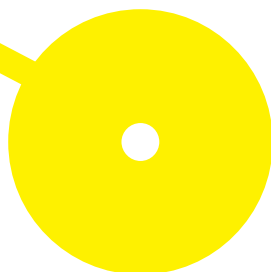




# Abordagem laboratorial no diagnóstico e *follow-up* de gamopatias monoclonais – uma comparação de métodos

Ana Isabel Nogueira Pereira

09/2023



**P. PORTO**

**ESCOLA  
SUPERIOR  
DE SAÚDE**



**Abordagem laboratorial no diagnóstico e *follow-up* de gamopatias monoclonais – uma  
comparação de métodos**

**Autor**

Ana Isabel Nogueira Pereira

**Orientadores**

Dr<sup>a</sup> Maria Calle, Serviço de Patologia Clínica, CHTS  
Prof<sup>a</sup> Doutora Mónica Vieira, ESS

Relatório de Estágio apresentado para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em **Bioquímica em Saúde** – Ramo de Especialização em **Bioquímica Aplicada** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

## Agradecimentos

Aos meus pais e irmã pela compreensão e apoio demonstrados, não só nos últimos dois anos, mas desde sempre.

Ao meu namorado pela paciência e carinho nos momentos mais ansiosos deste percurso.

Aos técnicos do Serviço de Patologia Clínica pela complacência, permitindo horários compatíveis com a frequência de aulas e aos mais próximos pelo encorajamento ao longo de todo o percurso.

Às minhas orientadoras pelo apoio prestado ao longo deste trabalho.

Aos Patologistas do Serviço de Patologia Clínica por tornarem possível este estudo comparativo e pela ajuda na obtenção e registo dos dados.

À Bárbara pela partilha de viagens, que tornava, inacreditavelmente, o caminho para a faculdade após uma noite de trabalho aprazível. Por nunca deixar de me responder às incontáveis chamadas e mensagens de *whatsapp* com dúvidas e desabafos (não só universitários e profissionais) e por não me deixar desistir, porque não fosse o companheirismo e amizade dela e isto não estaria completo.

À Raquel pela busca exaustiva de erros ortográficos e incoerências neste trabalho, pelas críticas, pelos lembretes quase diários que estava quase a conseguir e pelo apoio.

À Liliana pela constante pressão, e que tão necessária foi, para que sempre tentasse mais sem me deixar procrastinar.

Realizar um mestrado enquanto trabalhador-estudante não é fácil, por isso, a todos os que se envolveram neste caminho e o tornaram melhor, obrigada.

## **Resumo**

As discrasias de plasmócitos constituem um grupo de desordens malignas e pré-malignas caracterizadas pela produção de proteínas monoclonais, chamadas M-Proteína. A sua concentração pode variar de algumas mg/L de cadeias leves livres (CLL) no soro a g/L de imunoglobulinas monoclonais completas.

O doseamento de CLL em circulação é essencial no diagnóstico, prognóstico e avaliação da resposta aos tratamentos.

O desenvolvimento de novos métodos de quantificação de CLL tornou-se especialmente interessante porque representa o marcador tumoral de eleição diretamente relacionado com a fisiopatologia da doença.

O primeiro método de doseamento foi desenvolvido em 2001 e caracterizou-se por um ensaio baseado em nefelometria ou turbidimetria usando anticorpos policlonais. Posteriormente surgiu um novo método utilizando anticorpos monoclonais e com ele a necessidade de comparar os dois métodos, as suas limitações e utilidades no diagnóstico laboratorial.

A análise de dados mostra que o Atellica NEPH 630 obtém resultados mais concordantes para CLL Kappa (comparado com o método de referência) enquanto para CLL Lambda o equipamento DxC 700 AU obtém maior concordância.

**Palavras-chave:** Imunoglobulinas; Cadeias leves livres; Nefelometria; Turbidimetria; Anticorpos.

## **Abstract**

Plasma cell dyscrasias consist in a group of malignant and pre-malignant disorders characterized by the production of monoclonal proteins called M-Protein whose concentration may vary from a few mg/L of free light chains (FLC) to g/L of complete monoclonal immunoglobulins in serum. The measurement of circulating FLC is essential for diagnostic, prognostic and evaluation of treatment response.

The development of new quantification methods of FLC has become specially interesting because FLC represents the tumor marker of choice directly connected with the physiopathology. A nephelometric or turbidimetric method was first developed in 2001 using polyclonal antibodies, and it has been widely used. Later on, new methods using monoclonal antibodies came to light and with it the need to compare its limitations and utilities in the laboratory diagnosis.

After analysing the data of CLL dosing, it appears that *Atellica NEPH 630* has more consistent results in the dosage of CLL Kappa and *DxC 700 AU* in the dosage of CLL Lambda.

**Keywords:** Immunoglobulins; Free light chains; Nephelometry; Turbidimetry; Antibodies.

## Índice

Lista de Abreviaturas.....	VI
Índice de Tabelas.....	II
Índice de Figuras.....	III
Organização do Relatório.....	V
<b>1. Capítulo I: Estágio .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Instituição.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Laboratório de Imunologia.....</b>	<b>1</b>
<b>1.3. Metodologias de diagnóstico.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Capítulo II: Estudo de Caso.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Contextualização .....</b>	<b>2</b>
<b>2.2. Epidemiologia.....</b>	<b>3</b>
<b>2.3. Etiologia .....</b>	<b>3</b>
<b>2.4. Diagnóstico.....</b>	<b>4</b>
<b>2.5. Tratamento.....</b>	<b>5</b>
<b>3. Relevância do estudo.....</b>	<b>5</b>
<b>4. Material e Métodos .....</b>	<b>6</b>
<b>4.1. Análise Estatística .....</b>	<b>7</b>
<b>5. Resultados e discussão.....</b>	<b>7</b>
<b>5.1. Resultados CLL tipo Kappa.....</b>	<b>7</b>
<b>5.2. Resultados CLL tipo Lambda.....</b>	<b>14</b>
<b>6. Conclusão.....</b>	<b>20</b>
Referências Bibliográficas.....	21
Anexos.....	22

## Lista de Abreviaturas

CHTS	Centro Hospitalar do Tâmega e Sousa
CLL	Cadeias Leves Livres
MM	Mieloma Múltiplo, do inglês <i>Multiple Myeloma</i>
MGUS	Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado, do inglês <i>Monoclonal Gamopathy of undetermined significance</i>
SM	Mieloma Múltiplo Indolente, do inglês <i>Smoldering Myeloma</i>
κ	Kappa
λ	Lambda
CRAB	Cálcio elevado, Falência Renal, Anemia, Lesões ósseas do inglês <i>Calcium elevation, Renal failure, Anemia, Bone disease</i>
ISS	<i>International Staging System</i>
B2M	Beta 2 microalbumina
LDH	Lactato Desidogenase
TSDT	Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>

## Índice de Tabelas

Tabela 1 Dados obtidos nos métodos de comparação para doseamento de CLL Kappa.....13

Tabela 2 Dados obtidos nos métodos de comparação para doseamento de CLL Lambda.....18

## Índice de Figuras

Figura 1 Ilustração comparativa dos métodos turbidimetria e nefelometria .....	2
Figura 2 Fluxograma pré-analítico.....	6
Figura 3 Gráfico de correlação linear com valor de $R^2$ para comparação de CLL Kappa entre os equipamentos BN II e DxC 700 AU.....	8
Figura 4 Gráfico de correlação linear com valor de $R^2$ para comparação de CLL Kappa entre os equipamentos BN II e Atellica NEPH 630.....	8
Figura 5 Gráfico de regressão Passing e Bablok com equação de reta de regressão para comparação de CLL Kappa entre os equipamentos BN II e DxC 700 AU.....	9
Figura 6 Gráfico residual com representação de outlier destacado em um quadrado laranja para o equipamento DxC 700 AU.....	9
Figura 7 Gráfico de regressão Passing e Bablok com equação de reta de regressão para comparação de CLL Kappa entre os equipamentos BN II e Atellica NEPH 630.....	10
Figura 8 Gráfico residual com representação de outlier destacado em um quadrado laranja para o equipamento Atellica NEPH 630.....	10
Figura 9 Gráfico de Bland-Altman para comparação de CLL Kappa entre os equipamentos BN II e DxC 700 AU.....	11
Figura 10 Gráfico de Bland-Altman para comparação de CLL Kappa entre os equipamentos BN II e Atellica NEPH 630.....	11
Figura 11 Histogramas em árvore comparativos para equipamentos DxC 700 AU (linha azul) e Atellica NEPH 630 (linha verde) .....	12
Figura 12 Gráfico de correlação linear com valor de $R^2$ para comparação de CLL Lambda entre os equipamentos BN II e DxC 700 AU.....	14
Figura 13 Gráfico de correlação linear com valor de $R^2$ para comparação de CLL Lambda entre os equipamentos BN II e Atellica NEPH 630.....	14
Figura 14 Gráfico de regressão Passing e Bablok com equação de reta de regressão para comparação de CLL Lambda entre os equipamentos BN II e DxC 700 AU.....	15
Figura 15 Gráfico residual com representação de 2 outliers destacados em um quadrado laranja para o equipamento DxC 700 AU.....	15
Figura 16 Gráfico de regressão Passing e Bablok com equação de reta de regressão para comparação de CLL Lambda entre os equipamentos BN II e Atellica NEPH 630 .....	16

Figura 17 Gráfico residual com representação de outlier destacado em um quadrado laranja para o equipamento Atellica NEPH 630.....	16
Figura 18 Gráfico de Bland-Altman para comparação de CLL Lambda entre os equipamentos BN II e DxC NEPH 630.....	17
Figura 19 Gráfico de Bland-Altman para comparação de CLL Lambda entre os equipamentos BN II e Atellica NEPH 630.....	17
Figura 20 Histograma em árvore comparativos para equipamentos DxC 700 AU (linha azul) e Atellica NEPH 630 (linha verde).....	18

## **Organização do Relatório**

O presente relatório aborda o estágio curricular realizado no âmbito do Mestrado de Bioquímica em Saúde, ramo da Bioquímica Aplicada e o estudo de caso “Abordagem Laboratorial no diagnóstico e *follow-up* de gamapatias monoclonais: uma comparação de métodos” no Centro Hospitalar Tâmega e Sousa, no Hospital Padre Américo.

**Capítulo I**, contextualização e objetivos do estágio e metodologias desenvolvidas no laboratório.

**Capítulo II**, estudo de caso com contextualização do tema, metodologias, resultados e a sua análise estatística, discussão e conclusão.

## **1. Capítulo I: Estágio**

### **1.1. Instituição**

Oficialmente criado em 2007, o Centro Hospitalar do Tâmega e Sousa (CHTS) conta com duas unidades hospitalares. A Unidade Padre Américo localizada na cidade de Penafiel que constitui a sede do Centro Hospitalar e a Unidade de São Gonçalo, localizada em Amarante.

Responsável pela prestação de cuidados de saúde a uma população superior a 500 mil habitantes distribuídos pelos doze municípios da zona envolvente, este torna-se um dos hospitais a nível nacional cujo crescimento é primordial. A necessidade intrínseca de prestação de cuidados cada vez mais especializados à população conduz à constante avaliação e implementação de técnicas de diagnóstico que permitam aos clínicos uma avaliação rápida e um complemento ao diagnóstico precoce.

### **1.2. Laboratório de Imunologia**

O laboratório de Imunologia constitui um dos elementos essenciais na avaliação e acompanhamento de doentes provenientes, maioritariamente, da consulta. O sistema imunitário de cada indivíduo é constituído por células e tecidos especializados no combate a elementos estranhos que possam tornar-se uma ameaça ao bom funcionamento do organismo.

Com a constante ameaça externa a homeostasia torna-se um processo muito complexo e a desregulação de algum destes processos pode levar a hipersensibilidade e doenças de foro alérgico ou autoimune.

No presente laboratório são realizadas variadas técnicas que permitam o diagnóstico de doenças que surjam devido a uma insuficiente, exacerbada ou inadaptada resposta imunitária.

Como consequência do crescente número de análises enviadas para o exterior de Cadeias Livres (CLL) tornou-se uma preocupação para o Laboratório a implementação da técnica de doseamento destes componentes para além de uma redução de custos e um melhoramento da resposta ao clínico no diagnóstico de Mieloma Múltiplo.

### **1.3. Metodologias de diagnóstico**

No presente estudo serão utilizados dois métodos de diagnóstico, a turbidimetria e a nefelometria aplicadas à imunologia utilizando anticorpos monoclonais e policlonais.

Estes são os métodos mais utilizados, sendo a nefelometria o método de diagnóstico preferencial devido à maior capacidade de subtração ao resultado de possíveis interferências como lipemia e hemólise.

Estes métodos baseiam-se na formação de complexos insolúveis antígeno-anticorpo que precipitam e dispersam radiação quando um feixe de luz intensa incide na amostra. O nefelómetro mede a intensidade da luz dispersa através de um fotodetector colocado a 90° em relação à luz incidente enquanto a turbidimetria baseia-se nos mesmos parâmetros, no entanto mede a absorvância através da luz transmitida através da amostra. (1)

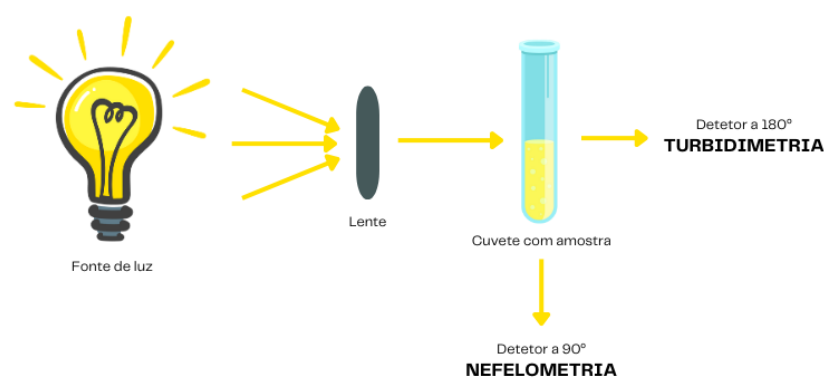


Figura 1 Ilustração comparativa dos métodos turbidimetria e nefelometria

## 2. Capítulo II: Estudo de Caso

### 2.1. Contextualização

As discrasias de plasmócitos consistem num grupo de desordens pré-malignas e malignas caracterizadas pela produção de proteínas monoclonais chamadas de M-proteínas, das quais faz parte o Mieloma Múltiplo (MM). (2)

Presentes na medula óssea estão um grupo de células essenciais na manutenção da imunidade humoral, os chamados plasmócitos. Os plasmócitos são células B maduras produtoras de anticorpos cuja proliferação monoclonal resulta em uma produção de anticorpos monoclonais e consequentes danos. (3)

Esta desordem é precedida por uma gamapatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS) que constitui um estado assintomático de pré-malignidade (4) caracterizado por uma produção

de M-Proteína abaixo dos 1,5g/dL ou por um Mieloma Múltiplo Indolente (SM), sem manifestações clínicas, mas com altos níveis de anticorpos. (3)

Clinicamente, a acumulação de anticorpos monoclonais pode conduzir a comorbilidades como danos na medula óssea ou danos renais, desregulação de níveis de cálcio compressão da medula espinal, entre outros. (5)

Cada anticorpo, em forma de Y, é formado por quatro cadeias polipeptídicas, duas pesadas e duas leves. Baseadas nas diferenças da cadeia pesada que é formada surgiram cinco classes de anticorpos IgA, IgM, IgG, IgE, IgD e durante a sua produção um excesso de cadeias leves kappa ( $\kappa$ ) e Lambda ( $\lambda$ ) é produzido e libertado na corrente sanguínea como CLL.(6) Estes tipos de cadeias leves diferem entre si na sequência das suas regiões contantes e a presença como CLL no soro está presente em uma proporção de 0,26 para 1,65 (Kappa-Lambda) (7). Embora a produção de Kappa seja sensivelmente o dobro da produção de Lambda, devido à forma monomérica de Kappa a sua filtração glomerular é mais rápida que CLL Lambda.(6) Em pacientes com gamapatias monoclonais produtoras de CLL Lambda a razão está diminuída e em pacientes com gamapatias monoclonais produtoras Kappa a razão está aumentada. (7)

## **2.2. Epidemiologia**

Com uma taxa de incidência de cerca de 7/100 000, Mieloma Múltiplo tornou-se a 14ª causa neoplásica mais comum no mundo. (3)

Considerada uma doença relacionada com a idade, a média de diagnóstico é 74 anos em mulheres e 71 anos em homens, colocando o diagnóstico abaixo dos 45 anos de idade em 2% dos diagnósticos reportados. (8)

Em 2018, o número de casos de MM estimado chegou aos 160 000 casos, com 70 000 desses do sexo feminino e 90 000 masculino. Esta taxa torna a doença 1.5x mais provável em homens que em mulheres. (3)

## **2.3. Etiologia**

A etiologia do MM é ainda fracamente conhecida, mas alguns fatores de risco incluem idade, género, raça, estilo de vida e mutações genéticas.

Na ausência de outros fatores de risco, a maior percentagem de mortes em pessoas acima de 65 anos pode estar relacionada com a acumulação de mutações resultantes das últimas décadas da sua vida.

As diferenças relacionadas com o género podem estar associadas com comportamentos de saúde de risco como consumo de álcool e tabagismo. A etnicidade é também relacionada com o MM, sendo os afro americanos com maior risco de desenvolver esta condição. (3)

Anomalias cromossómicas envolvendo troca na região da cadeia pesada da imunoglobulina foram identificadas. Esta região, localizada no braço longo do cromossoma 14, aumenta o risco, mas a sua existência, apenas, não parece ser suficiente para o desenvolvimento da doença. (5) A presença das mutações t(14;20), t(14;16), gain(1q) e del(17p) refletem um risco maior de desenvolvimento da doença. A presença da mutação t(4;14), encontrada em 15% dos pacientes, leva a uma desregulação da expressão do fator de crescimento de fibroblastos resultando em um quadro de pior prognóstico. (9)

#### **2.4. Diagnóstico**

Para o diagnóstico de MM é necessário que o exame à medula óssea apresente 10% ou mais de plasmócitos em associação com os chamados eventos característicos de MM incluídos nas características CRAB.(10)

A sigla CRAB inclui evidências de danos em órgãos relacionadas com a proliferação excessiva, como hipercalcemia, insuficiência renal, anemia e lesão óssea.(9)

Quando suspeito, é necessário procurar componentes monoclonais secretados pela neoplasia através de análise ao sangue e à urina. Vários métodos são utilizados para caracterização da doença como quantificação de imunoglobulinas, normalmente IgA, IgM, e IgG, caracterização do tipo de cadeias leves e pesadas por imunofixação e a quantificação de cadeias leves livres no soro. Além disso, é necessária a realização de hemograma para avaliação de anemia, doseamento de creatinina e níveis de cálcio para avaliação de insuficiência renal e possível hipercalcemia. (11)

Lesões ósseas podem ser diagnosticadas através de radiografias, tomografias computadorizadas ou tomografias por emissão de positrões.(12)

##### **Prognóstico**

O *International Staging System (ISS)*, sistema responsável pela classificação do estadió da doença e consequente avaliação de prognóstico, classifica os casos em três grupos: estadió I – Beta 2 Microglobulina (B2M) abaixo de 3.5 mg/L e albumina superior a 3.5 mg/dL, estadió III – B, stage III – B2M acima de 5.5 mg/L e estadió II para todos os intermédios. O ISS revisto acrescenta os níveis de lactato desidrogenase (LDH) como informação para prognóstico.(3)

## **2.5. Tratamento**

A cura para o Mieloma Múltiplo não foi ainda descoberta e o tratamento vai depender de vários fatores como as comorbidades.

Há várias drogas que mostram eficácia no tratamento, as maiores classes incluem os corticosteroides (dexametasona, prednisona), agentes alquilantes (ciclofosfamida, melfalano), drogas imunomodulatórias (talidomida, lenalidomida, pomalidomida) e inibidores de proteossoma (bortezomibe, carfilzomibe, ixazomibe). Também anticorpos monoclonais com CD38 como alvo desempenham um papel importante no tratamento, como isatuximab e daratumumab.(13)

No caso de nefropatia, para redução da concentração de paraproteínas é considerada a plasmaferese para pacientes que tenham síndrome de hiperviscosidade o que não invalida a necessidade de hemodiálise.(3)

A transplantação autóloga como opção de tratamento depende da condição geral do paciente (5) e com o avanço da terapia tem vindo a diminuir.

O desenvolvimento constante de novas abordagens imunoterapêuticas incluem anticorpos biespecíficos que envolvem a modelação de uma resposta imunitária direta ligando-se, simultaneamente, a células T e a um epítipo alvo.(14) Os marcadores clínicos que têm sido alvo de estudos desempenharão um papel importante no futuro para ultrapassar o pobre prognóstico característico da doença, contribuindo para um diagnóstico mais precoce. (15)

## **3. Relevância do estudo**

O doseamento de CLL é importante no diagnóstico e monitorização da terapia de utentes com Gamopatias Monoclonais. Com um número crescente de casos, torna-se pertinente disponibilizar um método de diagnóstico específico e sensível que esteja ao alcance da população dos 12 municípios circundantes ao CHTS. Para a implementação do teste é necessária a comparação dos dois métodos sugeridos e avaliação perante resultados obtidos no centro de diagnóstico atual. O objetivo de uma comparação de métodos é estimar qual a diferença entre os dois métodos, seja ela constante ou proporcional de modo a verificar se há diferenças significativas na precisão relativa usando amostras de pacientes.(16)

Portanto, o presente estudo remete-se sobre a questão “O método em estudo é concordante com o método utilizado atualmente?”

#### 4. Material e Métodos

O presente estudo contempla um total de 102 amostras de soro de pacientes, obtidas por venopunção, sujeitos a análises de rotina de doseamento de cadeias leves livres no serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Tâmega e Sousa.

Após colheita da amostra, realizada por Técnicos de Análises Clínicas e Saúde Pública (TSDT), esta seguiu a rotina laboratorial, com uma centrifugação a 3500rpm durante 10 minutos. O soro obtido foi separado em 2 alíquotas. Uma congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$  e enviada no dia útil seguinte para análise no hospital de referência (para doseamento de CLL) e outra congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$  que foi posteriormente utilizada para análise no Laboratório de Patologia Clínica do CHTS por métodos distintos.

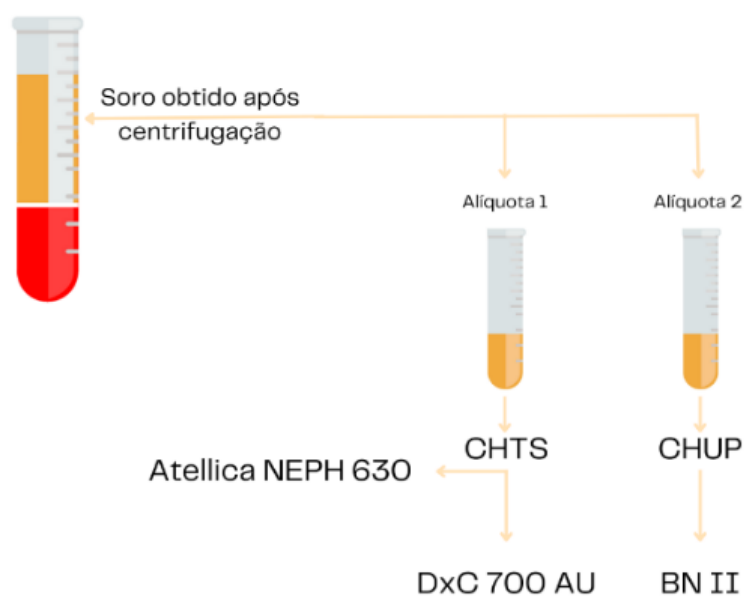


Figura 2 Fluxograma pré-analítico.

O doseamento foi realizado utilizando reagentes *Diazyme* com anticorpos policlonais no equipamento de análise química *DxC 700 AU* (Beckam Coulter Diagnostics, Califórnia) e reagentes utilizando anticorpos monoclonais no *Atellica NEPH 630* (Siemens Healthineers, Alemanha).

#### **4.1. Análise Estatística**

Um teste usado para comparação de resultados obtidos por dois métodos é o coeficiente de correlação de Pearsons. Quando o mesmo analito é medido usando diferentes métodos espera-se que o coeficiente de correlação seja muito alto. No entanto, embora este teste descreva a relação linear entre os dois pontos, não mede a sua concordância. Tal facto, conduziu ao desenvolvimento de métodos de análise desenvolvidos especificamente para comparação de métodos como Regressão de Passing e Bablok, histograma em montanha e gráficos de Bland e Altman. (16)

No presente estudo de caso analisar-se-ão os resultados segundo os métodos acima descritos.

### **5. Resultados e discussão**

#### **5.1. Resultados CLL tipo Kappa**

A análise entre cada um dos resultados dos dois métodos com o resultado do método de referência é iniciada com a realização de um gráfico de dispersão.

O gráfico de dispersão com uma linha hipotética de correlação perfeita,  $R^2=1$ , permite analisar a equivalência dos pontos avaliando a sua proximidade à linha. Quanto mais próximos da reta mais equivalentes os resultados são.

Foi realizado um gráfico de dispersão, comparando os valores do doseamento de CLL tipo Kappa obtidos de cada indivíduo no equipamento *DxC 700 AU* e no equipamento de referência deste estudo *BN II* e entre os valores obtidos no equipamento *Atellica NEPH 630* e o equipamento *BN II* (Figura 3 e 4).

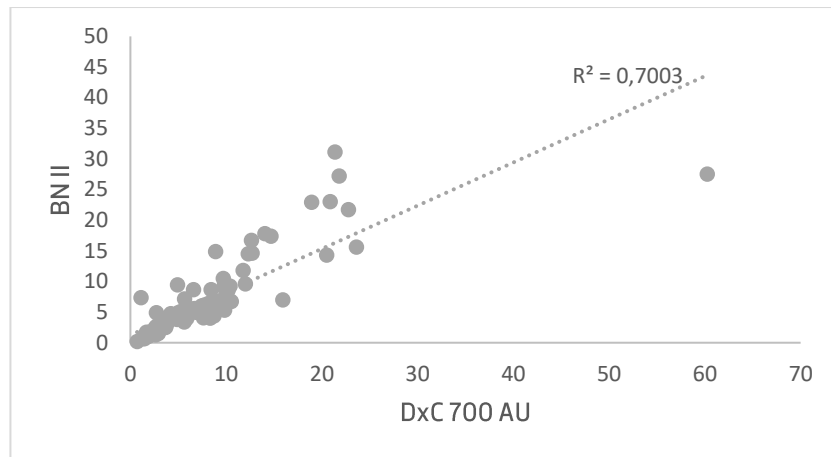


Figura 3 Gráfico de correlação linear com valor de R2 para comparação de CLL Kappa entre os equipamentos BN II e DxC 700 AU.

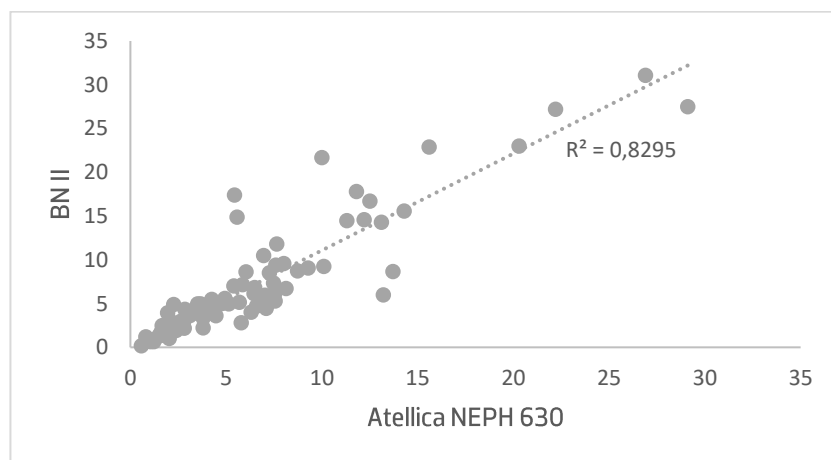


Figura 4 Gráfico de correlação linear com valor de R2 para comparação de CLL Kappa entre os equipamentos BN II e Atellica NEPH 630.

No entanto a utilização apenas do coeficiente de correlação não permite avaliar a real concordância entre os valores.

O valor de R traduz a relação entre os valores, ou seja, analisa se a associação entre os valores é boa não olhando à proximidade dos valores apresentados. Analisando a Figura 4, os valores obtidos no equipamento *Atellica NEPH 630* apresentam uma correlação boa com o equipamento *BN II*.

Utilizou-se posteriormente o método de regressão de Passing e Bablok para começar a avaliar a concordância dos resultados obtidos.

Este método defende que a regressão não é influenciada pela presença de um ou mais valores discrepantes, assumindo que os erros de medição obtidos em ambos os métodos tenham a mesma distribuição, não necessariamente normal (16) e, portanto, o tratamento de dados com exclusão desses resultados não foi necessária. A quantidade de resultados discrepantes será

analisada posteriormente em um dos pontos da análise por Passing e Bablok, o chamado gráfico residual.

Este método de regressão consiste na análise do diagrama de dispersão contendo a reta de regressão, gráfico residual e valor do teste de Cusum para aferir a linearidade.

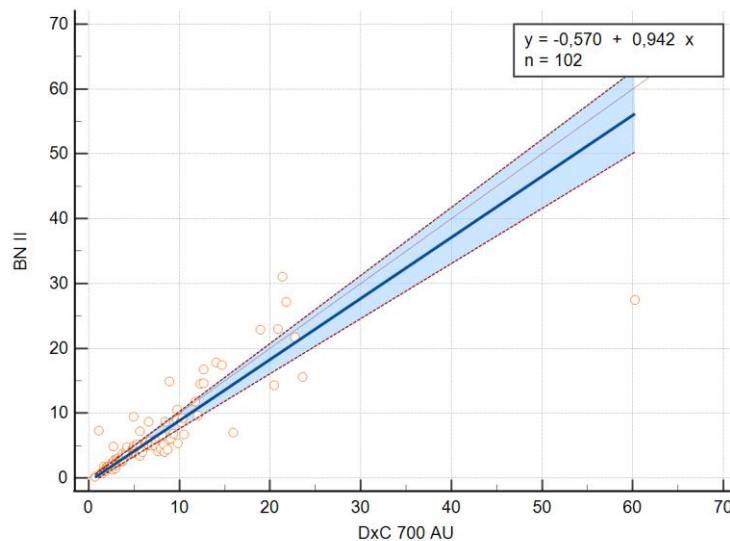


Figura 5 Gráfico de regressão Passing e Bablok com equação de reta de regressão para comparação de CLL Kappa entre os equipamentos BN II e DxC 700 AU. Linha x=y a laranja, linha de regressão representada a azul e os limites de confiança por duas linhas a vermelho tracejado.

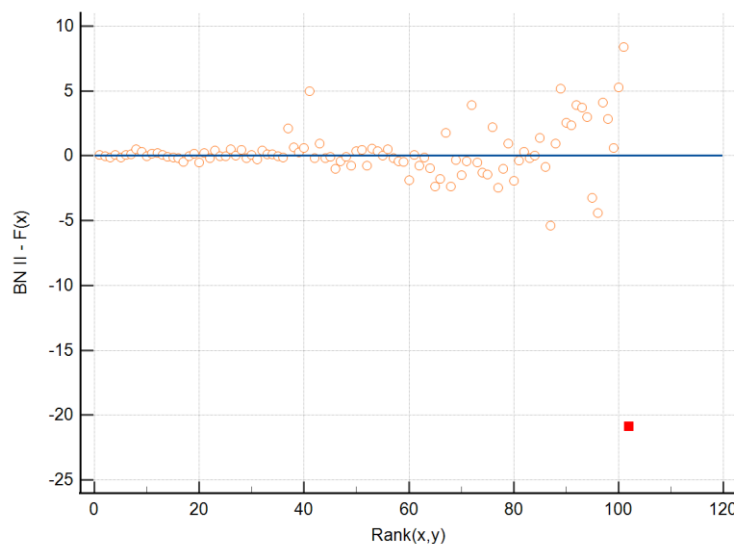


Figura 6 Gráfico residual com representação de outlier destacado em um quadrado laranja para o equipamento DxC 700 AU.

Para o equipamento *DxC 700 AU* pode-se concluir que o erro sistemático do equipamento, analisado perante este método é de  $-0,570$  e que o valor do declive se apresenta como  $0,942$ . Quando avaliado o gráfico residual obtido verifica-se que apenas se inclui um resultado considerado como *outlier*, significando que ultrapassa os  $4SD$  calculados neste método e que para valores até  $40\text{mg/dL}$  os resultados têm uma relação bastante linear.

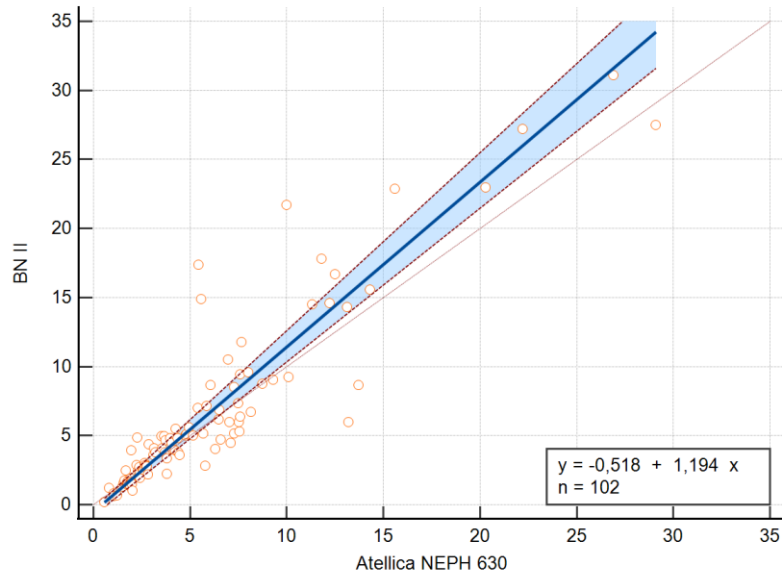


Figura 7 Gráfico de regressão Passing e Bablok com equação de reta de regressão para comparação de CLL Kappa entre os equipamentos BN II e Atellica NEPH 630. Linha  $x=y$  a laranja, linha de regressão representada a azul e os limites de confiança por duas linhas a vermelho tracejado.

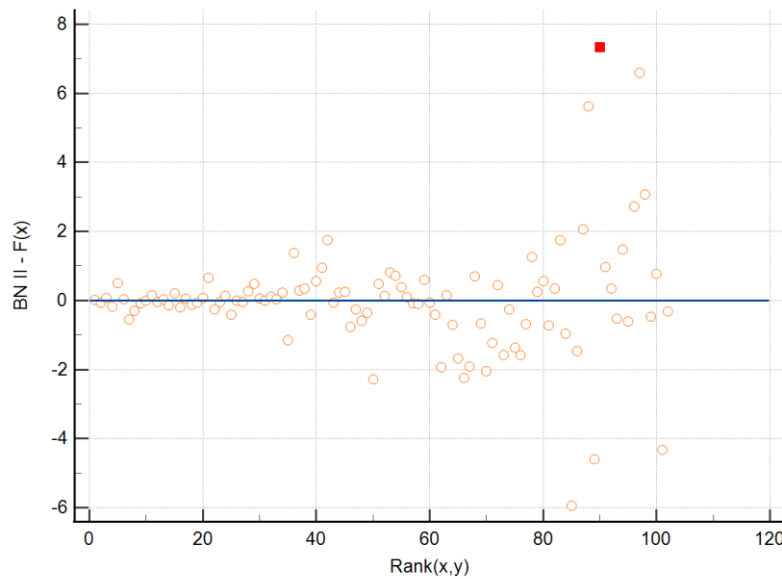


Figura 8 Gráfico residual com representação de outlier destacado em um quadrado laranja para o equipamento Atellica NEPH 630.

Para o equipamento *Atellica NEPH 630* verifica-se um erro sistemático de  $-0,518$  e um declive de  $1,194$ . Quanto aos resultados apresentados no gráfico residual verifica-se uma maior dispersão ao longo do eixo 0, no entanto, comparando a escala apresentada no gráfico ( $-6$  a  $8$ ) essa dispersão apresenta um comportamento mais uniforme em relação à Figura 6.

Recorreu-se à análise estatística também por um gráfico de Bland-Altman. Este método utiliza o valor da média dos dois métodos em cada paciente no eixo do X e relaciona com a diferença entre os valores dos dois métodos em cada paciente no eixo Y.

Um gráfico de Bland-Altman que relaciona dois métodos de diagnóstico perfeitamente concordantes apresenta todos os valores no eixo do Y no valor de 0 independentemente do valor do eixo do X. Ou seja, a diferença entre o método A comparado com o método B seria de zero, obtendo resultados iguais para valores baixos ou para valores altos (representados no eixo X).

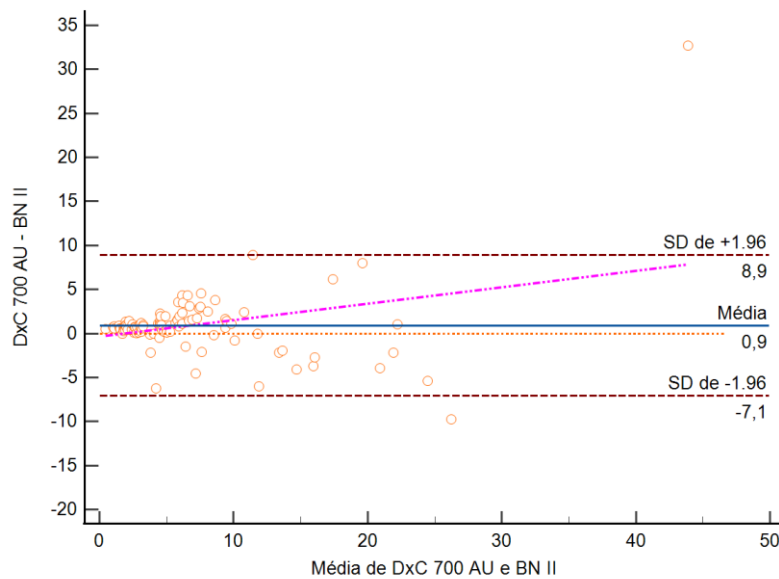


Figura 9 Gráfico de Bland-Altman para comparação de CLL Kappa entre os equipamentos BN II e DxC 700 AU. Linha de identidade a laranja ( $y=0$ ), linha de viés (diferença média entre os métodos) representada a azul e os limites de confiança por duas linhas a vermelho tracejado.

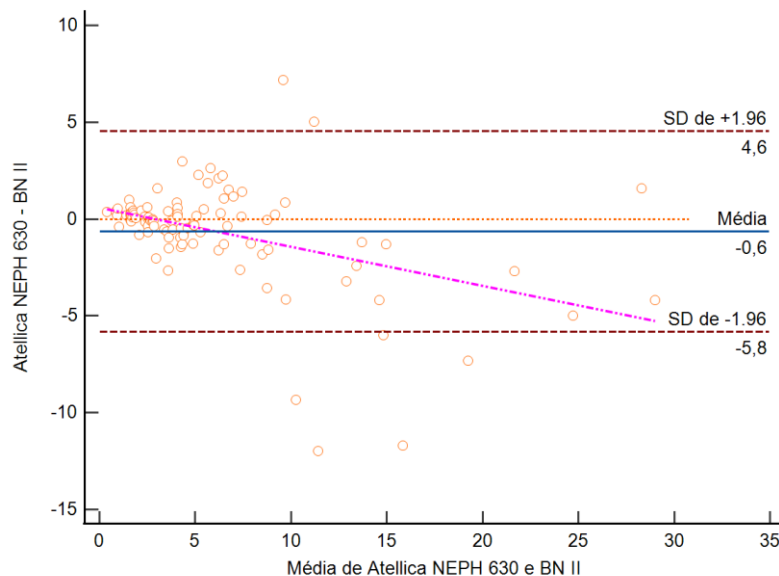


Figura 10 Gráfico de Bland-Altman para comparação de CLL Kappa entre os equipamentos BN II e Atellica NEPH 630. Linha de identidade a laranja ( $y=0$ ), linha de viés (diferença média entre os métodos) representada a azul e limites de confiança por duas linhas a vermelho tracejado.

Pela análise dos gráficos obtidos pelo *MedCalc* podemos afirmar que ambos os equipamentos sofrem maior variação nos seus doseamentos (aumento da diferença entre os dois valores representada no eixo y) à medida que a concentração aumenta. A distribuição uniforme de pontos entre os limites de confiança indica que o viés poderia ser usado como valor de erro sistemático. Embora haja mais valores que ultrapassem esses limites no gráfico de Bland-Altman relativos ao equipamento *Atellica NEPH 630*, a sua disposição é mais uniforme e o valor do Desvio Padrão calculado bastante menor o que pode indicar que este equipamento é mais preciso em relação ao *DxC 700 AU*, para o doseamento de CLL tipo Kappa.

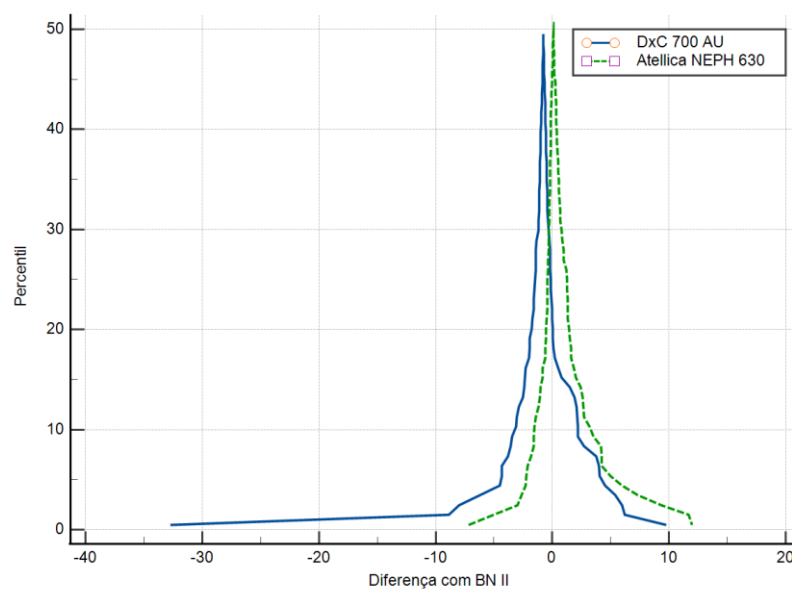


Figura 11 Histogramas em árvore comparativos para equipamentos DxC 700 AU (linha azul) e Atellica NEPH 630 (linha verde). Os pontos foram retirados para melhor visualização das linhas.

O Gráfico de montanha permite uma análise complementar ao gráfico de Bland-Altman dando informações sobre a distribuição das diferenças entre os dois métodos. Métodos centrados em zero dizem-se imparciais um em relação ao outro, enquanto longas caudas refletem diferenças entre os métodos apresentados.

Como verificado na Figura 11, o equipamento Atellica NEPH 630 apresenta-se mais centrado em zero, enquanto o equipamento DxC 700 AU apresenta uma cauda no início do histograma.

Tabela 1 Dados obtidos nos métodos de comparação para doseamento de CLL Kappa

		DxC 700 AU – BN II	Atellica NEPH 630 – BNII
Coeficiente de Correlação	R <sup>2</sup>	0,7003	0,8295
Passing e Bablok			
	Intercepção A	-0,5701	-0,5181
	95% de CI	de -0,9057 a -0,2279	de -0,7820 a -0,2793
	Descida B	0,9421	1,1940
	95% de CI	de 0,8498 a 1,0494	de 1,1128 a 1,2889
	Desvio Padrão Residual (RSD)	2,8232	1,6943
	Intervalo de ± 1.96 RSD	5,5335 a 5,5335	de -3,3209
	Teste Cusum para a linearidade	Sem desvio significativo da linearidade (P=0,39)	Sem desvio significativo da linearidade (P=0,54)
Bland – Altman			
	Intervalo de ± 1.96 RSD	-7,0752 a 8,8959	-5,8062 a 4,5542
	Amplitude	15,9711	10,3604
	Média Aritmética	0,9104	-0,6260

A análise da reta obtida no gráfico de Passing Bablok permite avaliar a diferença dos erros sistemáticos entre os dois equipamentos, avaliando o valor da intercepção A. Quando no intervalo de confiança relativas a essas diferenças sistemáticas A contém o valor de 0 então pode-se concluir que os equipamentos não diferem entre si.

Também analisando o valor de B consegue-se avaliar a diferença das proporções entre os dois métodos, sendo que se o intervalo de confiança contém 1 então os equipamentos não têm diferenças proporcionais.

Quando analisado os valores do intervalo de confiança para as diferenças proporcionais, em ambos, o intervalo de confiança contém o valor de 1, significando que não se prevêem diferenças proporcionais entre o equipamento Atellica NEPH 630 e BN II.

Pode concluir-se que o coeficiente de correlação obtido no primeiro gráfico de dispersão é melhor para o equipamento Atellica NEPH 630. Este apresenta um desvio padrão menor em ambos os métodos estatísticos e, portanto, intervalos de confiança de 95% mais apertados.

## 5.2. Resultados CLL tipo Lambda

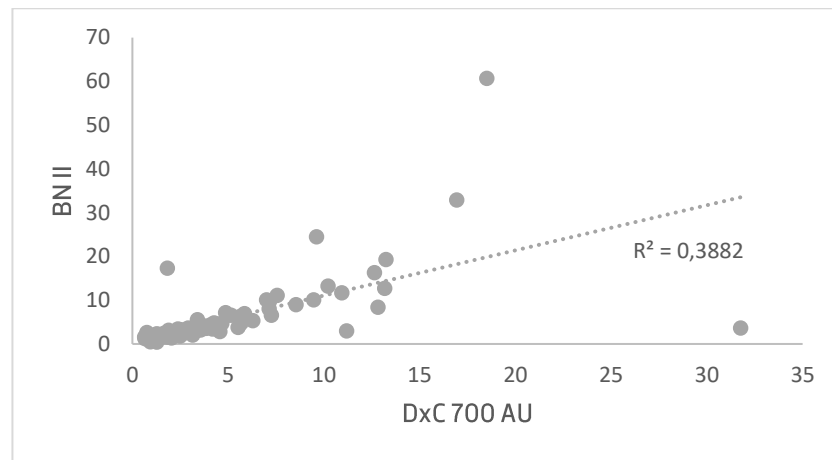


Figura 12 Gráfico de correlação linear com valor de  $R^2$  para comparação de CLL Lambda entre os equipamentos BN II e DxC 700 AU.

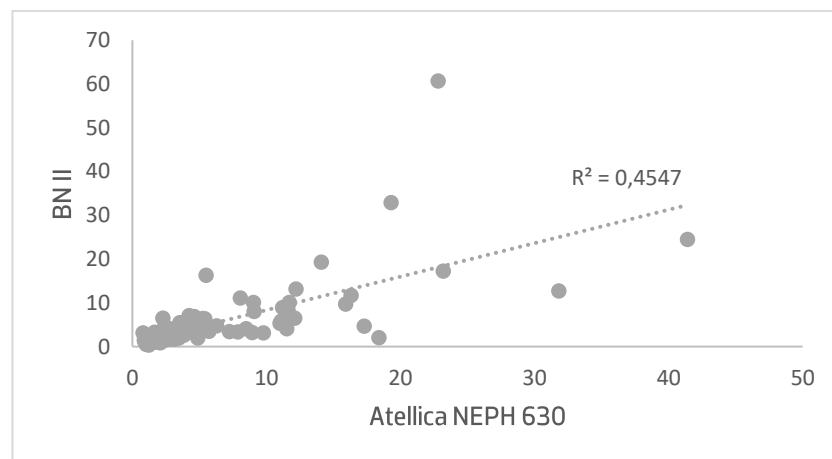


Figura 13 Gráfico de correlação linear com valor de  $R^2$  para comparação de CLL Lambda entre os equipamentos BN II e Atellica NEPH 630.

Analisando as Figuras 12 e 13 referentes aos valores obtidos nos doseamentos de CLL tipo Lambda verifica-se valores mais baixos de  $R^2$  para ambos os equipamentos o que sugere que estes resultados não apresentam resultados tão lineares em comparação ao doseamento de CLL tipo kappa.

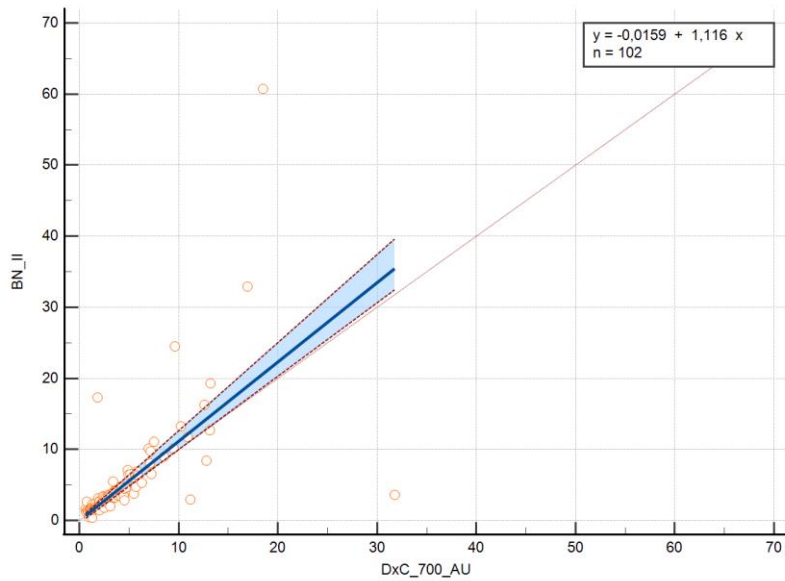


Figura 14 Gráfico de regressão Passing e Bablok com equação de reta de regressão para comparação de CLL Lambda entre os equipamentos BN II e DxC 700 AU. Linha  $x=y$  a laranja, linha de regressão representada a azul e os limites de confiança por duas linhas a vermelho.

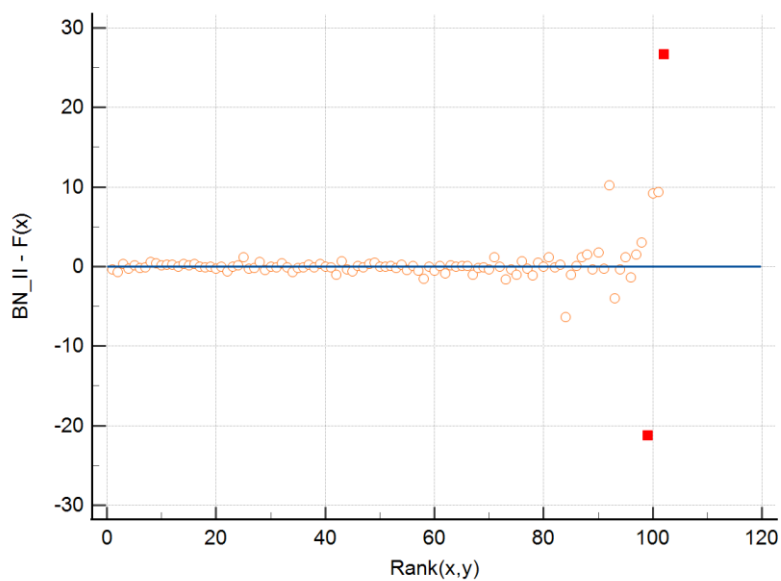


Figura 15 Gráfico residual com representação de 2 outliers destacados em um quadrado laranja para o equipamento DxC 700 AU.

Conclui-se que o erro sistemático para o equipamento *DxC 700 AU* perante o método de Passing e Bablok é de  $-0,0159$  e que o valor do declive se apresenta como  $1,116$ . Quando avaliado o gráfico residual obtido verifica-se a existência de 2 outliers e que este apresenta uma relação bastante linear até valores de sensivelmente  $80\text{mg/dL}$ .

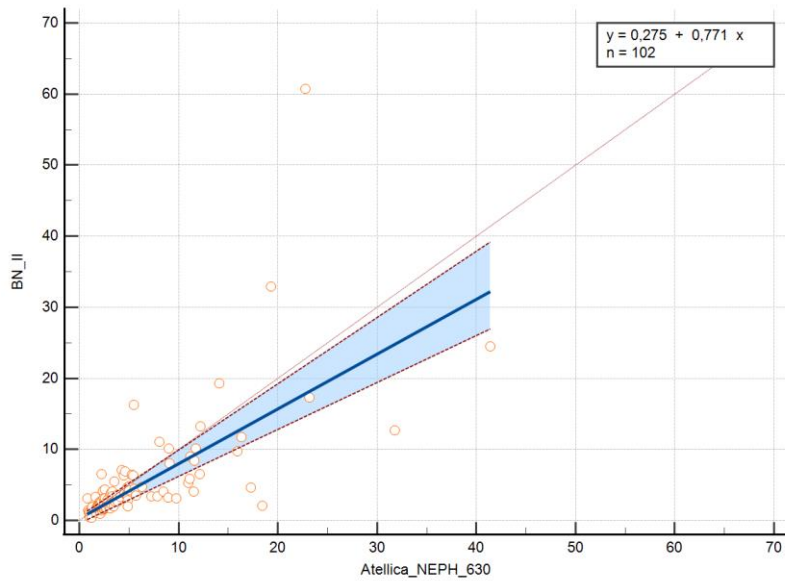


Figura 16 Gráfico de regressão Passing e Bablok com equação de reta de regressão para comparação de CLL Lambda entre os equipamentos BN II e Atellica NEPH 630. Linha  $x=y$  a laranja, linha de regressão representada a azul e os limites de confiança por duas linhas a vermelho tracejado.

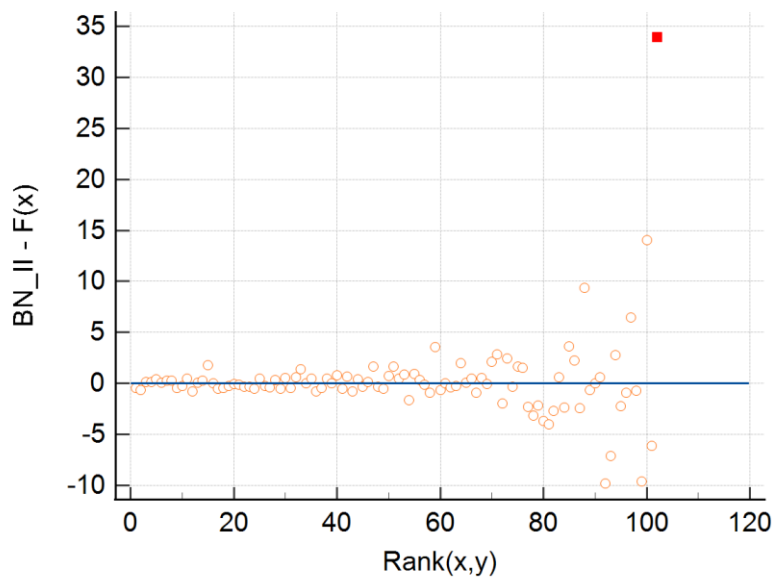


Figura 17 Gráfico residual com representação de outlier destacado em um quadrado laranja para o equipamento Atellica NEPH 630.

Avaliando os gráficos obtidos para o equipamento Atellica NEPH 630 o valor do declive (0,771) obtido na reta de regressão sugere que haja diferenças proporcionais entre os métodos, o mesmo verifica-se pela análise do gráfico residual (Figura 17) que mostra uma maior dispersão de pontos.

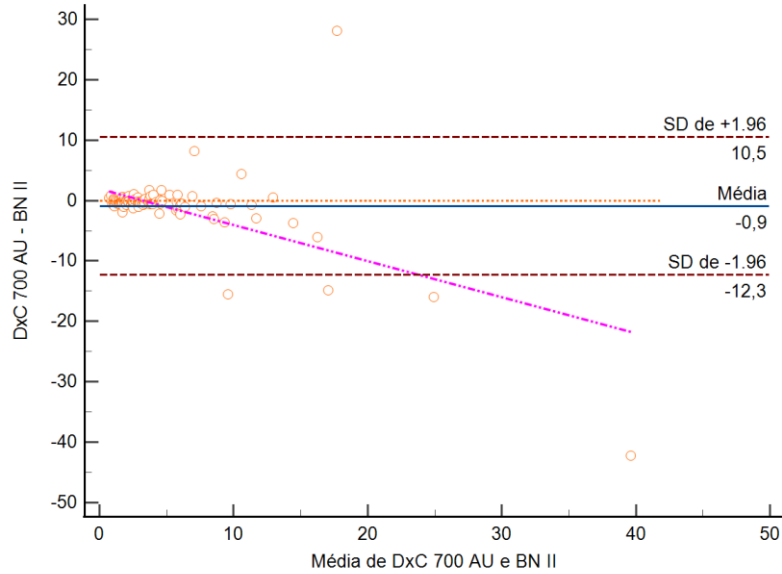


Figura 18 Gráfico de Bland-Altman para comparação de CLL Lambda entre os equipamentos BN II e DxC NEPH 630. Linha de identidade a laranja ( $y=0$ ), linha de viés (diferença média entre os métodos) representada a azul e os limites de confiança por duas linhas a vermelho tracejado.

Avaliando as diferenças de valores nos gráficos de Bland-Altman, o equipamento DxC 700 AU apresenta uma menor diferença entre a maioria dos valores (Figura 18), mais próximos da linha  $y=0$ , em relação aos valores de diferenças calculadas que se apresentam mais dispersos da linha  $y=0$  em relação aos apresentados na Figura 19.

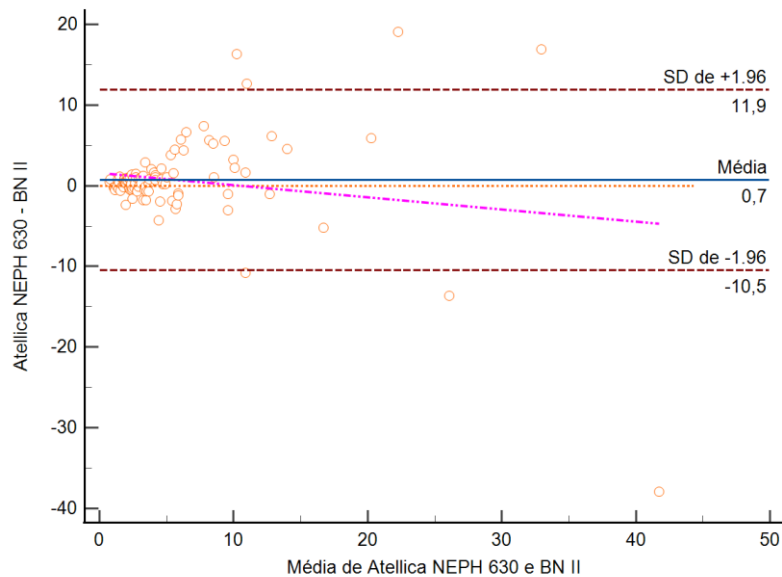


Figura 19 Gráfico de Bland-Altman para comparação de CLL Lambda entre os equipamentos BN II e Atellica NEPH 630. Linha de identidade a laranja ( $y=0$ ), linha de viés (diferença média entre os métodos) representada a azul e os limites de confiança por duas linhas a vermelho tracejado.

Do mesmo modo, avaliando o histograma abaixo verifica-se que a amplitude referente à marcação do equipamento *Atellica NEPH 630* é maior sugerindo uma maior diferença para com o método de referência.

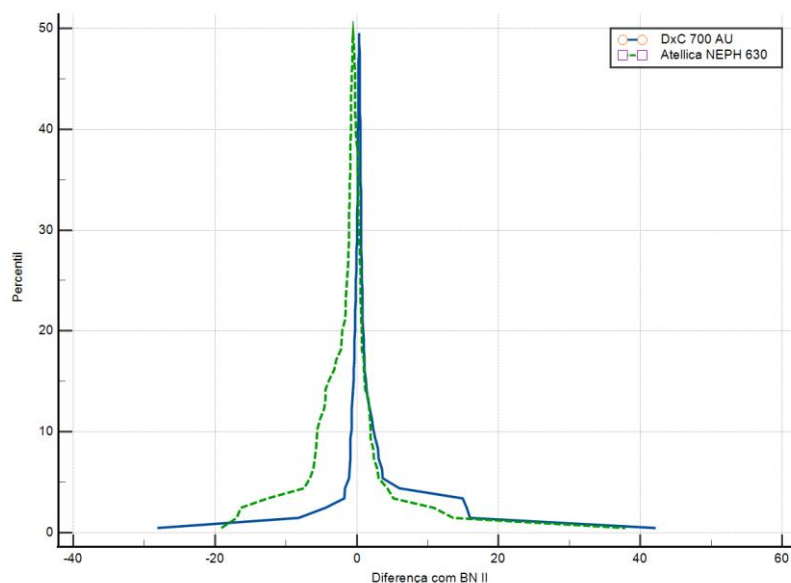


Figura 20 Histograma em árvore comparativos para equipamentos DxC 700 AU (linha azul) e Atellica NEPH 630 (linha verde). Os pontos foram retirados para melhor visualização das linhas.

Tabela 2 Dados obtidos nos métodos de comparação para doseamento de CLL Lambda.

		DxC 700 AU – BN II	Atellica NEPH 630 – BNII
Coeficiente de Correlação	R <sup>2</sup>	0,3882	0,4547
Passing e Bablok	Intercepção A	-0,01594	0,2751
	95% de CI	de -0,3550 a 0,2286	de -0,3982 a 0,5919
	Descida B	1,1159	0,7710
	95% de CI	de 1,0328 a 1,2400	de 0,6605 a 0,9324
	Desvio Padrão Residual (RSD)	3,9253	4,3887
	Intervalo de ± 1.96 RSD	-7,6937 a 7,6937	-8,6019 a 8,6019
	Teste Cusum para a linearidade	Sem desvio significativo da linearidade (P=0,86)	Sem desvio significativo da linearidade (P=0,89)
Bland – Altman	Intervalo de ± 1.96 RSD	-12,3118 a 10,5361	-10,4884 a 11,9123
	Amplitude	22,8479	22,4007
	Média Aritmética	-0,8878	0,7120

Perante os resultados auferem-se que o equipamento DxC 700 AU apresenta um valor de erro sistemático mais baixo em relação ao Atellica, sendo este de  $-0,01594$ . Também na Figura 18 se verifica que o viés calculado é de  $-0,9$  (valor exato de  $0,08878$ ) e, portanto, este equipamento tem tendência a dosear abaixo de BN II, no entanto, com uma diferença diminuída com 95% de confiança.

## 6. Conclusão

O doseamento de CLL está padronizado para diagnóstico, monitorização e prognóstico de doentes com MM, estando padronizado como método de referência a utilização de equipamentos automáticos de nefelometria.

O presente estudo contempla um universo de 102 amostras analisadas em 3 equipamentos: *Atellica Neph 630* (Siemens Healthineers, Alemanha), *DxC 700 AU* (Beckam Coulter Diagnostics, Califórnia) e *BN II* (Siemens Healthineers, Alemanha). Estes utilizam os seguintes reagentes: N Latex com anticorpos monoclonais, reagente *Diazyme* com anticorpos policlonais e Binding Site com anticorpos policlonais, respetivamente.

A aprovação de anticorpos monoclonais pela FDA para diagnóstico e monitorização de doentes com gamopatias monoclonais pode ser um escape a problemas causados pela deteção de CLL utilizando anticorpos policlonais e turbidimetria. Isto devido à incorreta classificação como CLL em doenças capazes de provocar estimulação de linfócitos B como doenças autoimunes e infeções crónicas.

Face aos resultados apresentados, conclui-se que, o equipamento com maior concordância nos resultados de doseamento de CLL tipo Kappa é o *Atellica NEPH 630* e para doseamentos de CLL tipo Lambda o *DxC 700 AU*.

No entanto, a internalização da análise no Laboratório de Imunologia do CHTS com reagentes monoclonais utilizando o *Atellica NEPH 630* requer mais testes. Embora os resultados se apresentem concordantes na sua maioria para os doseamentos de CLL (Kappa e Lambda) em ambos os equipamentos, uma análise com mais amostragem e uma análise estatística mais detalhada que permita, não só analisar a especificidade do equipamento, mas a sua sensibilidade e capacidade de repetibilidade é necessária para escolher o equipamento adequado.

## Referências Bibliográficas

1. Ruiz-Duque B, Bañuls L, Reinoso-Arija R, Carrasco-Hernandez L, Caballero-Eraso C, Dasí F, et al. Methodologies for the Determination of Blood Alpha1 Antitrypsin Levels: A Systematic Review. *Journal of Clinical Medicine*. 2021;10(21):5132.
2. Dejoie T, Attal M, Moreau P, Harousseau JL, Avet-Loiseau H. Comparison of serum free light chain and urine electrophoresis for the detection of the light chain component of monoclonal immunoglobulins in light chain and intact immunoglobulin multiple myeloma. *Haematologica*. 2016;101(3):356-62.
3. Padala SA, Barsouk A, Barsouk A, Rawla P, Vakiti A, Kolhe R, et al. Epidemiology, Staging, and Management of Multiple Myeloma. *Medical Sciences*. 2021;9(1):3.
4. 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. *The Lancet Oncology*. 2014;15(12):e538-e48.
5. Firth J. Haematology: multiple myeloma. *Clinical Medicine*. 2019;19(1):58-60.
6. Gudowska-Sawczuk M, Mroczko B. Free Light Chains  $\kappa$  and  $\lambda$  as New Biomarkers of Selected Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(11):9531.
7. Lee WS, Singh G. Serum Free Light Chains in Neoplastic Monoclonal Gammopathies: Relative Under-Detection of Lambda Dominant Kappa/Lambda Ratio, and Underproduction of Free Lambda Light Chains, as Compared to Kappa Light Chains, in Patients With Neoplastic Monoclonal Gammo. *Journal of Clinical Medicine Research*. 2018;10(7):562-9.
8. Gerecke C, Fuhrmann S, Striffler S, Schmidt-Hieber M, Einsele H, Knop S. The Diagnosis and Treatment of Multiple Myeloma. *Deutsches Ärzteblatt international*. 2016.
9. Rajkumar SV. Multiple myeloma: Every year a new standard? *Hematological Oncology*. 2019;37(S1):62-5.
10. Rajkumar SV. Updated Diagnostic Criteria and Staging System for Multiple Myeloma. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*. 2016(36):e418-e23.
11. Moreau P, San Miguel J, Ludwig H, Schouten H, Mohty M, Dimopoulos M, et al. Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2013;24(suppl 6):vi133-vi7.
12. Mosebach J, Thierjung H, Schlemmer H-P, Delorme S. Multiple Myeloma Guidelines and Their Recent Updates: Implications for Imaging. *RöFo - Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der bildgebenden Verfahren*. 2019;191(11):998-1009.
13. Rajkumar SV, Kumar S. Multiple myeloma current treatment algorithms. *Blood Cancer Journal*. 2020;10(9).
14. Cipkar C, Chen C, Trudel S. Antibodies and bispecifics for multiple myeloma: effective effector therapy. *Hematology*. 2022;2022(1):163-72.
15. Wallington-Beddoe CT, Mynott RL. Prognostic and predictive biomarker developments in multiple myeloma. *Journal of Hematology & Oncology*. 2021;14(1).
16. Bilic-Zulle L. Comparison of methods: Passing and Bablok regression. *Biochimica Medica*. 2011:49-52.

## Anexos

Amostra nº	CLL Kappa			CLL Lambda		
	DxC 700 AU	Atellica NEPH 630	BN II	DxC 700 AU	Atellica NEPH 630	BN II
1	1,83	1,48	1,3	5,51	4,52	3,76
2	3,47	2,21	2,87	1,63	1,99	2,38
3	8,72	2,85	4,37	11,19	2,82	2,96
4	1,68	1,6	1,73	0,63	1,21	1,58
5	6,95	3,66	4,96	3,64	2,35	4,17
6	2,43	1,7	1,5	1,28	1,26	1,87
7	5,04	3,52	4,96	4,86	4,24	7,13
8	8,32	4,12	3,99	4,08	2,6	4,34
9	2,31	1,76	1,52	1,28	2,11	2,30
10	18,93	15,6	22,9	10,94	16,3	11,70
11	3,67	2,53	2,51	2,63	2,56	3,09
12	4,81	4,02	4,49	2,43	3,61	2,63
13	6,6	13,7	8,67	4,67	17,3	4,68
14	60,24	29,1	27,5	8,54	11,2	8,96
15	5,56	4,46	3,61	1,05	1,23	1,35
16	4,91	7,59	9,42	1,12	0,93	1,14
17	6,56	4,78	5,04	5,65	5,4	6,35
18	8,9	5,57	14,9	1,54	1,73	1,92
19	14,69	5,44	17,4	1,07	1,25	1,57
20	12,02	8	9,59	5,88	4,49	6,38
21	1,36	1,03	0,82	12,63	5,49	16,30
22	3,05	2,4	2,29	2,04	2,29	1,40
23	3,41	2,64	2,73	2,91	3,12	3,62
24	4,91	3,72	4,69	3,4	3,54	5,51
25	4,9	3,7	3,8	2,0	2,49	2,76
26	3,73	2,76	2,77	1,31	1,75	1,69
27	23,62	14,3	15,6	1,6	2,34	1,67
28	2,76	2,37	2,72	12,82	11,6	8,38
29	22,76	10	21,7	2,49	2,70	1,78
30	1,12	7,48	7,35	5,85	4,6	6,90
31	10,15	8,72	8,76	5,66	6,28	4,74
32	3,74	3,19	3,82	1,9	3,46	2,00
33	5	6,31	4,02	2,91	7,85	3,40
34	1,49	1,22	0,67	0,86	1,02	1,22
35	2,41	1,97	1,52	2,05	2,66	1,68
36	0,69	0,57	0,2	0,75	2,24	2,63
37	2,98	3,79	2,22	1,77	2,54	1,59
38	3,44	5,79	2,83	1,77	4,88	1,96
39	6,26	4,79	5,1	3,45	4,88	3,22
40	6,73	4,93	5,6	3,12	3,84	2,63
41	5,22	4,35	4,83	2,17	3,24	2,16
42	3,55	2,59	2,51	2,12	2,48	2,23
43	10,4	10,1	9,25	7,26	12,1	6,54

44	5,63	3,79	3,37	3,14	3,77	3,58
45	3,63	2,76	2,84	1,61	2,44	1,81
46	5,65	5,85	7,16	3,64	8,49	4,08
47	5,7	3,95	4,81	2,82	2,44	3,16
48	4,08	3,1	3,62	2,35	2,05	2,55
49	5,05	1,94	3,96	2,0	18,4	2,07
50	8,87	7,51	5,98	4,51	5,58	4,49
51	7,73	6,46	6,16	3,85	5,72	3,54
52	10,54	8,13	6,73	4,5	4,79	3,52
53	5,09	3,55	4,1	1,82	23,2	17,30
54	3,15	2,31	2,45	1,36	2,24	1,47
55	14,06	11,8	17,8	6,28	11	5,33
56	2,97	2,69	2,86	2,32	2,8	2,47
57	7,31	5,14	4,99	3,18	4,15	3,32
58	7,41	7,03	5,97	4,18	7,24	3,42
59	10,21	7,26	8,53	4,92	5,26	6,47
60	1,93	1,77	1,69	0,66	1,68	1,26
61	12,64	12,5	16,7	9,46	11,7	10,10
62	12,69	12,2	14,6	5,63	11,1	5,88
63	2,04	1,73	1,6	1,87	2,34	1,7
64	12,29	11,3	14,5	7,16	15,9	9,74
65	5,38	7,26	5,17	3,48	11,5	4,08
66	15,9	5,4	7,01	31,76	4,72	3,63
67	2,11	1,95	1,71	1,15	2,13	1,63
68	8,44	6,04	8,65	9,61	41,4	24,5
69	21,35	26,9	31,1	1,28	1,22	0,40
70	8,25	5,68	5,17	1,83	1,9	1,74
71	5,9	4,2	3,95	4,27	5,04	4,81
72	6,31	4,25	5,5	3,48	3,33	4,03
73	2,39	1,96	1,63	1,55	2,53	1,73
74	5,25	4,37	3,8	3,66	5	4,22
75	2,66	2,81	2,2	1,51	3,1	1,72
76	1,78	0,81	1,22	2,04	2,11	2,66
77	3,22	2,65	3,01	2,37	3,35	3,45
78	8,16	7,57	6,4	13,24	14,1	19,30
79	1,89	2,03	1,04	1,16	2,17	1,79
80	1,37	1,06	0,65	2,8	3,23	2,95
81	7,64	3,54	4,08	5,15	2,27	6,54
82	9,74	9,28	9,06	10,21	12,2	13,20
83	9,34	6,49	6,84	7,55	8,06	11,10
84	2,97	2,4	1,96	18,51	22,8	60,70
85	9,05	13,2	6	2,83	9,77	3,13
86	9,71	6,95	10,5	4,27	4,83	4,62
87	20,86	20,3	23	3,14	2,99	2,02
88	7,94	7,09	4,46	4,56	4,87	2,85
89	2,72	2,25	4,89	0,93	1,03	0,52
90	4,22	6,58	4,73	3,56	8,94	3,23
91	21,79	22,2	27,2	13,17	31,8	12,70

92	2,63	1,91	1,29	1,2	2,07	0,91
93	2,92	1,87	1,49	2,51	1,66	3,28
94	2,61	1,66	2,48	1,89	0,78	3,16
95	2,17	1,75	1,45	0,79	0,89	1,45
96	11,78	7,64	11,8	7,0	9,03	10,10
97	9,83	7,56	5,31	7,14	9,08	8,02
98	20,48	13,1	14,3	16,93	19,3	32,90
99	6,61	4,75	5,03	2,73	3,43	2,51
100	4,08	3,12	4,08	3,46	3,16	3,84
101	2,33	1,92	1,88	1,12	1,72	1,00
102	2,2	1,58	1,62	1,61	2,06	1,78