Anna SUSKA[1]
Artur JURCZYSZYN[2]

Użyteczność testów Hevylite™ w diagnostyce i monitorowaniu szpiczaka plazmocytowego i gammapatii monoklonalnej o niezdefiniowanym znaczeniu.

The usefulness of Hevylite™ immunoassays in the diagnosis and monitoring of multiple myeloma and monoclonal gammapathy of undetermined significance

[1]Szpital Uniwersytecki w Krakowie, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

[2]Katedra i Klinika Hematologii UJ CM, Kraków
Kierownik:
Prof. dr hab. med. Aleksander Skotnicki

Dodatkowe słowa kluczowe:
szpiczak plazmocytowy
gammapatia monoklonalna
białko monoklonalne
diagnostyka
choroba resztkowa

Additional key words:
multiple myeloma
monoclonal gammapathy
monoclonal proteins
diagnosis
residual disease

Autorzy nie deklarują konfliktu interesów

Otrzymano: 18.09.2017
Zaakceptowano: 26.10.2017

Adres do korespondencji:
Dr hab. med. Artur Jurczyszyn
Katedra i Klinika Hematologii UJ CM
ul. Kopernika 17, 31-501 Kraków
tel. 12 424 76 00
tel./fax. 12 424 74 26
e-mail: mmjurczy@cyf-kr.edu.pl

Gammapatie monoklonalne to grupa chorób, w których zmienione komórki plazmatyczne produkują nieprawidłowe białka monoklonalne (paraproteiny). Diagnostyka obejmuje identyfikację białka oraz jego ocenę ilościową. Z uwagi na istotne ograniczenia konwencjonalnych metod diagnostycznych – elektroforezy (SPE) i immunofiksacji (IFE) – coraz częściej w praktyce wykorzystywana jest nowa technika – testy Hevylite™, które umożliwiają precyzyjne oznaczenie stężenia kompletnych immunoglobulin poszczególnych klas z rozróżnieniem na typy łańcucha lekkiego, a także wyliczenie proporcji stężeń (HLCr) immunoglobuliny monoklonalnej (iHLC) do poliklonalnej tej samej klasy (uHLC). Większa czułość testów Hevylite™ w porównaniu z tradycyjnymi badaniami wynika z jednoczesnego oznaczania dwóch parametrów: stężenia monoklonalnej immunoglobuliny oraz supresji izotypowo specyficznej uHLC. Testy Hevylite™ są szczególnie istotne w detekcji białka monoklonalnego IgA, utrudnionej w elektroforezie białek surowicy z powodu przemieszczania się paraproteiny w region β razem z innymi białkami osocza (głównie transferyną i białkami komplementu). Najistotniejszym parametrem jest HLCr niezależny od czynników zakłócających (objętości osocza/hematokrytu, obiegu immunoglobulin). Nieprawidłowy HLCr w momencie klinicznej prezentacji szpiczaka plazmocytowego (MM) stanowi o krótszym czasie przeżycia wolnego od progresji, głównie w związku z supresją izotypowo specyficzną, sugerującą zajęcie szpiku przez komórki nowotworowe. Normalizacja HLCr to dobry czynnik predykcyjny (nawet w przypadku dodatniego wyniku IFE), odzwierciedlający eradykację nowotworowych komórek plazmatycznych

The monoclonal gammopathies are a group of diseases characterised by the proliferation of clonal plasma cells to produce abnormal monoclonal proteins (paraproteins). Diagnostics includes protein identification and quantification. Due to the significant limitations of the conventional diagnostic methods (electrophoresis – SPE, immunofixation – IFE), a new technique – Hevylite™ immunoassay – is used to precisely separately quantify the different light chain types of each immunoglobulin class and to calculate ratios (HLCr) of monoclonal involved (iHLC) Ig to polyclonal uninvolved (uHLC) Ig concentrations. The high sensitivity of Hevylite™ results from the simultaneous determination of two parameters: monoclonal immunoglobulin and HLC-pair suppression (suppression of uHLC). Hevylite™ assay is of particular importance in detection of IgA monoclonal protein comigrating on electrophoresis with normal serum proteins (transferrin or complement) to the beta zone, making impossible a reliable densitometric estimation. HLCr is the most important parameter not affected by interfering factors (changes in blood volume, hematocrit, variable metabolism of Ig). Abnormal HLCr at clinical presentation of myeloma multiplex (MM) is predictive for shorter progression-free survival, predominantly due to the suppression of uHLC suggesting bone marrow involvement. Normal HLCr predicts a good outcome, irrespective of IFE positivity, reflecting eradication of tumour cells and recovery of the normal plasma-cell population. The conversion of a normal to an abnormal HLCr indicates evolving relapse, weeks or months before changes evident by conventional methods. Hevylite™ is also used in benign gammapathies. Monoclonal gammapathy of undetermined signifi-

i odbudowę prawidłowej populacji plazmocytów. Konwersja prawidłowego HLCr do wartości nieprawidłowych świadczy o zbliżającym się nawrocie choroby (tygodnie-miesiące przed nieprawidłowościami obserwowanymi w tradycyjnych metodach diagnostycznych). Hevylite™ znajduje zastosowanie także w gammapatiach nienowotworowych. Gammapatia monoklonalna o niezdefiniowanym znaczeniu (MGUS) po wielu latach bezobjawowego przebiegu może przejść w MM lub inną chorobę limfoproliferacyjną. Rozszerzona stratyfikacja ryzyka progresji obejmuje supresję izotypowo specyficzną, której wartość predykcyjna jest znacznie większa niż klasycznej immunoparezy (supresji produkcji wszystkich immunoglobulin poliklonalnych). Choć na chwilę obecną nie ma jasnych wytycznych uwzględniających testy Hevylite™ w rutynowej diagnostyce i monitorowaniu MM oraz MGUS, metoda ta prawdopodobnie będzie coraz częściej wykorzystywana w praktyce.

cance (MGUS) may develop into MM or other lymphoproliferative diseases, even after many years of asymptomatic course. New risk-stratification model proposed in the preliminary study includes HLC-pair suppression which predictive value is significantly higher than classical immunoparesis (suppression of uninvolved, polyclonal immunoglobulins). Although Hevylite™ immunoassays have not yet been incorporated into recommendations for diagnostics and monitoring of MM or MGUS, this method becomes more widely used in practice.

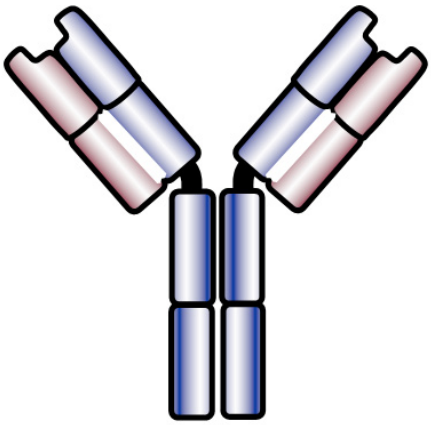
Wstęp

Szpiczak plazmocytowy (myeloma multiplex – MM) to trzeci co do częstości nowotwór hematologiczny, stanowiący 1-2% wszystkich nowotworów złośliwych [1]. Należy do gammapatii monoklonalnych, w których nieprawidłowe komórki plazmatyczne produkują białko monoklonalne, co prowadzi do manifestacji klinicznej choroby oraz powikłań narządowych [1,2]. Objawy są niecharakterystyczne, dlatego wykrycie w surowicy białka monoklonalnego, które jest wysoce specyficznym markerem szpiczaka, ma kluczowe znaczenie [3]. Diagnostyka obejmuje dwa kroki – identyfikację białka monoklonalnego (oznaczenie jakościowe) oraz jego ocenę ilościową [1,4]. W tym celu wykorzystywane są obecnie rozmaite metody laboratoryjne o bardzo zróżnicowanej czułości i swoistości. Należą do nich: elektroforeza białek surowicy (ang. serum protein electrophoresis – SPE) – złoty standard, elektroforeza białek moczu (ang. urine protein electrophoresis – UPE), immunofiksacja (ang. immunofixation electrophoresis – IFE), testy FLC (ang. free light chain) [1,5]. Jednak mimo znacznego ulepszenia wymienionych wyżej technik, precyzyjna ocena białka monoklonalnego nadal sprawia trudności [4,6].

Charakterystyka Hevylite™

W ostatnim czasie coraz szerzej wykorzystywana jest nowa metoda diagnostyczna – testy Hevylite™ – HLC (immunoglobulin heavy/light chain immunoassays). Służą one do określenia klonalności i ilościowego oznaczenia immunoglobulin poszczególnych klas z rozróżnieniem na typy łańcucha lekkiego (IgGκ, IgGλ, IgAκ, IgAλ, IgMκ, IgMλ) w zautomatyzowanej analizie turbidymetrycznej lub nefelometrycznej, wyznaczenia proporcji stężeń (ang. heavy/light chain ratio – HLCr) immunoglobuliny monoklonalnej (ang. involved HLC – iHLC) do poliklonalnej tej samej klasy (ang. uninvolved HLC – uHLC) tj. IgGκ/IgGλ, IgAκ/IgAλ, IgMκ/IgMλ oraz obliczenia różnicy (dHLC) między iHLC a uHLC (terminologia Hevylite™ – (Tab. I)). Wykorzystują przeciwciała poliklonalne rozpoznające epitopy znajdujące się pomiędzy przyległymi regionami stałymi ciężkich i lekkich łańcuchów [1,3,5,7] (Ryc. 1). Docelowe epitopy to tylko niewielki fragment powierzchni immunoglobuliny, więc stworzenie przeciwciał, które zapewniłyby odpowiednio wysoką czułość testu, wydaje się być dużym wyzwaniem.

Wykorzystywane obecnie przeciwciała poliklonalne są produkowane na drodze immunizacji owiec monoklonalnymi immunoglobulinami danej klasy zawierającymi dany typ łańcucha lekkiego, pozyskiwanymi na drodze elektroforezy żelowej w warunkach denaturujących (ang. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis – SDS-PAGE) i Western blott z moczu i osocza osób z rozpoznanymi gammapatiami monoklonalnymi [3]. Najbardziej wymagający aspekt produkcji testów Hevylite™ to zapewnienie odpowiedniej swoistości – po wyjściowej immunizacji uzyskuje się wysoce reaktywne surowice, które muszą przejść proces oczyszczania z przeciwciał reagujących krzyżowo. Walidacja metody następuje poprzez wykorzystanie próbek kontrolnych i zestawienie uzyskiwanych wyników z oznaczeniami sumarycznego stężenia immunoglobuliny danej klasy. Spójność między partiami odczynników jest kluczowa ze względu na stosowanie testów Hevylite™ w monitorowaniu przebiegu choroby w ciągu wielu lat. Poliklonalne surowice wykorzystywane do produkcji testów HLC zawsze zawierają co najmniej 90% składników poprzedniej partii reagentów, co minimalizuje różnice, zapewniając jednocześnie możliwość detekcji maksymalnej ilości epitopów [3]. Wartości referencyjne dla poszczególnych oznaczeń panelu Hevylite™ po raz pierwszy ustanowił Bradwell i wsp. [5]. Obecnie producent odczynników zaleca albo ustalenie lokalnych wartości referencyjnych, albo walidację już istniejących. Na analizę HLC



Rycina 1
Docelowe epitopy (na biało) dla przeciwciał HLC między przyległymi regionami stałymi ciężkiego i lekkiego łańcucha immunoglobuliny. Dzięki uprzejmości The Binding Site®.
Target epitopes (in white) for HLC antibodies on the constant regions between the heavy and light chains of immunoglobulin molecule. Reprinted by permission from The Binding Site®.

Tabela I
Terminologia Hevylite™.
Hevylite™ terminology.

Wyrażenie	Definicja i znaczenie	Przykład - pacjent z monoklonalnym IgGλ
HLCr (HLC ratio)	wskaźnik klonalności	IgGκ/IgGλ
iHLC (involved HLC)	zaangażowany izotyp - produkowany przez komórki szpiczaka (miara produkcji białka monoklonalnego)	IgGλ
uHLC (uninvolved HLC)	niezaangażowany izotyp - o tym samym łańcuchu ciężkim, a odmiennym łańcuchu lekkim względem iHLC (miara produkcji białka poliklonalnego)	IgGκ
dHLC	iHLC - uHLC	IgGλ - IgGκ
HLC pair supression (supresja izotypowo specyficzna)	uHLC poniżej zakresu referencyjnego + nieprawidłowe HLCr	niskie IgGκ

mogą mieć wpływ: hemoglobina (znaczna hemoliza), bilirubina (hiperbilirubinemia), lipoproteiny (osocze lipemiczne) – maksymalne stężenia poszczególnych substancji interferujących podane są w specyfikacji odczynników. Co ważne, choroby nerek nie wpływają na wyniki HLC, ponieważ kompletne immunoglobuliny nie są usuwane przez nerki [3]. Wyniki uzyskane w postaci liczbowej można zestawić z wcześniejszymi i późniejszymi oznaczeniami, co ułatwia ocenę przebiegu choroby [8,9].

Większa czułość testów Hevylite™ w porównaniu ze stosowanymi obecnie na szeroką skalę metodami konwencjonalnymi wynika z jednoczesnego oznaczania dwóch parametrów – stężenia monoklonalnej immunoglobuliny produkowanej przez komórki szpiczaka oraz supresji izotypowo specyficznej – zahamowania produkcji immunoglobuliny niemonoklonalnej tej samej klasy (HLC-pair supression) [1,10].

Ograniczenia konwencjonalnych metod diagnostycznych vs możliwości Hevylite™

Ocena ilościowa białka monoklonalnego w SPE zależy od wielu czynników, wśród których najważniejsze to: strefa migracji, szerokość migracji, stężenie bialka monoklonalnego oraz wielkość tła poliklonalnego [7]. W związku z tym dokładny pomiar stężenia immunoglobuliny monoklonalnej może być problematyczny z kilku powodów. Pierwszym z nich jest przemieszczanie się IgA w region β razem z innymi białkami osocza (transferyna, beta-lipoproteina, białko C3 komplementu) [7,9,11,12]. Ta kwestia może dotyczyć nawet >40% monoklonalnego IgA [13]. Ponadto, monoklonalne białko IgA może dać obraz szerokiego rozproszonego zespołu lub kilku (2-3) pików ze względu na występowanie w postaci mieszaniny monomerów i oligomerów [7,14], co sprawia trudności w ocenie klonalności. W przypadkach detekcji immunoglobuliny monoklonalnej IgG, występującej w SPE w postaci dyskretnego pasma, niewłaściwe wysycenie barwnikiem może prowadzić do zaniżenia stężenia białka monoklonalnego [15]. Ocena ilościowa małych białek monoklonalnych może być natomiast zaburzona przez mocne poliklonalne tło [16]. Obserwuje się liniową korelację między oznaczeniami stężenia immunoglobuliny monoklonalnej IgG i IgA w SPE i w testach Hevylite™, jednakże w przypadku MM IgA stwierdza się lepszą korelację iHLC z całkowitym stężeniem IgA wyznaczonym w nefelometrii niż z oznaczeniem w SPE, co wynika z trudności związanych z przemieszczaniem się tej paraproteiny [12].

Dokładne oznaczenie ilościowe białka monoklonalnego, różnicowanie między immunoglobuliną monoklonalną a poliklonalnym tłem (zwłaszcza przy niskich stężeniach białka M), ocena supresji szpiku są ważne dla prognozy, wyboru terapii oraz oceny odpowiedzi na leczenie. Wstępne wyniki badań naukowych nad użytecznością testów HLC wskazują, iż parametr HLCr może być wykorzystany w screeningu [17], monitorowaniu i stratyfikacji ryzyka u pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym [6,18,19], amyloidozą AL [20], MGUS [21].

Prognoza w momencie diagnozy

Międzynarodowa Klasyfikacja Prognostyczna Szpiczaka Plazmocytowego (ang. International Staging System – ISS) uwzględnia poziom β2mikroglobuliny i albuminy w surowicy [22]. W ostatnim czasie wykazano, iż ekstremalnie wysokie wartości HLCr i podwyższony poziom β2mikroglobuliny to jedyne niezależne czynniki krótszego przeżycia wolnego od progresji (ang. progression free survival – PFS), nie uzyskano natomiast istotności statystycznej dla albumin, FLCr, nieprawidłowości cytogenetycznych. W analizie regresji wielu zmiennych HLCr okazał się najważniejszym czynnikiem predykcyjnym przebiegu choroby. Nieprawidłowy HLCr w momencie klinicznej prezentacji świadczy o krótszym czasie PFS, głównie w związku z supresją izotypowo specyficzną immunoglobuliny tej samej klasy o odmiennym łańcuchu lekkim (uHLC) [3,10]. Większą istotność statystyczną obserwowano, gdy HLCr był wysoce nieprawidłowy [9,10]. Supresja tego samego izotypu poliklonalnej immunoglobuliny sugeruje zajęcie szpiku przez komórki nowotworowe szpiczaka. Dzięki temu, iż znajduje ona swoje odzwierciedlenie w nieprawidłowym wyniku HLCr, można stwierdzić obecność białka monoklonalnego, nawet gdy poszczególne oznaczenia HLC pozostają w zakresie normy [5]. Obserwuje się, iż pacjenci z wyższym stężeniem białka monoklonalnego (iHLC) zwykle mają niższe stężenie białka niemonoklonalnego (uHLC). Ta ujemna korelacja ma znaczenie zwłaszcza u pacjentów z MM IgG, u których mocne tło poliklonalne utrudnia diagnostykę [23]. Jednak w porównaniu z uHLC parametr HLCr ma większą wartość prognostyczną, ponieważ pozostaje niezaburzony przez czynniki wpływające na stężenie białka monoklonalnego czy immunoglobulin niemonoklonalnych w surowicy. Do czynników tych należą m.in. zmiany hematokrytu/objętości osocza (stężenie immunoglobulin może ulec zmianie nawet ponad 50% niezależnie od nasilenia produkcji białka monoklonalnego przez komórki nowotworowe), obieg immunoglobulin (wychwyt receptorowy zależny od stężenia – dotyczy IgG oraz IgA) [5,10,24-26]. Zatem sama zmiana stężenia immunoglobuliny monoklonlnej nie musi świadczyć o zmianie produkcji immunoglobuliny przez komórki nowotworowe, w związku z czym wyjściowe stężenie białka monoklonalnego nie ma wartości prognostycznej [27]. Szpiczaka plazmocytowego IgA i IgM cechuje większa produkcja białka monoklonalnego o krótszym okresie półtrwania niż w szpiczaku IgG, przez co dochodzi do bardziej nasilonej supresji produkcji immunoglobuliny poliklonalnej. Przekłada się to na większe nieprawidłowości w zakresie HLCr (przy jednakowych stężeniach białek monoklonalnych IgA/IgM/IgG) i na większą czułość testów HLC w ocenie ilościowej białka monoklonalnego IgA i IgM niż IgG [5].

Monitorowanie choroby

W związku z wprowadzeniem wielolekowej terapii, zwłaszcza w skojarzeniu z autologicznym przeszczepieniem komórek macierzystych (ang. autologous stem-cell transplantation – ASCT), konsolidacją oraz przedłużonym leczeniem podtrzymującym, nawet 50% pacjentów osiągało remisję całkowitą tradycyjnie definiowaną (ocena stężenia białka monoklonalnego w surowicy i moczu za pomocą elektroforezy lub/i immunofiksacji) [28-31]. Jednakże mimo to zwykle dochodziło do nawrotu choroby, co wskazywało na stale obecną chorobę, której nie wykrywano rekomendowanymi dotychczas narzędziami diagnostycznymi. Zaistniała więc potrzeba wykorzystania nowych technik pozwalających na wykrycie minimalnej choroby resztkowej poza obecnie uznawanymi kryteriami odpowiedzi.

W większości przypadków odpowiedź na leczenie oceniana metodą Hevylite™ pokrywa się z wynikami oznaczeń metodami konwencjonalnymi (SPE, IFE, oznaczenie całkowitego stężenia immunoglobulin w danych klasach metodą nefelometrii). Niekiedy jednak analiza HLC dostarcza dodatkowej czułości. Testy te bowiem oprócz informacji o pozostałych wydzielających klonach komórek plazmatycznych dostarczają istotną wiedzę o stanie układu immunologicznego (normalizacja HLCr sugeruje dokładniejszą eradykację klonu i odtworzenie populacji prawidłowych komórek plazmatycznych, co świadczy o braku negatywnego wpływu zastosowanego leczenia na status immunologiczny) [1]. W dostępnej literaturze [9,32,33] opisywano przypadki prawidłowego HLCr u osób z bardzo dobrą częściową remisją (ang. very good partial response – VGPR) lub prawie całkowitą remisją (ang. near complete response – nCR). Rozbieżności między HLC a IFE mogą wynikać z odbudowy puli immunoglobulin poliklonalnych, mającej swoje odzwierciedlenie w normalizacji HLCr, mimo obecności immunoglobuliny monoklonalnej w niewielkim stężeniu. Obserwowana normalizacja HLCr to dobry czynnik predykcyjny, nawet przy dodatnim wyniku IFE – w przypadku szpiczaka IgG niewielkie ilości immunoglobuliny monoklonalnej mogą być obecne nawet po zwalczeniu komórek szpiczaka ze względu na wydłużony okres półtrwania związany z obrotem z wykorzystaniem receptorów FcRn. Wówczas wynik IFE może być dodatni, a HLCr pozostaje w normie. HLCr nie zależy bowiem od obrotu immunoglobulin, dlatego też wykazuje większą niż IFE zgodność z wynikami cytometrii przepływowej [34]. Jednakże, by możliwe było sformułowanie ostatecznych wniosków na temat HLC, należy zgromadzić większą ilość danych – zwłaszcza w grupie pacjentów, którzy osiągnęli remisję całkowitą.

Ewolucja klonalna

Kolejnym aspektem ważnym z punktu widzenia przebiegu szpiczaka plazmocytowego jest ewolucja klonalna. Wyjściowy klon może pozostać jako jedyny, ale prawdopodobnie częściej dochodzi do powstania subklonów produkujących odmienne niż początkowo białka monoklonalne [35].

Nowe subklony mogą produkować łańcuchy lekkie lub kompletne immunoglobuliny, dlatego testy HLC (obok FLC) stanowią źródło dodatkowych informacji o zmianie klonalnej.

Poniżej przedstawiono najważniejsze potencjalne zastosowania testów Hevylite™.

Gammapatia monoklonalna o niezdefiniowanym znaczeniu

Gammapatia monoklonalna o niezdefiniowanym znaczeniu (ang. monoclonal gammapathy of undetermined significance – MGUS) stanowi ok. 50% wszystkich dyskrazji plazmocytowych. Po wielu latach bezobjawowego przebiegu może przejść w MM lub inną chorobę limfoproliferacyjną [36-40]. Ryzyko progresji wynosi ok. 1%/rok [41]. Wyróżnienie pacjentów ze zwiększonym ryzykiem progresji MGUS do szpiczaka plazmocytowego w momencie stawiania diagnozy jest trudne. Różnicowanie MM ze stanami prekursorowymi opiera się na manifestacji uszkodzenia narządów, a nie na wynikach laboratoryjnych czy histopatologii [2] Typowo pacjenci z MGUS udają się do hematologów w obliczu narastającego stężenia białka M w elektroforezie, kiedy cechy kliniczne charakterystyczne dla MM (np. niedokrwistość, hiperkalcemia, ból kostny, zmiany lityczne w układzie kostnym w badaniach obrazowych, uszkodzenie nerek) są już obserwowane. Takie monitorowanie choroby nie pozwala na identyfikację pacjentów obarczonych wyjściowo największym ryzykiem progresji, a co za tym idzie – nie jest możliwa optymalizacja badań kontrolnych [42].

Podstawowa stratyfikacja ryzyka rekomendowana u wszystkich pacjentów z MGUS opiera się na 3 czynnikach – stosunku stężeń łańcuchów lekkich κ/λ (nieprawidłowy FLCr), wielkości piku M w SPE (stężenie białka monoklonalnego w surowicy ≥15 g/L) oraz rodzaju łańcucha ciężkiego w białku monoklonalnym (typ IgA lub IgM) [43]. Rozszerzona stratyfikacja ryzyka, zaproponowana przez Katzmanna i wsp. [44], obejmuje nowy biomarker – supresję immunoglobuliny niemonoklonalnej uHLC (Tab. II). Im silniej wyrażona supresja, tym większe ryzyko progresji. W jednej z prac prezentowanych na zjeździe Amerykańskiego Towarzystwa Hematologicznego w 2016 roku wykazano, iż supresja immunoglobuliny niemonoklonalnej >50% jest czynnikiem prognostycznym progresji MGUS o znacznie większej wartości predykcyjnej niż klasyczna immunopareza (supresja immunoglobulin klas odmiennych od klasy białka monoklonalnego) [45]. Dowiedziono, iż w przypadku MGUS IgG nieprawidłowości dotyczą w większym stopniu supresji izotypowo specyficznej niż immunoparezy, natomiast w MGUS IgA supresja izotypowo specyficzna była obserwowana na podobnym poziomie jak immunopareza w grupie pacjentów ze zwiększonym ryzykiem progresji [21]. Co więcej, niektóre badania wskazują, że immunopareza w ogóle nie stanowi czynnika prognostycznego progresji MGUS [2,46].

Testy Hevylite™ umożliwiają dokładne oznaczenie ilościowe poszczególnych izotypów immunoglobulin, przez co możliwe jest wykazanie supresji immunoglobuliny uHLC np. supresja IgGλ u pacjenta z MGUS IgGκ. W analizie regresji wielu zmiennych supresja ta stanowi czynnik ryzyka progresji MGUS do MM, niezależnie od stężenia białka M w SPE, typu łańcucha ciężkiego czy wyniku FLCr [44]. Opisana wyżej supresja białka niemonoklonalnego pojawia się wiele lat (średnio 10 lat) przed manifestacją kliniczną i progresją MGUS do MM. Co ciekawe, różne klony wykazują różny potencjał supresji produkcji immunoglobuliny niemonoklonalnej – klony plazmocytów produkujące białko monoklonalne IgG powodują znacznie silniejszą selektywną supresję produkcji niemonoklonalnej IgG niż supresję produkcji IgA czy IgM [42,44].

Tabela II

Supresja izotypowo specyficzna jako niezależny czynnik ryzyka progresji MGUS do MM. Źródło: Katzmann Leukemia 2013;27:208-212. Dzięki uprzejmości The Binding Site®.

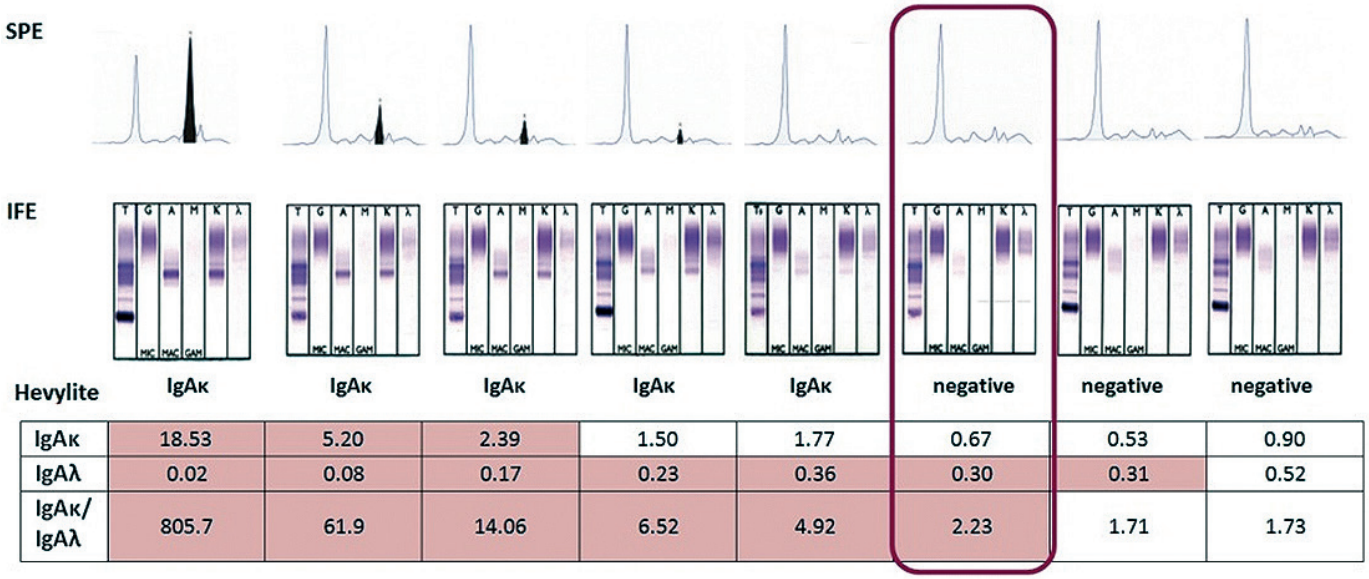
HLC-pair supression as an independent risk factor for progression. Adapted from: Katzmann Leukemia 2013;27:208-212. Reprinted by permission from The Binding Site®.

Czynnik ryzyka	Hazard Ratio	P-value
1. Stężenie białka monoklonalnego ≥15 g/L	2.3	<0.001
2. Izotyp IgA i IgM	2.7	<0.001
3. Nieprawidłowa wartość FLCr	2.0	0.007
4. Supresja izotypowo specyficzna	1.8	0.018

Dotychczasowe badania naukowe dowodzą, że testy Freelite™ i Hevylite™ łącznie zastosowane w momencie diagnozy pozwalają na optymalną ocenę ryzyka u pacjentów z MGUS [42]. Supresja uHLC stanowi niezależny czynnik ryzyka progresji MGUS do MM [42,44]. Należy jeszcze zbadać, czy parametr ten może być wykorzystywany jako wczesny czynnik predykcyjny rozwoju szpiczaka.

Choroba resztkowa

Ocena choroby resztkowej (ang. minimal residual disease – MRD) stanowi istotny biomarker ryzyka nawrotu choroby. Wprowadzenie nowoczesnych metod leczenia chorych na szpiczaka plazmocytowego (zwłaszcza wysokodawkowanej chemioterapii wspomaganej ASCT) wiąże się z koniecznością poszukiwania udoskonalonych technik monitorowania choroby, bowiem określenie całkowitej remisji MM klasycznymi metodami jest niewystarczające



Rycina 2

Rola Hevylite™ w wykrywaniu choroby resztkowej. Źródło: Ludwig Leukemia 2013; 27: 213-219. Dzięki uprzejmości Macmillan Publishers Ltd: Leukemia © 2013.

Hevylite™ in detection of minimal residual disease. Adapted from: Ludwig Leukemia 2013;27:213-9. Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Leukemia © 2013.

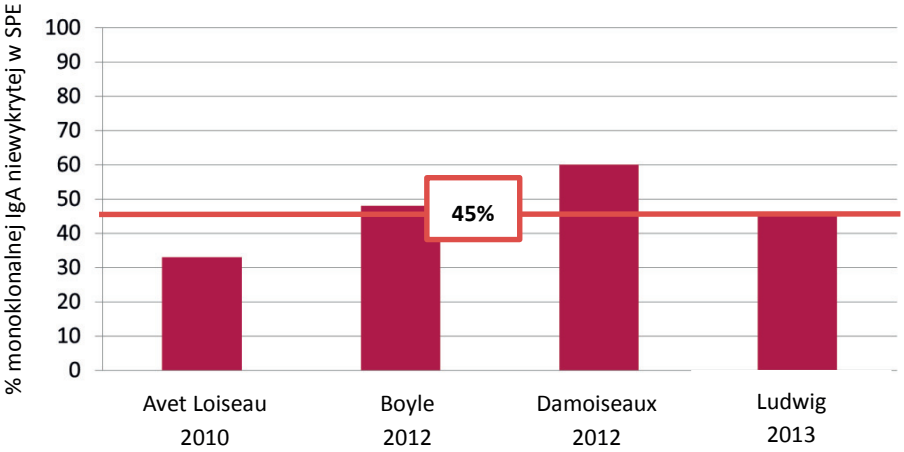
ze względu na ich zbyt małą czułość. Próg wykrywalności komórek nowotworowych za pomocą technik cytomorfologicznych wynosi 15%. W przypadku leczenia przeszczepianiem autologicznych komórek macierzystych (ASCT) istotne jest określenie stopnia zanieczyszczenia materiału przeszczepowego komórkami nowotworowymi. Pożądana czułość technik oceniających MRD wynosi co najmniej 10^{-3} komórek (1 komórka nowotworowa na 1000 prawidłowych) [47]. Obecnie najczęściej do oceny MRD stosuje się fenotypowanie komórek za pomocą cytometrii przepływowej (ang. multiparameter flow cytometry – MFC) oraz PCR w oparciu o oligonukleotydy allelo-specyficzne (ang. allele-specific oligonucleotide – (ASO-qPCR)), a także sekwencjonowanie nowej generacji (sekwencji VDJ), co przyczynia się do poprawy detekcji komórek szpiczakowych [48-52].

W jednej z prac przedstawionych na Zjeździe Amerykańskiego Towarzystwa Hematologicznego w 2016 roku wykazano po raz pierwszy, iż normalizacja zarówno HLCr jak i FLCr stanowi użyteczny marker zastępczy negatywnego wyniku cytometrii przepływowej [53]. Jednakże z uwagi na małą próbę badawczą ocenianą w niniejszej pracy, potrzebne są dalsze badania. Dotychczas przeprowadzone badania wskazują, iż dzięki wysokiej czułości testy Hevylite™ pozwalają wykryć chorobę resztkową w przypadkach sklasyfikowanych na podstawie konwencjonalnych testów (SPE, nefelometria, IFE) jako remisja całkowita (ang. complete response – CR) [9] (Ryc. 2), natomiast negatywny wynik oceny MRD wg. kryteriów IMWG w połączeniu z prawidłowym stosunkiem HLCr stanowi złożony punkt końcowy odzwierciedlający eradykację nowotworowych komórek plazmatycznych i odbudowę prawidłowej populacji plazmocytów do aktualnie dostępnego poziomu detekcji [54].

Bradwell i wsp. [5] wykazali, że niekiedy HLC jest mniej czułe niż IFE i SPE. Autorzy tłumaczą jednak, iż niskie stężenie białka monoklonalnego wykryte metodami konwencjonalnymi przy prawidłowym wyniku HLCr i FLCr świadczy prawdopodobnie o niskim ryzyku klinicznym. Niezależnie od dodatniego wyniku IFE, HLCr w zakresie normy to czynnik predykcyjny dobrej odpowiedzi na leczenie (spadek białka monoklonalnego przy wzroście stężenia poliklonalnej immunoglobuliny). Natomiast konwersja prawidłowego HLCr do wartości nieprawidłowych to czynnik prognostyczny zbliżającego się nawrotu choroby (tygodnie-miesiące przed nieprawidłowościami obserwowanymi w tradycyjnych metodach diagnostycznych) [5,9]. Dzięki testom Hevylite™ możliwe jest zatem wczesne wykrycie nawrotu choroby i śledzenie odpowiedzi na leczenie (niszczenie komórek nowotworowych vs toksyczny wpływ na komórki nienowotworowe/odbudowa populacji komórek nienowotworowych) [5].

Szpiczak plazmocytowy IgA

Pacjenci chorujący na szpiczaka plazmocytowego IgA (21-25% gamapatii monoklonalnych) [1] mają krótsze przeżycia



Rycina 3

Ograniczenia elektroforezy. Na podstawie: Avet Loiseau Hematology Reports 2010; 2: G72a; Boyle Blood 2012; 120: 3970a; Damoiseaux NVVI 2012; Ludwig Leukemia 2013; 27: 213-219. Dzięki uprzejmości The Binding Site®.

Limitations of electrophoresis. Adapted from: Avet Loiseau Hematology Reports 2010;2:G72a; Boyle Blood 2012;120:3970a; Damoiseaux NVVI 2012; Ludwig Leukemia 2013; 27: 213-219. Reprinted by permission from The Binding Site®.

niż w przypadku szpiczaka IgG [22]. Nadzieją na ulepszenie postępowania z tymi pacjentami jest poprawa dokładności oznaczeń immunoglobuliny monoklonalnej IgA, której detekcja metodami tradycyjnymi wiąże się z wieloma ograniczeniami. W SPE białko monoklonalne IgA wykazuje podobną ruchliwość elektroforetyczną (migracja w region β) jak inne białka występujące fizjologicznie w surowicy (m.in. transferyna, białko C3 komplementu), w związku z czym obraz SPE może być mniej czytelny – zwłaszcza przy niskich stężeniach białka monoklonalnego [12,15]. Badania naukowe [9,13] wskazują, że nawet ponad 40% monoklonalnych immunoglobulin IgA nie jest mierzalne za pomocą SPE (Ryc. 3.). Jako uzupełnienie SPE zaleca się oznaczenie całkowitego stężenia IgA metodą nefelometryczną [55]. Na uwadze jednak należy mieć fakt, iż pomiar całkowitego stężenia IgA nie dostarcza informacji na temat klonalności białka. Wówczas jako metodę jakościową należy zastosować IFE. Niektóre laboratoria stosują zasadę, że przy stężeniu białek migrujących w region β <20 g/L, nie jest możliwe jednoznaczne oznaczenie białka monoklonalnego z tego regionu w SPE i należy posłużyć się IFE. Przyjmując taką strategię, IFE byłoby wykonywane aż w 95% przypadków MM IgA w ocenie odpowiedzi na zastosowane leczenie [12]. Monitorowanie pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym IgA z użyciem metod konwencjonalnych wymaga zatem kombinacji trzech technik (SPE, IFE i oznaczenia całkowitego IgA w nefelometrii) [7,54].

Katzmann i wsp. wykazali, iż testy Hevylite™, pozwalające na technicznie proste, dokładne oznaczenie ilościowe, stanowią cenne narzędzie, mogące zastąpić powyższy panel badań [12]. W testach tych uzyskuje się niezależne wyniki stężeń IgAκ i IgAλ. Klonalność oceniana jest za pomocą parametru HLCr. Testy Hevylite™ IgA są bardziej czułe niż SPE i dostarczają powtarzalnych wyników w zakresie oceny stężenia immunoglobuliny monoklonalnej i niemonoklonalnej [7]. Największe znaczenie mają w przypadku przemieszczania się białka monoklonalnego IgA z białkami osocza w SPE, uniemożliwiającego właściwą detekcję w pomiarach densytometrycznych [7]. Z tego względu choć na chwilę obecną nie ma jasnych wytycznych uwzględniających testy Hevylite™ w rutynowej diagnostyce i monitorowaniu szpiczaka prawdopodobnie będzie coraz częściej wykorzystywane. Kompleksowe badania naukowe nad użyciem Hevylite™ IgA w warunkach laboratoriów klinicznych potwierdziły zadowalającą stabilność, zmienność wewnętrz- i międzyseryjną, liniowość i dokładność metody [13].

Evans i wsp. przeprowadzili badanie mające na celu walidację testów Hevylite™ w ocenie odpowiedzi na leczenie [11]. Sumaryczne stężenie izotypów IgA oznaczonych metodą HLC koreluje z całkowitym stężeniem immunoglobuliny tej klasy oznaczonej metodą nefelometryczną [7,13]. Nieprawidłowy stosunek HLCr obserwowany jest w momencie diagnozy u ok. 97% pacjentów ze szpiczakiem IgA [12,13]. W razie progresji choroby obserwuje się rosnące stężenie białka monoklonalnego i spadek niemonoklonalnej immunoglobuliny, co ma przełożenie na nieprawidłowy wynik HLCr, stanowiący czynnik predykcyjny krótszego przeżycia wolnego od progresji [10]. Konwersja prawidłowego HLCr do wartości nieprawidłowych świadczy o zbliżającym się nawrocie choroby [7].

Testy HLC powinny być wzięte pod uwagę w monitorowaniu wszystkich pacjentów z białkiem monoklonalnym IgA [11]. Wynik oznaczenia jest prosty do interpretacji, a analiza ilościowa białka monoklonalnego jest powtarzalna, precyzyjna- nawet w przypadkach niskiego stężenia (<10 g/L) immunoglobuliny monoklonalnej, dzięki czemu nie zachodzi konieczność przeprowadzania dodatkowych badań laboratoryjnych [7,11].

Choć ostatnie odkrycia w zakresie diagnostyki szpiczaka plazmocytowego i przypuszczalne mechanizmy leżące u ich

podstaw są fascynujące z punktu widzenia biologii choroby, potrzeba więcej danych przed ostatecznym wdrożeniem nowych metod do codziennego użytku klinicznego.

Piśmiennictwo

1. Szpiczak plazmocytowy i inne dyskrazje plazmocytowe, **pod red. Dmoszyńska A, Giannopoulos K**. Wydawnictwo Czelej, Lublin, 2015, ISBN: 978-83-7563-205-7
2. **Kyle RA, Rajkumar SV**: Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. Leukemia 2009; 23: 3-9.
3. Serum Free Light Chain Analysis plus Hevylite. The Binding Site Group Ltd, Birmingham, 2015. ISBN: 978-0-9932196-0-3
4. **Keren DF**. Heavy/Light-chain analysis of monoclonal gammapathies. Clin Chem. 2009; 55: 1606-1608.
5. **Bradwell AR, Harding SJ, Fourrier NJ, Wallis GL, Drayson MT. et al**: Assessment of monoclonal gammopathies by nephelometric measurement of individual immunoglobulin kappa/lambda ratios. Clin Chem. 2009; 55: 1646-1655.
6. **Kraj M:** Immunoglobulin heavy chain/light chain pairs (HLC, Hevylite™) assays for diagnosing and monitoring monoclonal gammopathies. Adv Clin Exp Med. 2014; 23: 127-133.
7. **Lakomy D, Lemaire-Ewing S, Denimal D, Bastie JN, Lafon I, Caillot D**: Evaluation of the new Hevylite™ IgA assay for the diagnosis and follow-up of monoclonal gammopathies. Ann Biol Clin. 2013; 71: 157-163.
8. **Fouquet G, Schraen S, Faucompré JI, Karlin L, Macro M. et al**: Hevylite® to Monitor Response to Therapy in Multiple Myeloma. Blood 2014; 124:2021.
9. **Ludwig H, Milosavljevic D, Zojer N, Faint JM, Bradwell AR. et al**: Immunoglobulin heavy/light chain ratios improve paraprotein detection and monitoring, identify residual disease and correlate with survival in multiple myeloma patients. Leukemia 2013; 27: 213-219.
10. **Bradwell A, Harding S, Fourrier N, Mathiot C, Attal M. et al**: Prognostic utility of intact immunoglobulin Ig'κ/Ig'λ ratios in multiple myeloma patients. Leukemia. 2013; 27: 202-207.
11. **Evans JA, Jenner EL, Carr Smith HD, Berlanga O, Harding SJ**: Quantification of β-region IgA monoclonal proteins - should we include immunochemical Hevylite® measurements? Clin Chem Lab Med. 2016; 54: 1053-1057.
12. **Katzmann JA, Willrich MA, Kohlhagen MC, Kyle RA, Murray DL. et al**: Monitoring IgA multiple myeloma: immunoglobulin heavy/light chain assays. Clin Chem. 2015; 61: 360-367.
13. **Boyle EM, Fouquet G, Guidez S, Bonnet S, Demarquette H. et al**: IgA kappa/IgA lambda heavy/light chain assessment in the management of patients with IgA myeloma. Cancer 2014; 120: 3952-3957.
14. **Donato LJ, Zeldenrust SR, Murray DL, Katzmann JA**: A 71-year-old woman with multiple myeloma status after stem cell transplantation. Clin Chem. 2011; 57: 1645-1648.
15. **Murray DL, Ryu E, Snyder MR, Katzmann JA**: Quantitation of serum monoclonal proteins: relationship between agarose gel electrophoresis and immunonephelometry. Clin Chem. 2009; 55: 1523-1529.
16. **Katzmann JA, Snyder MR, Rajkumar SV, Kyle RA, Therneau TM. et al**: Long-term biological variation of serum protein electrophoresis M-spike, urine M-spike, and monoclonal serum free light chain quantification: implications for monitoring monoclonal gammopathies. Clin Chem. 2011; 57: 1687-1692.
17. **Seetharam A, Mirbahai L, Lovatt T, Macwhannell A, Jacob A. et al**: Heavy/light chain ratios provide a rapid and sensitive alternative to IFE in identifying haematological malignancies. 13th International Myeloma Workshop, Paris 2011. Haematologica. 2011; 96: P-80.
18. **Avet-Loiseau H, Young P, Mathiot C, Attal M., Moreau P. et al**: Multiple myeloma outcome is associated with polyclonal immunoglobulin suppression of the same isotype as the tumor. 13th International Myeloma Workshop, Paris 2011. Haematologica 2011; 96: P-382.
19. **Ludwig H, Harding S, Bradley C, Milosavljevich D, Drayson MT. et al**: Abnormal Serum IgA Kappa / IgA Lambda Ratios at Maximum Response Predict Poor Progression Free Survival in Myeloma Patients. Blood 2009; 114: 4879.
20. **Wechalekar A, Faint J, Bradwell S, Lachmann H, Hawkins P. et al**: Significance of abnormal serum immunoglobulin heavy/light chain ratios (Hevylite) in 294 patients with systemic AL amyloidosis. 13th International Myeloma Workshop, Paris 2011. Haematologica 2011; 96: P-392.
21. **Katzmann J, Clark R, Dispenzieri A, Kyle L, Landgren O. et al**: Isotype-Specific Heavy/Light Chain (HLC) Suppression as a Predictor of Myeloma Development in Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance (MGUS). Blood 2009; 114: 1788.
22. **Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B. et al**: International staging system for multiple myeloma. J Clin Oncol. 2005; 23: 3412-3420.
23. **Dispenzieri A, Zhang L, Katzmann JA, Snyder M, Blood E. et al**: Appraisal of immunoglobulin free light chain as a marker of response. Blood. 2008; 111: 4908-4915.
24. **Kim J, Hayton WL, Robinson JM, Anderson CL**: Kinetics of FcRn-mediated recycling of IgG and albumin in human: pathophysiology and therapeutic implications using a simplified mechanism-based model. Clin Immunol. 2007; 122: 146-155.
25. **Akilesh S, Christianson GJ, Roopenian DC, Shaw AS**: Neonatal FcR expression in bone marrow-derived cells functions to protect serum IgG from catabolism. J Immunol. 2007; 179: 4580-4588.
26. **Wines BD, Hogarth PM**: IgA receptors in health and disease. Tissue Antigens. 2006; 68: 103-14.
27. **Durie BG, Jacobson J, Barlogie B, Crowley J**: Magnitude of response with myeloma frontline therapy does not predict outcome: importance of time to progression in southwest oncology group chemotherapy trials. J Clin Oncol. 2004; 22: 1857-1863.
28. **Attal M, Lauwers-Cances V, Marit G, Caillot.D, Moreau P. et al**: Lenalidomide maintenance after stem-cell transplantation for multiple myeloma. N Engl J Med. 2012; 366: 1782-1791.
29. **McCarthy PL, Owzar K, Hofmeister CC, Hurd DD, Hassoun H. et al**: Lenalidomide after stem--cell transplantation for multiple myeloma. N Engl J Med. 2012; 366: 1770-1781.
30. **Jakubowiak AJ, Dytfeld D, Griffi th KA, Lebovic D, Vesole DH. et al**: A phase 1/2 study of carfilzomib in combination with lenalidomide and low-dose dexamethasone as a frontline treatment for multiple myeloma. Blood 2012; 120: 1801-1809.
31. **Kumar S, Flinn I, Richardson PG, Hari P, Callander N. et al**: Randomized, multicenter, phase 2 study (EVOLUTION) of combinations of bortezomib, dexamethasone, cyclophosphamide, and lenalidomide in previously untreated multiple myeloma. Blood 2012; 119: 4375-4382.
32. **Michallet M, Chapuis-Cellier C, Dejoie T, Lombard C, Caillon H. et al**: Heavy+light chain monitoring correlates with clinical outcome in multiple myeloma patients. Leukemia 2017; doi: 10.1038/leu.2017.209.
33. **Batinić J, Perić Z, Šegulja D, Last J, Prijić S. et al**: Immunoglobulin heavy/light chain analysis enhances the detection of residual disease and monitoring of multiple myeloma patients. Croat Med J. 2015; 56: 263-271.
34. **Matsue K, Suehara Y, Fukumoto K, Fujisawa M, Takeuchi M. et al**: Heavy/Light Chain Analysis for Response Monitoring in Multiple Myeloma Patients: Comparisons With Immunofixation, Serum Free Light Chain, and Multicolor Flow-Cytometry Analysis. Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2015; 15: PO-015.
35. **Fernández de Larrea C, Tovar N, Cibeira MT, Aróstegui JI, Rosiñol L. et al**: Emergence of oligoclonal bands in patients with multiple myeloma in complete remission after induction chemotherapy: association with the use of novel agents. Haematologica 2011; 96: 171-173.
36. Choroby wewnętrzne. pod red. **Szczeklik A**. Medycyna Praktyczna, Kraków, 2016. ISBN: 978-83-7430-489-4.
37. **van de Donk NW, Palumbo A, Johnsen HE, Engelhardt M, Gay F. et al**: The clinical relevance and management of monoclonal gammopathy of undetermined significance and related disorders: recommendations from the European Myeloma Network. Haematologica. 2014; 99: 984-996.
38. **Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Larson DR, Plevak MF. et al**: Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. N Engl J Med. 2006; 354: 1362-1369.
39. **Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, Katzmann JA, Caporaso NE. et al**: Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. Blood 2009; 113: 5412-5417.
40. **Weiss BM, Abadie J, Verma P, Howard RS, Kuehl WM**: A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. Blood 2009; 113: 5418-5422.
41. **Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR. et al**: A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. N Engl J Med. 2002; 346: 564-569.
42. **Katzmann JA, Rajkumar SV**. A window into immunoglobulin quantitation and plasma cell disease: antigen epitopes defined by the junction of immunoglobulin heavy and light chains. Leukemia 2013; 27: 1-2.
43. **Rajkumar SV, Kyle RA, Therneau TM, Melton LJ 3rd, Bradwell AR. et al**: Serum free light chain ratio is an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. Blood 2005; 106: 812-817.
44. **Katzmann JA, Clark R, Kyle RA, Larson DR, Therneau TM. et al**: Suppression of uninvolved immunoglobulins defined by heavy/light chain pair suppression is a risk factor for progression of MGUS. Leukemia 2013; 27: 208-212.
45. **Jiménez J, Pais TM, Barbosa N, Campos L, Peñalver MA, de Larramendi CH**: Severe Isotype-Matched Immunosuppression By Hevylite® Is Predictive of Shorter Time to Progression in MGUS Patients. 58th ASH Annual Meeting and Exposition, San Diego, December, 2016.
46. **Pérez-Persona E, Vidriales MB, Mateo G, García-Sanz R, Mateos MV. et al**: New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. Blood 2007; 110: 2586-2592.
47. **Rokicka M, Torosian T**: Badanie choroby resztkowej u chorych na szpiczaka mnogiego. Cz. I. Bada-

nie za pomocą cytometrii przepływowej. Postępy Biologii Komórki 2005; 32: 273-280.

48. **Paiva B, Vidriales MB, Cervero J, Mateo G, Pérez JJ. et al**: Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation. Blood 2008; 112: 4017-4023.
49. **Rawstron AC, Child JA, de Tute RM, Davies FE, Gregory WM. et al**: Minimal residual disease assessed by multiparameter flow cytometry in multiple myeloma: impact on outcome in the Medical Research Council Myeloma IX Study. J Clin Oncol. 2013; 31: 2540-2547.
50. **Puig N, Sarasquete ME, Balanzategui A, Martínez J, Paiva B. et al**: Critical evaluation of ASO RQ-PCR for minimal residual disease evaluation in multiple myeloma. A comparative analysis with flow cytometry. Leukemia 2014; 28: 391-397.
51. **Puig N, Sarasquete ME, Alcoceba M, Balanzategui A, Chillón MC. et al**: Kappa deleting element as an alternative molecular target for minimal residual disease assessment by real-time quantitative PCR in patients with multiple myeloma. Eur J Haematol. 2012; 89: 328-335.
52. **Sarasquete ME, García-Sanz R, Gonzalez D, Martínez J, Mateo G. et al**: Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometry. Haematologica. 2005; 90: 1365-1372.
53. **Campbell L, Panitsas F, Basu S, Anyanu F, Lee S. et al**: Hevylite and Freelite Normalisation Is a Surrogate Marker for MRD Negativity Post--ASCT. 58th ASH Annual Meeting and Exposition, San Diego, December, 2016.
54. **Kumar S, Paiva B, Anderson KC, Durie B, Landgren O. et al**: International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. Lancet Oncol. 2016; 17: e328-e346.
55. **Dimopoulos M, Kyle R, Fermand JP, Rajkumar SV, San Miguel J. et al**: Consensus recommendations for standard investigative workup: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 3. Blood 2011; 117: 4701-4705.