo reactivo en estos nefelómetros han considerado que la concordancia no era aceptable (18,19).

Muchos de los estudios de comparación entre reactivos que utilizan anticuerpos policlonales (Freelite CLL, TBS) y reactivos que utilizan anticuerpos monoclonales (N Latex CLL, Siemens Healtheneers) detectan grandes diferencias en las comparaciones. Esto hace que los resultados no sean intercambiables y que se clasifiquen incorrectamente las muestras como patológicas y no patológicas. Las causas pueden ser la diferente composición de los reactivos y que la medición de Freelite se realiza en turbidímetros como Optilite o SPA Plus (6,7) u otras plataformas (20) y asumen que los RR para Freelite CLL son los obtenidos por Katzmann por nefelometría. Como queda patente en nuestro estudio y en la bibliografía, los RR tienen unas diferencias tan importantes que se podría pensar que las conclusiones de esos estudios podrían no ser correctas.

Una consideración importante en el diagnóstico, en la evaluación de la respuesta y de la remisión, y en el pronóstico de los pacientes con gammopatías monoclonales es la precisión de los RR de K-CLL, L-CLL, K/L-CLL y diferencia K-L para asegurar una interpretación clínicamente útil de los resultados de las pruebas. La adopción de los RR de CLL del fabricante y de la guía del IMWG, independientemente del tipo de plataforma del instrumento, podría sugerir que los RR de CLL son universales. Sin embargo, los reactivos para la medición de CLL están disponibles comercialmente en más de 10 plataformas y el efecto de la variabilidad entre instrumentos con diferente tecnología

debe ser tenido en cuenta. En el caso de la utilización del reactivo de Trimer Diagnostic un K/L-CLL entre 1,23-1,65 o entre 0,26-0,43 sería indicativo de proliferación monoclonal y, sin embargo, si utilizamos los valores de la guía IMWG serían totalmente normales (Tabla IV).

El hecho de que la guía del IMWG indicara unos RR concretos sin advertir de que no eran transferibles a otras plataformas ha generado confusión y pueden estar utilizando RR erróneos. Ni la ratio K/L CLL de 0,26-1,65, ni el de $i/u\text{-CLL} \geq 100$ o la concentración de la CLL involucrada > 100 mg/L serían valores correctos para la clasificación de los pacientes si no se usan los reactivos y el analizador empleado por Katzmann (18). Estudios publicados recientemente mostraron que los umbrales de diagnóstico para $i/u\text{-CLL} \geq 100$ propuestos para Freelite no se aplican a N Latex FLC y Sebia FLC. Se propusieron nuevos umbrales para N Latex FLC ≥ 30 (21) o ≥ 50 (22) y para Sebia FLC ≥ 16 (23) o ≥ 20 (22). La consecuencia clínica es que estos pacientes pueden o no cumplir con los criterios de MM que requieren terapia dependiendo del tipo de reactivo y la tecnología utilizada.

Como contribución original nosotros proponemos un nuevo RR para la diferencia K-L-CLL de -8,6 a 0,6 mg/L. En general, K/L-CLL se usa para el diagnóstico y seguimiento de gammopatías monoclonales y K-L-CLL es útil en la práctica clínica diaria porque, en las gammopatías monoclonales, además del aumento de la CLL involucrada, se suprime la no involucrada, y de esta diferencia no existen valores de referencia. Algunos autores han descrito otras utilidades de este parámetro, como la predicción de eventos tromboembólicos en pacientes con amiloidosis AL (24) o la distinción entre mieloma y no mieloma en pacientes con lesión renal aguda (25). Campbell y cols. (11) proporcionó un RR de K-L-CLL para la prueba Seralite y evaluó su comportamiento en pacientes con mieloma múltiple. El rango de diferencia K-L podría ayudar en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes y debe evaluarse en estudios posteriores.

La inmunodeficiencia común variable (IDCV) tiene una alta variabilidad clínica y heterogeneidad inmunológica. Varios investigadores han propuesto combinaciones de biomarcadores clínicos e inmunológicos para mejorar el diagnóstico y proporcionar estrategias de seguimiento y tratamiento que puedan mejorar el pronóstico de cada paciente. Un biomarcador propuesto recientemente para el diagnóstico de IDCV es la cuantificación de sCLL (26-28). Guevara-Hoyer y cols. (29) han sugerido la suma de K+L-CLL como un biomarcador combinado práctico del diagnóstico de IDCV y otras aplicaciones potenciales para su seguimiento y pronóstico. Han obtenido un punto de corte para discriminar entre IDCV y otras inmunodeficiencias. La mayoría de los pacientes con IDCV presentan sCLL bajos o indetectables en comparación con inmunodeficiencias primarias o secundarias. Proponemos un nuevo RR que no ha

sido definido hasta el momento para la suma de K+L-CLL de 12,4-32,8 mg/L con los reactivos de Trimer Diagnostic.

En la validación del rango de diagnóstico K/L-CLL obtenido con muestras con hipogammaglobulinemia policlonal e hipergammaglobulinemia policlonal todos los valores estaban dentro del nuevo RR, lo que confirma la validez del nuevo rango. Como era de esperar, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) entre las concentraciones de K-CLL y L-CLL de las muestras de estos pacientes y las de los donantes de sangre.

Entre los factores que pueden influir en la obtención de resultados diferentes en los distintos estudios podemos encontrar variables pre- y post-analíticas como el número de sujetos evaluados en el estudio, los criterios de inclusión y exclusión, la utilización de uno o varios lotes de reactivos, el análisis estadístico realizado (eliminación de outliers, método basado en distribución normal, método no paramétrico CLSI EP28-A3C o la utilización del método robusto).

Este estudio tiene fortalezas como los criterios de inclusión y exclusión que han hecho que los RR sean más estrechos que otros publicados (4,17,20). Como limitaciones podemos considerar el rango de edad hasta los 65 años, si bien algunos autores solo detectaron diferencias significativas a partir de 80 años (4,14,15); y también la utilización de un único lote de reactivos. En numerosas ocasiones se ha citado la falta de consistencia entre lotes de reactivos policlonales como Freelite (16,30) y esto puede ser causa de una alta variabilidad en los resultados y unos RR más amplios, sobre todo en el límite superior.

CONCLUSIONES

En este estudio presentamos RR de sCLL para reactivos de Trimer Diagnostics medidos por turbidimetría en un AU5800 de Beckman Coulter. Estos rangos son diferentes a los proporcionados por el fabricante, que son los indicados en las guías IMWG, utilizados en la mayoría de estudios publicados, lo que consideramos ha podido suponer una clasificación errónea de los pacientes.

Como contribución original se proponen RR para K-L-CLL y K+L-CLL que no han sido descritos previamente para este reactivo. La utilidad de estos RR debe investigarse en futuros estudios.

Debido a las diferencias entre reactivos monoclonales y policlonales y las distintas plataformas con diferente tecnología que se utilizan para medir las sCLL, la variabilidad en los rangos es elevada y no pueden existir unos RR ni puntos de corte únicos y universales. Por esa razón, es necesario disponer de un estándar internacional para minimizar las diferencias.

Los fabricantes y los laboratorios clínicos deben esforzarse para proporcionar unos RR para la tecnología que están utilizando y para su población.

BIBLIOGRAFÍA

1. Tosi P, Tomassetti S, Merli A, Polli V. Serum free light-chain assay for the detection and monitoring of multiple myeloma and related conditions. *Ther Adv Hematol* 2013;4(1):37-41. DOI: 10.1177/2040620712466863
2. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos M-V, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2014;15(12):e538-548. DOI: 10.1016/S1470-2045(14)70442-5
3. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, Durie B, Landgren O, Moreau P, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2016;17(8):e328-46.
4. Katzmann JA, Clark RJ, Abraham RS, Bryant S, Lymp JF, Bradwell AR, et al. Serum reference intervals and diagnostic ranges for free kappa and free lambda immunoglobulin light chains: relative sensitivity for detection of monoclonal light chains. *Clin Chem* 2002;48(9):1437-44. DOI: 10.1093/clinchem/48.9.1437
5. Kim H-S, Kim HS, Shin K-S, Song W, Kim HJ, Kim HS, et al. Clinical comparisons of two free light chain assays to immunofixation electrophoresis for detecting monoclonal gammopathy. *BioMed Res Int* 2014;2014:647238.
6. Maisin D, Lepoutre T, Gruson D, Wallemacq P. Quantification of serum free light chain kappa and lambda by the SPAPLUS analyser. *Clin Biochem* 2013;46(7-8):622-6. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2012.12.015
7. White-Al Habeeb MMA, Earle T, Spencer M, Blasutig IM. Evaluation of the N-latex serum free light chain assay on the Siemens BNII analyzer and agreement with The Binding Site FreeLite assay on the SPAPLUS. *Clin Biochem* 2018;51:90-6. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2017.05.009
8. Velthuis H, Knop I, Stam P, van den Broek M, Bos HK, Hol S, 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(8):1323-32.
9. Smith A, Wu AHB. Analytical and clinical concordance of free light chain assay. *Pract Lab Med* 2019;13:e00112. DOI: 10.1016/j.plabm.2018.e00112
10. Jacobs JFM, de Kat Angelino CM, Brouwers HMLM, Croockewit SA, Joosten I, van der Molen RG. Evaluation of a new free light chain ELISA assay: bringing coherence with electrophoretic methods. *Clin Chem Lab Med* 2018;56(2):312-22. DOI: 10.1515/cclm-2017-0339
11. Campbell JP, Heaney JLJ, Shemar M, Baldwin D, Griffin AE, Oldridge E, et al. Development of a rapid and quantitative lateral flow assay for the simultaneous measurement of serum κ and λ immunoglobulin free light chains (FLC): inception of a new near-patient FLC screening tool. *Clin Chem Lab Med* 2017;55(3):424-34. DOI: 10.1515/cclm-2016-0194
12. Inker LA, Schmid CH, Tighiouart H, Eckfeldt JH, Feldman HI, Greene T, et al. Estimating glomerular filtration rate from serum creatinine and cystatin C. *N Engl J Med* 2012;367(1):20-9. DOI: 10.1056/NEJMoa1114248
13. Clinical and Laboratory Standards Institute. Defining, establishing and verifying reference intervals in the clinical laboratory: approved guideline EP28-A3C. 3rd ed. Vol. 28. CLSI; 2010.
14. Hernandez JM, Muñoz H, Jimenez-Cobaleda MJ, Quiñez JA, Latorre M, de la Hoz B, et al. Normal ranges and reference intervals of serum free light chains values are higher in elderly people: study in a Spanish urban population. *Haematologica* 2011;96:0863a.
15. Machalkova K, Vavrova J, Maisnar V, Radocha J, Tichy M. Age dependency of reference values of immunoglobulin heavy/light chain pairs and free light chains serum levels. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2013;13:P-418a.
16. Altinier S, Seguso M, Zaninotto M, Varagnolo M, Adami F, Angeli P, et al. Serum free light chain reference values: a critical approach. *Clin Biochem* 2013;46(7-8):691-3. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2013.01.014

17. Cotten SW, Shajani-Yi Z, Cervinski MA, Voorhees T, Tuchman SA, Korpi-Steiner N. Reference intervals and diagnostic ranges for serum free κ and free λ immunoglobulin light chains vary by instrument platform: Implications for classification of patient results in a multi-center study. *Clin Biochem* 2018;58:100-7. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2018.06.003
18. Lock RJ, Saleem R, Roberts EG, Wallage MJ, Pesce TJ, Rowbottom A, et al. A multicentre study comparing two methods for serum free light chain analysis. *Ann Clin Biochem* 2013;50(Pt 3):255-61. DOI: 10.1177/0004563212473447
19. Yang Y, Han X, Zheng G, Cai Z. Comparison of two serum free light chain assays for the diagnosis of primary plasma cell malignant proliferative disease. *Health Sci Rep* 2019;2(4):e113. DOI: 10.1002/hsr2.113
20. Mohammed N, Chandran PA, Kandregula M, Mattaparthi RD, Gundeti S, Volturi J, et al. Robust reference intervals for serum kappa and lambda free light chains from a multicentre study population from Hyderabad, India: myeloma diagnostic implications. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP* 2016;17(5):2605-10.
21. Bossuyt X, Delforge M, Reynders M, Dillaerts D, Sprangers B, Fostier K, et al. Diagnostic thresholds for free light chains in multiple myeloma depend on the assay used. *Leukemia* 2018;32(8):1815-8. DOI: 10.1038/s41375-018-0041-0
22. Schieferdecker A, Hörber S, Ums M, Besemer B, Bokemeyer C, Peter A, et al. Comparison of three different serum-free light-chain assays-implications on diagnostic and therapeutic monitoring of multiple myeloma. *Blood Cancer J* 2020;10(1):2. DOI: 10.1038/s41408-019-0267-8
23. Caillon H, Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, Decaux O, Dejoie T. Comparison of Sebia free light chain assay with Freelite assay for the clinical management of diagnosis, response, and relapse assessment in multiple myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2019;19(5):e228-37. DOI: 10.1016/j.clml.2019.01.007
24. Park H, Kim J-W, Youk J, Koh Y, Lee J-O, Kim KH, et al. Serum free light chain difference and β 2 microglobulin levels are risk factors for thromboembolic events in patients with AL amyloidosis. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2018;18(6):408-14. DOI: 10.1016/j.clml.2018.03.005
25. Heaney JLJ, Campbell JP, Yadav P, Griffin AE, Shemar M, Pinney JH, et al. Multiple myeloma can be accurately diagnosed in acute kidney injury patients using a rapid serum free light chain test. *BMC Nephrol* 2017;18(1):247. DOI: 10.1186/s12882-017-0661-z
26. Compagno N, Cinetto F, Boscaro E, Semenzato G, Agostini C. Serum free light chains in the differential diagnosis and prognosis of primary and secondary hypogammaglobulinemia. *J Allergy Clin Immunol* 2015;135(4):1075-1077.e6. DOI: 10.1016/j.jaci.2014.10.003
27. Scarpa R, Pulvirenti F, Pecoraro A, Vultaggio A, Marasco C, Ria R, et al. Serum free light chains in common variable immunodeficiency disorders: role in differential diagnosis and association with clinical phenotype. *Front Immunol* 2020;11:319. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00319
28. Hanitsch LG, Sotzny F, Volk H-D, Scheibenbogen C, Witke K. Serum free light chains in CVID -a marker for differential diagnosis. *J Clin Immunol* 2018;38(2):163-5. DOI: 10.1007/s10875-018-0478-y
29. Guevara-Hoyer K, Ochoa-Grullón J, Fernández-Arquero M, Cárdenas M, Pérez de Diego R, Sánchez-Ramón S. Serum free immunoglobulins light chains: a common feature of common variable immunodeficiency? *Front Immunol* 2020;11:2004. DOI: 10.3389/fimmu.2020.02004
30. Tate JR, Mollee P, Dimeski G, Carter AC, Gill D. Analytical performance of serum free light-chain assay during monitoring of patients with monoclonal light-chain diseases. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem* 2007;376(1-2):30-6. DOI: 10.1016/j.cca.2006.07.011