

# OBSAH

<b>1. Předmluva</b>	4
<b>2. Abstrakt disertační práce</b>	7
<b>Abstract of the dissertation</b>	8
<b>3. Cíle disertační práce</b>	9
<b>4. Úvod do problematiky</b>	10
Monoklonální gamapatie - obecné poznatky	10
Základní rozdělení a charakteristika jednotlivých typů monoklonálních gamapatií	12
4.1. Monoklonální gamapatie nejasného významu - MGUS	12
4.1.1. Epidemiologie MGUS	12
4.1.2. Etiologie a patogeneze	13
4.1.3. Prevalence MGUS	14
4.1.4. Diagnostika MGUS	14
4.1.5. Klinický průběh	16
4.1.6. Prognostické faktory, monitorování aktivity monoklonálních gamapatií	17
4.2. Maligní monoklonální gamapatie	20
<b>5. Přehled základních laboratorních metod využívaných v rámci diagnostiky monoklonálních gamapatií a jejich úskalí</b>	24
5.1. Elektroforéza sérových bílkovin (ELFO)	24
5.2. Imunofixační elektroforéza bílkovin séra i moči	26
5.3. Kvantitativní stanovení polyklonálních IgG, IgA a IgM, imunoparéza	28
5.4. Další laboratorní vyšetření potřebná pro diagnostiku monoklonálních gamapatií, principy metod a referenční meze	31
5.4.1. Stanovení celkové bílkoviny v séru	33
5.4.2. Stanovení celkové bílkoviny v moči	34
5.4.3. Stanovení albuminu v séru	35
5.4.4. Stanovení beta2-mikroglobulinu v séru	36
5.4.5. Stanovení kreatininu v séru	36
5.4.6. Vyšetření glomerulární filtrace	36
5.4.7. Stanovení koncentrace vápníku v séru	37
5.5. Kontrolní systém SEKK a standardizace základních biochemických parametrů a prognostických ukazatelů v diagnostice monoklonálních gamapatií	37

<b>6. Nové směry v diagnostice monoklonálních gamapatií</b>	40
6.1. Stanovení koncentrace FLC v séru	40
6.2. Imunofenotypizační vyšetření	44
6.3. Vyšetření genomu	45
<b>7. Vlastní laboratorní diagnostika MGUS</b>	47
7.1. Způsob získávání dat a statistické metody zpracování dat	47
7.2. Detekce MIG při elektroforetickém vyšetření bílkovin a příklady vlastních pozorování	47
7.2.1. Příklady detekce MIG v oblasti beta-globulinů	48
7.2.2. Biklonální (zdvojené) monoklonální gamapatie	50
7.2.3. Triklonální monoklonální gamapatie	52
7.2.4. Tranzientní (přechodné) paraproteinémie	53
7.3. Základní charakteristiky analyzovaného souboru pacientů s MGUS	57
7.4. Základní rozdělení sledovaného souboru nemocných s MGUS	61
7.5. Frekvence progresu sledovaných pacientů s MGUS do maligní monoklonální gamapatie v definovaném časovém úseku	64
<b>8. Zajímavé kazuistiky pacientů s monoklonální gamapatií - vlastní pozorování</b>	67
8.1. Význam dlouhodobého sledování pacientů s MGUS	67
8.2. Příklady pozdní diagnostiky mnohočetného myelomu – kazuistiky	70
8.3. Interference monoklonálních imunoglobulinů při stanovení některých analytů	78
8.3.1. Interference MIG při stanovení bilirubinu	79
8.3.2. Interference MIG při stanovení glykovaného hemoglobinu	80
<b>9. Doporučení pro laboratorní diagnostiku a sledování nemocných s MGUS a pro stratifikaci rizika přechodu v mnohočetný myelom</b>	83
<b>10. Diskuse</b>	84
<b>11. Závěry</b>	87
<b>Summary</b>	88
<b>12. Literatura</b>	90
<b>13. Přehled tabulek, grafů a obrazové dokumentace</b>	100
13.1. Tabulky	100
13.2. Grafy	101
13.3. Obrázky	101
<b>14. Přehled použitých zkratk a symbolů</b>	103
<b>15. Přehled dosavadní publikační činnosti</b>	105

## 1. Předmluva

Monoklonální gamapatie nejasného (neurčeného) významu – tzv. MGUS (monoclonal gammopathy of undetermined significance) je definována jako klinicky němý, bezpříznakový stav, při kterém nejsou splněna diagnostická kritéria mnohočetného myelomu (MM), Waldenströmovy makroglobulinémie, AL-amyloidózy nebo jiného zhoubného lymfoproliferativního onemocnění. Jedná se v podstatě o laboratorní nález, jehož pojmenování zavedl a základní charakteristiky popsal profesor Robert A. Kyle z Mayo kliniky v USA v roce 1978 (1). Monoklonální gamapatie (paraproteinémie) přitom mají dnes již více než 150letou historii. Od první analýzy moče nemocného s mnohočetným myelomem v roce 1847 Henry Bence Jonesem, přes první klinický popis mnohočetného myelomu prof. Otto Kahlerem, měl zásadní význam v poznacích o monoklonálních gamapatiích rozvoj laboratorních metod v 30. letech minulého století, a to zejména elektroforetických a imunochemických, který vedl až k současným úspěchům laboratorní diagnostiky a následné včasné terapie (2,3). Právě biochemické vyšetření je dosud základem laboratorní diagnostiky monoklonálních gamapatií.

Monoklonální gamapatie nejasného významu je nejčastější monoklonální gamapatií. Je řazena mezi prekancerózy vzhledem k jejímu možnému vývoji do obrazu maligní lymfoproliferace. Každý pacient s MGUS by proto měl být pravidelně sledován. Narůstající incidence monoklonálních gamapatií včetně té nejzávažnější z nich, kterou je mnohočetný myelom, je patrná z dostupných dat Národního onkologického registru (viz Obrázek č. 1).

Přitom právě ve východních Čechách, konkrétně v okresech Hradec Králové, Jičín a Trutnov, byla zaznamenána jedna z nejvyšších frekvencí výskytu maligních lymfoproliferací v rámci České republiky (viz Obrázek č. 2). Incidenci mnohočetného myelomu v jednotlivých krajích České republiky znázorňuje Graf č.1. Tato skutečnost a fakt, že každému MM dle novějších poznatků předchází bezpříznaková fáze MGUS (4,5,6), mne proto přivedla k dlouhodobému sledování nemocných s MGUS diagnostikovaných v naší regionální laboratoři. Další inspirací pro mne byl fakt, že jsem se měla možnost zapojit do spolupráce biochemických pracovišť a České myelomové skupiny (CMG) na přípravě Doporučení pro laboratorní diagnostiku a sledování nemocných s MGUS. CMG byla založena 17. dubna 1996 jako dobrovolné sdružení lékařů spolupracujících na výzkumu, diagnostice a léčbě monoklonálních gamapatií. Ve spolupráci s Českou hematologickou společností CMG pravidelně vydává Doporučené

postupy diagnostiky a léčby pacientů s mnohočetným myelomem. Prvními společnými aktivitami, na kterých jsem se mohla podílet, byly zaměřeny na standardizaci základních laboratorních vyšetření využívaných v rámci diagnostiky monoklonálních gamapatií (3). Jedním z hlavních projektů CMG je Registr monoklonálních gamapatií (RMG), jehož provoz byl zahájen 1. května 2007. Aktuálně RMG obsahuje data již více než 11 tisíc pacientů s MG, kteří jsou sledováni prostřednictvím 19 českých a 4 slovenských center léčebné péče. Jedná se tak o jednu z největších databází svého druhu na v Evropě, ale i na světě.

**Obrázek 1. Predikce epidemiologie novotvarů mízní, krvetvorné a příbuzné tkáně v ČR v letech 2018 - 2019 (Národní onkologický registr, ÚZIS ČR)**

	Incidence		Prevalence	
	Rok 2018	Rok 2019	Rok 2018	Rok 2019
Hodgkinův lymfom (HL)	290 (256; 323)	291 (256; 327)	6 283 (6 153; 6 413)	6 398 (6 266; 6 530)
Non-Hodgkinův lymfom (NHL)	1 600 (1 513; 1 688)	1 621 (1 533; 1 709)	14 430 (14 232; 14 628)	15 039 (14 837; 15 241)
B-buněčný lymfom z velkých buněk, difúzní (DLBCL)	611 (571; 653)	619 (579; 662)	4 052 (3 948; 4 158)	4 223 (4 117; 4 331)
Folikulární lymfom (FL)	284 (257; 313)	288 (261; 318)	3 026 (2 936; 3 118)	3 153 (3 061; 3 247)
Lymfom z pláštěvých buněk (MCL)	107 (91; 126)	109 (92; 128)	726 (682; 772)	757 (712; 804)
Mnohočetný myelom (MM) a plasmocytární novotvary (PN)	636 (596; 675)	648 (605; 689)	3 138 (3 046; 3 230)	3 196 (3 103; 3 289)
Mnohočetný myelom (MM)	599 (559; 641)	610 (570; 652)	2 864 (2 777; 2 954)	2 916 (2 828; 3 006)
Chronická lymfatická leukemie (CLL)	642 (575; 710)	639 (569; 709)	5 230 (5 111; 5 349)	5 305 (5 185; 5 425)
Chronická myeloidní leukemie (CML)	89 (70; 108)	88 (68; 108)	969 (918; 1 020)	985 (933; 1 037)
Akutní myeloidní leukemie (AML)	350 (313; 386)	349 (311; 386)	1 438 (1 376; 1 500)	1 462 (1 399; 1 525)
Akutní promyelocytická leukemie (PML)	19 (12; 28)	19 (12; 28)	158 (138; 180)	161 (141; 183)
Akutní lymfoblastická leukemie (ALL)	79 (64; 94)	79 (64; 94)	1 664 (1 597; 1 731)	1 669 (1 602; 1 736)
Myelodysplastické syndromy (MDS)	343 (280; 407)	350 (286; 414)	1 231 (1 173; 1 289)	1 273 (1 214; 1 332)

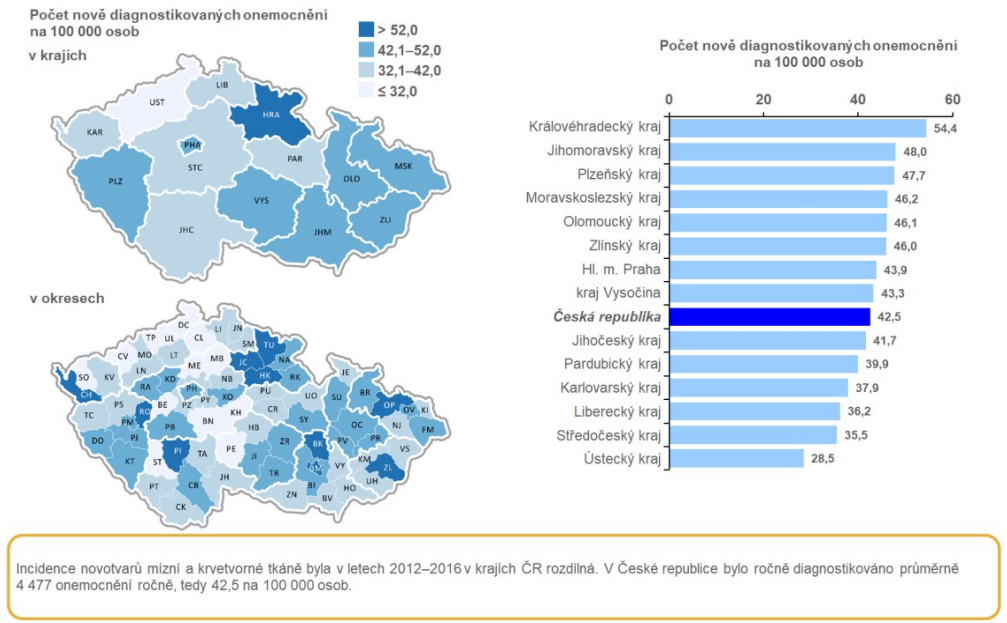
Zdroj: Národní onkologický registr, ÚZIS ČR

Pozn. v letech 2012-2016 byla průměrná incidence MM a plasmocytárních novotvarů 587

Vzorem pro přípravu mé disertační práce se stala i nedávná analýza souboru nemocných s MGUS sledovaných v rámci RMG, která byla publikována dr. Sandeckou (7,8). Mým cílem bylo srovnání výsledků této analýzy s analýzou dat získaných během 10letého sledování pacientů s MGUS v okrese Trutnov. Toto srovnání by nám tak mělo přinést odpověď na otázku, zda vyšší výskyt MM a dalších maligních lymfoproliferací v našem regionu je

způsoben vyšším výskytem pacientů s MGUS nebo vyšší frekvencí jejich transformace do obrazu maligní gamapatie.

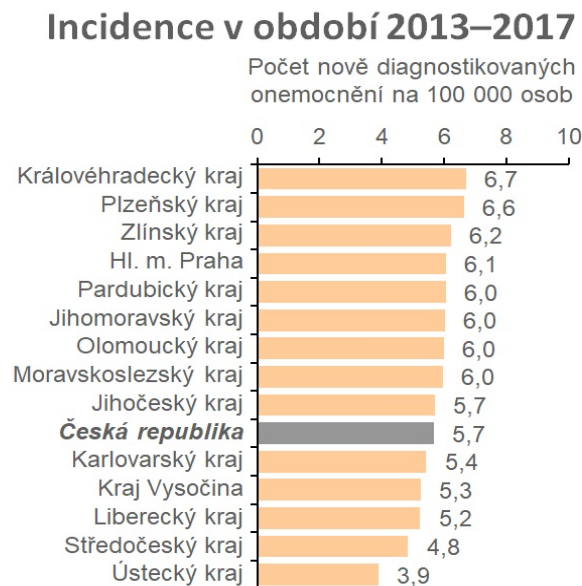
**Obrázek 2. Incidence novotvarů mízní a krvetvorné tkáně v ČR v letech 2012 – 2016 (Národní onkologický registr, ÚZIS ČR)**



Zdroj: Národní onkologický registr, ÚZIS ČR



**Graf 1. Incidence mnohočetného myelomu v jednotlivých krajích ČR (Národní onkologický registr, ÚZIS ČR)**



## 2. Abstrakt disertační práce

**Úvod:** Monoklonální gamapatie jsou relativně častým nálezem při vyšetření elektroforézy bílkovin. Poměrně nedávno byl potvrzen fakt, že mnohočetnému myelomu vždy předchází fáze monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS) a jedná se tak vlastně o prekancerózu. Jako významný prognostický faktor maligní transformace MGUS se v posledních letech osvědčilo stanovení volných lehkých řetězců v séru, zejména jejich vzájemného poměru.

**Pacienti a metody:** Disertační práce přináší výsledky analýzy 10letého sledování vlastního souboru 555 nemocných s MGUS. Hlavními laboratorními parametry sledovanými v rámci diagnostiky a prognózy byly koncentrace a typ monoklonálního imunoglobulinu, albuminu a beta2-mikroglobulinu. Nově byl diagnostický panel u MG rozšířen o stanovení volných lehkých řetězců v séru. Pro analýzu dat byl použit program SigmaPlot 12.0.

**Výsledky:** Medián věku sledovaných osob byl 69 let, přičemž věkové rozpětí se pohybovalo od 24 do 96 let, zastoupení mužů a žen bylo téměř rovnoměrné. Nejčastěji pozorovaným typem monoklonálního imunoglobulinu byl typ IgG, který byl zaznamenán v 67,9% případů. Nejpočetnější byla skupina nemocných s kvantitou MIG do 5 g/L, která tvořila 60,7% případů. U 16,4 % (91/555) sledovaných osob s MGUS došlo v průběhu sledování k transformaci do maligního onemocnění, nejčastěji, celkem v 8,3% (46 pacientů) do mnohočetného myelomu. Celkové riziko maligní transformace v námi sledovaném souboru bylo 1,6% případů ročně.

**Shrnutí:** Na vlastním souboru nemocných jsme ověřili platnost Mayo clinic prognostického modelu pro nemocné s MGUS. Námi zjištěná frekvence maligní transformace odpovídá výsledku zjištěnému v rámci rozsáhlé analýzy České myelomové skupiny. Vyšší výskyt maligních lymfoproliferací na Trutnovsku tak musí být způsoben vyšším celkovým výskytem monoklonálních gamapatií nejasného významu v našem regionu.

## **Abstract of the dissertation**

**Introduction:** Monoclonal gammopathies are a relatively common finding in protein electrophoresis. Quite recently it has been confirmed that multiple myeloma is always preceded by a phase of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and is this is a precancerosis. In recent years, the determination of free light chains in serum, especially their ratio, has proved to be an important prognostic factor in malignant transformation.

**Patients and methods:** The dissertation brings results of analysis of 10-year follow-up of own group of 555 patients with MGUS. The main laboratory parameters monitored in the diagnosis and prognosis were the concentration and type of monoclonal immunoglobulin, albumin and beta2-microglobulin. The diagnostic panel for MG has now been extended to include the determination of free light chains in serum. SigmaPlot 12.0 was used for data analysis.

**Results:** The median age of the monitored persons was 69 years, with the age range ranging from 24 to 96 years, the representation of men and women was almost even. The most commonly observed type of monoclonal immunoglobulin was the IgG type, which was reported in 67.9% of cases. The most frequent group was patients with MIG up to 5 g / l, which represented 60.7% of cases. 16.4% (91/555) of MGUS subjects experienced malignancy during the follow-up, most frequently, a total of 8.3% (46 patients) into multiple myeloma. The overall risk of malignant transformation in the study group was 1.6% of cases per year.

**Summary:** We verified the validity of the Mayo clinic prognostic model for patients with MGUS in our own group of patients. The frequency of malignant transformation we found corresponds to the result of extensive analysis of the Czech myeloma group. The higher incidence of malignant lymphoproliferations in the Trutnov region must be due to a higher overall incidence of monoclonal gammopathies of unclear significance in our region.

### **3. Cíle disertační práce**

1. Rozšíření diagnostického panelu potřebného pro diagnostiku a sledování nemocných s monoklonálními gamapatiemi v podmínkách regionální biochemické laboratoře o stanovení volných lehkých řetězců v séru.
2. Analýza vlastního, dlouhodobě (10 let) sledovaného souboru nemocných s MGUS z Trutnovského regionu s cílem srovnání jejich výsledků s výsledky analýzy provedené na větším souboru nemocných sledovaných prostřednictvím Registru monoklonálních gamapatií České myelomové skupiny a dostupnými literárními daty.
3. Ověření významu stanovení volných lehkých řetězců a platnosti stratifikačního modelu Mayo clinic u pacientů s MGUS v praxi regionální biochemické laboratoře.
4. Formulace vlastních doporučení pro laboratorní diagnostiku a sledování pacientů s monoklonální gamapatií nejasného významu.



## 4. Úvod do problematiky

### Monoklonální gamapatie - obecné poznatky

Monoklonální gamapatie (MG) tvoří velmi heterogenní skupinu onemocnění, která je charakterizována proliferací jednoho klonu diferencovaných B-lymfocytů produkujících homogenní imunoglobulin, tzv. monoklonální imunoglobulin (M-Ig, synonyma – paraprotein, M-komponenta, M-gradient). Tento monoklonální imunoglobulin můžeme prokázat v séru a/nebo v moči. Monoklonální gamapatie můžeme také definovat jako skupinu chorob, které vznikají mutací buňky B-lymfocytární řady. Prof. Kyle z Mayo kliniky zavedl základní dělení monoklonálních gamapatií na maligní monoklonální gamapatie a monoklonální gamapatie nejasného (neurčeného významu) – tzv. MGUS (monoclonal gammopathy of undetermined significance) (1,2,3,9,10).

Monoklonální imunoglobulin (M – protein, M – komponenta, paraprotein) se může skládat jak z intaktní imunoglobulinové molekuly nebo také jen z jejích strukturálních komponent, tj. lehkých řetězců kappa či lambda, vzácněji z těžkých řetězců molekuly imunoglobulinu. Těžké řetězce patří k jedné z pěti imunoglobulinových tříd G, A, M, D nebo E. Monoklonální imunoglobulin náleží vždy k jedné imunoglobulinové třídě (Ig), k jedné podtřídě Ig a má jeden typ lehkých řetězců. Rozdíl od normálních Ig je především v homogenitě. Protilátková aktivita u většiny paraproteinů není známa, ale jednou z teorií původu monoklonálních Ig je nadměrná imunitní odpověď, která se vymkla kontrolním mechanismům (3,11,12).

V posledních letech je pozorován postupný nárůst výskytu (incidence) monoklonálních gamapatií. V naprosté většině případů průkazu monoklonální gamapatie jde o monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS), které jsou ve většině případů benigní (2,3). Nicméně se jedná o potenciálně maligní stav charakterizovaný nezhoubnou klonální proliferací plazmatických buněk secernujících monoklonální imunoglobulin (4,5,6). V případě zjištění přítomnosti monoklonálního gradientu v séru nebo v moči je tedy nutné provést další vyšetření. Stanovení volných lehkých řetězců  $\kappa$  a  $\lambda$  a jejich  $\kappa/\lambda$  indexů je dnes nezbytným doplňkovým vyšetřením u monoklonálních gamapatií (4,5,6). Poměr volných lehkých řetězců imunoglobulinu v séru společně s kvantitou a typem M-proteinu tvoří základ Mayo klasifikace umožňující stratifikaci jedinců s MGUS do 4 rizikových skupin podle míry

rizika maligní progrese (4,5,6). Dalším nepříznivým faktorem spojeným s vysokým rizikem maligní transformace je např. i přítomnost monoklonálních volných lehkých řetězců v moči.

**Tabulka 1. Klasifikace monoklonálních gamapatií (Kyle 2006)**

<b>Monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS)</b>	
	Benigní (IgG, IgA, IgD, IgM, a vzácně lehké řetězce)
	Benigní (IgG, IgA, IgD, IgM, a vzácně lehké řetězce)
	Asociované s nádory z buněk neprodukujících MIG
	Biklonální a triklonální gamapatie
	Idiopatická Bence-Jonesova proteinurie
<b>Maligní monoklonální gamapatie</b>	
	Mnohočetný myelom (IgG, IgA, IgD, IgE a free lambda nebo kappa)
	Symptomatický a asymptomatický/doutnající MM
	Plazmocelulární leukémie
	Nesekreční myelom
	IgD myelom
	POEMS syndrom: polyneuropatie, organomegalie, endokrinopatie, MIG, kožní změny (skin)
<b>Plazmocytom</b>	
	Solitární kostní plazmocytom
	Extramedulární plazmocytom
<b>Maligní lymfoproliferace</b>	
	Waldenströмова makroglobulinémie
	Maligní lymfomy
	Chronická lymfatická leukémie
<b>Nemoci těžkých řetězců</b>	
	μ Heavy-chain disease
	α Heavy-chain disease
	γ Heavy-chain disease
<b>AL amyloidóza</b>	

## **Základní rozdělení a charakteristika jednotlivých typů monoklonálních gamapatií**

Jak již bylo uvedeno, základní rozdělení monoklonálních gamapatií na maligní monoklonální gamapatie a na MGUS zavedl prof. Kyle z Mayo kliniky (1,13). Rozdělení je uvedeno přehledně v Tabulce č. 1. Monoklonální gamapatie nejistého významu (MGUS) je potenciálně maligní stav charakterizovaný nezhoubnou klonální proliferací plazmatických buněk secernujících monoklonální imunoglobulin. Dále se dělí dle základní klasifikace na benigní monoklonální gamapatie s produkcí kompletní molekuly IgG, IgA, IgD, IgM a vzácně i volných lehkých řetězců, dále na biklonální a triklonální gamapatie. Určení míry rizika, tj. zda MGUS zůstane stabilní nebo bude progredovat do mnohočetného myelomu (MM) nebo jiné příbuzné nemoci, je z klinického hlediska důležité (1,13).

### **4.1. Monoklonální gamapatie nejasného významu - MGUS**

#### **4.1.1. Epidemiologie MGUS**

Monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS) je definována jako klinicky němý bezpříznakový stav, při kterém nejsou splněna diagnostická kritéria mnohočetného myelomu, M. Waldenström, AL-amyloidózy nebo jiného zhoubného lymfoproliferativního onemocnění. Poprvé byla popsána v roce 1978 prof. Kylem a Greippem (4,5). Monoklonální gamapatie nejasného významu je nejčastější monoklonální gamapatií. Její prevalence v celé populaci dospělých osob se pohybuje kolem 1 % pozorování za rok (15,16). Incidence MGUS je oproti nejčastější maligní monoklonální gamapatii, kterou je mnohočetný myelom, přibližně 100x vyšší (1,15,17). V mladších věkových skupinách (pod 50 let) je poměrně vzácná (dokonce méně než 1%). Frekvence výskytu dále stoupá s věkem a u lidí nad 50 let je přítomna zhruba u 3 % populace, v případě mužů nad 80 let je pak prevalence více než 8 % (1,15,17). Muži jsou postiženi o něco méně často než ženy. Přibližně 70 % MGUS je typu IgG, následuje IgM (cca 15-20 %) a nejméně často se vyskytuje typ IgA (cca 11 %) (6). Převažují také lehké řetězce kappa (62 %) nad lambda (38 %) (2). V současné době je na MGUS pohlíženo jako na prekancerózu (4,5,6,15).

#### 4.1.2. Etiologie a patogeneze

Klíčové biologické a molekulárně genetické mechanismy vývoje MGUS nebyly dosud zcela objasněny. Jedná se o proces, na kterém se spolupodílí mnoho faktorů včetně genetické predispozice, vlivu životního prostředí, možné chronické infekce nebo autoimunního onemocnění a další různé faktory (15). Jedním z faktorů, který se může podílet na vyšším výskytu MGUS je i obezita (16). Dokonce byla prokázána souvislost s tělesnou hmotností a rizikem progresu MGUS do obrazu maligní monoklonální gamapatie (18,19).

Výzkum zaměřený na detekci časných genetických změn u MGUS prokázal, že již ve fázi MGUS mohou být přítomny obdobné cytogenetickou abnormitu u klonálních plazmatických buněk jako je tomu v případě mnohočetného myelomu (20). Byly popsány zhruba 4 základní mechanismy, které se účastní časných patogenetických změn ve vývoji MGUS. Jsou to IgH translokace, hyperdiploidie buněk, delece chromozomu 13 a deregulace genů pro cyklin D (21). Metodou FISH byla prokázána translokace genu pro IgH řetězec asi u poloviny pacientů s MGUS, ve vyšším procentu pak u pacientů s myelomem a plazmocelulární leukémií (21). Hyperdiploidní jádra byla detekována u zhruba 30-47 % pacientů s MGUS (21) a význam tohoto jevu je intenzivně zkoumán, závěry studií však často nebývají zcela jasné. Delece chromozomu 13 je přítomna asi u 25 % pacientů s MGUS. Konkrétní geny na 13. chromozomu, které se účastní patogenetického procesu však nejsou známy. U MGUS si výsledné aberantní klonální plazmatické buňky uchovávají mnoho fenotypových vlastností jako zdravé buňky, avšak pomaleji proliferují. Studie neprokázaly žádné významné rozdíly mezi fenotypy plazmatických buněk nalezených u MGUS a MM. Neexistují ani významné rozdíly v profilech genové exprese plazmatických buněk. Přestože mohou nastat další změny, které ovlivňují DNA sekvenci a rozdíly v expresi microRNA mezi MGUS a MM, nejsou jen tyto změny odpovědné za progresi z MGUS do MM. Spíše se předpokládá, že přechod je způsoben expanzí populace klonálních buněk MGUS v průběhu času (22). Bylo prokázáno, že v patogenezi MGUS hrají roli rovněž rasa a etnicita (5).

Na základě zkušeností získaných jejich dlouhodobým sledováním je na MGUS nyní nahlíženo jako na prekancerózu s rizikem přechodu v maligní monoklonální gamapatii u přibližně 1% případů ročně. Poznatkem z poslední doby je i skutečnost, že transformací z MGUS pravděpodobně vznikají všechny případy MM (4,5,15). V minulosti se totiž předpokládalo, že jde pouze o jejich menší část.

#### 4.1.3. Prevalence MGUS

Výskyt MGUS se liší u různých etnických skupin – 8,6 % u afroameričanů, 3-6 % u bělochů a 2,7% u Japonců. Prevalence MGUS je tak 2-3x častější u Afroameričanů v porovnání s bělochy (5,23). U bělochů přitom prevalence s věkem narůstá, u afroameričanů se prevalence překvapivě s narůstajícím věkem nemění (1,15,23). V porovnání s bělochy se naopak MGUS vyskytuje méně u Asiatů, nejméně pak u obyvatel Japonska a Mexika (5). MGUS je o něco častější u mužů. Zároveň se předpokládá i genetická predispozice, což bylo potvrzeno familiárním výskytem MGUS (5). IgM MGUS se ve větší míře objevuje v zemích západní Evropy, také v USA, Kanadě a v jižní Austrálii. Podstatně méně často se objevuje ve východní Evropě, Řecku a v Izraeli oproti zemím jižní Evropy (Itálie, Španělsko). Nízká prevalence IgM MGUS je také například ve Švédsku a v Nizozemí (24). Prakticky vůbec se nevyskytuje u asijské populace (např. odhad prevalence IgM MGUS v Japonsku je asi 0,16%). U jedinců mladších 50 let se monoklonální gamapatie vyskytuje v 0,2 %, nad 50 let věku v 1,0 - 1,7 %, ve věkové kategorii nad 70 let již ve 3 % a v období nad 80 let je prevalence již 10 % (25).

#### 4.1.4. Diagnostika MGUS

Diagnostika MGUS je založena na detekci přítomnosti monoklonálního imunoglobulinu elektroforézou bílkovin s následnou imunofixací. Základní diagnostická kritéria pro MGUS jsou uvedena v Tabulce č. 2. V ní je též uvedeno, že základním parametrem diagnostiky MGUS je nepřítomnost tkáňového nebo orgánového postižení (1,3). Toto je jedním z problémů při interpretaci klinického obrazu MGUS. Je nutné pátrat po orgánovém postižení ve smyslu anémie, selhání ledvin, přítomnosti hyperkalcémie a kostního onemocnění (CRAB symptomy). Zároveň je podstatné i vyloučit jinou preexistující malignitu (1). U každého pacienta s MGUS je podstatné vždy důsledně zvážit, zda symptomy, které pacient má, mohou nebo naopak nemohou nějak souviset s MGUS. Sternální punkce by měla být provedena u pacientů, u kterých jsou přítomny známky jakéhokoliv orgánového postižení nebo jejich symptomatologie budí klinické podezření na možnou malignitu (3,15). Jelikož je v současné době nutnou součástí diagnózy MM průkaz klonality plazmatických buněk, je v rámci vyšetření kostní dřeně u pacientů s MGUS nezbytné i provedení imunofenotypizačního či imunohistochemického vyšetření (1,15). U pacientů, kteří mají

diagnostikována nízkou hladinou MIG a současně u nich nejsou přítomny žádné klinické obtíže ani známky orgánového poškození není nezbytně nutné vyšetření kostní dřeně provádět. Vždy je však nutné každou situaci posoudit individuálně, obecné doporučení zde neexistuje. Proto je vždy lepší při jakékoli nejistotě vyšetření kostní dřeně provést. Poměrně často může být MG asociována s kožními a revmatickými onemocněními, s často přechodným výskytem monoklonálního imunoglobulinu se můžeme setkat i u imunodeficiencí (26,27). Vlastní diagnostická kritéria MGUS byla aktualizována v roce 2016. Hodnota M-proteinu v séru (non-IgM typ) musí být podle nich pod 30g/L, počet klonálních plazmocytů v kostní dřeni nesmí přesáhnout hodnotu 10% a nesmí být přítomny známky orgánového poškození (CRAB-symptomy), které by souvisely s plazmocelulárním onemocněním (1,4,14,19,26). Aktuální diagnostická kritéria MGUS dle Mezinárodní Myelomové Pracovní skupiny (IMWG) z let 2014 a 2016 jsou přehledně uvedena v Tabulce č. 2.

**Tabulka 2. Diagnostická kritéria MGUS – upraveno dle Rajkumara et al., 2014, 2016**

	Non IgM MGUS	IgM MGUS	Light-chain MGUS
<b>M-protein</b>	<30 g/L	<30 g/L	Sérum: 0 g/L+negativní IFE Moč: 0 g/L <500 mg/24 hod.
<b>FLCr</b>	-	-	< 0,26 nebo >1,65
<b>Infiltrace KD</b>	< 10% klonál.PC	<10% lymfoplazmocytů	<10% klonál.PC
<b>Orgánové poškození</b>	Nepřítomnost: <b>C:</b> S-Ca<2,75 mmol/L <b>R:</b> S-krea< 177 μmol/L event. Cl-krea<40 mL/min <b>A:</b> Hb<100 g/L <b>B:</b> osteolytických lézí /osteoporózy a kompresivních fraktur	Nepřítomnost: Anémie Hyperviskozity Hepatosplenomegalie Lymfadenopatie	Nepřítomnost: C: S-Ca<2,75 mmol/L R:S-krea< 177 μmol/L Event. Cl-krea<40 mL/min A: Hb<100 g/L B:osteolytických lézí/osteoporózy a kompresivních fraktur

#### 4.1.5. Klinický průběh

Nejčastěji je MGUS zachycena zcela náhodně při rutinním vyšetření pacientů z jiného důvodu, například v rámci laboratorní diagnostiky osteoporózy z osteologické poradny, bolestí zad z neurologické ambulance, pacientů z alergologické ambulance event. dalších specializovaných ambulancí. Jedním ze základních kritérií onemocnění je jeho asymptomaticnost. Přítomnost MIG nepůsobí zpravidla žádné subjektivní ani objektivní obtíže, ani žádné změny orgánových funkcí (25). Objevují se ale tři typy možných komplikací, na které je třeba u pacientů s MGUS myslet.

Jako první typ problémů bylo zaznamenáno zvýšené riziko tromboembolických příhod oproti ostatní populaci bez MGUS (28). V rámci několika studií bylo opakovaně prokázáno, že pacienti s MGUS mají vyšší riziko venózního tromboembolismu ve srovnání s věkově stejnou populací bez přítomnosti MGUS. Na základě těchto zkušeností byl MGUS označen za jeden z možných rizikových faktorů pro rozvoj tromboembolické nemoci.

Druhým typem zdravotních komplikací je možný výskyt periferní neuropatie u pacientů s MGUS (29,30). V současné době není izolovaná polyneuropatie považovaná za klinický příznak orgánového postižení při MGUS, proto není z hematologického hlediska ani v tomto případě indikována terapie. Je však známo, že zejména ve skupině pacientů s polyneuropatií a přítomností MIG typu IgM je prokázán vyšší titr protilátek anti-MAG (s myelinem asociovaný glykoprotein) a to až v 50 %. Přes existenci tohoto faktu však zatím nebyl přímý patogenetický korelát potvrzen (29,30).

Anti-MAG neuropatie je velmi vzácná forma získané polyneuropatie spojené s IgM monoklonální gamapatií nejistého významu (IgM-MGUS) (29,30). Termín paraproteinemická neuropatie (PPN, event. neuropatie asociovaná s paraproteinémií) je v literárních zdrojích popisovaná jako heterogenní skupina neuropatií charakterizovaná přítomností monoklonálního imunoglobulinu v séru (31). Při paraproteinemické neuropatii se objevují různé neurologické symptomy jako křeče, mírná distální slabost, senzitivní poruchy (jako např. necitlivost, zvýšená bolestivost, parestézie, dysestézie), poruchy rovnováhy. PPN je nejčastěji pozorována u IgM gamapatie (asi v 48%), poté následuje IgG MG (asi v 37%) a IgA MG (v 15%). PPN se dělí do 3 hlavních klinických subtypů a to na distální demyelinizační symetrickou neuropatii, chronickou zánětlivou demyelinizační polyneuropatii (CIDP) a axonální senzomotorickou periferní neuropatii (31). Výskyt periferní neuropatie může několik

let předcházet vývoji maligní monoklonální gamapatie. Periferní neuropatie je definována jako onemocnění nebo degenerativní stav, který postihuje motorické, senzitivní nebo vasomotorické periferní nervy (30,31). S MGUS asociované neuropatie nejsou obecně léčeny s výjimkou IgM monoklonální gamapatie nebo v případě asociace s chronickou zánětlivou demyelinizační neuropatií. PPN mohou být způsobeny interakcí protilátek se specifickým antigenem na periferních nervech nebo depozicí imunoglobulinu. Přibližně 10 % pacientů s chronickou senzomotorickou neuropatií nejasného původu má monoklonální gamapapatii, z toho u 2/3 pacientů se jedná o MGUS (31). Přítomnost polyneuropathie by měla u pacientů s MGUS vést i k vyloučení možné AL amyloidózy.

V třetím případě se jedná o možné spojení MGUS a osteoporózy (32). V klinických studiích bylo prokázáno, že u pacientů s MGUS jsou změněny hladiny nejméně dvou cytokinů (MIP – 1alfa a DKK 1), které hrají u osteoporózy významnou roli. Současně byla dokumentována zvýšená kostní fragilita u pacientů s MGUS při vyšetření CT (32,33).

Přirozený průběh MGUS má obvykle benigní charakter, avšak vždy existuje riziko progresu do maligního onemocnění. Nejčastěji dochází k transformaci MGUS do mnohočetného myelomu, méně často také do AL amyloidózy, Waldenströmovy makroglobulinémie event. jiných lymfoproliferací.

#### **4.1.6. Prognostické faktory, monitorování aktivity monoklonálních gamapatií**

Monoklonální gamapatie nejasného významu byly dlouhou dobu považovány za zcela benigní onemocnění. Výzkumy z poslední doby však ukázaly, že MGUS s sebou nese v průběhu času maligní potenciál. Riziko maligní transformace MGUS do MM nebo jiných asociovaných nemocí je 1% ročně. Pro MGUS typu IgM je riziko maligní transformace dokonce vyšší a to 1,5% ročně (1,26,34). Jak již bylo zmíněno v předchozím textu, v poměrně nedávné době bylo prokázáno, že každý mnohočetný myelom je předcházen fází MGUS (1). Nesmíme tedy zapomínat na skutečnost, že v případě MGUS se jedná o prekancerózu. Z historických zkušeností vyplývá, že ačkoliv většina pacientů s MGUS zemře na onemocnění, které nemá žádný dokumentovaný vztah k MGUS, u části pacientů dojde v čase k malignímu vývoji ve smyslu progresu do lymfoidní malignity, nejčastěji MM (34). Z tohoto důvodu v současné době většina pracovišť zaměřuje svoji pozornost právě na identifikaci pacientů, u kterých je riziko přechodu do malignity nejvyšší. Cílem této snahy je správně vytipovat



nejrizikovější pacienty, u nichž by bylo možné zahájit léčbu ještě před vznikem symptomatické malignity a tak co nejvíce oddálit její další vývoj resp. vznik orgánového poškození. Ideální by pak samozřejmě bylo vývoj v maligní onemocnění zcela odvrátit (15).

Jedním z dlouhodobě studovaných prognostických faktorů, který má svůj význam z hlediska laboratorní diagnostiky MGUS, je stanovení volných lehkých řetězců v séru pacientů, především stanovení poměru kappa/Lambda řetězců. V roce 2004 byly poprvé prezentovány Rajkumarem první zmínky o významu FLCr jako prognostického markeru pro pacienty s MGUS (14,35). Z analýzy malé skupiny pacientů tehdy vyplynulo, že FLCr je častěji abnormální u pacientů s progresivní chorobou. Později bylo prokázáno na velké kohortě pacientů (1148 jedinců s MGUS z registru Mayo clinic), že jedinci s abnormálním poměrem FLCr mají asi 2,6x vyšší riziko rozvoje malignity v porovnání s jedinci s normálním FLCr (14,35). K této situaci dochází, neboť produkce monoklonálního proteinu je vázaná na přítomnost klonálních plazmatických buněk v kostní dřeni. I když ve sternálních punktátu u pacientů s MGUS obvykle nenalezneme větší množství plazmocytů, může být nadprodukce kappa nebo lambda komponenty odrazem jejich zvýšené metabolické aktivity, se kterou je spojena též zvýšená pravděpodobnost častějšího maligního zvratu (14,35). Z tohoto důvodu bylo stanovení FLC implementováno do nového prognostického modelu Mayo clinic, který kromě FLCr zahrnuje též stanovení kvantity MIG a jeho typizaci (5,6,14,36). Jde o v současnosti nejčastěji využívaný stratifikační model pacientů s MGUS v rámci běžné klinické praxe. Pacienty dle tohoto modelu členíme do 4 skupin (viz Tabulka č. 3).

**Tabulka 3. Riziko progresu MGUS do malignity (Kyle 2008)**

Riziková skupina	Relativní riziko (%)	Absolutní riziko progresu ve 20 letech (%)
„Low-risk“ (MIG <15 g/L, IgG typ, normální FLCr (0,26 – 1,65)	1	5
„Low-Intermediate-risk“ (1 faktor abnormální)	5,4	21
„High-Intermediate-risk“ (2 faktory abnormální)	10,1	37
„High-risk“ (3 faktory abnormální)	20,8	58

Na základě těchto zjištění byla v roce 2009 vypracována doporučení IMWG, která nově zahrnuje stanovení FLCr v době diagnózy do základního vyšetřovacího panelu MGUS. Vyšetření FLCr by tak dnes mělo být pomocným kritériem k posouzení rizika progresu choroby do malignity. Nízce rizikové pacienty je pak možné sledovat 1x za 2-3 roky, zatímco vysoce rizikové pacienty je nutné monitorovat častěji, a to 1x za 3-6 měsíců (14,36).

Dalším sledovaným parametrem u pacientů s MGUS je rozsah infiltrace kostní dřeně plazmatickými buňkami. V praxi to znamená, že čím více klonálních plazmatických buněk je v kostní dřeni přítomno, tím vyšší je riziko progresu do malignity (především mnohočetného myelomu). V roce 2007 byl Pethema skupinou publikován rizikově-stratifikační model (PETHEMA model) maligní transformace pacientů s MGUS založený na stanovení procenta fenotypově abnormálních plazmatických buněk v rámci všech plazmatických buněk kostní dřeně a přítomnosti aneuploidních změn (tzv. DNA index) (37,38,39). Dle této studie bylo zjištěno, že pacienti s MGUS, u nichž je více než 95% plazmatických buněk kostní dřeně abnormálního fenotypu a zároveň je přítomna aneuploidie, mají 46% riziko maligního zvratu v následujících 5 letech sledování (39).

V roce 2010 pak stejná výzkumná skupina publikovala podobný rizikově-stratifikační model progresu pacientů s MGUS, kdy byl definován vyvíjející se MGUS („evolving“) jako minimálně 10% zvýšení koncentrace M-proteinu v séru během 3 let (38,40). Bylo popsáno, že 72% pacientů s MGUS s více než 95% fenotypově abnormálních plazmatických buněk ze všech plazmatických buněk kostní dřeně a „evolving“ charakterem progreduje během následujících 7 let od stanovení diagnózy (40).

V roce 2017 byl navržen třetí rizikově-stratifikační model Českou myelomovou skupinou. Model byl postaven na základě pěti rizikových faktorů a to na koncentraci MIG v séru 15 g/L a více, patologickém poměru FLC (<0,26 nebo >1,65), infiltraci kostní dřeně plazmatickými buňkami <5%, přítomnosti imunoparézy a hodnotě sérového hemoglobinu <120 g/L (26). MGUS skupina, která měla 4-5 rizikových faktorů, měla 63x vyšší riziko progresu ve srovnání s referenční skupinou (26).

Mezi další rizikové faktory patří imunoparéza neklonálních imunoglobulinů (41,42), přítomnost cirkulujících plazmatických buněk v periferní krvi (26), stanovení těžkých řetězců metodou Hevylite (41), DNA aneuploidie a cytogenetické změny (26,27,43). Důležité z hlediska predikce rizika maligní transformace a jejího časného rozpoznání jsou i moderní

zobrazovací techniky. Patří sem vyšetření pomocí magnetické rezonance (MRI) a vyšetření pozitronovou emisní tomografií (PET/CT) (26).

#### **4.2. Maligní monoklonální gamapatie**

Hlavním představitelem skupiny maligních monoklonálních gamapatií je především mnohočetný myelom. Mnohočetný myelom je druhou nejčastější hematologickou malignitou po ne-Hodgkinových lymfomech. Reprezentuje zhruba 10 % hematologických malignit a 1 % všech zhoubných tumorů obecně. Současně je zodpovědný zhruba za 2 % úmrtí na maligní onemocnění. Celosvětově je patrný pomalý nárůst jeho výskytu a je zaznamenán překvapivě stále častější výskyt v mladších věkových skupinách. V České republice se odhaduje jeho incidence asi 4-6 případů na 100 000 obyvatel ročně (9). Ve výskytu mírně převažují muži nad ženami, a to v poměru 3/2. Medián věku je zhruba 65 let. Myelom je častější v černošské populaci (zde je incidence kolem 8/100 000 obyvatel ročně), oproti kavkazské populaci, kde je incidence 5/100 000 obyvatel ročně (9,10,11,45,46,47). V případě mnohočetného myelomu dominuje MIG IgG, následovaný IgA, volnými lehkými řetězci a až poté následují vzácné IgD myelomy a ještě vzácnější IgE a IgM myelom.

Od roku 1975 se používal původní stážovací systém mnohočetného myelomu podle Durieho a Salmona založený na kritériálním stážování (9). Tento systém spíše než prognózu pacientů odrážel množství myelomové masy a jeho význam se při současných terapeutických možnostech snížil. V roce 2005 IMWG zveřejnila nový prognostický systém pro mnohočetný myelom, který je založený na stanovení dvou základních biochemických markerů (albuminu a  $\beta$ 2M). Ten je přehledně uveden v následující kapitole v Tabulce č. 7. Tento systém dokáže lépe vyjádřit vstupní prognózu pacientů. Jeho zásadní limitací je obtížná interpretace u pacientů s renální insuficiencí, neboť hladina B2M je zde zvýšena díky jeho snížené clearance ledvinami. Oba systémy dovedou s určitými limitacemi odhadnout prognózu nemocných v době diagnózy. Pro prognózu každého nemocného je ale důležité i biologické chování choroby částečně vyjádřené cytogenetickým vyšetřením a dosažená léčebná odpověď, která se naštěstí díky novým lékům stále zlepšuje. Na konci roku 2015 vydala IMWG aktualizovaná kritéria pro stanovení diagnózy mnohočetného myelomu (48). Úpravu kritérií z roku 2003 si vyžádaly zejména další pokroky v léčbě mnohočetného myelomu i přínos nových zobrazovacích a laboratorních technik v diagnostice onemocnění. Snahou je zabránit

poškození organismu v rámci asymptomatické fáze nemoci zahájením časně léčby v případě identifikace nových rizikových faktorů. Česká myelomová skupina na vydání nových kritérií zareagovala vydáním doplňku ke guidelines (49,50).

Ke změnám došlo i v názvosloví, pojem symptomatický myelom byl nahrazen pojmem mnohočetný myelom a asymptomatický myelom se vrátil k původnímu názvu doutnající („smoldering“) myelom. Nadále platí CRAB kritéria, ale renální funkce pacientů jsou navíc kromě sérové koncentrace kreatininu posuzovány i pomocí stanovení jeho clearance (zde je nejčastěji využíván odhad pomocí MDRD nebo CKD-EPI). Zároveň bylo nově zařazeno užití moderních diagnostických metod k průkazu kostního poškození (MRI) (49,50) a nově se posuzuje i poměr  $\kappa/\lambda$  lehkých řetězců. Tyto změny jsou přehledně uvedeny v Tabulce č. 4.

V rámci sledování nemocných se „smoldering“ (asymptomatickým) myelomem byly nově identifikovány tři rizikové faktory (viz Tabulka č. 4), jejichž identifikace by měla vést k časnému zahájení léčby. Co se týče předchozích diagnostických kritérií mnohočetného myelomu, došlo ke snížení významu přítomnosti M-Ig nezávisle na jeho kvantitě. Přítomnost monoklonálního imunoglobulinu je využívána pouze v rámci dělení onemocnění na secernující a nesecernující typ (46,49,50).

Mezi maligní monoklonální gamapatie patří i Waldenströмова makroglobulinémie. Medián věku při stanovení diagnózy je kolem 60-65 let, i zde je popisována lehká převaha u mužů. Onemocnění je provázeno výskytem sérového M-Ig typu IgM, při jehož vyšší koncentraci se mohou objevit příznaky hyperviskozity. U části nemocných může být prokazatelný kryoglobulin, což se může projevat manifestací Raynaudova syndromu, kloubními bolestmi, periferní neuropatií (3). U tohoto onemocnění na rozdíl od MM mohou být postiženy uzliny, kostní dřeň a slezina. U nemocných, kteří jsou asymptomatictí, není nutné zahajovat neprodleně léčbu (44,51).

Dalším vzácným představitelem maligních monoklonálních gamapatií je onemocnění z těžkých řetězců. Dle typu těžkého řetězce je dále děleno na gama ( $\gamma$ ), alfa ( $\alpha$ ) a mí ( $\mu$ ). Onemocnění z těžkých řetězců jsou charakterizovaná proliferací jednoho klonu B-lymfocytů, které produkují strukturálně abnormální (nekompletní) těžké řetězce imunoglobulinů bez asociace s lehkými řetězci. Poprvé bylo onemocnění popsáno Franklinem v roce 1964, proto bývá dle objevitele nemoci někdy nazýváno Franklinova nemoc (44,51). Bývají u ní postiženy uzliny, kostní dřeň, játra a slezina (51). Nemoc z těžkých řetězců alfa se vyskytuje zpravidla při

nádorovém lymfoplazmocytoidním procesu tenkého střeva, postihuje mladší nemocné mezi 20. - 30. rokem věku (51). Je to nejčastější typ nemoci z těžkých řetězců. Předpokládá se i účast chronické střevní infekce (*Campylobacter pylori*). Nemoc z těžkých řetězců mí se objevuje spíše ve středním a vyšším věku a je provázena hepatosplenomegalií (51).

Primární AL amyloidóza je maligní gamapatií vyskytující se převážně u dospělých. Podstatou nemoci je ukládání lehkých řetězců jako depozit do různých tkání. Incidence onemocnění je 1 na 100 000 obyvatel ročně (51). Maximum výskytu se uvádí mezi 60-65 rokem věku. Častěji jsou postiženi muži a to v poměru 2:1. Toto onemocnění postihuje různé orgány. Nejčastěji zastoupeným typem postižení je amyloidóza srdce (asi 37%). Po ní následuje postižení ledvin (28%) s nefrotickým syndromem a periferní amyloidová neuropatie (asi 15%).

**Tabulka 4. Nová diagnostická kritéria doutnajícího a mnohočetného myelomu**  
(upraveno pro diagnostická doporučení CMG 2018 podle IMWG 2014)

	<b>Smoldering myelom</b>	<b>Mnohočetný myelom</b>
Koncentrace MIG v séru a v moči	c-MIG (IgG nebo IgA) $\geq 30$ g/L nebo c MIG v moči $\geq 500$ mg/24 hod a/nebo 10-60 % klonálních plazmocytů v KD	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Koncentrace sérového kalcia <math>&gt; 0,25</math> mmol/L nad horní limit nebo kalcémie <math>&gt; 2,75</math> mmol</li> <li>* Kreatinin <math>&gt; 177</math> <math>\mu</math>mol/L nebo clearance kreatininu <math>&lt; 40</math> mL/min (=0,67 mL/s)</li> <li>* Koncentrace hemoglobinu o 20 g/L nižší než dolní limit referenčního rozmezí nebo hemoglobin <math>&lt; 100</math> g/L</li> <li>* FLCr <math>\geq 100</math></li> </ul>
	Absence CRAB kritérií nebo amyloidózy	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Klonální plazmatické buňky v kostní dřeni <math>\geq 10</math> %, či biopticky verifikovaný plazmocytom</li> <li>* Lytické léze nebo osteoporóza s kompresivními frakturami (CT,PET)</li> <li>* <math>&gt;1</math> fokální léze na MRI</li> </ul>

	<b>Smoldering myelom</b>	<b>Mnohočetný myelom</b>
1. Ultra-high risk – SMM	40% roční riziko progrese do MM, ≥ 60% BMPC nebo FLCr ≥100 nebo 1 fokální léze na MRI	Symptomatický nesekreční myelom Infiltrace kostní dřene ≥10% klonálních plazmocytů, bez průkazu MIG, ale se známkami poškození orgánů
2. High risk - SMM	25% roční riziko progrese do MM	
3. Low risk - SMM	5% roční riziko progrese do MM	

Méně časté je postižení gastrointestinálního traktu (8%). K diagnóze amyloidózy je nutné provedení orgánové biopsie s typickým histologickým nálezem kongofilních amyloidových depozit. Pomocí imunohistochemického vyšetření se prokáže izotyp lehkých řetězců a k sledování aktivity AL amyloidózy lze nověji využít stanovení volných lehkých řetězců v séru (52).

Pouze lokálně se vyskytující maligní monoklonální gamapatie je označována jako plazmocytom, který se dle vztahu ke kosti dále dělí na solitární kostní a extramedulární.

Produkce monoklonálního imunoglobulinu bývá zjištěna i u části nemocných s maligními lymfomy a chronickou lymfatickou leukémií. Mezi maligní monoklonální gamapatie patří i syndrom POEMS, jehož název je vytvořen na základě příznaků, které tento syndrom tvoří. Jedná se o polyneuropatii, organomegalii, endokrinopatii, přítomnost monoklonálního imunoglobulinu a kožní („skin“) změny (51).

## 5. Přehled základních laboratorních metod využívaných v rámci diagnostiky monoklonálních gamapatií a jejich úskalí

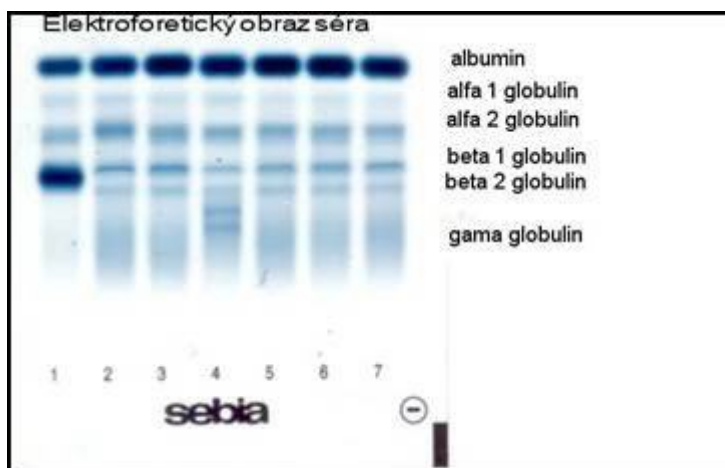
### 5.1. Elektroforéza sérových bílkovin (ELFO)

Elektroforéza bílkovin (ELFO) je základní metodou využívanou v praxi k vyhledávání a kvantifikaci monoklonálního imunoglobulinu (M-komponenty) v séru i jiných tělesných tekutinách. Slouží jako screeningová metoda, tj. jako metoda k „vyhledávání odchylek od normy“ ve složení spektra proteinů tělních tekutin (2,3). Separace proteinů se provádí na vhodném nosiči, např. na agarózovém gelu. Proteiny tvoří velkou skupinu látek přítomných v plazmě (séru), jejichž celková koncentrace se pohybuje v rozmezí 65 - 80 g/L. Při elektroforéze na agaróze získáme šest frakcí: nejrychlejší je frakce albuminu, za ním následují alfa-1 globuliny ( $\alpha_1$ ), alfa-2 globuliny ( $\alpha_2$ ), beta-1 globuliny ( $\beta_1$ ), beta-2 globuliny ( $\beta_2$ ) a gama globuliny ( $\gamma$ ) (44,53,54,55). Většina těchto frakcí je tvořena mnoha různými proteiny, které mají při hodnotě pH 8,6 podobnou migrační rychlost. Monoklonální imunoglobulin se může v elektroforetickém obraze nacházet mezi gama- až alfa-2 globuliny. Může mít charakter ostrého M-gradientu, ale může být charakterizován i širší difúzní zónou nebo splývat se zónou beta globulinů, což se týká zejména paraproteinů IgA. Právě tyto typy paraproteinů pak mohou být běžným elektroforetickým vyšetřením těžko odhalitelné (2). K modifikaci elektroforetického nálezu může docházet při přítomnosti monomerů, dimerů nebo polymerů IgM, polymerů IgA nebo agregátů IgG. Přítomnost M-proteinu mohou napodobovat i některé bílkoviny. Jedná se o tzv. pseudoparaproteiny (např. fibrinogen, CRP, lysozym, komplex hemoglobin-haptoglobin, migrační artefakty apod.).

Elektroforeogram je vyhodnocován denzitometricky (viz Obrázek č. 4). Při tomto hodnocení jsou získána relativní procenta zastoupení jednotlivých frakcí bílkovin (rovněž i monoklonálního imunoglobulinu) a společně se stanovením celkové bílkoviny v séru lze poté určit koncentraci jednotlivých frakcí včetně monoklonálního imunoglobulinu (2). Diagnosticky důležité je stanovení výchozí koncentrace monoklonálního imunoglobulinu a jeho následné monitorování v průběhu sledování vývoje monoklonální gamapatie. Je vhodné, aby sledování pokud možno probíhalo na stejném pracovišti, stejnými osobami a stejným přístrojovým vybavením (54). Klasická elektroforéza bílkovin zůstává i dnes nejlepším laboratorním skríníngem. Tato metoda je dostatečně citlivá, rychlá, levná a snadno dostupná (viz Obrázek

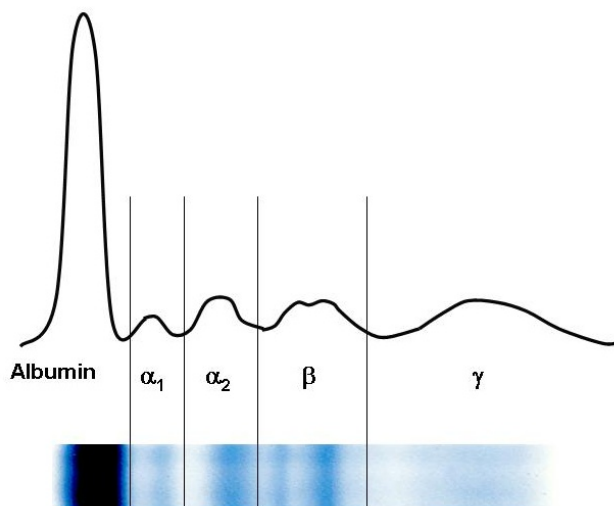
č. 3). Ve velkých rutinních laboratořích klinické biochemie je dnes klasická elektroforéza nahrazována kapilární elektroforézou (CE). Při použití kapilární elektroforézy je přímo měřena absorbance bílkovin v UV oblasti (200 nm) na katodickém konci kapiláry. Současné elektroforetické metody jsou velmi citlivé a dokáží zachytit M-gradienty v koncentraci 0,5 g/L (2,3). Při průkazu M-komponenty nebo při podezření na její přítomnost v elektroforeogramu by měla následovat imunofixační imuno elektroforéza séra či moči.

**Obrázek 3. Elektroforéza bílkovin séra**



zdroj: [www.sebia.com](http://www.sebia.com)

**Obrázek 4. Elektroforeogram**



zdroj: [www.is.muni.cz](http://www.is.muni.cz)

V laboratoři OKB trutnovské nemocnice máme k dispozici přístroj Hydrasys 2 firmy BioVendor (viz Obrázek č. 5), který využívá principu gelové elektroforézy na agaróze. Princip elektroforézy, která je založena na pohybu nabitých částic v elektrickém poli, je znám již přes



200 let (57,58). Proteiny jsou amfotery, které mohou nabývat kladného i záporného náboje podle pH okolního roztoku. Pozitivně nabitě molekuly proteinů mají větší schopnost adsorpce než negativně nabitě, proto jsou při elektroforéze proteinů využívány negativní náboje. Přebytek pozitivních iontů neutralizuje negativní náboj a zůstane pozitivní náboj skupiny a opačně přebytek negativní iontů vede k negativnímu náboji skupiny a k pohyblivosti k anodě (2). Přístroj Hydrasys 2 je poloautomatický, multiparametrický systém pro kompletní elektroforézu na agarozovém gelu. Tento proces zahrnuje nanesení vzorků, migraci, inkubaci, sušení, barvení, odbarvení a závěrečné vysušení (60). Program umožňuje ovládání přístroje (migrace, barvení) přes dotykovou obrazovku. Přístroj je připojen k počítači s programem Phoresis, který umožňuje získat obrázek elektroforetické migrace a následně jej i vytisknout.

**Obrázek 5. Přístroj Hydrasys 2 (BioVendor)**



zdroj: [www.sebia.com](http://www.sebia.com)

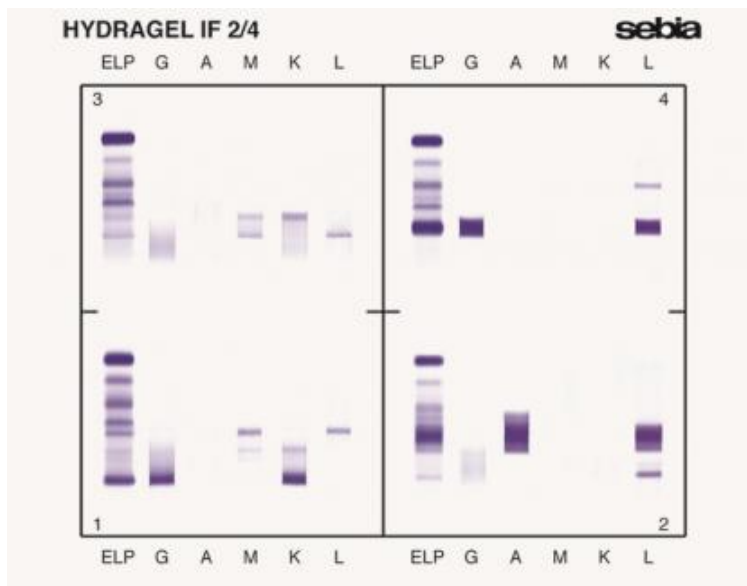
## **5.2. Imunofixační elektroforéza bílkovin séra i moči**

Imunofixace je metoda umožňující následnou identifikaci a typizaci monoklonálních imunoglobulinů v séru a v moči. Imunofixace je důležitá a zcela nezbytná k potvrzení nálezu elektroforézy (2,3). Její citlivost je ve srovnání s elektroforézou asi 50krát vyšší. Imunofixace je nezbytná jak pro určení imunoglobulinové třídy MIG, tak pro určení antigenního typu lehkých řetězců Ig (viz Obrázek č. 7). Imunofixace se používala také jako skrínig např. při podezření na AL amyloidózu, kdy kvantita M-proteinů může být tak nízká, že není možná

jejich detekce při elektroforéze (52). Dnes ji v této indikaci nahradilo stanovení volných lehkých řetězců v séru. Při imunofixaci se vzorek séra elektroforeticky dělí na agarozovém gelu v 5 "drahách" a po skončení dělení se každá dělicí linie převrství jedním z antisér - proti IgA, IgM, IgG a lehkým řetězcům kappa a lambda. Nenavázané bílkoviny se promytím gelu odstraní a obarví se imunoprecipitáty fixovaných proteinů (2). Imunofixace je schopna detekovat v séru koncentrace M-proteinu kolem 0,2 g/L a v moči kolem 0,04 g/L. Je-li imunofixace negativní s antiséry proti imunoglobulinům A, G a M a jsou přítomny monoklonální lehké řetězce kappa nebo lambda, měla by následovat ještě imunofixace s antiséry proti IgD a IgE (2).

Provedení imunofixace nám umožňuje stejné přístrojové vybavení jako v předchozím případě, tedy přístroj Hydrasys 2 (BioVendor). Na tomto přístroji je totiž využíván princip elektroforézy s následnou imunofixací s monovalentními antiséry. Antisérum je aplikováno přímo na elektroforeogram a reakce mezi antigenem a protilátkou proběhne během několika minut. Z hlediska techniky můžeme rozdělit imunofixaci na 3 fáze: elektroforézu, aplikaci antiséra a barvení a promývání. Jako nosič jsou používány především agarózový a acetylcelulóзовый gel (viz Obrázek č. 6). Pomocí imunofixace je možné určit antigenní typ lehkých řetězců a identifikovat paraprotein v koncentracích i kolem 0,1 g/L. U paraproteinů typu IgM někdy pozorujeme tendenci k polymerizaci a tvorbě agregátů (60). Tento jev odstraníme při použití 2-merkaptoetanolu (2-ME), který přidáme k séru a necháme 5-10 minut inkubovat při pokojové teplotě a následně provedeme imunofixaci (2,60). Moč na imunofixaci zahušťujeme dle koncentrace celkové bílkoviny v moči dle přesného schématu.

**Obrázek 6. Příklad výsledku imunofixačního vyšetření bílkovin**

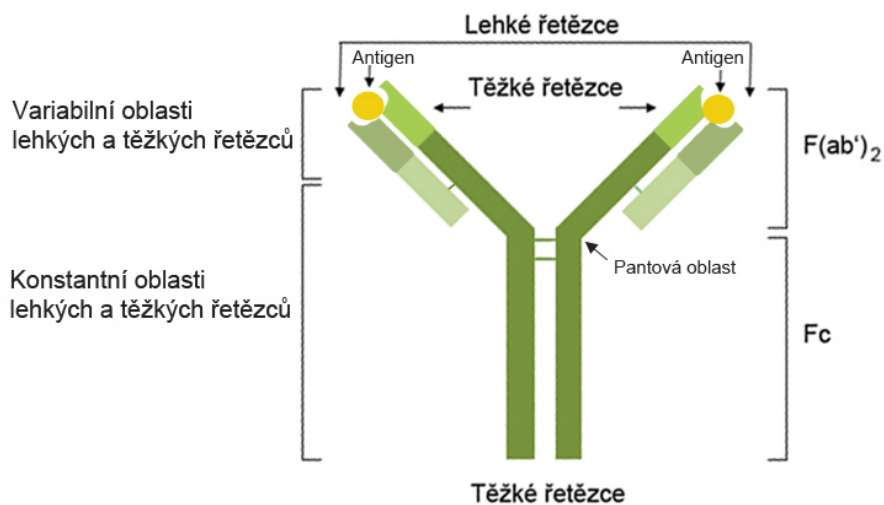


zdroj: [www.sebia-usa.com](http://www.sebia-usa.com)

### **5.3. Kvantitativní stanovení polyklonálních IgG, IgA a IgM, imunoparéza**

Imunoglobuliny (Ig) jsou tvořeny plazmatickými buňkami jako humorální (protilátková) odpověď na kontakt imunosystému s antigenem. Chemicky se jedná o glykoproteiny. Při prvním kontaktu se v rámci primární reakce vytvářejí nejdříve protilátky třídy IgM, po nichž následuje vznik protilátek IgG a IgA (56). Kvantitativní stanovení imunoglobulinů může poskytnout důležité informace o stavu humorálního imunitního systému. Při imunochemické reakci vytváří imunoglobuliny obsažené ve vzorcích lidského séra nebo moči imunokomplexy po kontaktu se specifickými protilátkami (56). Tyto imunokomplexy způsobují rozptyl světla procházejícího vzorkem, kdy intenzita rozptýleného světla je úměrná koncentraci IgA, IgG nebo IgM ve vzorku. Vyhodnocení se provádí porovnáním se známou koncentrací ve standardu. Kvantitativní stanovení polyklonálních imunoglobulinů (IgA, IgG i IgM) se provádí turbidimetricky nebo nefelometricky na základě reakce těžkých řetězců imunoglobulinů s polyvalentním antiserem specifickým pro danou třídu těžkých řetězců (viz Obrázek č. 7).

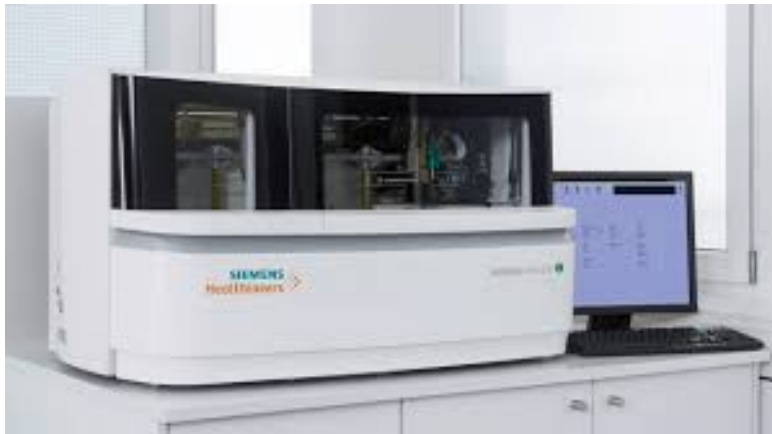
**Obrázek 7. Schéma stanovení polyklonálních imunoglobulinů**



zdroj: [www.labguide.cz](http://www.labguide.cz)

Kvantita imunoglobulinů různých tříd byla u pacientů s MG na OKB ON Trutnov a.s. stanovována na přístroji BN Pro Spec (Siemens). Tento přístroj (viz Obrázek č. 8) provádí analýzu na principu nefelometrie. Ta je nejčastěji používaná metoda pro imunochemické stanovení proteinů v séru, moči a ostatních tělních tekutinách (58,61). Je také nejpřesnější metodou v oblasti proteinů. Jedná se o plně automatizované měření (analýzu). Principem této metody je měření záření rozptýleného na sloučenině antigen-protilátka. Pokud se ve vzorku nachází antigen a do měřicí kyvety je přidána odpovídající protilátka, vytvoří se sloučenina antigen-protilátka, jejímuž množství odpovídá intenzita měřeného rozptýleného záření za konkrétních podmínek (57,58,61). Při konstantní koncentraci protilátky odpovídá signál množství antigenu. Kalibrační křivka je vytvořena pomocí standardních vzorků se známým množstvím antigenu. Signál rozptýleného záření je pomocí kalibrační křivky vyhodnocen jako koncentrace antigenu. Rozptýlený signál je podstatně zesilován adhezí antigenu nebo protilátky k latexovým částicím. Toto umožňuje provést citlivá měření sledovaných proteinů. Světelné záření je generováno laserovou diodou, paprsek dále prochází skrz kyvetu. Intenzita rozptýleného světla závisí na poměru velikosti částice antigen-protilátka a vlnové délky světelného záření (57,58).

**Obrázek 8. Přístroj BN Prospec (Siemens)**



zdroj: [www.healthcare.siemens.com](http://www.healthcare.siemens.com)

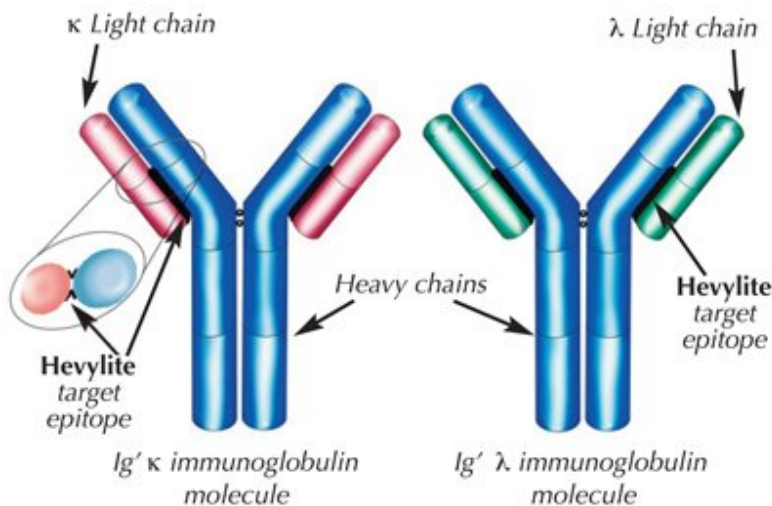
Protože denzitometrie může oproti nefelometrii a turbidimetrii poskytnout při kvantifikaci monoklonálních imunoglobulinů odlišné výsledky, monitoring aktivity onemocnění by měl být u jednoho nemocného prováděn stále stejnou metodou (54,57,58).

Imunoparéza je definovaná jako pokles hladiny normálních imunoglobulinů jednoho nebo více izotypů v séru. Imunoparéza je řazena k dalším významným faktorům využitelným v rámci predikce individuálního rizika transformace MGUS. Bylo prokázáno, že míra suprese polyklonálních imunoglobulinů (imunoparéza) je spojena s vyšším rizikem transformace MGUS (1). K posouzení imunoparézy lze nově využít HLC (Hevylite™; „Heavy/Light chain“) párový test, který s sebou přináší další možnost pochopení biologie, vývoje a potenciální maligní transformace MGUS se současnou výhodou dalšího měřitelného parametru (41). Podstatou metody je individuální identifikace izotypů imunoglobulinů podle lehkých řetězců, tj. IgG $\kappa$ , IgG $\lambda$ , IgA $\kappa$ , IgA $\lambda$ , IgM $\kappa$  a IgM $\lambda$ . Molekuly jsou vyšetřovány v párech, např. IgG $\kappa$ /IgG $\lambda$  a následně je stanoven jejich poměr (42,59,67). Jedná se o jednoduchou, rychlou a plně automatizovanou techniku umožňující kvantifikaci a typizaci jednotlivých složek M-proteinu, nacházející uplatnění v případech, kdy není možné monoklonální protein kvantifikovat. Jedná se například o případy, kdy dochází ke komigraci, objevují se difúzní pásy nebo protein není v elektroforetickém vyšetření vůbec zachycen nebo je přítomen v nízkém množství (59,67).

Princip metody spočívá v tom, že protilátka je namířena proti konstantní doméně junkčního epitopu mezi lehkým a těžkým řetězcem (viz Obrázek č. 9). Metoda poskytuje kvantitativní výsledky i v případě pouhé imunofixační positivity MIG. Tato metoda má tedy

přínos pro stanovení hloubky a monitoraci remise u pacientů s MM i sledování pacientů s MGUS a to zvláště v případě IgA izotypu MIG (42,59,67). Metoda má však i značné limitace, kdy zcela opomíjí imunoglobuliny třídy IgD a IgE, samostatné těžké řetězce a též přítomnost biklonální gamapatie (78).

**Obrázek 9. Princip metody Hevylite™**



zdroj – wikilite.com (The Binding Site)

Analýza HLC páru umožňuje zlepšit identifikaci jedinců s vyšším rizikem přeměny na maligní typ monoklonální gamapatie. Imunoparéza byla zjištěna průměrně u 27 % pacientů s MGUS. Některá literární data se však zmiňují o výskytu až u 40 % pacientů s MGUS (34,38). Jde tak o další nezávislý prediktor transformace MGUS v mnohočetný myelom (59,81,82).

#### **5.4. Další laboratorní vyšetření potřebná pro diagnostiku monoklonálních gamapatií, principy metod a referenční meze**

Kromě dosud uvedených metod patří do základního laboratorního vyšetření pacientů s monoklonálními gamapatiemi např. i stanovení rychlosti sedimentace erytrocytů (FW). Jedná se o jednoduché, levné a běžné vyšetření prováděné i ambulantně v ordinacích praktických lékařů i specialistů. Hodnota FW včetně stanovení CRP poskytuje základní diferenciálně diagnostické vodítko. Důležité je vyšetření kompletního krevního obrazu včetně diferenciálního rozpočtu. Koagulační vyšetření informuje o případných změnách koagulačních poměrů v důsledku přítomnosti monoklonálního imunoglobulinu. Biochemické vyšetření séra

je zaměřeno na monitoraci renálních funkcí, mineralogramu včetně hladiny kalcia. Nezbytné je vyšetření hladiny beta2-mikroglobulinu (B2M) a albuminu, nověji i vyšetření volných lehkých řetězců v séru jako známých prognostických markerů monoklonálních gamapatií (3,10). Nízká hladina albuminu upozorňuje na katabolický stav organismu, který může být způsoben pokročilým nádorovým onemocněním, hodnota B2M pak odráží velikost nádorové masy. Kromě uvedených základních vyšetření nám pomohou v diagnostice MG i další pomocná vyšetření. Zvýšená aktivita LDH upozorňuje na vyšší metabolický obrat nádorových buněk a může upozornit na agresivnější chorobu. Doplnkovým vyšetřením při vysoké hladině MIG je vyšetření viskozity plazmy event. séra. V rámci následujícího textu se zaměřím na metody, které používáme na našem oddělení ke stanovení nejdůležitějších biochemických parametrů potřebných pro přesnou diagnostiku a následný monitoring monoklonálních gamapatií.

Ke stanovení biochemických parametrů v naší laboratoři využíváme přístroj Cobas 6000 (viz Obrázek č. 10), což je modulární analytický systém pro středně velké klinické laboratoře. Sestává z tzv. ovládací konzole, Core jednotky - obslužného modulu a modulů pro ISE, klinickou chemii (tzv. cobas c 501) a heterogenní analýzu (cobas e 601). Přístroj cobas 6000 využívá 3 měřících principů a to ISE (iontově selektivní elektrody) pro měření elektrolytů - Na, K, Cl, fotometrickou jednotku pro klasickou fotometrii a turbidimetrii a elektrochemiluminiscenční měření. Ovládací konzole se skládá z počítače, dotykové obrazovky, klávesnice a tiskárny. Core jednotka pracuje s 5 pozičními stojánky. Do vstupu je možné vložit dva nosiče – každý až s 15 stojánky. Je tedy možné analyzovat až 150 vzorků současně. Statimový vstup slouží pro vkládání stojánek s urgentními vzorky (62).

Fotometrický c 501 modul je plně automatický, samostatný, počítačem řízený analyzátor pro in vitro stanovení širokého spektra analytů. Provádí stanovení v různých typech vzorků: sérum/plazma, moč, likvor, punktát. Modul c 501 provádí fotometrická stanovení spolu s měřením iontově selektivními elektrodami (ISE). Míchání reakční směsi je ultrazvukové. Tím se snižuje možnost kontaminace a zároveň se oproti klasickému míchání snižuje spotřeba vody. Jeho výkon je až 600 testů za hodinu (62).

Modul e 601 je plně automatický analyzátor pro imunochemické analýzy. Je schopen kvantitativních i kvalitativních in vitro stanovení pomocí širokého spektra testů. Vzorky jsou transportovány do e 601 modulu jednotkou Core systému cobas 6000. Principem je

heterogenní imunoanalýza elektrochemiluminiscenční technologií. Tímto principem se stanovují například osteomarkery, kardiální markery, tumorové markery atd. Prakticky je možné v jednom vzorku současně provádět 18-22 různých stanovení (62).

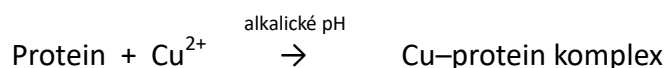
**Obrázek 10. Přístroj Cobas 6000 (Roche)**



zdroj: [www.roche-diagnostics.cz](http://www.roche-diagnostics.cz)

#### **5.4.1. Stanovení celkové bílkoviny v séru**

Při měření koncentrace celkové bílkoviny v séru probíhá reakce měďnatých iontů s peptidickou vazbou proteinů v silně alkalickém prostředí za přítomnosti vlnanu sodno-draselného (57,58). Při této reakci dochází k tvorbě charakteristického růžového až purpurového biuretového komplexu (viz níže uvedená chemická reakce). Vlnan sodno-draselný přitom brání precipitaci měďnatých sloučenin a jodid draselný zabraňuje autoredukci měďnatých iontů (62).



Intenzita zabarvení je přitom přímo úměrná fotometricky stanovené koncentraci celkové bílkoviny. Tabulka č. 5 uvádí doporučená referenční rozpětí koncentrace celkové bílkoviny v séru pro určitý věk (64).



**Tabulka 5. Referenční rozpětí koncentrace celkové bílkoviny v séru**

- příbalový leták diagnostické soupravy TP2 Total Protein Gen.2 (Roche)

Věk	Referenční rozmezí koncentrace celkové bílkoviny v séru (g/L)
nedonošené děti	36 – 60
novorozenci	46 – 70
děti: 1. týden až 6. měsíc	44 – 76
6. měsíc až 1 rok	51 – 73
1-2 roky	56 – 75
2 - 15 let	60 – 80
dospělí od 15 let	64 – 83

#### **5.4.2. Stanovení celkové bílkoviny v moči**

K stanovení koncentrace celkové bílkoviny v moči používáme opět fotometrickou metodu, při které dochází k fotometrickému vyhodnocení zákalu vznikajícího po denaturaci proteinů a přidání benzethonium chloridu (57,58). Jedná se o nejcitlivější techniku ze všech metod na stanovení celkových proteinů v moči. Při turbidimetrické metodě je vzorek předinkubován v alkalickém prostředí obsahujícím EDTA, které denaturuje proteiny a zabraňuje interferenci hořečnatých iontů. Po přidání benzethonium chloridu je vzniklý homogenní zákal vyhodnocen fotometricky při 505 nm (57,58,62).

#### **Referenční rozpětí koncentrace celkové bílkoviny v séru (dle Tietze; 64)**

\* Náhodný vzorek moči: do 120 mg/L

\* Odpad za 24 hodin: 0 – 150 mg/24 hod.

### 5.4.3. Stanovení albuminu v séru

Při stanovení koncentrace albuminu v séru je využívána fotometrická metoda stanovení. Princip této metody je založen na afinitě acidobazického indikátoru bromkresolové zeleně (BCG) k specifickým vazebným místům albuminu při pH 4,2 (58,62). Po vazbě barviva na albumin dochází k posunu absorpčního maxima a ke zvýšení absorbance komplexu barvivo-albumin v poměru k absorbanci samotného barviva. Bromkresolová zeleň vytváří v citrátovém pufru modrozelený komplex, jehož intenzita zbarvení odpovídá koncentraci albuminu ve vzorku (57,58). Tato metoda je standardizována již od roku 1972 (3). Tabulka č. 6 uvádí doporučená referenční rozpětí koncentrace albuminu v séru pro určitý věk (64).

**Tabulka 6. Referenční rozpětí koncentrace albuminu v séru**  
– příbalový leták diagnostické soupravy ALB2 Albumin Gen.2 (Roche)

Věk	Referenční rozmezí koncentrace albuminu v séru (g/L)
děti do 2 týdnů	27,0 – 33,0
děti 2 týdny - 1 rok věku	28,0 – 33,0
1 – 15 let	32,0 – 48,0
15 – 60 let	36,0 – 49,0
nad 60 let	36,0 – 47,0

Spolu s beta2-mikroglobulinem je albumin součástí jednoduchého mezinárodního stážovacího systému (ISS) pro mnohočetný myelom doporučeného International Myeloma Working Group – viz níže uvedená Tabulka č. 7 (63).

**Tabulka 7. Mezinárodní prognostický index pro MM dle IMWG, 2003**

Klinické stadium (ISS)	Beta2-mikroglobulin (mg/L)	Albumin (g/L)
I	< 3,5	> 35 nebo =35
II	< 5,5	< 35
III	> 5,5	nezávisí

#### 5.4.4. Stanovení beta2-mikroglobulinu v séru

Beta2-mikroglobulin je glykoprotein o malé molekulové hmotnosti (jeho mol. hmotnost je 11800 daltonů). Tento glykoprotein je součástí histokompatibilních antigenů (HLA) na povrchu buněk a je homologní s konstantní částí těžkých řetězců imunoglobulinů (56,58). Koncentrace beta2-mikroglobulinu v séru koreluje nejen s nádorovou masou a biologickými vlastnostmi myelomových buněk, ale je také závislá na funkci ledvin. V ledvinách je beta2-mikroglobulin odbouráván a vylučován. V ledvinách je filtrován do primární moči a následně téměř 100% reabsorbován v proximálních tubulech (58). Při stanovení koncentrace beta2-mikroglobulinu používáme imunoturbidimetrické stanovení založené na reakci protilátky proti beta2-mikroglobulinu vázané na latexovou částici s antigenem ve vzorku. Vzniklý komplex antigen-protilátka je po aglutinaci stanoven turbidimetricky (57,62).

#### Referenční rozpětí koncentrace beta2-mikroglobulinu v séru (dle Tietze; 64)

\* dospělí : 0,80 – 2,20 mg/L

#### 5.4.5. Stanovení kreatininu v séru

Při stanovení koncentrace kreatininu v séru se využívá kinetického kolorimetrického stanovení, které je založeno na Jaffé metodě. Principem této metody je skutečnost, že kreatinin reaguje v alkalickém prostředí s kyselinou pikrovou za vzniku žluto-oranžového komplexu s pikrátem (57,58,62). Rychlost tvorby zabarvení je přímo úměrná koncentraci kreatininu ve vzorku. Metodika je zaměřena na minimalizaci interference bilirubinu. Vzorky séra a plazmy obsahují proteiny, které v Jaffé metodě reagují nespecificky. Aby bylo dosaženo správných výsledků, hodnoty kreatininu v séru a plazmě jsou korigovány o -26  $\mu\text{mol/L}$ .

#### Referenční rozpětí koncentrace kreatininu v séru (dle Tietze; 64)

\* dospělí muži: 60 - 110  $\mu\text{mol/L}$

\* dospělé ženy: 53 - 91  $\mu\text{mol/L}$

#### 5.4.6. Vyšetření glomerulární filtrace

Glomerulární filtrace (GF) se využívá k hodnocení funkce ledvin a monitorování jejich stavu v čase. Glomeruly jsou drobné filtry v ledvinách, které umožňují odstranění odpadních

produktů z krve. Přitom zabraňují ztrátám důležitých součástí krve jako jsou např. bílkoviny. Stupeň filtrace se vyjadřuje jako množství krve, které je profiltrováno za časovou jednotku (56,58). Přímé měření GF je náročné, proto se častěji používá její odhad. Ke stanovení odhadu GF slouží kalkulátory. Nejvíce využívaným vzorcem byl výpočet MDRD (Modification of Diet in Renal Disease study), který byl samotnými autory nahrazen vzorcem CKD-EPI. Ten využívá k odhadu GF skupinu 4 proměnných (standardizovaný sérový kreatinin, věk, pohlaví, rasová příslušnost). Výsledek je přepočten na standardní povrch těla (1,73 m<sup>2</sup>). Je součástí guidelines pro diagnostiku a management pacientů s chronickým renálním onemocněním, kde je doporučován jako základní nástroj pro odhad glomerulární filtrace. Hodnoty GF vypočtené na základě CKD-EPI jsou v porovnání s MDRD přesnější a vyšší (56,58).

**Odhad glomerulární filtrace pomocí vzorce CKD-EPI: norma 1,5 - 2,0 mL/s/1,73 m<sup>2</sup>**

#### **5.4.7. Stanovení koncentrace vápníku v séru**

Při stanovení koncentrace vápníku v séru u vzorků pacientů se vycházelo z reakce vápenatých iontů v alkalickém prostředí za vzniku komplexu, který ve druhém kroku reaguje s EDTA. Změna absorbance je přímo úměrná koncentraci vápníku a je měřena fotometricky opět na přístroji Cobas 6000 (57,58,62).

**Referenční rozpětí koncentrace vápníku v séru (dle Tietze; 64)**

\* dospělí : 2,10 - 2,55 mmol/L

### **5.5. Kontrolní systém SEKK a standardizace základních biochemických parametrů a prognostických ukazatelů v diagnostice monoklonálních gamapatií**

Správná diagnostika monoklonálních gamapatií vyžaduje především zázemí spolehlivé klinické laboratoře, která by se měla účastnit kontrolního systému kvality svých výsledků (13,54,65,66). V roce 1996 došlo v ČR k zařazení typizace a následné kvantifikace monoklonálního imunoglobulinu do akreditovaného externího kontrolního systému SEKK. V roce 2005 byl zařazen mezi sledované parametry i beta2-mikroglobulin jako jeden z nejdůležitějších prognostických ukazatelů monoklonálních gamapatií. Stejně tak je v rámci

kontrolního systému SEKK vyhodnocováno i stanovení albuminu, který je dnes jedním z nejdůležitějších prognostických faktorů MM. V roce 2010 byl vyšetřovací panel cyklu Gamapatie doplněn ještě o stanovení volných lehkých řetězců. Současný stav panelu Gamapatie v rámci kontrolního cyklu SEKK tak zahrnuje stanovení koncentrace celkové bílkoviny včetně albuminu, typizaci a následnou kvantifikaci monoklonálního imunoglobulinu, stanovení koncentrace beta2-mikroglobulinu (od roku 2012 není zahrnut v cyklu Gamapatie, když nově byl zařazen do kontrolního systému nádorových markerů) a volných lehkých řetězců včetně poměru kappa/Lambda (3). Níže je přehledně uvedena úspěšnost naší laboratoře u jednotlivých metod v rámci SEKK. Naše dlouhodobá úspěšnost je u jednotlivých metod je konstantně velmi dobrá (viz Tabulka č. 8).

**Tabulka 8. Úspěšnost jednotlivých metod v období let 2006-2018 v rámci SEKK**

<b>Úspěšnost v cyklech EHK (%)</b>	<b>2006</b>	<b>2007</b>	<b>2008</b>	<b>2009</b>	<b>2010</b>	<b>2011</b>	<b>2012</b>	<b>2013</b>	<b>2014</b>	<b>2015</b>	<b>2016</b>	<b>2017</b>	<b>2018</b>
<b>Urea</b>	96	96	96	97	96	96	97	97	98	99	100	100	100
<b>Kreatinin</b>	88	87	63	89	90	77	91	95	98	99	100	100	100
<b>Kyselina močová</b>	94	97	97	97	97	96	97	98	99	99	100	100	100
<b>Kalcium</b>	94	94	95	94	96	96	97	96	98	99	100	100	100
<b>Laktátdehydrogenáza</b>	72	88	93	95	95	100	97	97	97	97	100	100	100
<b>Celková bílkovina</b>	96	96	96	93	96	93	96	97	98	99	100	100	100
<b>Albumin</b>	93	89	96	96	97	98	98	98	99	99	100	100	100
<b>Beta2-mikroglobulin</b>	-	85	93	96	93	94	89	90	92	94	100	100	100
<b>Elfo_Albumin</b>	90	96	94	97	95	95	96	97	97	97	100	100	100
<b>Elfo_Gamaglobuliny</b>	86	93	92	90	94	91	92	95	97	98	100	100	100

## 6. Nové směry v diagnostice monoklonálních gamapatií

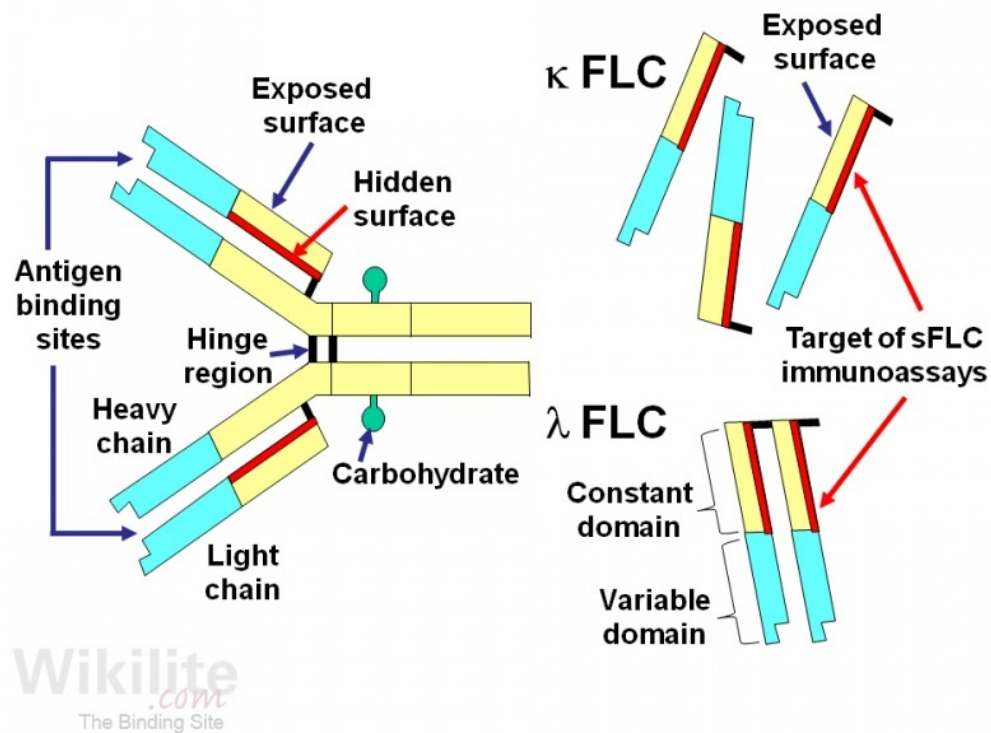
### 6.1. Stanovení koncentrace FLC v séru

Zavedení spolehlivé metody pro stanovení koncentrace volných lehkých řetězců v séru bylo prvním cílem mé disertační práce.

Volné lehké řetězce kappa a lambda jsou u zdravých jedinců běžně produkovány v množství asi 500 mg denně ve zdravých plazmatických buňkách dřeně a lymfatické tkáni (54, 68). Vzhledem k tomu, že se jedná o relativně malé molekuly složené ze zhruba 220 aminokyselin, prochází volně glomerulární filtrací do moči. Zde jsou pak za normálních okolností reabsorbovány pinocytózou zpět do krevního řečiště a to tak, že jen asi 10 mg je vyloučeno močí za 24 hodin. Relativně rychlá clearance je příčinou krátkého biologického poločasu novotvořených FLC v séru (2-4 hodiny pro kappa a 3-6 hodin pro lambda). Za patologických okolností může koncentrace FLC stoupat (53,54,68,69). Může se jednat o renální problém, kdy z důvodu snížené glomerulární filtrace proporcionálně stoupají jak lehké řetězce kappa, tak i lambda (10). Z tohoto důvodu se v praxi častěji využívá pro vyjádření patologické nadprodukce jednoho či druhého typu FLC jejich poměr (FLCr), který lépe odráží přítomnost patologické klonální produkce. Snížení glomerulární filtrace může částečně vysvětlovat často se vyskytující elevaci FLC u starších nemocných bez přítomnosti monoklonální gamapie a s normálním FLCr. Snížená clearance také signifikantně prodlužuje poločas FLC v séru u pacientů s kompletním renálním selháním a to třeba až na 2-3 dny (10). Vlivem výrazné nadprodukce FLC může dojít k překročení kapacity reabsorpčního systému.

Po zavedení nové automatizované metody stanovení FLC v roce 2001 došlo k rychlému rozšíření používání této metody v klinické praxi. Jde o velmi citlivou metodu automatizované imunochemické analýzy volných lehkých řetězců (FLC), kdy lze s využitím specifické detekční protilátky použít běžné proteinové analyzátory. Tato protilátka byla připravena v roce 2000 prof. Bradwellem (10). Jedná se o velmi avidní polyklonální protilátku proti vnitřnímu epitopu molekul lehkých řetězců kappa nebo lambda, což umožňuje specifické a kvantitativní stanovení velice nízkých koncentrací kappa a lambda volných lehkých řetězců pomocí nefelometrické nebo turbidimetrické techniky. Vnitřní epitop molekuly lehkých řetězců je v celkové molekule nepřístupný a tím je vyloučena zkřížená reaktivita s lehkými řetězci vázanými v molekule intaktního imunoglobulinu. (10,11,70,73,74). Princip této metody je schématicky znázorněn na Obrázku č. 11.

Obrázek 11. Princip imunochemické metody stanovení FLC



Metodika stanovení FLC je v současné době již dobře zavedenou metodou, kdy je celosvětově převážně využíván standardizovaný systém FreeLite™ (Binding Site, UK). Princip metody je imunoturbidimetrický, kdy se využívá vazby epitopů řetězců kappa či lambda na protilátku. Následně vzniklé imunoprecipitáty jsou pak stanoveny turbidimetricky (10,67). Protilátky pro toto vyšetření jsou modifikovány tak, aby se vázaly pouze na epitopy FLC, které nejsou přístupné na kompletní molekule imunoglobulinu. Test je založen na afinitně purifikovaných polyklonálních protilátkách proti FLC, které jsou vázány na latexové částice. Tato metoda je velmi rychlá a citlivá, se senzitivitou detekce pod 1 mg/L, což suverénně překračuje možnosti konvenčních elektroforetických metod (10,67). Referenční intervaly byly nejprve testovány autorem systému FreeLite A. R. Bradwellem, ale kompletně byly definovány až J. A. Katzmannem po vyšetření rozsáhlého souboru vzorků sér od zdravých dárců krve a rovněž vyšetřením souboru vzorků zdravých jedinců různého věkového rozložení. Vypočtený poměr řetězců  $\kappa$  a  $\lambda$ , tzv.  $\kappa/\lambda$  index, určuje klonalitu lehkých řetězců a tím i klonalitu plazmocelulární populace produkující MIG (67,68,69). Hladiny volných lehkých řetězců mírně narůstají s věkem z důvodu snižování glomerulární filtrace a proto i při renální insuficienci dochází k nárůstu hladin FLC s mírným ovlivněním indexu  $\kappa/\lambda$  (10,67).

Referenční meze vyšetření pomocí FreeLite™ jsou uvedeny v Tabulce č. 9.



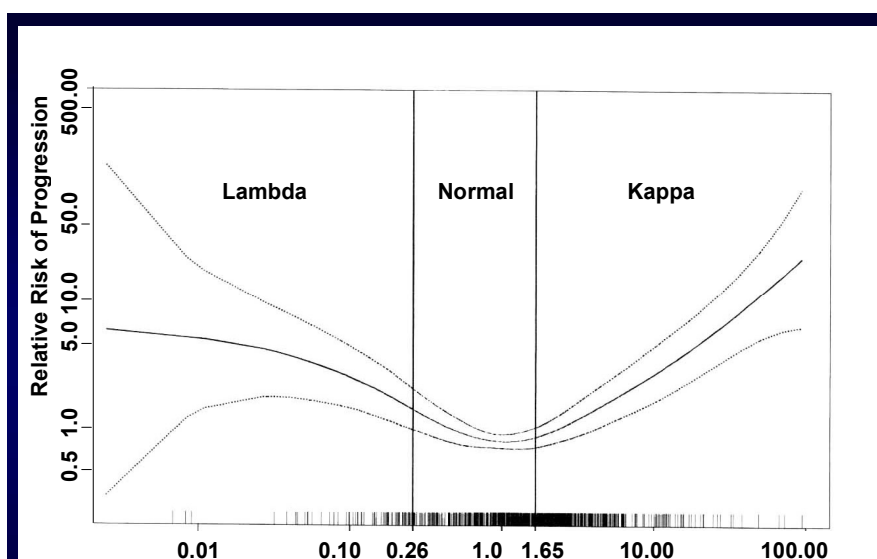
**Tabulka 9. Referenční meze vyšetření FreeLite™ dle Katzmanna et al. (69)**

Kappa	95% interval: 3,3–19,4 mg/L
Lambda	95% interval interval: 5,7–26,3 mg/L
Kappa/Lambda poměr	95% interval: 0,3–1,2
	Normální poměr: 0,26–1,65

FreeLite™ (Binding Site, UK) je zatím jedinou doporučenou metodou pro stanovení FLC u pacientů s monoklonálními gamapatiemi v rámci IMWG i národních guidelines. Proto jsme i my zvolili tento test jako nejvhodnější při zavádění metody stanovení volných lehkých řetězců v séru v naší biochemické laboratoři. Měření FLC provádíme na přístroji BN ProSpec (Siemens). Při stanovení je využíván imunonefelometrický princip.

Stanovení FLC v séru je dnes zcela běžně využíváno jak v rámci diagnostiky, tak i monitoringu monoklonálních gamapatií (15,54,76). Jak již bylo uvedeno, jedná se o jeden z klíčových nezávislých prognostických faktorů u pacientů s MGUS (15,54,76). Závislost rizika progresu na naměřené hodnotě poměru volných lehkých řetězců v séru názorně vyjadřuje Graf č. 2 dle Bradwella.

**Graf 2. Bradwell, A.R. Relativní riziko progresu dle hodnoty FLC**



Nezastupitelné místo má ale stanovení FLC v séru i v diagnostice tzv. nesekrečních myelomů, kdy díky této metodě výrazně klesl počet skutečně nesekrečních myelomů, neboť vysoká citlivost metody umožňuje detekovat a dále sledovat i myelomy s malou produkcí FLC. Obrovský význam má v diagnostice AL amyloidózy, kde MIG často chybí nebo je jen v malé kvantitě a tudíž nelze využít ke sledování léčebné odpovědi klasických metod (52).

Při sledování léčebné odpovědi pacientů s gamapatiemi může být stanovení FLC přínosem v několika rovinách. Především nově formulovaná kritéria léčebné odpovědi MM dle IMWG (14) zahrnují FLCr a jeho normalizaci při hodnocení hloubky kompletní remise. Stanovení FLC je využíváno i při pravidelném sledování pacientů v remisi MM k časně detekci relapsu onemocnění. U některých pacientů může docházet k relapsu se sekrecí pouze FLC, nikoli s kompletním MIG (tzv. „light chain escape“ fenomén) (14), kdy léčbou došlo k selekci klonu, který neprodukuje kompletní molekulu MIG, ale jen FLC. Tato klonálně selekční teorie evoluce mnohočetného myelomu se dnes stala jednou z oblastí intenzivního výzkumu.

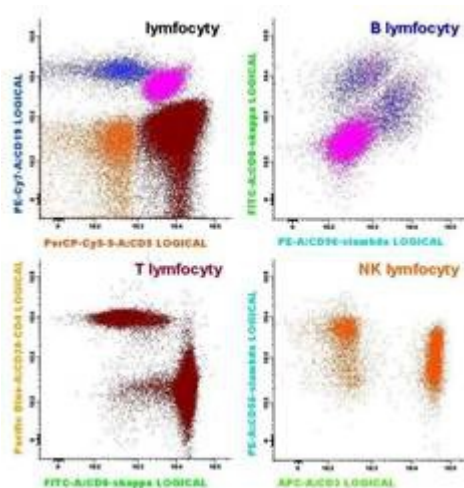
Samozřejmě i metoda FreeLite™ má svá úskalí. Jedním z hlavních problémů stanovení volných lehkých řetězců je zkřížená reakce s lehkými řetězci navázanými v intaktních imunoglobulinových molekulách. Anti-FLC antiséra mají průměrnou zkříženou reaktivitu 0,1. Stále chybí mezinárodní referenční materiál, neboť je složité validovat kalibrátor pro velkou strukturální heterogenitu lehkých řetězců, která může být modifikována působením pH, polymerace a oligomerace. Ke kalibraci se používá směs 3-30 klonálně rozdílných Bence Jones proteinů. Tento tzv. koktejl poskytuje průměr z rozdílných antigenních referenčních materiálů (54,72). Donedávna byl tak v ČR, ale i celosvětově hlavní problém se standardizací tohoto vyšetření a proto byly následně podniknuty kroky ke sjednocení metodiky vyšetřování FLC i v ČR (53,54). Výsledky stanovení FLC byly za účelem standardizace tohoto vyšetření porovnávány mezilaboratorně (75). Z této mezilaboratorní studie vyplynulo, že je nutné především sjednotit ředění sér v jednotlivých laboratořích dle pokynů výrobce. Index kappa/Lambda je stanovitelný s menší přesností, proto bylo doporučeno používat ve větší míře hodnot koncentrací FLC. Stanovení FLC bylo od počátku roku 2010 zařazeno do panelu kontrolního cyklu SEKK Gamapatie (75).

Přestože je dnes stanovení volných lehkých řetězců v séru již nedílnou součástí laboratorních vyšetření a diagnostického procesu u pacientů s monoklonální gamapatií, interpretace výsledků může být někdy obtížná. Proto je v tomto případě nezbytná dokonalá mezioborová spolupráce klinických lékařů a laboratorních specialistů (77).

## 6.2. Imunofenotypizační vyšetření

Toto vyšetření je v současné době u monoklonálních gamapatií nejasného významu a mnohočetného myelomu využíváno stále častěji. Z důvodu zavedení nutnosti stanovení klonality plazmatických buněk v kostní dřeni je důležité také podrobné určení imunofenotypové charakteristiky plazmocytů. Jelikož se metodiky flowcytometrie využitím multiparametrické cytometrie stále rozvíjejí, lze s větší senzitivitou stanovit i minimální reziduální chorobu u pacientů. Základními znaky, které charakterizují plazmatické buňky, jsou CD38 a CD138. Tyto znaky jsou společné pro normální i abnormální plazmocyty. Jejich rozlišení lze provést až na základě analýzy exprese dalších znaků (79). Klonální plazmocyty mají sníženou expresi CD19, CD27, CD38 a CD45, a naopak zvýšeně exprimují CD20, CD28, CD33, CD56 a CD117 (37,80). Současně se využívá k průkazu klonálního původu i přítomnosti cytoplazmatických kappa a lambda řetězců (44). K určení klonality plazmatických buněk musí být analyzována přítomnost minimálně 4 znaků. K podrobné analýze minimální reziduální choroby a nově i k stanovení tzv. imunofenotypové kompletní remise je nutné mít k dispozici minimálně 6-, ideálně 8- a vícebarevnou flowcytometrii (viz Obrázek č. 12). Multiparametrická flowcytometrie a imunofenotypizace je díky současným znalostem a technickým možnostem řazena na přední místo v diagnostice mnoha hematologických malignit (80). Vyšetření je využíváno v diferenciací diagnostice hematologických onemocnění, stanovení rizika progresu u MGUS a asymptomatického myelomu. Nezastupitelný význam má také v rámci panelu prognostických markerů mnohočetného myelomu a v detekci minimální reziduální nemoci (79). Jediný problém flowcytometrie zatím spočívá v tom, že k jednoznačnému výsledku při hodnocení přítomnosti minimální reziduální choroby je nutné poměrně velké množství materiálu, v tomto případě odebrané kostní dřeni (79).

**Obrázek 12. Ukázka výsledku flowcytometrie**



zdroj: [www.babak.med.muni.cz](http://www.babak.med.muni.cz)

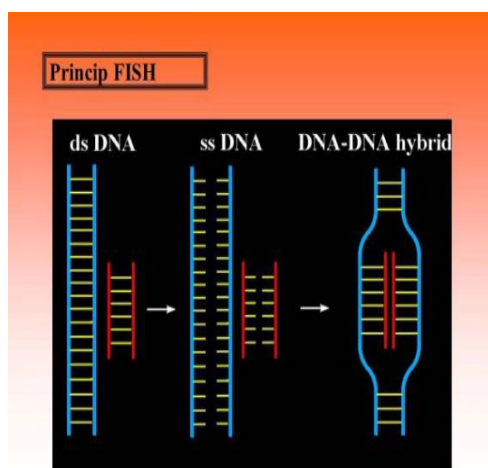
### 6.3. Vyšetření genomu

V souvislosti s tím, jak pokračují nejnovější výzkumy o biologii monoklonálních gamapatií vzrůstá také význam cytogenetického a zejména celogenomového vyšetření. Klasická cytogenetika společně s metodami FISH dokáže bezpečně odhalit chromozomové aberace běžně popisované u mnohočetného myelomu. FISH (fluorescenční hybridizace in situ) se provádí fluorescenčním mikroskopem a k vyhodnocení se využívá počítačová analýza obrazu (princip metody viz (Obrázek č. 13). MGUS i mnohočetný myelom mají společné některé genetické odchylky v úvodu onemocnění. Jednou z časných onkogenních událostí je translokace genů IgH. Jedná se o 3 hlavní skupiny genů, které kódují cyklin D, MAF geny a geny MMSET/FGFR3. Translokace, které kódují cyklin sami o sobě spouští dysregulaci v expresi cyklinů a tím zahájí deregulaci kontroly buněčného cyklu. MAF geny deregulují transkripční faktory, které kontrolují CCND2 (cyklin D2) a expresi dalších faktorů jako např. adhezivních molekul plazmatických buněk k mikroprostředí kostní dřeně. Úloha aktivace MMSET genů je zatím předmětem výzkumu.

Nejprogresivnějšími směry poslední doby v cytogenetice jsou stanovení profilu genové exprese (GEP) a sekvenování další generace (NGS). S velkou pravděpodobností půjde v budoucnosti o jednu z nejvýznamnějších diagnostických a prognostických metodik u pacientů s MG. Nepochybně bude mít v konečném důsledku význam i pro průběžné hodnocení efektu jejich léčby při stanovení minimální reziduální choroby (44).

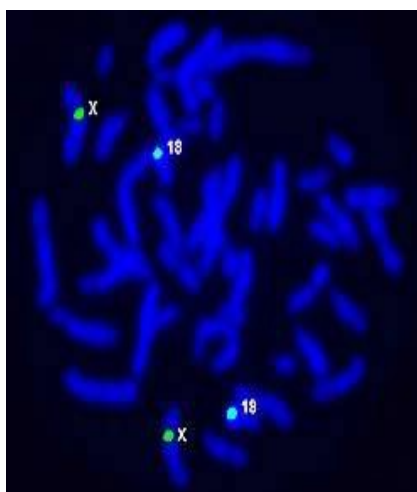
V roce 2015 byl prognostický systém ISS rozšířen o naměřenou koncentraci LDH a přítomnost rizikových cytogenetických změn. Byl zaveden nový, revidovaný prognostický model R-ISS, jehož používání je nově doporučeno místo původního modelu (viz Tabulka č. 10). Nicméně původní prognostický systém ISS zůstává pro svou jednoduchost i nadále v platnosti.

**Obrázek 13 . Princip FISH**



zdroj:www.slideplayer.cz

**Chromozomy v metafázi**



www.genetikakv.cz

**Tabulka 10. Revidovaný mezinárodní prognostický index (R-ISS) mnohočetného myelomu**

R-ISS	Kritéria
I	ISS stadium Ia průkaz standardně rizikové cytogenetiky při vyšetření iFISH a normální koncentrace LDH
II	Nejsou splněna kritéria R-ISS I ani III
III	ISS stadium III a současně průkaz přítomnosti vysoce rizikových cytogenetických změn při vyšetření iFISH nebo zvýšené LDH

## **7. Vlastní laboratorní diagnostika MGUS**

### **7.1. Způsob získávání dat a statistické metody zpracování dat**

Analyzovaná data pacientů pochází výhradně z Oddělení klinické biochemie Oblastní nemocnice v Trutnově. Celkem bylo v časovém období 1. 8. 2008 - 1. 8. 2018 diagnostikováno 555 pacientů s MGUS. Ve všech případech byly jejich vzorky kompletně zpracovány a diagnostikovány na Oddělení klinické biochemie ON Trutnov a.s. Při jejich vyšetření bylo použito metod, které byly podrobně popsány v kapitole 5. Jednalo se zejména o nefelometrii, turbidimetrii, elektroforetické a imunofixační vyšetření. Pro analýzu FLC, která byla provedena u 282 vzorků sér pacientů s MGUS byla využita metoda FreeLite™.

Laboratorními parametry, které byly v rámci diagnostiky a prognózy stanoveny u jednotlivých vzorků pacientů, byly koncentrace a typ monoklonálního imunoglobulinu, koncentrace albuminu a beta2-mikroglobulinu. Z dalších biochemických parametrů byly stanovovány základní parametry ledvinných funkcí včetně odhadu GF pomocí rovnice CKD-EPI, koncentrace minerálů včetně kalcémie, koncentrace kyseliny močové, celkové bílkoviny a kvantitativní proteinurie.

V rámci zpracování byla využita základní popisná (deskriptivní) analýza dat a to medián, minimum, maximum a percentily. Pro analýzu byl použit program SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc., USA). Veškeré testy byly vyhodnoceny s 5 hladinou významnosti.

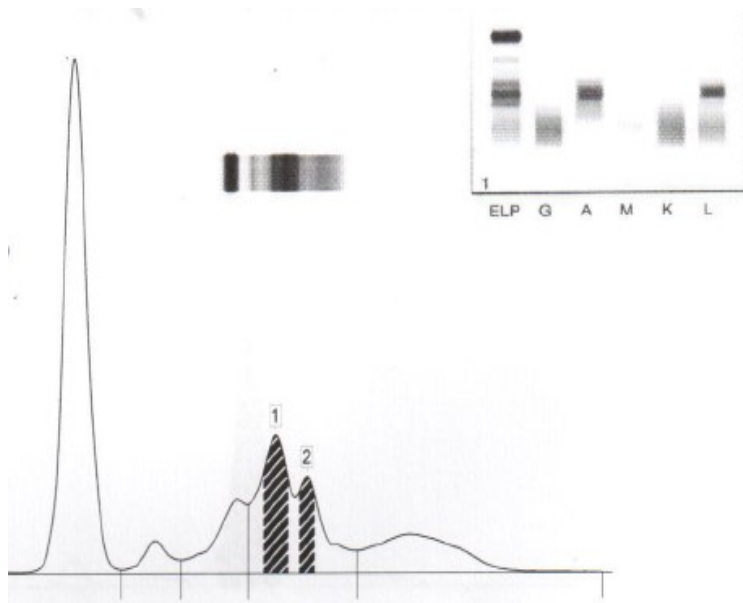
### **7.2. Detekce MIG při elektroforetickém vyšetření bílkovin a příklady vlastních pozorování**

Základní charakteristikou MGUS je přítomnost MIG v séru nebo v moči. Monoklonální imunoglobulin se přitom může při elektroforetickém vyšetření objevit kdekoliv v oblasti mezi gama-globuliny až alfa-2-globuliny. Může být pozorován jako ostrý gradient nebo může mít charakter širší difúzní zóny anebo může splývat s frakcí beta-globulinů (hlavně paraprotein IgA) (2,3). V oblasti alfa-2 až beta-globulinů jsou pak takové paraproteiny hůře odhalitelné. V případě těchto širších frakcí je třeba k potvrzení nebo vyloučení MIG doplnit imunofixační vyšetření.

### 7.2.1. Příklady detekce MIG v oblasti beta-globulinů

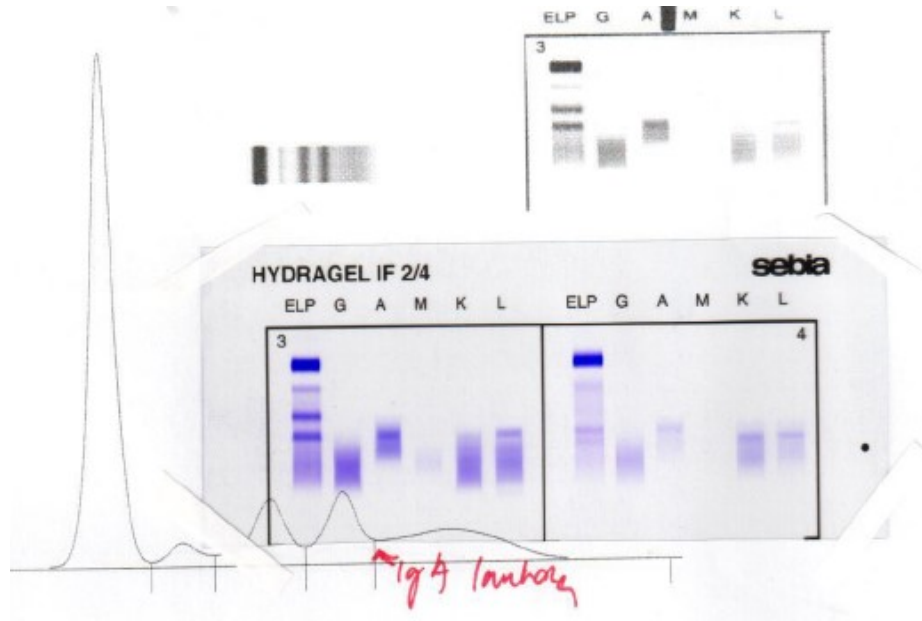
Jako první příklad zde uvádím elektroforetické a imunofixační vyšetření u pacientky s průkazem monoklonální gamapatie IgA-lambda o dvojitým gradientu s koncentracemi 8,4 a 4,2 g/L. MIG IgA-lambda byl prokázán v oblasti beta-globulinů (viz Obrázek č. 14). Imunofixační vyšetření bylo doporučeno pro nález rozšířené frakce betaglobulinů. Jednalo se o 85letou pacientku, která je v dispenzarizaci hematologické ambulance pro MGUS IgA-lambda od července 2014. Vyšetření sternálního punktátu prokázalo 7,6 plazmatických buněk. Scintigrafické vyšetření skeletu bylo negativní, ani low dose CT skeletu neprokázalo žádné patologické změny.

**Obrázek 14. Elektroforetické a imunofixační vyšetření séra u pacientky se zdvojenou paraproteinémií IgA-lambda (OKB ON Trutnov a.s.)**



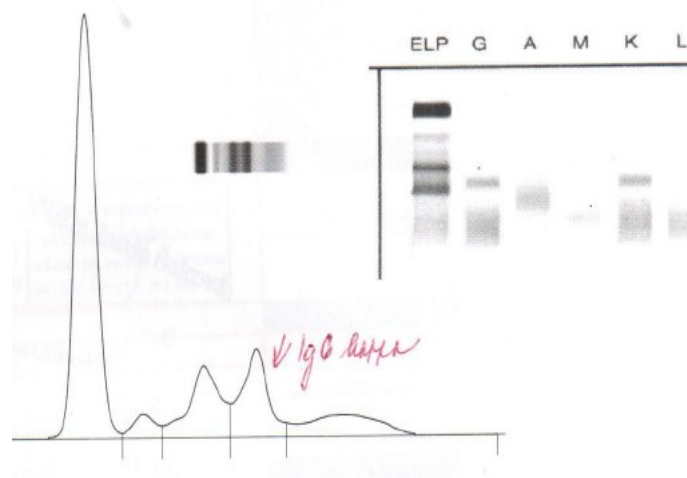
Druhé pozorování se týká 83letého pacienta, u něhož byla při elektroforetickém vyšetření séra prokázána jen mírně zmnožená frakce beta-globulinů. Až po doplnění imunofixačního vyšetření byl prokázán MIG IgA-lambda s přechodem do moči (viz Obrázek č. 15). Pacient je v dispenzarizaci hematologické ambulance v Trutnově od října 2014.

**Obrázek 15. Elektroforetické a imunofixační vyšetření séra u pacienta s MGUS IgA-lambda (OKB ON Trutnov a.s.)**



Jako třetí příklad záchytu monoklonálního imunoglobulinu v oblasti beta-globulinů uvádím nález u 75leté pacientky. Imunofixační vyšetření u ní bylo provedeno na základě nálezů rozšířené frakce beta-globulinů a prokázalo paraprotein IgG-kappa (viz Obrázek č. 16). U pacientky byla následně v rámci hospitalizace na kardiologické klinice FN Motol v Praze pro restriktivní kardiomyopatii nejasné etiologie diagnostikována amyloidóza.

**Obrázek 16. Elektroforetické a imunofixační vyšetření séra u pacientky s monoklonální gamapatií IgG-kappa (OKB ON Trutnov a.s.)**





### 7.2.2. Biklonální (zdvojené) monoklonální gamapatie

Biklonální MG představují přibližně 3-5 % z celkového počtu monoklonálních gamapatií. Někdy je zdvojená gamapatie zjištěna již při elektroforéze, jindy až při imunofixaci. Většinou se jedná o „biclonal gammopathy of undertermined significance“ (BGUS) (1). Biklonální gamapatie nejistého významu (BGUS) je méně obvyklý nález charakterizovaný přítomností dvou monoklonálních gradientů a relativně příznivým biologickým chováním (78). Termín biklonální přítom vždy neznamená, že se jedná o produkci MIG dvěma separátními klony plazmatických buněk, může se též jednat o nekompletní přepnutí třídy Ig jednoho klonu plazmatických buněk. Pak jsou přítomny i rozdílné typy lehkých řetězců. Většinou se však vyskytují stejné typy lehkých řetězců s dvěma rozdílnými typy těžkých řetězců nebo s rozdílnými podtřídami těžkých řetězců (78). Biklonální gamapatie, které mají původ v monoklonální plazmocytární populaci, jsou zpravidla způsobeny abnormální rekombinací těžkých řetězců imunoglobulinu (tzv. „class switch“) v průběhu vývoje B-lymfocytů, vedoucí k biklonální syntéze a sekreci těžkých řetězců (83). I když BGUS má stejné biologické chování jako MGUS, velká část prognostických ukazatelů včetně stanovení FLC zde selhává (10,78,83). Je nezbytné využívat technik multiparametrické průtokové cytometrie s izolací a separací jednotlivých buněčných klonů a následnou molekulárně-cytogenetickou analýzou nebo vyšetřením profilu genové exprese. Takto je možné i posouzení rizika možné maligní transformace. Z klinického pohledu platí doporučení klinicko-laboratorního sledování v 3-6 měsíčních časových intervalech (78). Klinicky není rozdíl mezi biklonálními a monoklonálními gamapatiemi, ale je důležité sledovat během vývoje onemocnění oba klony, neboť vývoj obou klonů může být asynchronní (1). Asi 1 % všech BGUS může během 1 roku progredovat do mnohočetného myelomu, což je obdobné jako u MGUS (83).

My jsme v rámci celého souboru 555 monoklonálních gamapatií v průběhu 10letého sledovacího období prokázali zdvojené (biklonální) gamapatie celkem v 35 případech. Frekvence výskytu biklonální gamapatie v našem souboru tak činila 6,3 % z celkového souboru MG (viz Tabulka č. 11). Nejčastěji pozorovaným zdvojeným paraproteinem byl typ MIG IgG-kappa + IgG-lambda. Do souboru jsme přitom nezahrnuli zdvojené M-gradientsy tvořené stejnými monoklonálními imunoglobuliny. Ty jsme zjistili v dalších 46 případech. Klasické biklonální gamapatie jsme detekovali u 15 žen a 20 mužů. Nejmladší pacientkou byla

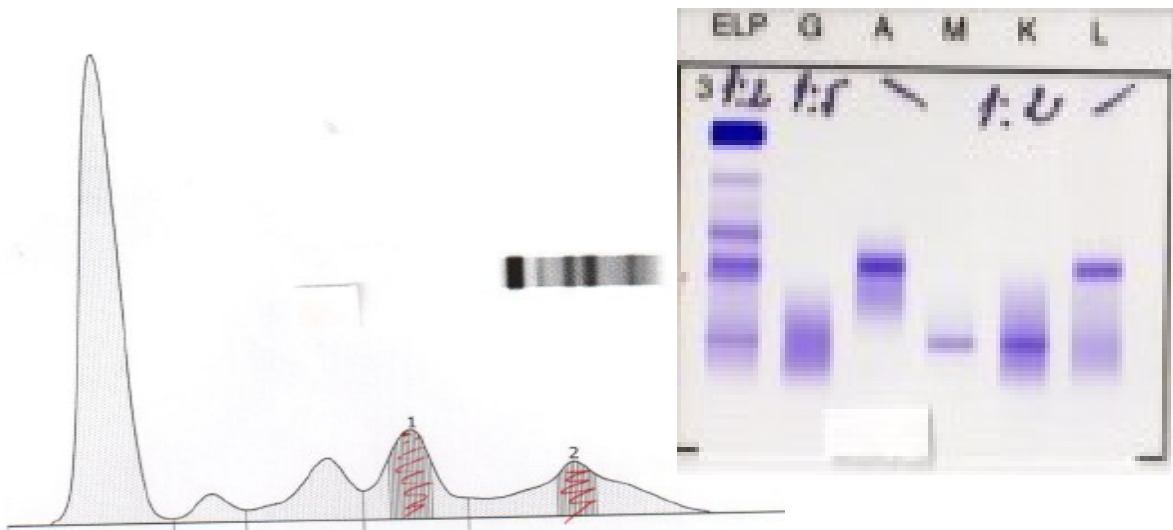
32letá a nejstarší pak 91letá žena. U mužů byl nejmladší pacient 54letý a nejstarší ve věku 88 let. Medián věku u obou pohlaví byl 71 let.

**Tabulka 11. Biklonální (zdvojené) monoklonální gamapatie zachycené v časovém období 1. 8. 2008 - 1. 8. 2018 v souboru 555 monoklonálních gamapatií**

Typy monoklonálních imunoglobulinů	Počet
IgG-kappa +IgG-lambda	7
IgG-lambda+IgM-kappa	5
IgG-kappa+ lambda free	5
IgG-kappa+ IgM-lambda	4
IgG-lambda+IgM-lambda	4
IgG-lambda+IgA-lambda	2
IgA-lambda+IgM-kappa	2
IgA-kappa+IgG-lambda	2
IgM-lambda+kappa free	1
IgA-lambda+IgM-lambda	1
IgA-kappa+IgG-kappa	1
IgA-kappa+IgM-kappa	1
	Celkem: 35 (6,3 %)

Pro ilustraci uvádím pozorování 60letého pacienta s biklonální gamapatií IgA-lambda a IgM-kappa o koncentraci MIG 7,1 resp. 4,1 g/L (viz Obrázek č. 17).

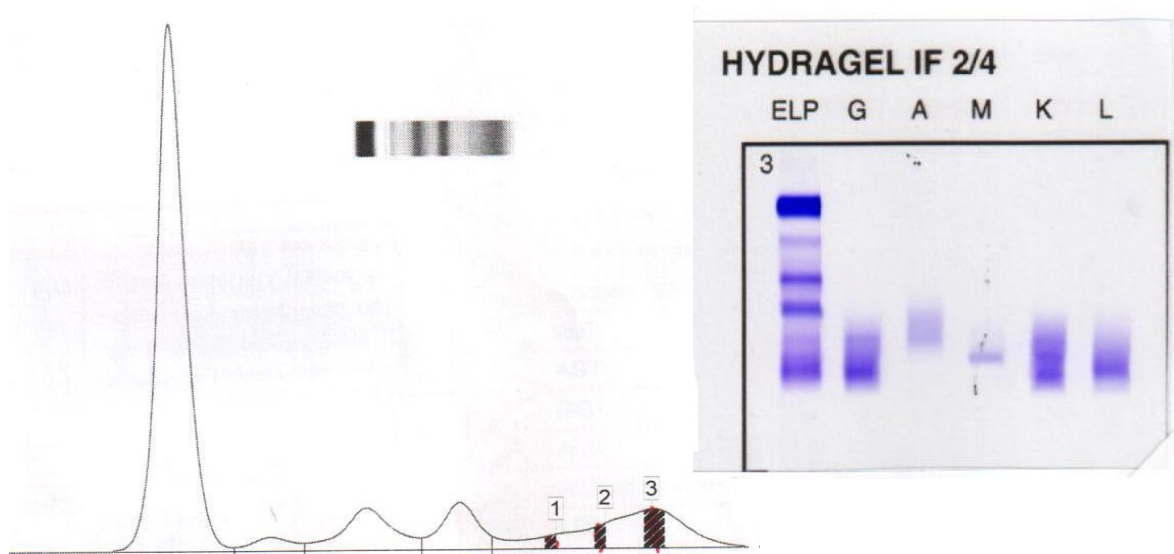
**Obrázek 17. Výsledky elektroforetického a imunofixačního vyšetření séra u pacienta s biklonální gamapatií IgA-lambda + IgM-kappa (OKB ON Trutnov a.s.)**



### 7.2.3. Triklonální monoklonální gamapatie

V jednom případě 66leté ženy jsme zachytili dokonce triklonální gamapatii. Pomocí imunofixačního vyšetření byli potvrzeni tři typy MIG: IgG-kappa + IgM-kappa + IgG-lambda v příslušných koncentracích 0,5, 0,9 resp. 2,4 g/L (viz Obrázek č. 18).

**Obrázek 18. Výsledky elektroforetického a imunofixačního vyšetření séra u pacientky s triklonální gamapatií IgG-kappa + IgM-kappa + IgG-lambda (OKB ON Trutnov a.s.)**



#### 7.2.4. Tranzientní (přechodné) paraproteinémie

Rovněž tranzientní monoklonální gamapatie patří do skupiny monoklonálních gamapatií nejasného významu (MGUS). Jedná se o stav spojený s přechodnou přítomností MIG v séru a/nebo v moči. Tranzientní MIG jsou definovány jako malé monoklonální imunoglobuliny identifikované pomocí elektroforézy proteinů séra (SPE) a potvrzené imunofixací bílkovin séra (IFE) (85,87). Tranzientní MIG se obvykle objevují náhle, v nízkých koncentracích a spontánně se ztrácejí v průběhu několika dní, týdnů až měsíců (86,88). Pojem tranzientní paraprotein se poprvé objevuje v publikaci Seligmanna a Younga v roce 1965 (87). Vyvolávající agens tranzientních paraproteinémií může být různé, nejčastěji se jedná o virové infekce. Typově se proto nejčastěji jedná o MIG typu IgM. Mechanismem vzniku tranzientního MIG je atypická, nespecifická aktivace některých klonů B-lymfocytů a zároveň reaktivní imunologická abnormalita (nespecifická reakce na imunitní podnět) u predisponovaného jedince (např. s alergií, přechodným imunodeficitem). Nesporný je i možný vliv genetické predispozice (84,89). Mezi onemocnění, která mohou být rovněž spojená s výskytem tranzientní paraproteinémie patří autoimunní a systémová onemocnění (autoimunní hepatitis, systémový lupus erythematodes, revmatoidní arthritida, osteoarthritis, sklerodermie, autoimunní tyreoiditida apod.), virová onemocnění (hepatitis C, EBV – infekční mononukleóza, CMV – cytomegalovirová infekce), onemocnění z poruchy imunity (hypogamaglobulinémie, Wiskott – Aldrichův syndrom), nádorová onemocnění (akutní leukémie, epiteliální nádory) a další onemocnění (cirhóza jater, městnavé srdeční selhání, sepse, febrilní stav nejasného původu) (85,86,88,90,91,92,93,94).

Tranzientní MIG jsou do dnes záhadným laboratorním fenoménem, jehož příčiny jsou nadále předmětem výzkumu (87). Zda tyto proteiny znamenají zvýšené riziko pro neoplázií plazmatických buněk zatím není prokázáno. Tranzientní paraproteinémie mohou být snadno přehlédnuty při hypergamaglobulinémii. Standardně se doporučuje monoklonální gamapatie i s minimální koncentrací MIG v séru pravidelně a dlouhodobě sledovat. Přínosné by zřejmě bylo i dlouhodobější sledování jedinců, u nichž se tranzientní paraproteinémie vyskytly a to nejen co se týče vztahu k budoucí prognóze nemocných, ale i s cílem pochopení a případného využití jejich výskytu.

Na OKB ON Trutnov a.s. jsme se zaměřili na analýzu výskytu tranzientních MIG u několika našich pacientů včetně jejich dalšího sledování. Celkově se jednalo o soubor 28

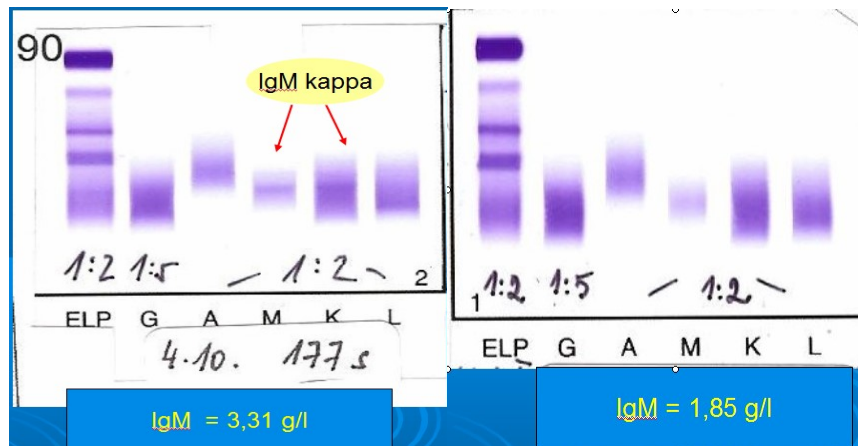
pacientů, v 18 případech jsme pozorovali tranzientní paraprotein u žen a v 10 případech u mužů (viz Tabulka č. 12). Nejmladším pacientem byl 20letý muž, nejstarším 84letá žena. Imunofixací byly prokázány paraproteiny IgG-kappa, IgG-lambda, IgM-kappa a IgM-lambda. Nejčastější byl výskyt MIG IgG-kappa a to ve 12 pozorováních. Naměřené koncentrace MIG se nacházely v rozmezí od 0,7 g/L do 4,9 g/L, doba přítomnosti MIG od jeho průkazu do vymizení se pohybovala od 1 měsíce do maximálně 3 let (viz Tabulka č. 12).

Pro ilustraci uvádím 2 případy námi zachycené tranzientní paraproteinémie. V prvním případě se jednalo o 46letou ženu, která byla hospitalizována na interním oddělení pro febrilní stav nejasné etiologie. Pacientka byla v dispenzarizaci alergologické ambulance pro astma bronchiale a dále sledována v urologické ambulanci pro chronickou cystitidu. V rámci hospitalizace bylo provedeno základní biochemické vyšetření včetně elektroforézy bílkovin séra. Na základě výsledku elektroforetického vyšetření byla doplněna imunofixace bílkovin séra. Ta potvrdila přítomnost monoklonálního IgM-kappa v séru o koncentraci 1,2 g/L (viz Obrázek č. 20). Dalšími sérologickými testy byla zjištěna probíhající cytomegalovirová infekce. Kontrolní elektroforéza séra provedená s odstupem 1 měsíce již původně zachycený paraprotein IgM-kappa neprokázala (viz Obrázek č. 19) a rovněž koncentrace celkového IgM poklesla do fyziologického rozmezí.

**Tabulka 12. Přechodné monoklonální gamapatie – soubor pacientů**

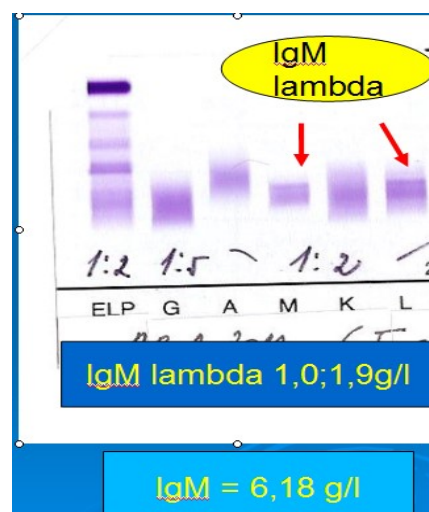
Pohlaví	Rok narození	Diagnóza	Typ MIG	Koncentrace MIG (g/L)	Doba přítomnosti MIG
1. žena	1936	K 769	IgM-κ	4,9	2 roky
2. žena	1952	K 739	IgM-λ	1,0; 1,9	5 měs.
3. žena	1964	R 509	IgM-κ	1,2	2 měs.
4. muž	1990	K 30	IgM-κ	1,4	7 měs.
5. žena	1931	M 800	IgG-κ	1,1	5 měs.
6. žena	1932	R 509	IgG-λ	3,0	6 měs.
7. žena	1951	K 30	IgM-λ	2,0	2 měs.
8. žena	1953	D 649	IgG-λ	2,9	22 měs.
9. muž	1979	Z 000	IgM-κ	0,9	4 měs.
10. muž	1946	J 441	IgG-κ +IgM-λ	1,1; 1,0	3 roky
11. muž	1963	D 472	IgG-λ	1,9	1 měs.
12. žena	1941	K 754	IgG-κ	0,8	14 měs.
13. žena	1957	K 703	IgG-λ	4,4	2 měs.
14. muž	1958	D 472	IgG-λ	1,7	15 měs.
15. muž	1958	D 591	IgG-κ	2,1	9 měs.
16. žena	1943	M 545	IgG-λ	4.6	30 měs.
17. muž	1971	D 472	IgG-κ	0,8	13 měs.
18. muž	1963	D 728	IgG-κ	0,7	11 měs.
19. muž	1941	D 472	IgG-κ	1,8	4 měs.
20. žena	1955	K 30	IgG-κ	1,6	11 měs.
21. žena	1953	D 472	IgG-λ	1,2; 2,0	15 měs.
22. žena	1942	E 782	IgG-κ	1.9	3 měs.
23. žena	1931	I 10,E 780	IgG-κ	1,1	5 měs.
24. žena	1963	K 703	IgM-λ	3,7	13 měs.
25. žena	1938	D 472	IgG-κ	0,7	14 měs.
26. muž	1993	R 104	IgM-λ	1,1	1 měs.
27. žena	1947	K 703	IgM-κ	0,8	14 měs.
28. žena	1960	D 472	IgG-κ	0,7	17 měs.

**Obrázek 19. Vstupní a kontrolní imunofixační vyšetření séru u pacientky s tranzitní paraproteinémií IgM-kappa (OKB ON Trutnov a.s.)**



Ve druhém případě se jednalo o 59letou ženu, která byla hospitalizována na interním oddělení pro febrilní stav nejasné etiologie. Pacientka se léčila s arteriální hypertenzí, jinak do té doby vážněji nestonala. Byla provedena základní biochemická vyšetření včetně elektroforézy a imunofixace séra a moči. Imunofixací séra byl zjištěn monoklonální Ig IgM - lambda o dvojitým gradientu (o koncentracích 1,0 a 1,9 g/L). Výsledek imunofixačního vyšetření séra této pacientky zobrazuje Obrázek č. 21. Kontrolní elektroforéza i imunofixace byly provedeny po 4 měsících od původního záchytu. Paraprotein IgM-lambda o dvojitým gradientu vymizel současně s poklesem celkové koncentrace IgM.

**Obrázek 20. Imunofixační vyšetření séra u pacientky s tranzitní zdvojenou paraproteinémií IgM-lambda (OKB ON Trutnov a.s.)**



### 7.3. Základní charakteristiky analyzovaného souboru pacientů s MGUS

V rámci analýzy byla zpracována data od 555 pacientů s diagnostikovanou MGUS. Jednalo se o sběr a analýzu dat z období desetiletého sledování v časovém období od 1.8.2008 - 1.8.2018. Medián věku sledovaných osob byl 69 let, přičemž věkové rozpětí se pohybovalo od 24 do 96 let. V souboru diagnostikovaných monoklonálních gamapatií bylo téměř rovnoměrné zastoupení mužů i žen. V případě nejmladšího pacienta s monoklonální gamapatií šlo o 24letého muže, u kterého se jednalo o MGUS IgG-kappa o kvantitě 1,2 g/L bez progresu v čase. Přehledně je rozložení analyzovaného souboru nemocných s MGUS dle věku a pohlaví uvedeno v Tabulce č. 13.

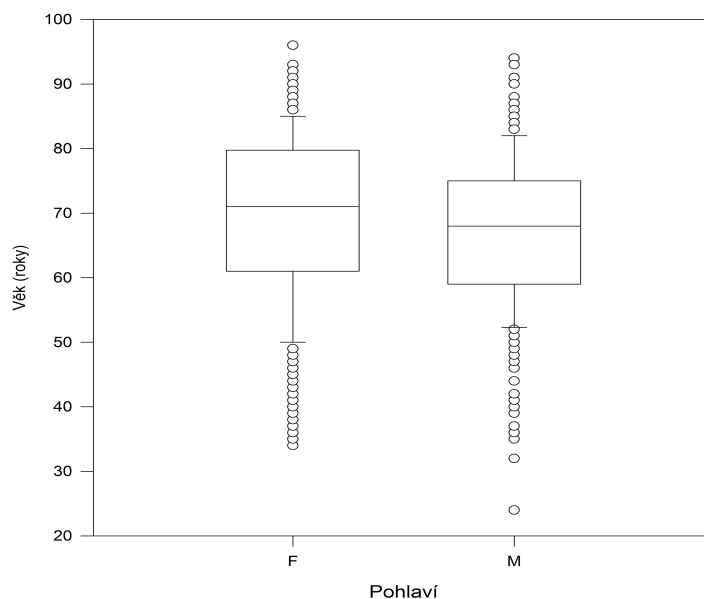
**Tabulka 13. Složení analyzovaného souboru pacientů s MGUS dle věku a pohlaví**

Pohlaví	N=555
Muži	283 (51 %)
Ženy	272 (49 %)
Věk při stanovení diagnózy	N=555
< 40	13 (2,3 %)
40-49	28 (5,1 %)
50-59	89 (16,0 %)
60-69	147 (26,5 %)
< 69	278 (50,1 %)

Na pokladě variantní analýzy při využití Kruskal-Wallis testu ke zjištění věkové difference při nově prokázaném MIG byl zjištěn statisticky významně vyšší věk u žen při nově diagnostikované monoklonální gamapatii ( $p < 0,05$ ). Závislost věku pacientů při nově prokázané MG na pohlaví znázorňuje Graf č. 3.



**Graf 3. Věk pacientů s nově prokázanou MG dle pohlaví**



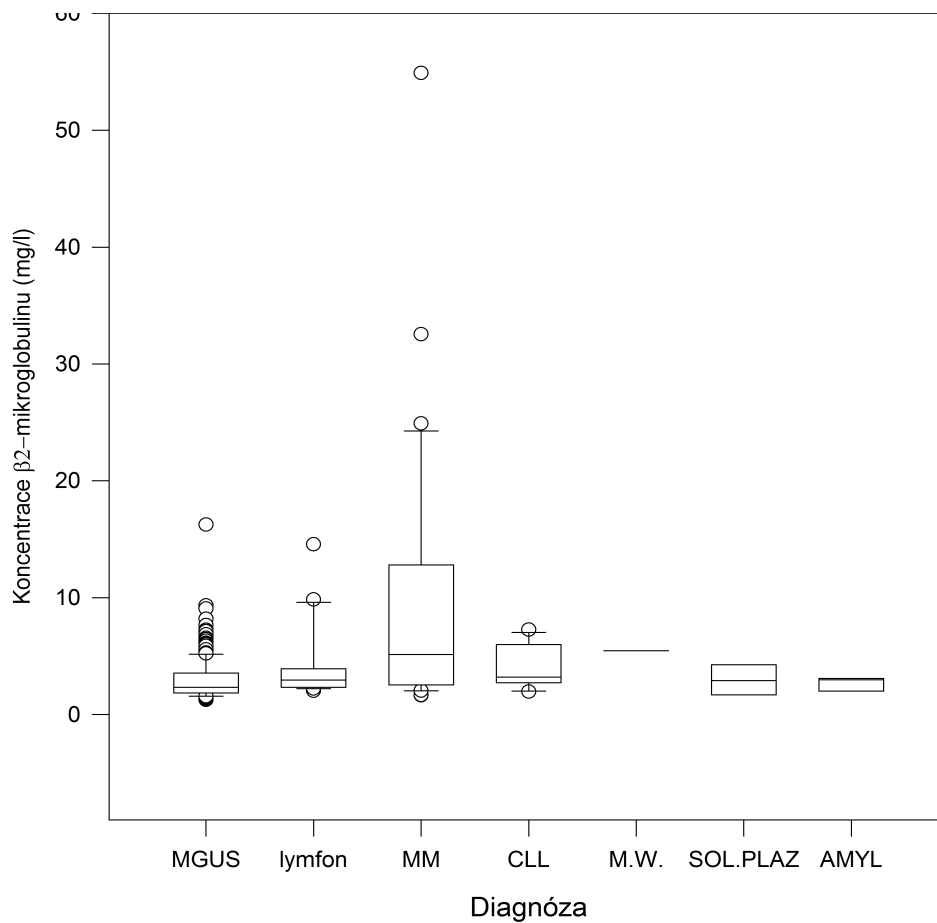
Nejčastěji pozorovaným typem monoklonálního imunoglobulinu v 10letém sledování byl monoklonální imunoglobulin typu IgG-kappa, následovaný IgG-lambda. V 35 případech jsme prokázali monoklonální imunoglobulin v oblasti betaglobulinů. Rovněž v 35 případech z celkového počtu 555 nemocných s MGUS (6,3 %) jsme prokázali biklonální gamapatií. Nejnižší stanovená koncentrace monoklonálního imunoglobulinu byla 0,1 g/L, maximální pak 73,8 g/L. Ve třech případech byl prokázán rodinný výskyt u monoklonálních gamapatií. Přehled vybraných základních parametrů analyzovaného souboru nemocných s MGUS podává následující Tabulka č. 14.

**Tabulka 14. Přehled vybraných základních parametrů u pacientů analyzovaného souboru**

Parametr	Maximum	Mimumum	Medián	25. percentil	75. percentil
Věk (roky)	96,0	2,0	69,0	60,0	78,0
Kvantita MIG (g/L)	73,8	0,1	2,7	1,4	5,6
FLCr	4264,4	0,0	1,5	1,04	2,4
FLC κ (mg/L)	13 500,0	1,3	25,5	17,1	47,1
FLC λ (mg/L)	10 307,1	1,1	15,5	10,8	34,8
B2M (mg/L)	54,9	1,3	2,6	2,0	4,1

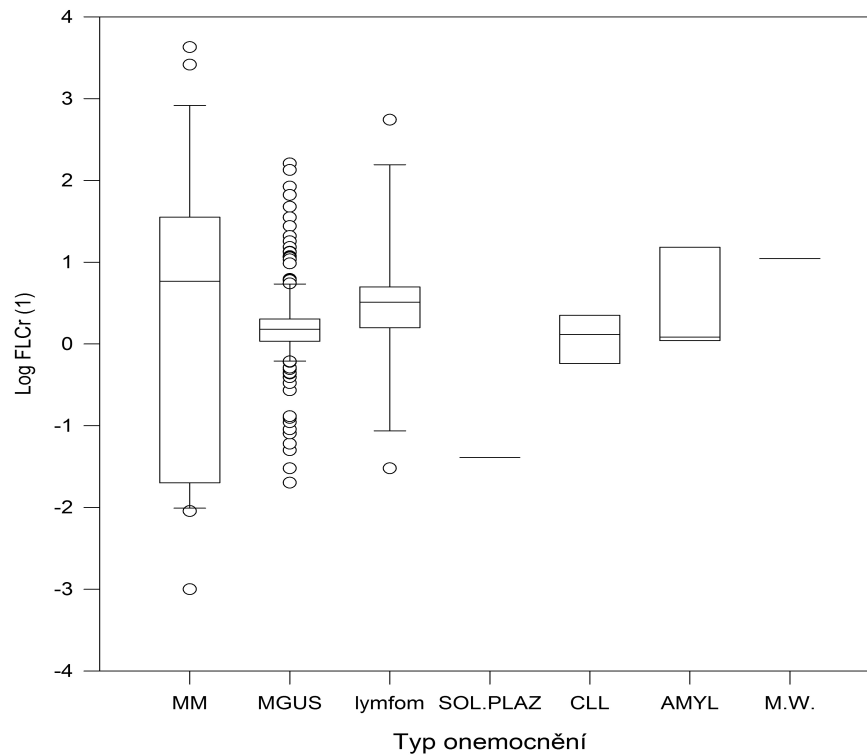
Na analyzovaném souboru bylo prokázáno, že při testování vztahu stanovené koncentrace B2M v g/L a jednotlivých lymfoproliferací (MGUS, lymfomů, MM, CLL, WM, solitárního plazmocyтому a amyloidózy) byl na podkladě srovnávací analýzy při využití Holm-Sidak metody prokázán statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ) mezi MGUS a MM, mezi MM a lymfomy a také mezi MM a CLL. Dosahované koncentrace B2M při určité hematologické diagnóze přehledně znázorňuje Graf č. 4.

**Graf 4. Závislost koncentrace beta2-mikroglobulinu a hematologické diagnózy**



Co se týče analýzy dalších základních parametrů, byla kromě B2M nalezena silná korelace i mezi hodnotou FLCr a vztahem k diagnóze. Byl prokázán statisticky významný rozdíl ( $p < 0,001$ ) naměřené hodnoty FLCr u jednotlivých monoklonálních gamapatií. Nejvyšší rozdíl v hodnotách FLCr byl zjištěn mezi pacienty s diagnózami MGUS a MM. Ke srovnání dat byl použit test normality (Shapiro-Wilk) s následnou srovnávací analýzou s logaritmickou stupnicí koncentrací (viz Graf č.5).

**Graf 5. Logaritmus FLCr u jednotlivých typů MG**



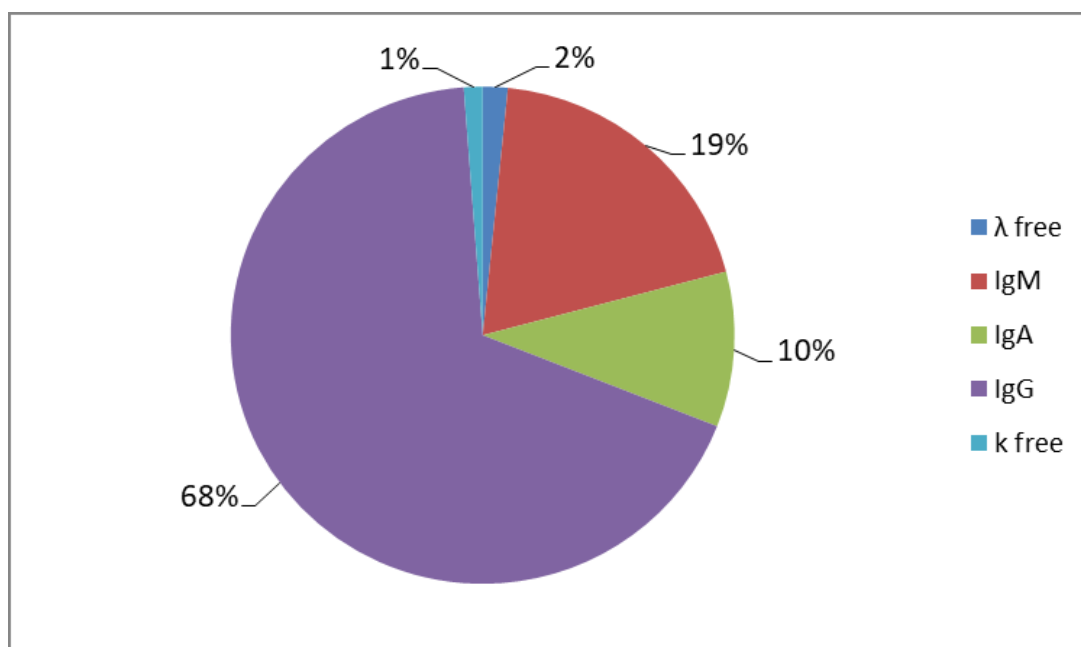
#### **7.4. Základní rozdělení sledovaného souboru nemocných s MGUS**

Pacienty s MG jsme si rozdělili dle různých kritérií. Nejprve jsme provedli jejich rozčlenění dle věkové struktury při stanovení diagnózy a též dle pohlaví. Základním rozdělením MG bylo samozřejmě na MGUS a maligní monoklonální gamapatie. Dalším použitým rozdělením souboru monoklonálních gamapatií bylo na základě typu stanoveného MIG (viz Tabulka č. 15) a Graf č. 6. Dále jsme provedli rozčlenění pacientů do 6 skupin dle kvantity MIG od nejnižší stanovené koncentrace po nejvyšší - konkrétně do 5 g/L, do 9,99 g/L, do 14,99 g/L, do 19,99 g/L a nad 20 g/L (viz Tabulka č. 16). Nejpočetnější zde byla skupina s kvantitou monoklonálního imunoglobulinu do 5 g/L. Dále jsme připravili i kombinované zobrazení souboru MGUS rozděleného dle naměřené kvantity a typu MIG (viz Tabulka č. 17). Přejít do moči jsme zaznamenali celkem u 86 pacientů a to nejčastěji u pacientů s IgG-kappa a IgG-lambda.

**Tabulka 15. Rozdělení souboru dle typu stanoveného MIG**

Typ monoklonálního imunoglobulinu	Počet případů
IgG-kappa	228
IgG-lambda	164
IgA-kappa	24
IgA-lambda	34
IgM-kappa	72
IgM-lambda	39
Kappa free	7
Lambda free	9

**Graf 6. Rozdělení dle typu stanoveného MIG (OKB ON Trutnov a.s.)**



**Tabulka 16. Počty diagnostikovaných pacientů dle kvantity MIG**

Kvantita MIG	Počet případů
Pod 5 g/L	337
5 - 10 g/L	70
10 - 15 g/L	23
15 -20 g/L	27
Nad 20 g/L	63
Ve frakci betaglobulinů	35

**Tabulka 17. Rozdělení počtu jednotlivých typů MIG v závislosti na jejich koncentraci**

Typ MIG	Koncentrace MIG (g/L)				
	< 5 g/L	5,0 - 9,99 g/L	10,0 - 14,99 g/L	15,0 - 19,99 g/L	≥ 20 g/L
IgG-kappa	120	34	8	15	14
IgG-lambda	94	29	10	12	10
IgA-kappa	14	4	-	-	2
IgA-lambda	12	4	-	1	3
IgM-kappa	42	10	3	4	2
IgM-lambda	26	2	2	3	-
Biklonální paraprotein	17	5	4	2	7
Triklonální paraprotein	1	-	-	-	-
Lambda free	4	-	1	-	-
Kappa free	1	-	-	-	-

### **7.5. Frekvence progresu sledovaných pacientů s MGUS do maligní monoklonální gamapatie v definovaném časovém úseku**

Při vyhodnocení celého souboru nemocných, tj. 555 nemocných s MGUS, bez ohledu na stanovenou míru rizika došlo k transformaci do obrazu maligní lymfoproliferace celkem u 91 nemocných (16,4 %). Nejčastěji došlo k progresi MGUS do mnohočetného myelomu a to celkem ve 46 případech (8,2 %), ve 21 případech (3,8 %) se jednalo o lymfom, u 18 nemocných (3,2 %) byla v čase diagnostikována chronická lymfatická leukémie. Celkově ve 4 případech (0,7 %) se během doby sledování vyvinula primární amyloidóza a u 2 pacientů (0,4 %) byla diagnostikována Waldenströмова makroglobulinémie. Výše celkového rizika transformace u našeho souboru nemocných s MGUS byla stanovena na 1,6 za 1 rok.

U 282 pacientů z celkového počtu 555 pacientů s MG (51 %) byla pomocí testu Freelite™ v posledních 10 letech stanovena koncentrace FLC lambda i kappa v séru včetně následného výpočtu FLCr (FLC index), které byly pravidelně monitorovány i v rámci dalších laboratorních kontrol. Těchto 282 pacientů bylo rozděleno na základě stratifikačního systému dle Rajkumara (viz Tabulka č. 18). Transformaci do obrazu maligní monoklonální gamapatie jsme ve skupině nízkého rizika našeho souboru nemocných s MGUS nezaznamenali. Obecně se zde uvádí pouze 5% riziko přechodu do maligní monoklonální gamapatie (14). Ve skupině nízké – střední riziko byl prokázán přechod do maligní MG u 17 z celkem 102 jedinců v této kategorii, ve skupině vysoké-střední riziko se jednalo již o 30 jedinců, tj. 44 % pacientů zařazených do této rizikové kategorie. V kategorii vysokého rizika pak došlo v našem souboru k progresi do obrazu maligní MG u 10 pacientů s MGUS (50 %) splňujících daná kritéria. Nejčastěji došlo k progresi do obrazu mnohočetného myelomu a to u celkem 28 pacientů z 282, tj. u 10 % z celkového počtu pacientů, u kterých byla stanovena kvantita FLC.

**Tabulka 18. Rozdělení souboru jedinců s MGUS podle Mayo stratifikačního systému a počet pozorovaných transformací do obrazu maligní MG v průběhu 10 let**

	Riziková skupina (N=282)		Jedinci v transformaci (N=57)	
	Počet	%	Počet	%
Nízké riziko	92	33	0	0
Nízké-střední riziko	102	36	17	17
Vysoké-střední riziko	68	24	30	44
Vysoké riziko	20	7	10	50

Vyšetření FLC v séru má tak i podle výsledků našeho dlouhodobého sledování pacientů s monoklonální gamapatií velký a nezpochybnitelný význam. Velmi důležitá je přitom vstupní hodnota FLCr u nově zjištěné monoklonální gamapatie a samozřejmě pak také její dynamika v rámci laboratorních kontrol. Poměr FLC se stal nově součástí doporučení pro zahájení léčby mnohočetného myelomu. Jde v podstatě o časně zahájení léčby již ve fázi smoldering (asymptomatického) myelomu, protože FLCr  $\geq 100$  znamená výrazně zvýšené riziko progresse do MM a to konkrétně ve výši cca 40% v průběhu 1 roku. Z našeho souboru 282 pacientů, u kterých byly měřeny FLC, se objevila hodnota FLCr  $\geq 100$  celkem u 9 pacientů. U všech byla zaznamenána progresse v maligní monoklonální gamapatii v průběhu 2 let od diagnózy MGUS. Z toho u 7 pacientů došlo k progresi do MM. U jednoho pacienta se manifestovala jiná maligní lymfoproliferace, konkrétně se jednalo o lymfom. U jedné pacientky s FLCr  $\geq 100$  zatím k progresi do maligní monoklonální gamapatie nedošlo, když hodnota FLCr u ní zůstává stabilní již po dobu 8 let. Z výše uvedeného důvodu jsme se při našem sledování zaměřili i na pacienty s FLCr v rozmezí 60-99,9. V této skupině bylo identifikováno 10 pacientů, přičemž z tohoto počtu rovněž u 2 z nich již došlo k transformaci do obrazu MM. U dalších 2 pacientů byl diagnostikován smoldering myelom, v jednom případě Waldenströмова makroglobulinémie a v dalším pak lymfom (viz Tabulka č. 19). Je nutno ale myslet i na druhý extrém a to pacienty s nízkým poměrem kappa/Lambda, tedy s výraznou převahou lehkých řetězců lambda v séru. Z 19 případů, u nichž byla v rámci našeho sledování opakovaně zaznamenána hodnota FLCr nižší než 0,1, došlo ve 12 případech k progresi do obrazu MM, v jednom případě se jednalo o solitární plazmocytom a v dalším



pak o lymfom. Proto zbývajících 5 pacientů s MGUS s hodnotou FLCr nižší než 0,1 nadále pravidelné monitorujeme.

**Tabulka 19. Soubor pacientů s vyššími resp. nižšími hodnotami FLCr, u nichž došlo k progresi do maligní lymfoproliferace (OKB ON Trutnov a.s.)**

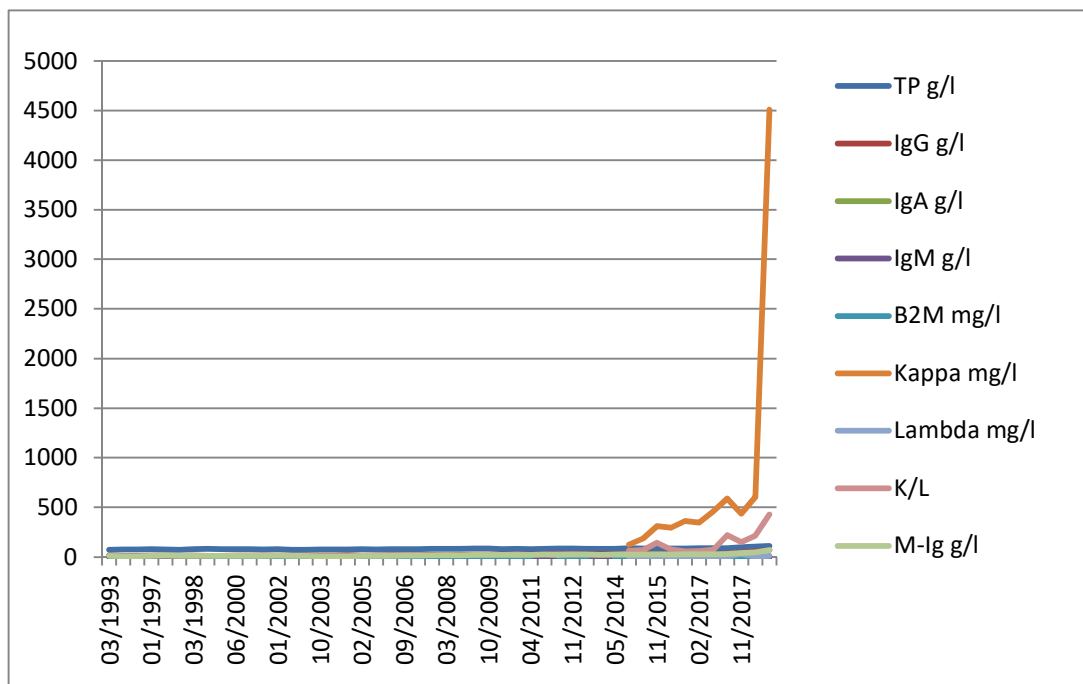
pacient	Typ MIG	Kvantita MIG (g/L)	Hodnota FLCr	Progrese do maligní MG
Žena 1942	IgG-κ	29,8	387,5	MM
Muž 1946	IgG-κ	47,3	483,2	MM
Muž 1934	IgA-κ	37,9	451,9	MM
Muž 1938	IgM-κ	19,1	550,7	Lymfom
Žena 1912	IgG-κ	50,4	618,9	MM
Muž 1956	Free -κ	Beta-globulin	4624,4	MM
Muž 1967	Free -κ	1,3 + beta-globulin	2601,1	MM
Muž 1950	IgG-κ	16,4	134,2	MM
Žena 1922	IgM-κ	34,4	80,9	WM
Žena 1915	Free -κ	Beta-globulin	66,4	SMM
Muž 1935	IgG-κ	17,6	67,6	SMM
Žena 1955	IgG-κ	20,1	85,5	MM
Žena 1927	IgG-κ	19,8	95,7	MM
Žena 1930	IgG-κ	15,3	84,1	Lymfom
Žena 1921	IgG-λ	37,8	0,000	MM
Muž 1946	Free-λ	13,8	0,001	MM
Muž 1942	IgA-λ	55,4	0,090	MM
Muž 1947	IgG-λ	59,1	0,009	MM
Žena 1937	IgG-κ	0,9	0,041	Solit. plazmocytom
Žena 1934	IgG-κ	17,6	0,010	MM
Žena 1952	IgG-λ	11,5	0,020	MM
Žena 1934	IgA-λ	4,9	0,080	MM
Žena 1953	IgG-λ	55,2	0,010	MM
Muž 1957	IgG-λ	37,9	0,050	MM
Muž 1947	IgG-λ	51	0,010	MM
Muž 1946	IgG-λ	39	0,020	MM
Muž 1943	IgM-λ	18,5	0,030	Lymfom

## 8. Zajímavé kazuistiky pacientů s monoklonální gamapatií - vlastní pozorování

### 8.1. Význam dlouhodobého sledování pacientů s MGUS

Jako příklad významu dlouhodobého sledování koncentrace a typu MIG, včetně kontroly hladin FLC a výpočtu jejich poměru, uvádím případ pacientky, která byla sledována v hematologické ambulanci od roku 1996 pro MGUS IgG-kappa. Prvně byl u ní prokázán MIG již v roce 1993, kdy bylo pacientce 63 let a vstupní koncentrace MIG byla 8,6 g/L. V roce 1996, kdy byla pacientka poprvé vyšetřena v hematologické ambulanci, byla koncentrace MIG stacionární, bez dynamiky oproti diagnóze. Provedenou sternální punkcí nebyl zjištěn žádný patologický nález. Pacientka byla pravidelně kontrolována v hematologické poradně v 6-měsíčních intervalech. Byl pozorován pozvolný nárůst koncentrace MIG o 0,5-1,0 g/L ročně až do roku 2016. V únoru 2017 byl zaznamenán náhlý vzestup koncentrace MIG o 4 g/L, následně v květnu 2017 pak o 12 g/L. Nově byl prokázán MIG i v moči. Za 11 let od diagnózy MGUS byly v roce 2014 naměřeny patologické hodnoty FLC s FLCr 64,4 při koncentraci MIG 23,9 g/L (viz Tabulka č. 20). Při dalších kontrolách, kdy byly FLC pravidelně monitorovány, došlo postupně k další progresi hodnot (viz Tabulka č. 20). Na konci roku 2017 dosáhla koncentrace MIG 41 g/L a FLCr 151, provedené kontrolní vyšetření kostní dřeně prokázalo její infiltraci buňkami MM. Vzhledem k absenci známek orgánového poškození byla nemocná dále jen sledována. V lednu 2018 byla zjištěna hodnota FLCr 213 při koncentraci MIG 48,3 g/L, v květnu 2018, kdy byla u nemocné zahájena pro anemizaci léčba, hodnota MIG dosáhla 68 g/L a FLCr 425. K transformaci MGUS do MM u této pacientky došlo za 24 let od vstupní diagnózy MG. Progresi jednotlivých biochemických parametrů v závislosti na čase týkající se tohoto případu znázorňuje Graf č. 7.

**Graf 7. Časová progresa jednotlivých biochemických parametrů u pacientky s vývojem MGUS do MM (vývoj za 24 let)**



**Tabulka 20. Základní parametry MG v čase u pacientky s vývojem MGUS do MM (za 24 let)**

Datum	CB (g/L)	B2M (mg/L)	Kappa (mg/L)	Lambda (mg/L)	K/L	MIG (g/L)
03/1993	72					9,9
04/1996	77					8,6
06/1996	76					9,8
01/1997	80					10,7
04/1997	77					13,9
09/19/97	74					11,4
03/1998	79					10,8
11/1998	81	2,28				11,1
12/1999	78	2,07				11,1
06/2000	78	2,22				12,5
01/2001	78	2,19				10,7
07/2001	77	1,99				12,3
01/2002	78	1,37				13,6
08/2002	74	1,49				12,9
03/2003	72	1,56				10,3
10/2003	75	2,41				8,2
04/2004	77	4,34				9,2
08/2004	75	2,45				11,2
02/2005	78	2,36				11,3
08/2005	75	2,28				12,4
02/2006	79	2,47				13,7
09/2006	79	2,39				14,2
03/2007	80	2,31				17,9
09/2007	81	2,48				16,5
03/2008	83	2,56				19,2
09/2008	82	2,18				21,1
03/2009	87	2,48				22,1
10/2009	85	2,62				20,9
04/2010	78	2,19				22,0
10/2010	81	2,41				21,4
04/2011	79	2,57				22,8
10/2011	81					22,4
04/2012	85	2,84				23,4
11/2012	85	2,88				23,1
05/2013	82	2,88				21,6
11/2013	83					24,0
05/2014	82	2,96				23,9

Datum	CB (g/L)	B2M (mg/L)	Kappa (mg/L)	Lambda (mg/L)	K/L	MIG (g/L)
12/2014	89	2,87	123	1,91	64,40	23,0
06/2015	84	2,97	186	2,62	70,99	26,5
11/2015	86		310	2,18	142,20	25,1
02/2016	87	2,89	294	3,92	75,00	28,0
08/2016	86	3,13	362	6,24	58,01	29,1
02/2017	90	3,22	347	5,96	58,22	28,7
05/2017	89	3,40	459	6,21	73,91	41,4
11/2017	99	3,56	436	30,40	151,32	48,3
01/2018	105	4,29	603	2,28	213,83	68,2
05/2018	110		4510	10,60	425,47	

## 8.2. Příklady pozdní diagnostiky mnohočetného myelomu – kazuistiky

V následujícím textu se budu věnovat celkem 4 pacientům s mnohočetným myelomem, na jejichž diagnóze se ve sledovaném období naše oddělení podílelo. První dvě pozorování se týkají pacientek vyššího věku dlouhodobě sledovaných na různých ambulancích pro jejich chronická onemocnění.

V prvním případě se jednalo o 77letou ženu, která byla po dobu 8 let sledována a léčena v endokrinologické poradně pro nodózní strumu s mírnou thyreotoxikózou a involuční osteoporózu. Kromě těchto onemocnění byla dále léčena ještě pro arteriální hypertenzi, hypercholesterolémii a depresivní syndrom. Ze subjektivních obtíží u ní dominovala únavnost, nekvalitní spánek, artralgie, bolesti holenních kostí a bederní páteře. Objektivně nebyly zaznamenány významnější patologické změny. Během pravidelných kontrol v endokrinologické poradně bylo prováděno vyšetření thyreoidálních hormonů, parametrů kostního a lipidového metabolismu. Elektroforéza bílkovin, vyšetření sedimentace ani celkové bílkoviny nebyly provedeny. Vzhledem k akcentaci subjektivních obtíží pacientky (únavnost, vertebrogenní algický syndrom, artralgie) byl vyšetřovací program nakonec zahájen praktickou lékařkou. Ta kromě odběru vzorku krve ke stanovení základních parametrů krevního obrazu požadovala též vyšetření hladiny celkové bílkoviny a sedimentace erytrocytů. Koncentrace celkové bílkoviny v séru byla 137 g/L a hodnota FW 84/94. Výsledky provedeného laboratorního vyšetření jsou přehledně uvedeny v Tabulce č. 21. Na základě laboratorního nálezu zahrnujícího i zhoršení renálních funkcí a přítomnost normocytární, normochromní anémie bylo doporučeno provedení elektroforetického vyšetření bílkovin

v séru i v moči. To bylo následně doplněno ještě imunofixačním vyšetřením, které prokázalo vysoké koncentrace paraproteinu IgG-lambda ve vzorcích séra i moči (koncentrace MIG v séru byla 80 g/L). Provedené vyšetření sternálního punktátu prokázalo 10 infiltraci klonem plazmatických buněk. Při RTG vyšetření skeletu byla přítomna difúzní osteoporóza osového skeletu bez přítomnosti typických osteolytických změn. Pacientka byla přeložena s diagnózou mnohočetného myelomu IgG-lambda, stádium IIA dle Durie-Salmona, ISS 3, s extrémními hodnotami celkové bílkoviny a paraproteinu a středně těžkou renální insuficiencí na II. Interní kliniku – OKH FN v Hradci Králové. Zde byla zahájena léčba režimem MPT senior (Alkeran 10 mg + Prednison 60 mg 4 dny a ex + Myrin 100 mg kontinuálně).

**Tabulka 21. Pacient č. 1 – laboratorní výsledky**

	3.6.2009	8.6.2009
Urea (mmol/L)	7,1	12,0
Kreatinin (μmol/L)	157	181
Kyselina močová (μmol/L)	558	582
Kalcium (mmol/L)	-	2,06
Celková bílkovina (g/L)	137	-
IgG (g/L)	87,10	-
IgA (g/L)	0,65	-
IgM (g/L)	0,18	-
Hemoglobin (g/L)	116	106

Ve druhém případě se rovněž jednalo o 77letou ženu, která byla v srpnu 2009 přijata pro akutní infarkt myokardu spodní stěny na interní JIP nemocnice v Trutnově. Pacientka byla již dříve léčena pro arteriální hypertenzi, chronickou renální insuficienci, kombinovanou hyperlipidémií a ischemickou chorobu srdeční. Od roku 1996, kdy prodělala infarkt myokardu posterolaterální, byla sledována v kardiologické poradně. V průběhu posledních 5 let nebyla u této pacientky provedena žádná laboratorní kontrola. Po přijetí na interní JIP v srpnu 2009 byla při vstupním laboratorním vyšetření zjištěna závažná renální insuficience a normocytární, normochromní anémie. Koncentrace celkové bílkoviny byla 94 g/L. Přehled laboratorních parametrů stanovených v rámci vstupního vyšetření je uveden v Tabulce č. 22.

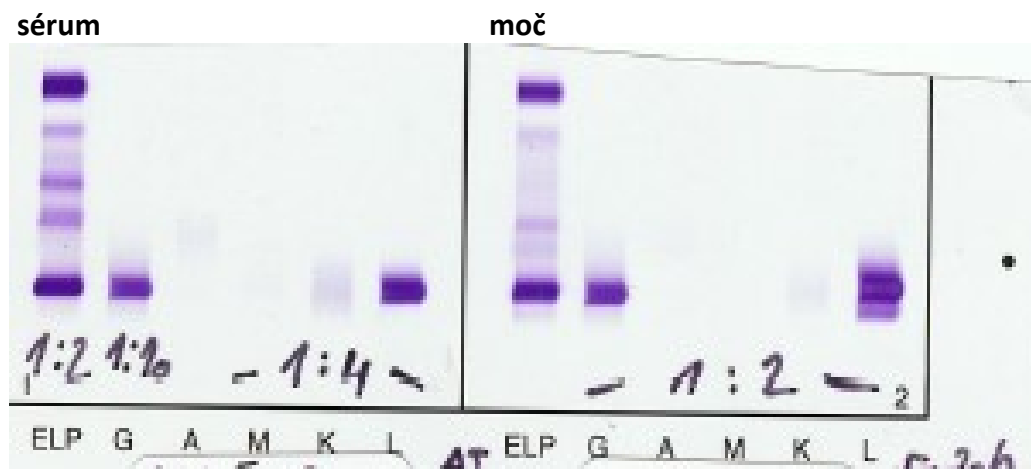
Elektroforetické a následné imunofixační vyšetření séra a moči u ní prokázalo přítomnost paraproteinu IgG-lambda, tentokrát v koncentraci 38 g/L v séru (viz Obrázek č. 21) s přechodem do moči. V průběhu hospitalizace se stav nemocné dále zhoršoval s postupným rozvojem známek multiorgánového selhání. Třetí den hospitalizace došlo k jejímu úmrtí. S velkou pravděpodobností se i v tomto případě jednalo o mnohočetný myelom. Vzhledem k exitu pacientky bez následně provedené pitvy však definitivní diagnóza mnohočetného myelomu stanovena nebyla.

Obě předchozí pozorování se týkaly starších žen léčených pro osteoporózu a renální insuficienci. Proto jsem se na jejich případech snažila upozornit na to, jak je důležité na tuto rizikovou skupinu nemocných nezapomínat. Zejména je nutné dbát na pravidelné laboratorní kontroly u pacientů s těmito nálezy rozšířené alespoň o koncentraci celkové bílkoviny a krevní obraz. V každodenní praxi nám mohou pomoci doporučení vydaná Českou myelomovou skupinou věnovaná možnostem časně diagnostiky mnohočetného myelomu v podmínkách ambulantní klinické praxe, která vyžadují minimální náklady.

**Tabulka 22. Pacient č. 2 – laboratorní výsledky**

	31.8.2009
Urea (mmol/L)	20,3
Kreatinin (μmol/L)	569
Kyselina močová (μmol/L)	460
Kalciium (mmol/L)	2,30
Celková bílkovina (g/L)	94
Hemoglobin (g/L)	98

**Obrázek 21. Elektroforetické a následné imunofixační vyšetření séra a moči u pacientky č. 2 (OKB ON Trutnov a.s.)**



Další dvě pozorování se týkají diagnostiky mnohočetného myelomu u dvou mužů. U obou pacientů nebyly přítomny typické subjektivní příznaky, proto se zpočátku vůbec nepředpokládalo, že by se mohlo jednat o hematologickou malignitu a pátralo se po jiných příčinách. V prvním případě pro vertebrogenní a ve druhém případě pro kardiální obtíže.

V prvním případě se jednalo o 63letého muže, který udával 9 měsíců trvající bolesti bederní páteře s propagací do PDK, nejintenzivnější bolesti udával v oblasti vnější strany lýtka. Byl dlouhodobě léčen ambulantně sérií analgetických infúzí, poté perorálními analgetiky střední intenzity. Pacient byl pro bolest postupně omezen ve stoji i chůzi. Nakonec si stav vyžádal hospitalizaci na neurologickém oddělení nemocnice v Trutnově s diagnózou oboustranné protrahované lumboischialgie s iritací L5, bez pares či sfinkterových poruch. Bylo provedeno MR LS páteře s nálezem osteolytických lézí těl obratlů L4 a L5 (s podezřením na patologickou frakturu obratle L5) – viz Obrázek č. 22. Na základě tohoto výsledku bylo doporučeno elektroforetické vyšetření séra, při kterém byl prokázán paraprotein IgG-lambda o celkové koncentraci 12,5 g/L (viz Obrázek č. 23). Kromě mírně zvýšené sedimentace erytrocytů (FW 15/41) byla všechna ostatní laboratorní vyšetření v normě včetně koncentrace celkové bílkoviny, kreatininu a vápníku v séru. Vyšetřením sternální punkce bylo zjištěno nedignostické zmnožení plazmocytů na 6, průtokovou cytometrií bylo prokázáno 1,7 % klonálních plazmocytů. Bylo doplněno celotělové CT s nálezem osteolytických lézí obratlů L4-5 a 7. žebra vpravo. Pacient byl s diagnózou mnohočetného myelomu IgG-lambda stádia IIIA

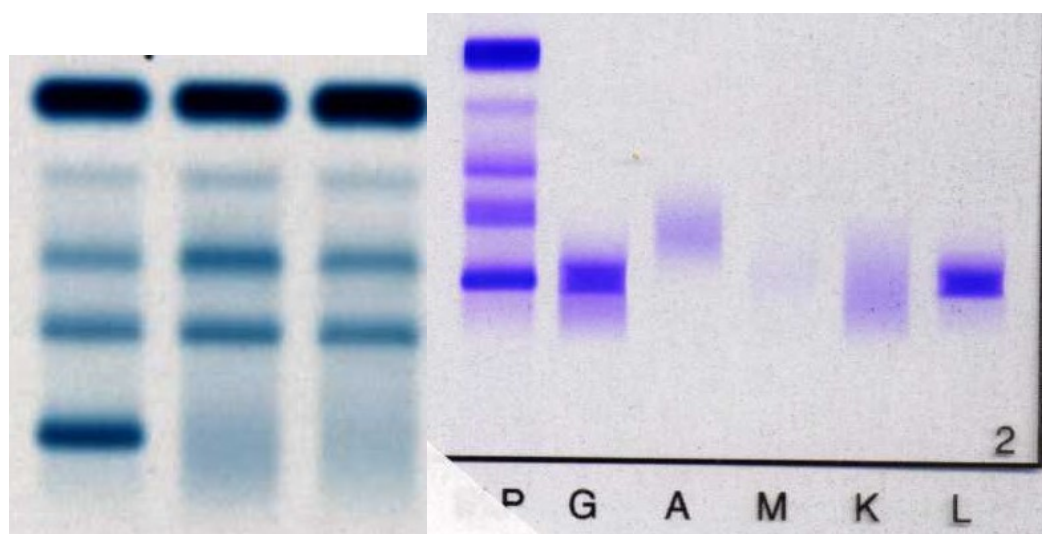


dle Durieho-Salmona a ISS 1 přeložen k další péči na IV. interní hematologickou kliniku FN v Hradci Králové.

**Obrázek 22. Nález na MR LS páteře u pacienta č. 3**  
(Radiodiagnostické pracoviště ON Trutnov a.s.)

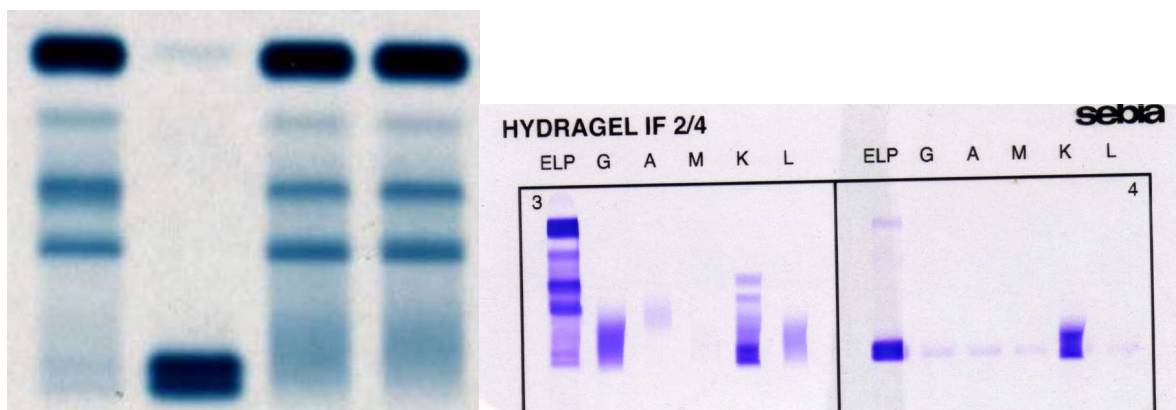


**Obrázek 23. Elektroforetické a imunofixační vyšetření séra s nálezem paraproteinu IgG-lambda u pacienta č. 3 (Oddělení klinické biochemie ON Trutnov a.s.)**



Ve druhém případě se jednalo o 50letého muže, který dříve vážněji nestonal. Pacient udával 1 rok trvající bolesti v oblasti hrudníku, které byly provázeny námahovou dušností. Pacient zaznamenal ale i úbytek váhy 16 kg za dobu 8 měsíců. Byl vyšetřován z hlediska diferenciální diagnostiky bolestí na hrudi. Byla provedena ergometrie, echokardiografie včetně vyšetření kardiálních markerů. Kardiální etiologie byla vyloučena. Až po 10 měsících bylo internistou naordinováno elektroforetické vyšetření, při němž byly v séru i v moči nalezeny lehké řetězce kappa (viz Obrázek č. 24) včetně jejich patologického poměru, zvýšená hodnota B2M, koncentrace celkové bílkoviny, parametry KO i FW byly v normě. Přehled laboratorních hodnot je uveden v Tabulce č. 23. Klinický hematolog provedl sternální punkci, kdy v nátěru kostní dřeně byla zjištěna její masivní infiltrace patologickými plazmatickými buňkami. Na rtg lbi (viz Obrázek č. 25) byla patrna ložiska okrouhlého tvaru a různé velikosti odpovídající mnohočetnému myelomu. Scintigrafické vyšetření skeletu (viz Obrázek č. 26) prokázalo difúzní ložiskové postižení skeletu s postižením žeber, kalvy i páteře svědčící pro mnohočetný myelom. Následně byl pacient s mnohočetným myelomem kappa free, stádia IIA dle Durieho-Salmon, ISS 2, přeložen k další léčbě na IV. interní hematologickou kliniku FN v Hradci Králové.

**Obrázek 24. Elektroforetické a imunofixační vyšetření séra a moči u pacienta č. 4**  
(Oddělení klinické biochemie ON Trutnov a.s.)



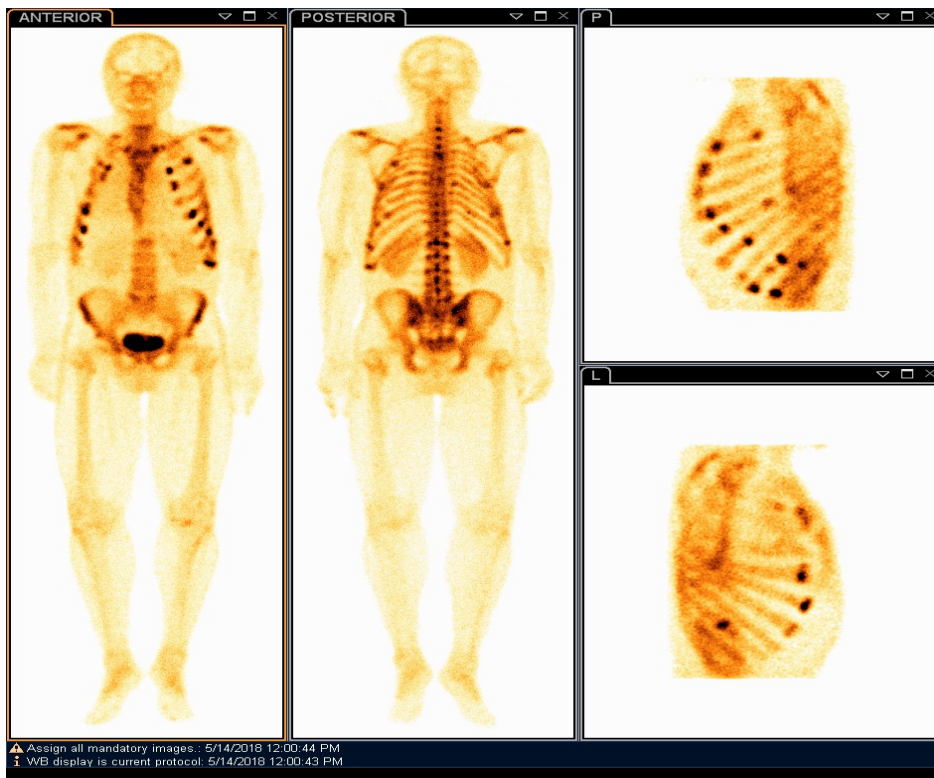
**Tabulka 23. Pacient č. 4 s mnohočetným myelomem kappa free – laboratorní výsledky**

Kreatinin ( $\mu\text{mol/L}$ )	82
FLC- $\kappa$ (mg/L)	13 500
FLC- $\lambda$ (mg/L)	5,19
FLC-r	2601
Kalcium (mmol/L)	2,72
Celková bílkovina (g/L)	66
B2M (mg/L)	2,98
FW (mm/hod)	15/41

**Obrázek 25. Nález na rtg lebky u pacienta č. 4**  
(Radiodiagnostické pracoviště ON Trutnov a.s.)



**Obrázek 26. Scintigrafické vyšetření skeletu u pacienta č. 4**  
(Oddělení nukleární medicíny ON Trutnov a.s.)



### 8.3. Interference monoklonálních imunoglobulinů při stanovení některých analytů

Poslední skutečností, na kterou bych chtěla v rámci výsledkové části své disertační práce upozornit, je možnost významné interference monoklonálního imunoglobulinu v séru při stanovení řady analytů (95). Rozličné případy interferencí často vznikají na podkladě precipitace při reakci vedoucí k falešnému zvýšení absorbance. Mohou vznikat ale např. i specifickou vazbou monoklonálního imunoglobulinu na stanovovaný analyt. Tato vazba poté může ovlivnit rozpustnost a reakční mechanismus při některých typech stanovení (95,96). Interference mohou být zapříčiněny i zvýšenou viskozitou séra při velmi vysoké koncentraci MIG nebo vytvořením gelu v chlazených vzorcích séra v případě kryoglobulinémie. Většina analyzátorů je schopna detekovat viskózní vzorky sér. Výskyt interference při stanovení některých analytů obvykle závisí na koncentraci monoklonálního imunoglobulinu (95).

Moderní typy analyzátorů jsou schopny zaznamenat průběh kinetiky reakcí a v případě neobvyklého průběhu změny detekovat. Případy interference monoklonálních imunoglobulinů u pacientů s monoklonálními gamapatiemi při stanovení různých analytů jsou v literatuře zmiňovány jen vzácně. V publikovaných materiálech byly zmíněny a popsány ojedinělé interference při stanovení CRP, celkového bilirubinu, fosfátů, kyseliny močové, močoviny, glukózy, gamaglutamyltransferázy, celkové bílkoviny, glykovaného hemoglobinu, ferritinu a transferinu (47,95,96,97,98). Nejčastěji se jednalo o laboratorní interference z důvodu přítomnosti monoklonálního IgM (90).

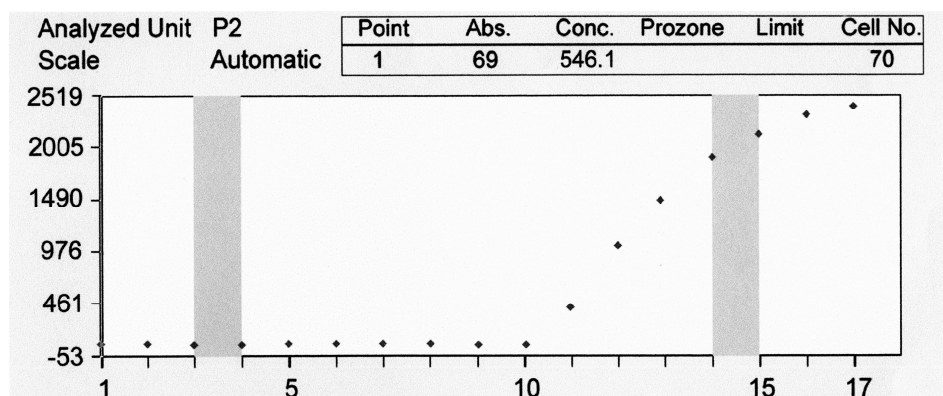
Analytická interference může být na druhou stranu i užitečným nástrojem pro náhodnou laboratorní diagnostiku monoklonálních gamapatií v rámci rutinní biochemické analýzy. V literatuře lze najít kazuistiky pacientů, u nichž nejčastěji při stanovení koncentrací kyseliny močové a konjugovaného bilirubinu byly náhodně na pokladě interference zachyceny monoklonální gamapatie v raném stadiu (47).

My jsme se v průběhu našeho sledování setkali s jedním případem falešně zvýšené koncentrace bilirubinu u pacientky s mnohočetným myelomem, u dvou dalších pacientů s diabetem mellitem 2. typu jsme zjistili přítomnost monoklonálních gamapatií na základě interference MIG při stanovení glykovaného hemoglobinu.

### 8.3.1. Interference MIG při stanovení bilirubinu

U pacientky s dříve diagnostikovaným mnohočetným myelomem, u níž byl v séru přítomen paraprotein IgG-kappa o koncentraci 61,6 g/L, byla při rutinním laboratorním vyšetření opakovaně stanovena hladina celkového bilirubinu 564 umol/L (přístroj Modular Roche). Pacientka byla objektivně anikterická, bez přítomnosti jaterního onemocnění či subhepatální obstrukce. Rovněž i sérum pacientky bylo čiré, anikterické. Při kontrolním měření na přístroji Olympus AU 400 byla ve stejném vzorku opakovaně naměřena hodnota celkového bilirubinu 6 umol/L. Při inspekci reakční křivky na přístroji Modular bylo patrné atypické a rychlé zvýšení absorbance (viz Graf č. 8), zjevně v důsledku přítomnosti MIG. Je velmi pravděpodobné, že příčinou diferencí mezi výsledky na dvou různých přístrojích byla přítomnost vysoké koncentrace IgG-kappa v séru pacientky v případě použití metody Modular Roche, kdy došlo k tvorbě zákalu v reakční směsi. Jediný významný rozdíl v reakcích při stanovení bilirubinu na obou typech přístrojů – Modular (Roche) a Olympus AU 400 je v použitém typu akcelérátoru při azokopulační reakci bilirubinu s diazoniiovými činidly za vzniku kyselé (červené) formy azobilirubinu. Metoda na přístroji Olympus AU 400 využívá jako akcelérátor kofein. V případě analyzátoru Modular (Roche) je jako použitý akcelérátor zmiňován blíže nespecifikovaný detergent, který je uveden i v pracovním návodu sestaveném výrobcem. Už v roce 2003 byla publikována práce autorů (96), která popisovala interferenci monoklonálních imunoglobulinů právě při měření bilirubinu za použití diagnostik firmy Roche a vysvětlující tuto interferenci vznikem zákalu v reakční směsi.

**Graf 8. Reakční křivka stanovení bilirubinu při použití přístroje Modular (Roche) u pacientky s MM IgG-kappa (ÚKBD FN Hradec Králové)**



### 8.3.2. Interference MIG při stanovení glykovaného hemoglobinu

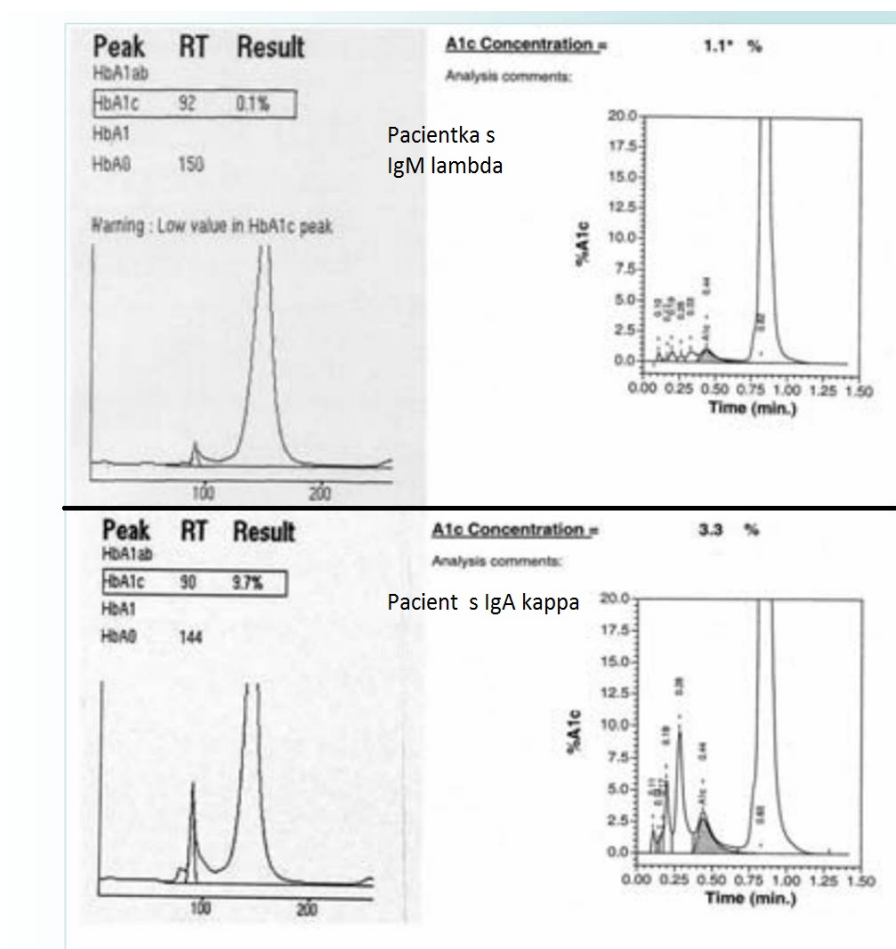
Během našeho sledování jsme zaznamenali dva případy léčených, kompenzovaných diabetiků, u nichž byla až na základě interference prokázána přítomnost monoklonálního imunoglobulinu v séru. U obou pacientů byly naměřeny hodnoty HbA<sub>1c</sub>, které neodpovídaly jejich klinickému stavu ani hodnotám plazmatické glukózy. Hodnota glykovaného hemoglobinu byla metodologicky stanovena na dvou přístrojích využívajících principu kapalinové chromatografie na bázi iontové výměny – přístroji DS-5 (BioVendor) používaném na OKB Trutnov ON a.s. a přístroji Variant II Turbo (BIO-RAD) používaném na ÚKBD FN v Hradci Králové. Stanovení glukózy v plazmě probíhalo fotometricky na přístroji Hitachi 911 (Roche). U prvního pacienta, který byl léčen pro diabetes mellitus 2. typu dietou a perorálními antidiabetiky byla stanovena rozdílná koncentrace glykovaného hemoglobinu, kdy na přístroji DS-5 byla stanovena hodnota HbA<sub>1c</sub> 94-103 mmol/mol a na přístroji Variant II Turbo 33 mmol/mol při stanovené glykémii v plazmě v rozmezí 6,1-7,5 mmol/L (viz Tabulka č. 24). U tohoto pacienta byla následně v séru prokázána přítomnost paraproteinu IgA-kappa o koncentraci 4,8 g/L. U druhé pacientky s diabetem léčeným konvenční inzulinoterapií byly na obou přístrojích opakovaně naměřeny neadekvátně nízké hodnoty glykovaného hemoglobinu (1-11 mmol/mol) neodpovídající klinické situaci (viz Tabulka č. 24). U této pacientky byl v séru prokázán paraprotein IgM-lambda o koncentraci 27 g/L. Chromatografické záznamy obou pacientů znázorňuje Graf č. 9.

**Tabulka 24. Výsledky příslušných laboratorních vyšetření u pacientů 1 a 2**

	Pacient 1	Pacient 2
Koncentrace a typ MIG (g/L)	IgA-kappa (4,8 g/L)	IgM-lambda (27 g/L)
P-glukóza (mmol/L)	6,1 - 7,5	6,5 - 8,8
HbA <sub>1c</sub> DS-5 (mmol/mol)	94 - 103	1
HbA <sub>1c</sub> Variant II Turbo (mmol/mol)	33	11

U dvou léčených pacientů s diabetem mellitem 2.typu byla tedy prokázána diference mezi klinickým stavem, hodnotami plazmatické glukózy a hodnotami glykovaného hemoglobinu. Při ověřování a kontrole hodnot HbA<sub>1c</sub> byl zjištěn další nesoulad mezi výsledky, které byly naměřeny ve dvou klinických laboratořích (OKB ON Trutnov a.s. a ÚKBD FN Hradec Králové). Obě zmíněné laboratoře se přitom pravidelně a úspěšně účastní kontrolních cyklů v rámci programu EHK SEKK s dlouhodobou úspěšností 100 %. Analýzy HbA<sub>1c</sub> byly ve všech případech prováděny opakovaně a získané výsledky nebyly významně rozdílné. V literatuře jsou popisovány jen interference patologických hemoglobinů, lipoperoxidáz, karbamylovaného hemoglobinu u uremických pacientů (99,100,101,102). Odstraňování těchto interferencí je dosahováno zlepšením předseparačních kroků a separačních postupů.

**Graf 9. Chromatografické záznamy obou pacientů při vyšetření glykovaného hemoglobinu (OKB ON Trutnov a.s.)**



Pozn.:

V době laboratorních měření bylo zastoupení HbA<sub>1c</sub> vyjadřováno v %, hodnoty v současně užívaných SI jednotkách látkového množství mmol/mol pro vyšetření HbA<sub>1c</sub> jsou číselně 10× vyšší



Interference při stanovení různých analytů se mohou objevovat zcela náhodně. Jelikož každý monoklonální imunoglobulin je jedinečný a má jiné vlastnosti, není možné vytvořit systematický přehled očekávaných interferencí. K tomu, abychom je odhalili, je zapotřebí věnovat dostatek času každé neočekávané hodnotě při stanovení analytu, tj. výsledku, který neodpovídá klinickému stavu pacienta a tím potlačit riziko jeho případného ovlivnění přítomností paraproteinu. V tom případě je zapotřebí dostatečně využít nástrojů postanalytické fáze (validace výsledků při lékařské kontrole, kritické diference, autovalidace a jiné). Je důležité uplatnit možnosti přístrojové techniky, která ve většině případů umožňuje monitorování průběhu analytických reakcí a zobrazení reakčních křivek. V případě diference výsledků, výskytu abnormálních hodnot atd. je vhodné provést inspekci reakčních křivek, případně chromatografických záznamů v případě stanovení glykovaného hemoglobinu. Každopádně je nutné věnovat dostatek pozornosti při vydávání výsledků a využívat všech možností moderních technologií.

## 9. Doporučení pro laboratorní diagnostiku a sledování nemocných s MGUS a pro stratifikaci rizika přechodu v mnohočetný myelom

1. Nezbytným, důležitým a stále častěji využívaným vyšetřením zůstává **elektroforéza bílkovin séra i moče s imunofixací**. Ta by tak měla být součástí vyšetření v ordinacích praktických lékařů i specializovaných poradn.
2. Po vyloučení jiného typu monoklonální gamapatie musí být pro stanovení diagnózy MGUS splněna **kritéria IMWG**.
3. Na základě stanovení typu monoklonálního imunoglobulinu, jeho koncentrace a poměru lehkých řetězců by mělo být určeno **riziko transformace (Mayo model)** a na jeho základě by měla být určena frekvence sledování.
4. Frekvence sledování v prvním roce od první diagnostiky upřesňuje dynamiku MGUS např. i odhalí tranzientní paraproteinémii. Interval 1. kontroly od prvního záchytu MIG by měl být v řádu 2-4 měsíců. **Kontrolní vyšetření od druhého roku sledování by pak měla být v intervalech od 2-4 měsíců do 12-18 měsíců a to v závislosti na míře rizika transformace**. Z praktického hlediska by pak zřejmě optimální dobou pro použití při dalším sledování pacientů se stabilní kvantitou MIG v rámci klinické praxe mohl být časový interval 6 měsíců až 1 roku dle stupně rizika.
5. Důležité je **dlouhodobé sledování pacientů s MGUS**, abychom včas rozpoznali případný přechod do maligní monoklonální gamapatie. Je nutné si uvědomit, že **jde o prekancerózu**.

## 10. Diskuse

Monoklonální gamapatie jsou relativně častým při vyšetření elektroforézy bílkovin v biochemické laboratoři. Výskytem MGUS se zabývala řada studií, největší z nich byla populační studie provedená pracovníky Mayo clinic na celkovém počtu 21.463 obyvatel. Ta také prokázala rizikovost tohoto laboratorního nálezu, když potvrdila, že každému případu mnohočetného myelomu, který se ve vyšetřeném souboru nemocných vyskytl, předcházela právě fáze MGUS. Můj zájem o tuto problematiku vzbudila vyšší incidence maligních lymfoproliferací a zvláště MM v našem regionu, která je patrná i z dostupných dat Národního onkologického registru (viz Obrázek č. 1 a Graf č. 1). Proto jsem se zaměřila v průběhu předchozích 10 let právě na diagnostiku a sledování pacientů s MGUS, kteří byli zachyceni laboratoří OKB oblastní nemocnice v Trutnově v rámci rutinního vyšetření.

V rámci mé následné analýzy byla zpracována data celkem 555 pacientů s novou monoklonální gamapatií nejasného významu. Základními charakteristikami sledovaného souboru byly věk pacienta při stanovení diagnózy, jeho pohlaví a vstupní koncentrace MIG. Soubor byl dále rozčleněn na 2 skupiny a to na pacienty s MGUS bez progresu a pacienty s progresí v maligní monoklonální gamatii. Z celkového souboru 555 pacientů bylo 425 pacientů starších 60 let (76,6 %). Základní charakteristiky našeho souboru tak byly podobné jako v původní sestavě z Mayo clinic (našich 67,9 % MIG IgG oproti 69,7 % z Mayo clinic) i v největší analýze českých dat z Registru monoklonálních gamapatií CMG (4,5,34,42,103).

U 16,4 % (91 z 555) sledovaných osob s MGUS došlo k transformaci do maligního onemocnění. V 8,3 % (46 z 555) z celkového počtu se jednalo o mnohočetný myelom. Obecně se uvádí, že riziko progresu MGUS v maligní monoklonální gamatii stoupá s délkou sledování (nárůst incidence ze 16,5% při 10letém až na 26,5% při 15letém sledování). Výsledky nejrozsáhlejších analýz souboru pacientů s MGUS jsou opakovaně publikovány pracovníky Mayo clinic v čele s prof. Kylem. Obdobné výsledky měla i rozsáhlejší analýza připravená MUDr. Sandeckou za Českou myelomovou skupinu, která zpracovala data 1887 pacientů z Registru monoklonálních gamapatií. Ta zaznamenala ve své práci zaměřené na vytvoření prognostického panelu u nově diagnostikovaných monoklonálních gamapatií transformaci do maligního onemocnění sice u nižšího počtu sledovaných osob s MGUS, konkrétně u 8,6 % (162/1887), přitom se ale v 6,6 % případů jednalo o MM (7).

Námi zjištěná frekvence maligní transformace korelovala s výsledkem zjištěným dr. Sandeckou v rozsáhlé studii CMG, tj. 1,6 % ročně, a je tak významně vyšší než v případě frekvence uváděné ve studii z Mayo clinic, kde byla na úrovni cca 1 % ročně. Tyto rozdílné výsledky mohou být ovlivněny menší velikostí našeho souboru i souboru analyzovaného Českou myelomovou skupinou. Nicméně pokud je námi prokázané procento maligní transformace u pacientů s MGUS z našeho regionu shodné s již prokázaným v rámci celé České republiky, pak musí vyšší výskyt maligních lymfoproliferací hlášených v rámci Národního onkologického registru v okresech Náchod a Trutnov souviset s vyšším výskytem monoklonálních gamapatií celkově. O možném důvodu této skutečnosti je možné jen spekulovat, ale jistě se na ní musí podílet vlivy životního prostředí jakými mohou být např. zvýšený výskyt radonu, vyšší spad popílku z uhelných elektráren, přechod radioaktivního mraku při havárii atomové elektrárny v Černobyl přes lokální území atd.

Jako významný nedostatek naší analýzy lze vnímat fakt, že u 273 pacientů s MGUS nebyla vstupně vyšetřena koncentrace FLC. Stanovení kvantity FLC s jejich vzájemného poměru bylo zavedeno laboratoří OKB ON Trutnov v roce 2009. V následujících letech byla nutná jeho standardizace, která je pravidelně kontrolována v rámci systému SEKK. Teprve poté bylo možné, aby se toto vyšetření stalo pravidelnou součástí diagnostického panelu u nemocných s MG na našem pracovišti. Z tohoto důvodu potom soubor MGUS v stratifikačním systému dle Rajkumara zahrnuje méně pacientů než soubor celkový. I přesto se i na našem souboru nemocných podařilo potvrdit jeho přínos pro sledování nemocných s MG. Proto se domnívám, že je možné námi získané výsledky považovat za přínosné a také vypovídající o postupném zlepšování kvality práce v rámci regionální biochemické laboratoře, která je odpovědná za první záchyt a přesnou diagnostiku přítomného MIG.

V každém případě je podle mne velmi důležité, aby se na diagnostice a interpretaci výsledků u pacientů s MG podílel kromě odborníka z oboru klinická biochemie i příslušný klinický odborník. Klinicko-biochemická spolupráce je důležitá jak z hlediska diagnostiky, tak i případného včasného zahájení léčby pacientů. Proto Česká společnost klinické biochemie nyní připravuje nové guidelines laboratorní diagnostiky monoklononálních gamapatií, které se tak stanou obdobou klinických guidelines České myelomové skupiny, které se již řadu let osvědčují v každodenní klinické praxi. V závěru disertační práce jsem se pokusila o vlastní návrh doporučení pro záchyt a následné sledování pacientů MGUS, který se stal i jedním z podkladů pro přípravu výše zmíněných guidelines biochemické společnosti. Včasná a

správná identifikace zejména vysoce rizikových pacientů s MGUS je totiž do budoucna nezbytná, pokud se nám má podařit snížit riziko jejich maligní transformace (8,26).

## 11. Závěry

V rámci disertační práce jsem se snažila popsat výsledky dosažené při sledování pacientů s MGUS během mého postgraduálního studia a doložit tak splnění všech v úvodu stanovených cílů:

1. Diagnostický panel využívaný v rámci naší biochemické laboratoře pro účely diagnostiky a sledování nemocných s monoklonálními gamapatiemi jsme od roku 2009 doplnili o stanovení volných lehkých řetězců v séru. Používáme standardizovaný a doporučený systém FreeLite™ společnosti The Binding Site (Birmingham, Velká Británie), měření FLC provádíme na přístroji BN ProSpec (Siemens) při využití imunonefelometrického principu stanovení.
2. V průběhu 10letého sledování jsme shromáždili data celkem 555 nemocných s MGUS, které jsme následně podrobili rozsáhlé analýze, jejíž výsledky jsou podrobně popsány v rámci výsledkové části disertační práce. Medián věku sledovaných osob byl 69 let, přičemž věkové rozpětí se pohybovalo od 24 do 96 let, zastoupení mužů a žen bylo téměř rovnoměrné. Nejčastěji pozorovaným typem monoklonálního imunoglobulinu byl typ IgG, který byl zaznamenán v 67,9 % případů. Nejpočetnější byla skupina nemocných s kvantitou MIG do 5 g/L, která tvořila 60,7 % případů. U 16,4 % (91 z 555) sledovaných osob s MGUS došlo v průběhu sledování k progresi do obrazu maligního onemocnění, nejčastěji, celkem v 8,3 % (46 pacientů) se jednalo o MM. Celkové riziko maligní transformace v námi sledovaném souboru dosáhlo 1,6 % případů ročně. Námi zjištěná frekvence maligní transformace odpovídá výsledku zjištěnému v rámci rozsáhlé analýzy České myelomové skupiny. Vyšší výskyt maligních lymfoproliferací na Trutnovsku tak musí být způsoben vyšším celkovým výskytem monoklonálních gamapatií nejasného významu v našem regionu. Výsledky podrobné analýzy jsou doloženy řadou zajímavých kazuistik.
3. Na vlastním souboru 273 nemocných, u nichž byla stanovena koncentrace FLC v séru v rámci naší laboratoře jsme ověřili platnost Mayo clinic prognostického modelu pro nemocné s MGUS. Ve skupině nízké-střední riziko byl prokázán přechod do maligní MG u 17 % jedinců, ve skupině vysoké-střední riziko se jednalo o 44 % a ve skupině vysokého rizika o 50 % jedinců zařazených v dané rizikové kategorii. Nejčastěji došlo k progresi do obrazu mnohočetného myelomu a to celkem u 28 pacientů z 282, tj. u 10 z celkového počtu pacientů, u nichž byla stanovena kvantita FLC. I v této části disertační práce jsem

využila k dokumentaci reálné praxe několika pro tento účel vhodných kazuistik.

4. Na základě výsledků dlouhodobého sledování jsem se v závěru disertační práce pokusila o formulaci doporučení pro laboratorní diagnostiku a sledování nemocných s MGUS a pro stratifikaci rizika přechodu v maligní MG, které se staly jedním z podkladů pro přípravu guidelines biochemické společnosti, které jsou přiloženy v rámci publikačního přehledu.

## Summary

I tried in my dissertation to describe the results achieved in the follow-up of MGUS patients during my postgraduate studies and to demonstrate the fulfillment of all the objectives set at the beginning:

1. Since 2009 the diagnostic panel used in our biochemical laboratory for the purpose of diagnosis and monitoring of patients with the monoclonal gammopathies has been supplemented with the determination of free light chains in serum. We use the standardized and recommended FreeLite™ system from The Binding Site (Birmingham, UK), and perform FLC measurements on a BN ProSpec (Siemens) using the immunonephelometric assay principle.
2. During the 10-year follow-up, we collected data from a total of 555 MGUS patients, who were then subjected to extensive analysis, the results of which are described in detail in the results of the dissertation. The median age of the monitored subjects was 69 years, with the age range ranging from 24 to 96 years, the representation of men and women was almost even. The most commonly observed type of monoclonal immunoglobulin was the IgG type, which was reported in 67.9% of cases. The most frequent group was patients with MIG up to 5 g/L, which represented 60.7% of cases. 16.4% (91/555) of MGUS subjects progressed to malignancy during follow-up, most frequently, in 8.3% (46 patients) they were MM. The overall risk of malignant transformation in the sample under review reached 1.6% of cases per year. The frequency of malignant transformation we found corresponds to the result of extensive analysis of the Czech myeloma group. The higher incidence of malignant lymphoproliferations in the Trutnov region must be due to a higher overall incidence of monoclonal gammopathies of undetermined significance in our region. The results of detailed analysis are supported by a number of interesting case reports.

3. We verified the validity of the Mayo clinic prognostic model for patients with MGUS in our own group of 273 patients with serum FLC in our laboratory. In the low-moderate risk group, a transition to malignant MG was demonstrated in 17% of the subjects, in the high-moderate risk group it was 44% and in the high-risk group 50% of subjects in the given risk category. Most frequently, progression to multiple myeloma occurred in 28 patients out of 282, i.e. 10% of the total number of patients who had FLC. Also in this part of the dissertation I used several case reports suitable for the documentation of the real practice.
4. Based on the results of long-term follow-up I tried to formulate recommendations for laboratory diagnostics and monitoring of patients with MGUS and for stratification of risk of transition to malignant MG, which have become one of the basis for the preparation of guidelines of the biochemical society, which are included in the publication review.



## 12. Literatura

1. Kyle RA, Rajkumar SV. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. Br J Haematol 2006; 134: 573-89.
2. Tichy M. Laboratorní analýza monoklonálních imunoglobulinů (paraproteinů). Český Těšín: Finidr s.r.o.,1997, ISBN:80-902022-1-7, 96 s.
3. Maisnar V, Tichý M a kol. Monoklonální imunoglobuliny – výskyt, význam a možnosti jejich průkazu. Nucleus HK, 2012, ISBN:978-80-87009-87-1, 129 s.
4. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. Blood 2009; 113(22): 5412-7.
5. Landgren O, Kyle RA, Rajkumar SV. From myeloma precursor disease to multiple myeloma: new diagnostic concepts and opportunities for early intervention. Clin Cancer Res 2011; 17(6): 1243-52.
6. Landgren O. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma: biological insights and early treatment strategies. Hematology 2013; 2013: 478-87.
7. Sandecká V, Hájek R, Pour L, Špička I, et al. A first Czech analysis of 1887 cases with monoclonal gammopathy of undetermined significance. Eur J Haematol 2017; 99(1): 80-90.
8. Sandecká V, Pour L, Adam Z, et al. Monoklonální gamapatie nejasného významu. Klin Onkol 2018; 31(4):270-6.
9. Maisnar V. Diferenciální diagnostika monoklonálních gamapatií. Lék. Zpr. LFUK Hradec Králové 1997; 42:167-74.
10. Bradwell AR. Serum free light chain analysis (6<sup>th</sup> edition). The Binding site Ltd., Birmingham, UK 2010, ISBN:9780704427969,350 s.

11. Attaelmannan M, Levinson S. Understanding and Identifying Monoclonal Gammopathies. Clin Chem 2000; 46:1230-38.
12. Tichý M, Maisnar V. Laboratorní průkaz monoklonálních imunoglobulinů. Vnitř Lék 2006; 52:41-45.
13. Kyle RA. The monoclonal gammopathies. Clin Chem 1994; 40:2154-61.
14. Kyle RA, Durie BGM, Rajkumar SV, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma, IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. Leukemia 2010; 24: 1121-7.
15. Maisnar V. Riziko přechodu monoklonální gamapatie nejasného významu do maligní monoklonální gamapatie. Klin Biochem Metab 2013; 21 (2): 93-96.
16. Van den Donk NW, Mutis T, Poddighe PJ, et al. Diagnosis risk stratification and management of monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. Int Journal of laboratory hematology 2016; 38(Suppl.1):110-122.
17. Weiss BM, Kuehl WM. Advances in monoclonal gammopathy of undetermined significance as a precursor of multiple myeloma. Expert Rev Hematol 2010; 3(2):165-174.
18. Chang SH, Luo S, Thomas TS, et al. Obesity nad the transformation of monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma: a population based cohort study. J Ntl Cancer Inst 2016; 109(5):30-6.
19. Thordardottir M, Lindqvist EK, Lund SH, et al. Obesity and risk of monoclonal gammopathy of undetermined significance and progression to multiple myeloma: a population-based study. Blood Adv 2017; 1(24): 2186-2192.
20. Fonseca R, Bailey RJ, Ahmann GJ, et al. Genomic abnormalities in MGUS. Blood 2002; 100:1417-1424.
21. Zingone A, Kuehl WM. Pathogenesis of monoclonal gammopathy of undetermined significance and progression to multiple myeloma. Semin Hematol 2011; 48(1): 4-12.

22. Ramasamy K, Lonial S. Multiple Myeloma and plasma cell dyscrasias . Second edition November 2017,ISBN:978-1-910797-33-4, 31 s.
23. Kyle RA, Therneau T, Rajkumar V, et al. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. N Engl J Med 2006; 354: 1362-9.
24. Mc Master ML, Landgren O. Prevalence, clinical aspects and natural history of IgM MGUS. Cytometry Part B 2010; 78 (Suppl 1): 91-97.
25. Ščudla V, Pika T. Monoklonální gamapatie nejistého významu ve světle současných poznatků. Klin Biochem Metab 2009; 17(38): 62-71.
26. Hájek R, Maisnar V et al. Diagnostika a léčba mnohočetného myelomu. Transfúze a hematologie dnes 2018, Suppl: 151-54.
27. Krizalkovicová V, Maisnar V, Pour L, et al. Monoclonal gammopathies of undetermined significance. Klin Onkol 2008; 21(4): 160-64.
28. Kristinsson S, Fears T, Gridley G, et al. Deep vein thrombosis after monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma. Blood 2008; 112(9): 3582-66
29. Nobile-Orazio E. Update on neuropathies associated with monoclonal gammopathy of undetermined significance (2008-2010). J Peripher Nerv Syst 2010; 15(4):302-6.
30. Talamo G, Mir MA, Pandey MK, et al. IgM MGUS associated with anti-MAG neuropathy: a single institution experience. Ann Hematol 2015 ; 94(6):1011-6.
31. Rison RA, Beydoun SR. Paraproteinemic neuropathy: a practical review. BMC Neurol 2016; 16: 1-13.
32. Drake MT. Unveiling skeletal fragility in patients diagnosed with MGUS: no longer a condition of undetermined significance? J Bone Miner Res 2014; 29(12): 2529-33.
33. Ščudla V, Petrová P, Lochman P, et al. Úloha ukazatelů kostního metabolismu v hodnocení myelomové kostní nemoci. Klin Biochem Metab 2013; 21(42): 71-78.

34. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, et al. A long-term study of prognosis of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Eng J Med* 2002; 345: 564-9.
35. Rajkumar SV, Kyle RA, Therneau TM, et al. Serum free light chain ratio is an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 2005; 106: 812-17.
36. Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G, et al. International Myeloma working group guidelines for serum free light chain analysis in multiple myeloma. *Leukemia* 2009; 23: 215-24.
37. Mateo G, Montalbán MA, Vidriales MB, et al. Prognostic value of immunophenotyping in multiple myeloma: a study by the Pehtema/Gem cooperative study groups on patients uniformly treated with high-dose therapy. *J Clin Oncol* 2008; 26(16): 2737-44.
38. Pérez-Persona E, Vidriales MB, Mateo G, et al. New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood* 2007; 110: 2586-92.
39. Perez-Persona E, Mateos G, Vidriales MB, 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.
40. Perez-Persona E, Mateo G, Garcia-Sanz R, et al. Risk of progression in smoldering myeloma and monoclonal gammopathies of unknown significance: comparative analysis of the evolution of monoclonal component and multiparameter flow cytometry of bone marrow plasma cells. *Brit J Haematol* 2010; 148(1): 110-114.
41. Pika T., Heřmanová Z., Lochman P, et al. Systém Hevylite u IgA monoklonálních gamapatií – první zkušenosti. *Klin Biochem Metab* 2011; 19(40): 85-90.
42. Pika T, Lochman P, Klincová M, et al. Suprese alternativního páru imunoglobulinu koreluje s mírou rizikovosti MGUS výrazněji nežli suprese hladin polyklonálních imunoglobulinů – dílčí výsledky vyšetření Hevylite u MGUS. *Klin Biochem Metab* 2012; 20(41): 63-71.

43. Kaufmann H, Ackermann J, Baldia C, et al. Both IgH translocations and chromosome 13q deletions are early events in monoclonal gammopathy of undetermined significance and do not evolve during transition to multiple myeloma. *Leukemia* 2004; 18(11): 1879-81.
44. Špička I et al. Mnohočetný myelom a další monoklonální gamapatie. Galén, Praha, 2005 ; ISBN:80-7262-330-3, 119 s.
45. Solomon A, McLaughlin C. Bence-Jones. *Proteins and Light Chains of Immunoglobulins. J Immunol* 1969; 244( 12): 3393-404.
46. Wochner RD, Strober W, Waldmann TA. The role of the kidney in the catabolism of Bence Jones protein and immunoglobulin fragments. *J Exp Med.* 1967; 126: 207-21.
47. Quiñones-Torrelo C, Villanueva-Gil MP, Rodríguez-Muñoz A, et al. When an Analytical Interference Is a Useful Diagnostic Tool: Finding Monoclonal Gammopathies in Routine Analysis. *J Clin Lab Anal* 2016; 30(2): 140-4.
48. Rajkumar VS, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2014; 15: 538-48
49. Hájek R, Adam Z, Ščudla V, et al. Diagnostika a léčba mnohočetného myelomu. *Transfuze a Hematol dnes* 2018; Suppl 1: 1-160.
50. Maisnar V. Nová diagnostická kritéria mnohočetného myelomu. *Klin Biochem Metab* 2016; 24(45): 127-28.
51. Češka R a kol. *Interna. 2. aktualizované vydání.* Triton, Praha, 2015, ISBN: 978-80-7387-885-6, 751-764, 909 s.
52. Ryšavá R. *Systémové amyloidózy a jejich léčba.* Maxdor Jesenius, 2013 ISBN:978-80-7345-341-1, 124 s.
53. Tichý M, Vávrová J, Friedecký B, Maisnar V. Přehled metod na stanovení volných lehkých řetězců. *Klin Biochem Metab* 2008; 16(37): 93-96.
54. Tichý M, Friedecký B, Vávrová J, et al. Standardizace biochemických laboratorních vyšetření u mnohočetného myelomu. *Klin Biochem Metab* 2006; 14 (1): 8-13.

55. Katzman JA, Kyle RA, Benson J, et al. Screening Panel for detection of Monoclonal gammopathies. Clin Chemistry 2009; 55: 1517-22.
56. Racek J et al. Klinická biochemie, Galén, 2006, 2.vydání, ISBN:80-7262-324-9, 329 s.
57. Novák F. Úvod do klinické biochemie. Nakladatelství Karolinum, 2002, 1.vydání, ISBN:8024603667, 342 s.
58. Zima T et al. Laboratorní diagnostika, Galén, 2002, 1. vydání, ISBN:80-7262-201-3, 728 s.
59. Pika T, Lochman P, Sandecka V, Maisnar V, et al. Immunoparesis in MGUS – Relationship of uninvolved immunoglobulin pair suppression and polyclonal immunoglobuline levels to MGUS risk categories. Neoplasma 2015; 62(5): 827-832.
60. Sebia - Návod k obsluze – verze 2.XX , 2008/11.
61. Siemens BN Pro Spec systém – Návod k obsluze – verze 1.1., 2001.
62. Roche Cobas 6000 – Uživatelská příručka – Verze Softwaru 01-01.
63. Greipp PR, San Migule JF, Durie BGM, et al. International staging system for multiple myeloma. J Clin Oncol 2005; 23: 3412-20.
64. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics book. London, UK 2012, ISBN 9781455759422, 2259 s.
65. Tichý M. Paraproteinémie nejasného významu. Klin Biochem Metab 1998; 61: 172-5.
66. Tichý M. Stanovení monoklonálních imunoglobulinů a jejich fragmentů u monoklonálních gamapatií – editorial. Vnitřní lékařství 2005; 51: 1225-7.
67. Bradwell AR. Serum free light chain analysis plus Hevylite (7<sup>th</sup> edition). The Binding site Ltd., Birmingham, UK 2015, ISBN:978-0-9932196-0-3, 415 s.
68. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, et al. Highly sensitive automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine. Clin Chem 2001; (47): 637-80.

69. Katzman JA, Clark RJ, Abraham RS, et al. Serum reference intervals and diagnostic ranges for free  $\kappa$  and free  $\lambda$  immunoglobulin light chains. *Clin Chem* 2002; 48:1437-44.
70. Sheldon J. Free light chains. *Ann Clin Biochem* 2007; 44: 503–5.
71. Katzmann JA. Quantitative Free Light Chain Assays for the Diagnosis and Monitoring of Monoclonal Gammopathies 2005; 27(4): 246-255.
72. Velthuis H, Knop I, Stam P, 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.
73. Levinson S, Keren DF. Free Light Chains of Immunoglobulins: Clinical Laboratory Analysis. *Clin Chem* 1994; 40(10): 1869-78.
74. Kyle RA, Rajkumar SV, Therneau TM, et al. Prognostic factors and predictors of outcome of immunoglobulin M monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Clin Lymphoma* 2005; 5(4): 257-60
75. Vávrová J, Tichý M, Friedecký B, et al. Mezilaboratorní studie stanovení volných lehkých řetězců imunoglobulinů. *Klin Biochem Metab* 2010;18(39): 73-76.
76. Mayo MM, Johns GS. Serum free light chains in the diagnosis and monitoring of patients with plasma cell dyscrasias. *Contrib Nephrol* 2007; 153: 44-65.
77. Pika T, Lochman P, Minařík J, et al. Úskalí interpretace výsledků společné analýzy hladin volných lehkých řetězců a elektroforézy séra. *Klin Biochem Metab* 2012; 20(41): 59-62.
78. Pika T, Lochman P, Maisnar V, et al. Klinicko - laboratorní aspekty biklonální gamapatie nejistého významu-BGUS. *Klin Biochem Metab* 2013; 21(42): 83-87.
79. Kovářová L, Hájek R. Prognostický význam imunofenotypizace u nemocných s monoklonální gamapatií nejasného významu a mnohočetným myelomem. *Klin Biochem Metab* 2011; 19(40): 96-100.

80. Cannizzo E, Bellio E., Sohani AR, et al. Multiparameter immunophenotyping by flow cytometry in multiple myeloma: The diagnostic utility of defining ranges of normal antigenic expression in comparison to histology. *B Clin Cytoch* 2010; 78(4): 231-38.
81. Magnano L, Larrea C, Elena M, et al. Prognostic effect of serum heavy/Light chain pairs in patient with monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering myeloma: Long-term results from a single institution. *Clinical Lymphoma & Leukemia* 2016: 1-7.
82. Pika T, Lochman P, Klincová M, et al. Suprese alternativního páru imunoglobulinu koreluje s mírou rizikovosti MGUS výrazněji nežli suprese hladin polyklonálních imunoglobulinů – dílčí výsledky vyšetření Hevylite u MGUS. *Klin Biochem Metab* 2012; 20(41): 63-71.
83. Kyle RA, Robinson RA, Katzmann JA. The clinical aspects of biclonal gammopathies. *Am J Med* 1981; 71: 999-1008.
84. Murray DL, Seningen JL, Dispenzieri A, et al. Laboratory persistence and clinical progression of small monoclonal abnormalities. *American Journal of Clinical Pathology* 2012; 138(4): 609-13.
85. Buryška J, Mlejnková B, Niesleníková M. Transientní paraproteinémie - kazuistika. *Klin Biochem Metab* 2007;15(36): 106-109.
86. Young VL. Transient paraprotein. *Proc Roy Soc Med* 1969; 62: 778-80.
87. Seligman M, Danon F, Clauvel JP. Transient Paraproteins. *Br Med J* 1971; 2: 321.
88. Strobel SL. Transient paraproteinemia: an intriguing immunological anomaly 2003, *Ann Clin Lab Sci*; 33(3): 265-70.
89. Giraldo P, Rubio-Félix D, Delgado P, Giralto M. Transient monoclonal gammopathies: Study of 34 cases. *Sangre (Barc)* 1994 ;139(5): 351-5.
90. Stoimenis D, Spyridonidou Ch, Papaioannou N. Transient monoclonal gammopathy induced by *Staphylococcus aureus* infection. *Case Rep Med* 2012: 1-5.



91. Van Camp B, Reynaerts P, Naets JP, Radl J. Transient IgA-lambda paraproteinemia during treatment of acute myelomonoblastic activity. *Blood* 1980; 55(1): 21-5.
92. Tichý M, Hrnčíř Z, Urbánková J. Transient IgM-lambda paraprotein in a 15-month of child. *Clinica Chimica acta* 1976; 70: 201-4.
93. Tichý M, Hrnčíř Z, Křenová I, Polák J. Simultaneous occurrence of IgG-kappa and IgG lambda paraproteins in a 12-year-old girl with malignant reticulosis. *Neoplasma* 1976; 23(3): 301-4.
94. Vodopick H, Chaskes SJ, Solomon A, Stewart JA. Transient monoclonal gammopathy associated with cytomegalovirus infection. *Blood* 1974; 44(2): 189-95.
95. Bakker AJ, Mucke M. Gammopathy interference in clinical assays: mechanism, detection and prevention. *Clin Chem Lab Med* ; 45: 1240-3.
96. Pantanowitz L, Horowitz GL, Upalakalin JN, Beckwith BA. Artifactual hyperbilirubinemia due to paraprotein interference. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127: 55-9.
97. Tichý M, Friedecký B, Budina M, et al. Interference of IgM-lambda paraprotein with biurete-type assay for total serum protein quantification. *Clin Chem Lab Med* 2009; 47: 235-236.
98. Roszyk L, Faye B, Tournilhac O, et al. Monoclonal IgM interference with immunoturbidimetric determination of ferritin and transferrin. *Ann Biol Clin (Paris)* 2007; 65(6): 659-62.
99. Little RR, Rohlfing CL, Hanson S, et al. Effects of hemoglobin HbE and HbD traits on measurement of HbA<sub>1c</sub> by 23 methods. *Clin Chem* 2008; 41:1277-82.
100. Saymenak J, Leroy N, Lavalard E, Gilley P. Interference of labile glycated hemoglobin on HbA<sub>1c</sub> assay. *Ann Bil Clin (Paris)* 2008; 66:459-63.
101. Selveray N, Bobby Z, Koner BC, Das, AK. Reassessing the increased glycation of hemoglobin in nondiabetic chronic renal failure patients: a hypothesis on the role of lipid peroxids. *Clin Chim Acta* 2005; 360: 108-113.

102. Thoma J, Stirn F, Kutter D. Influence of urea on HbA<sub>1c</sub> determination by Menarini HA 8140 and on the difference between immunoturbidimetric and HPLC HbA<sub>1c</sub> results. Clin.Lab 2000 ;46 (5-6): 261-8.
103. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, et al. Long-term follow-up of 241 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance: the original Mayo clinic series 25 years later. Mayo Clin Proc 2004; 79(7): 859-66.

## 13. Přehled tabulek, grafů a obrazové dokumentace

### 13.1. Tabulky

Tabulka 1. Klasifikace monoklonálních gamapatií (Kyle 2006)

Tabulka 2. Diagnostická kritéria MGUS – upraveno dle Rajkumara et al., 2014, 2016

Tabulka 3. Riziko progresse MGUS do malignity (Kyle 2008)

Tabulka 4. Nová diagnostická kritéria doutnajícího a mnohočetného myelomu (upraveno pro diagnostická doporučení CMG 2018 podle IMWG 2014)

Tabulka 5. Referenční rozpětí koncentrace celkové bílkoviny v séru - příbalový leták diagnostické soupravy TP2 Total Protein Gen.2 (Roche)

Tabulka 6. Referenční rozpětí koncentrace albuminu v séru – příbalový leták diagnostické soupravy ALB2 Albumin Gen.2 (Roche)

Tabulka 7. Mezinárodní prognostický index pro MM dle IMWG, 2003

Tabulka 8. Úspěšnost jednotlivých metod v období let 2006-2018 v rámci SEKK

Tabulka 9. Referenční meze vyšetření FreeLite™ dle Katzmanna et al. (69)

Tabulka 10. Revidovaný mezinárodní prognostický index (R-ISS) mnohočetného myelomu

Tabulka 11. Biklonální (zdvojené) monoklonální gamapatie zachycené v časovém období 1. 8. 2008 - 1. 8. 2018 v souboru 555 monoklonálních gamapatií

Tabulka 12. Přejídné monoklonální gamapatie – soubor pacientů

Tabulka 13. Složení analyzovaného souboru pacientů s MGUS dle věku a pohlaví

Tabulka 14. Přehled vybraných základních parametrů u pacientů analyzovaného souboru

Tabulka 15. Rozdělení souboru dle typu stanoveného MIG

Tabulka 16. Počty diagnostikovaných pacientů dle kvantity MIG

Tabulka 17. Rozdělení počtu jednotlivých typů MIG v závislosti na jejich koncentraci

Tabulka 18. Rozdělení souboru jedinců s MGUS podle Mayo stratifikačního systému a počet pozorovaných transformací do obrazu maligní MG v průběhu 10 let

Tabulka 19. Soubor pacientů s vyššími resp. nižšími hodnotami FLCr, u nichž došlo k progresi do maligní lymfoproliferace (OKB ON Trutnov a.s.)

Tabulka 20. Základní parametry MG v čase u pacientky s vývojem MGUS do MM (za 24 let)

Tabulka 21. Pacient č. 1 – laboratorní výsledky

Tabulka 22. Pacient č. 2 – laboratorní výsledky

Tabulka 23. Pacient č. 4 s mnohočetným myelomem kappa free – laboratorní výsledky

Tabulka 24. Výsledky příslušných laboratorních vyšetření u pacientů 1 a 2

### 13.2. Grafy

Graf 1. Incidence mnohočetného myelomu v jednotlivých krajích (Národní onkologický registr, ÚZIS ČR)

Graf 2. Bradwell, A.R. Relativní riziko progresu dle hodnoty FLC

Graf 3. Věk pacientů s nově prokázanou MG dle pohlaví

Graf 4. Závislost koncentrace beta2-mikroglobulinu a hematologické diagnózy

Graf 5. Logaritmus FLCr u jednotlivých typů MG

Graf 6. Rozdělení dle typu stanoveného MIG (OKB ON Trutnov a.s.)

Graf 7. Časová progresu jednotlivých biochemických parametrů u pacientky s vývojem MGUS do MM (vývoj za 24 let)

Graf 8. Reakční křivka stanovení bilirubinu při použití přístroje Modular (Roche) (ÚKBD FN Hradec Králové)

Graf 9. Chromatografické záznamy obou pacientů při vyšetření glykovaného hemoglobinu (OKB ON Trutnov a.s.)

### 13.3. Obrázky

Obrázek 1. Predikce epidemiologie novotvarů mízní, krvetvorné a příbuzné tkáně v ČR v letech 2018 - 2019 (Národní onkologický registr, ÚZIS ČR)

Obrázek 2. Incidence novotvarů mízní a krvetvorné tkáně v ČR v letech 2012 – 2016 (Národní onkologický registr, ÚZIS ČR)

Obrázek 3. Elektroforéza bílkovin séra

Obrázek 4. Elektroforeogram

Obrázek 5. Příklad přístroje Hydrasys 2 (BioVendor)

Obrázek 6. Příklad výsledku imunofixačního vyšetření bílkovin

Obrázek 7. Schéma stanovení polyklonálních imunoglobulinů

Obrázek 8. Příklad přístroje BN Prospec (Siemens)

Obrázek 9. Princip metody Hevylite™

Obrázek 10. Příklad přístroje Cobas 6000 (Roche)

- Obrázek 11. Princip imunochemické metody stanovení FLC
- Obrázek 12. Ukázka výsledku flowcytometrie
- Obrázek 13. Princip FISH a chromozomy v metafázi
- Obrázek 14. Elektroforetické a imunofixační vyšetření séra u pacientky se zdvojenou paraproteinémií IgA-lambda (OKB ON Trutnov a.s.)
- Obrázek 15. Elektroforetické a imunofixační vyšetření séra u pacienta s MGUS IgA - Lambda (OKB ON Trutnov a.s.)
- Obrázek 16. Elektroforetické a imunofixační vyšetření séra u pacientky s monoklonální gamapatií IgG-kappa (OKB ON Trutnov a.s.)
- Obrázek 17. Výsledky elektroforetického a imunofixačního vyšetření séra u pacienta s biklonální gamapatií IgA-lambda+IgM-kappa (OKB ON Trutnov a.s.)
- Obrázek 18. Výsledky elektroforetického a imunofixačního vyšetření séra u pacientky s triklonální gamapatií IgG-kappa + IgM-kappa + IgG-lambda (OKB ON Trutnov a.s.)
- Obrázek 19. Vstupní a kontrolní imunofixační vyšetření séru u pacientky s tranzientní paraproteinémií IgM-kappa (OKB ON Trutnov a.s.)
- Obrázek 20. Imunofixační vyšetření séra u pacientky s tranzientní zdvojenou paraproteinémií IgM-lambda (OKB ON Trutnov a.s.)
- Obrázek 21. Elektroforetické a následné imunofixační vyšetření séra a moči u pacientky č. 2 (OKB ON Trutnov a.s.)
- Obrázek 22. Nález na MR LS páteře u pacienta č. 3 (Radiodiagnostické pracoviště ON Trutnov a.s.)
- Obrázek 23. Elektroforetické a imunofixační vyšetření séra s nálezem paraproteinu IgG-lambda u pacienta č. 3 (Oddělení klinické biochemie ON Trutnov a.s.)
- Obrázek 24. Elektroforetické a imunofixační vyšetření séra a moči u pacienta č. 4 (Oddělení klinické biochemie ON Trutnov a.s.)
- Obrázek 25. Nález na rtg lebky u pacienta č.4 (Radiodiagnostické pracoviště ON Trutnov a.s.)
- Obrázek 26. Scintigrafické vyšetření skeletu u pacienta č.4 (Oddělení nukleární medicíny ON Trutnov a.s.)

## 14. Přehled použitých zkratk a symbolů

B2M	beta2-mikroglobulin
Ca	calcium – vápník
CB	celková bílkovina
CD	cluster of differentiation = diferenciační znak
CE	kapilární elektroforéza
Cl	chloridy
c-MIG	koncentrace monoklonálního imunoglobulinu
CMG	česká myelomová skupina
CRAB	příznaky mnohočetného myelomu (hypercalcemia, anemia, renal disease, bone disease)
CRP	C-reaktivní protein
CT	počítačová tomografie
DS	Durieho-Salmonův stážovací systém
EBV	virus Epstein-Baarové
EHK	externí hodnocení kvality
FISH	fluorescenční hybridizace in situ
FLC	volné lehké řetězce
FLCr	poměr volných lehkých řetězců
GEP	Gene Expression Profiling - genový expresní profil
GF	glomerulární filtrace
Hb	hemoglobin
HbA <sub>1c</sub>	glykovaný hemoglobin
HLC	Heavy/Light Chain - pár lehkých/těžkých řetězců
IF	imunofixace
Ig	imunoglobulin
IgH	těžké řetězce imunoglobulinů
IMWG	International Myeloma Working Group
ISS	International Staging System = mezinárodní stážovací systém
KD	kostní dřeň
KO	krevní obraz

LDH	laktátdehydrogenáza
MG	monoklonální gamapatie
MGUS	monoklonální gamapatie nejasného významu
MIBI	methoxy-isobutyl-isonitrile
MIG	monoklonální imunoglobulin
MM	mnohočetný myelom
MRI	magnetická rezonance
Na	natrium-sodík
OKB	oddělení klinické biochemie
ON	oblastní nemocnice
PAD	perorální antidiabetika
PD	Progressive Disease = progresivní choroba
PET/CT	pozitronová emisní tomografie / CT
PKB	periferní kmenové buňky
PPN	paraproteinemická neuropatie
RMG	Registr monoklonálních gamapatií
ROTI	related organ or tissue impairment = související orgánové a tkáňové poškození
SEKK	system externí kontroly kvality
SMM	smoldering multiple myeloma
ÚKBD	ústav klinické biochemie a diagnostiky
VLŘ	volné lehké řetězce

## 15. Přehled dosavadní publikační činnosti

1. Šolcová L, Friedecký B, Radocha J, et al. Abnormální hyperbilirubinémie u pacientky s mnohočetným myelomem. *Klin Biochem Metab* 2008; 16(37): 202-3.
2. Friedecký B., Tichý M., Šolcová L., et al. Možná interference paraproteinů při stanovení glykovaného hemoglobinu u dvou pacientů. *Klin Biochem Metab* 2009; 17(38): 81-2.
3. Šolcová L, Maisnar V, Šimková J. Soubor nově diagnostikovaných monoklonálních gamapatií v regionální laboratoři v osmiletém časovém období. *Klin Biochem Metab* 2016; 24(45): 179-82.
4. Šolcová L, Maisnar V, Tichý M. Pozdní diagnostika mnohočetného myelomu – kazuistiky. *Klin Biochem Metab* 2010; 18(39): 88-9.
5. Šolcová L. Monoklonální gamapatie. *Fons* 2013; 1: 22-26
6. Pika T, Lochman P, Sandecka V, Maisnar V, Minarik J, Tichy M, Zapletalova J, Solcova L, Scudla V, Hajek B. Immunoparesis in MGUS – Relationship of uninvolved immunoglobulin pair suppression and polyclonal immunoglobuline levels to MGUS risk categories. *Neoplasma* 2015, 62: 827-32.
7. Šolcová L, Maisnar V, Šimková J. Laboratorní diagnostika pacientů s MGUS a výsledky jejich sledování v regionální biochemické laboratoři v průběhu 10 let. *Klin Biochem Metab* 2019; 27(48): 112-5.
8. Spáčilová J, Šolcová L, Tichý M. Transientní monoklonální gamapatie – kazuistiky. *Klin Biochem Metab* 2012; 20(41): 88-90.
9. Pitělinová J, Šolcová L, Tichý M. Interference léku při sledování pacienta s diabetes mellitus - kazuistika. *Klin Biochem Metab* 2011; 19(40): 26-7.
10. Vávrová J, Kušnierová P, Maisnar V, Šolcová L. Doporučení České společnosti klinické biochemie a České myelomové skupiny k laboratorní diagnostice monoklonálních gamapatií. *Klin. Biochem. Metab.*, 28 (49), 2020, No. 1, p. 26-34.



# Doporučení České společnosti klinické biochemie a České myelomové skupiny k laboratorní diagnostice monoklonálních gamapatií

Vávrová J., Kušnierová P., Maisnar V., Šolcová L.

## Úvod

Dokument je přirozeným důsledkem i součástí celosvětového úsilí o harmonizaci a směřování laboratorní medicíny k precizní medicíně [1-4]. Mohl by být efektivním nástrojem k diagnostice, přičemž diagnostika sama přesahuje hranice tohoto doporučení a není možné obě věci zaměřovat navzájem. Doporučení si neklade za cíl řešit klinické indikace dané doporučeními odborných společností průběžně aktualizovanými na mezinárodní úrovni [5], nýbrž chce přispět ke srovnatelnému přístupu analytického i postanalytického laboratorního vyšetření parametrů laboratorní diagnostiky monoklonálních gamapatií. Laboratorní pracovníci poskytují rutinně základní a mnohdy zásadní informace o podezření na přítomnost monoklonálního gradientu, jeho průkazu, typizaci a následné kvantifikaci. Tato vyšetření jsou pro další léčbu pacienta mnohdy klíčová a včasnost léčby také závisí na požadování vyšetření praktickými lékaři, či oblastními specialisty. Popis a interpretace laboratorních výsledků by měly být mezilaboratorně srovnatelné a poskytnout klinickému lékaři jasné informace, potřebné jak pro přesnou diagnostiku, tak odpovídající léčbu jeho pacientů. Výsledkové listy musí obsahovat informace umožňující posouzení dat podle klinických kritérií.

Za základní klinicko-biochemické vyšetření je považováno stanovení koncentrace celkové bílkoviny, elektroforéza frakcí sérových proteinů a k určení imunoglobulinové třídy a antigenního typu lehkých řetězců paraproteinů pak imunofixační elektroforéza. Svě místo v algoritmu laboratorních metod používaných u monoklonálních gamapatií zaujímá také stanovení koncentrace volných lehkých řetězců (nesekretorický myelom, AL amyloidóza, onemocnění z lehkých řetězců). Z řady prognostických faktorů byla vybrána kombinace  $\beta$ 2-mikroglobulinu a albuminu, v paletě laboratorních vyšetření je třeba myslet také na doplňující stanovení viskozity séra a průkaz kryoglobulinů [6, 7].

## Nomenklatura

- Monoklonální komponenta v sérovém elektroforetickém profilu je kvalitativně popisována synonymy „monoklonální imunoglobulin“, „monoklonální gradient“ nebo „paraprotein“.
- Termín monoklonální volné lehké řetězce je preferován před názvem „Bence Jonesova bílkovina“, odkazuje-li na monoklonální volné lehké řetězce v séru.
- Monoklonální komponenta v moči je označována obecně jako „Bence Jonesova bílkovina“, „parapro-

tein“ nebo jako „monoklonální volné lehké řetězce v moči“.

- Oligoklonální profil nálezu odkazuje na dvě nebo více linií v gama frakci imunofixační elektroforézy sérových proteinů; rozlišení monoklonálních a polyklonálních pásů se v rutinní diagnostice neprovádí.

## Požadovaná laboratorní vyšetření související s diagnostikou a sledováním monoklonálních gamapatií [5]

### 1. Laboratorní vyšetření, která by měl provést obvodní (praktický) lékař u nemocných s podezřením na mnohočetný myelom

#### Hematologie:

- Sedimentace erytrocytů. Velmi vysoká sedimentace u nemocných s mnohočetným myelomem souvisí s přítomností monoklonálního imunoglobulinu.
- Kompletní krevní obraz. Mnohočetný myelom mohou provázet jak anémie, tak případně trombocytopenie, ale i neutropenie.

#### Klinická biochemie:

- Celková bílkovina a albumin v séru.
- Urea, kreatinin, elektrolyty včetně kalcia v séru.
- Elektroforéza bílkovin séra (detekuje monoklonální imunoglobulin ve vyšších koncentracích, spolehlivě nad 5 g/L).
- Kvantitativní vyšetření imunoglobulinů v séru (izolované zvýšení jednoho typu imunoglobulinu se současným snížením jednoho nebo všech ostatních typů dalších se označuje jako imunoparéza a je častým nálezem při diagnóze mnohočetného myelomu).
- Vyšetření přítomnosti lehkých řetězců v moči (Bence-Jonesova bílkovina).

Pokud jsou přítomny příznaky a některé z vyšetření budí podezření na mnohočetný myelom, musí být takový pacient ihned odeslán na specializované pracoviště s možností toto podezření konfirmovat.

### 2. Rozsah vyšetření prováděných ve specializovaných centrech s cílem potvrdit mnohočetný myelom, stanovit klinické stadium nemoci a její prognózu

#### Základní biochemická vyšetření:

- Urea, kreatinin, kyselina močová, Ca, ionizované Ca, Na, K, Cl, P, bilirubin, ALT, AST, ALP, glykémie, CRP a LDH.

- Koncentrace celkové bílkoviny a albuminu v séru.
- Kvantitativní proteinurie ze sběru moči za 24 hodin.
- Vyšetření glomerulární filtrace.

#### Speciální vyšetření bílkovin:

- Elektroforéza séra a zahuštěné moči.
- Typizace paraproteinu imunofixací (IFE) v séru i v moči. Vyšetření je nutno provést vždy i u pacientů, u nichž je podezření na tuto chorobu a elektroforéza je negativní.
- Kvantitativní denzitometrické stanovení monoklonálního imunoglobulinu.
- Kvantitativní denzitometrické stanovení lehkých řetězců v moči buď v náhodném vzorku moči se vztažením ke koncentraci kreatininu v tomto vzorku, nebo měřené ve vzorku moči ze sběru za 24 hodin.
- Kvantitativní stanovení polyklonálních (neizotypických) imunoglobulinů.
- Volné lehké řetězce v séru včetně stanovení indexu  $\kappa/\lambda$ .
- Stanovení koncentrace  $\beta_2$ -mikroglobulinu v séru.

### Metodické přístupy k laboratorním vyšetřením související s diagnostikou a sledováním monoklonálních gamapatií

Metody stanovení základních rutinních laboratorních vyšetření jsou v laboratořích používány frekventně a jsou povinně v každé laboratoři zajištěny dlouhodobým sledováním v systémech vnitřní kontroly kvality i v rámci externího hodnocení kvality daných analytů. V souvislosti s mezinárodním úsilím o standardizaci v oblasti monoklonálních gamapatií je proto zde diskutována pouze otázka metody stanovení albuminu v séru [8].

### Stanovení koncentrace albuminu v séru – doporučena metoda s bromkrezolovým purpurem

Současná situace v harmonizaci postupů pro měření koncentrace albuminu v séru a její dopad pro lékařská rozhodování prokazují významné rozdíly mezi imunochemickými, BCG (bromcresol green) a BCP (bromcresol purple) metodami. Ze spektra rutinně nabízených možností měření jsou statisticky významně úspěšnější BCP postupy. Má-li být dosaženo harmonizace, pak doporučení a výpočty pro klinická hodnocení funkce ledvin a dalších nemocí musí zvážit volbu a používání metody pro měření albuminu [8, 9].

### Detekční systém pro elektroforézu proteinů

- Elektromigrační metody dělení frakcí proteinů v uspořádání na agarózovém gelu a v uspořádání kapilární zónové elektroforézy (CZE) jsou srovnatelné a jsou vhodnými postupy pro elektroforézu proteinů v séru.

- Frakce sérových proteinů se kvantifikují na gelu denzitometricky nebo skenováním, u CZE je detekčním místem průchod frakce proteinů detekčním okénkem, kde dochází ke snímání fotometrického signálu, pro kvantifikaci se zaznamenává plocha pod křivkou. Kvantitativně se hodnoty uvádí v g/L.
- Elektroforetický systém musí mít vysoké rozlišení, aby byl schopen detekovat malé monoklonální pásy (nebo monoklonální imunoglobuliny o nízké koncentraci), které mohou migrovat s ostatními proteiny v oblasti frakce beta nebo případně i ve frakci alfa. Doporučuje se používání diagnostik dělicích sérové proteiny na frakce albumin, alfa 1, alfa 2, beta 1, beta 2 a gama.
- Pro elektroforézu proteinů není doporučována elektroforéza na acetátu celulózy vzhledem k nízkému rozlišení.
- Lékaři by měli požadovat sledování koncentrace paraproteinu u jednotlivých pacientů vždy stejnou metodou, přičemž výhodou je dlouhodobé využívání služeb stejné laboratoře disponující dlouhodobou databází výsledků s kumulativním laboratorním nálezem téhož pacienta.
- Vzorky vyžadující typizaci IFE by měly být předány k dovyšetření do referenční laboratoře, pokud laboratoř metodu IFE sama neprovádí, nebo neprovádí ji v plném rozsahu s antiséry IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, kappa a lambda.

### Možné příčiny falešně negativního výsledku elektroforézy [6]

- Paraprotein tvoří komplexy s ostatními bílkovinami plazmy, což mění pohyblivost v elektrickém poli nebo maskuje přítomnost PP.
- Elektroforetický obraz může být modifikován přítomností monomerů, dimerů nebo polymerů IgM, polymerů IgA nebo agregátů IgG.
- Bílkoviny mohou simulovat přítomnost M proteinu, jako tzv. pseudoparaproteiny (fibrinogen, CRP, lysozym, komplex hemoglobinu s haptoglobinem, migrační artefakty apod.), proto spolehlivý průkaz monoklonálních Ig v séru anebo v moči poskytuje až imunofixace.
- Elektroforetická analýza paraproteinů v jiných tělesných tekutinách než v séru obvykle vyžaduje úpravu analyzovaného materiálu. Nejčastěji se jedná o analýzu bílkovin moči. Moč se pro elektroforetickou analýzu sbírá 24 hod, vhodná je její konzervace azidem sodným (2 mg/L) proti růstu bakterií, nebo může být použit k analýze druhý ranní vzorek moči. Stanoví se koncentrace bílkoviny a kreatininu, podle potřeby se provede zahuštění, případně naředění moči.

### Kvantitativní hodnocení frakcí elektroforézy proteinů v séru (SPE)

- Kvantitativní hodnocení frakcí SPE se vyjadřuje jako podíl frakce z celku a při znalosti koncentrace celkové bílkoviny v séru stanovené rutinní biochemickou

metodou se přepočítává na hmotnostní zastoupení této frakce v g/L.

- SPE a CZE mohou dávat v důsledku odlišného detekčního systému rozdílné výsledky při vysokých koncentracích imunoglobulinů. Obecně je detekční systém CZE považován za citlivější a nezávislý na interakcích protein - gel - barvivo.
- Při hodnocení SPE je potřebné kvantitativně vyhodnotit:
  - Koncentraci celkového proteinu (rutinní analytickou metodou v g/L).
  - Hodnotu albuminu z elektroforetického záznamu:
    - jako podíl z jedné, případně jako procentuální zastoupení z celku všech rozdělených frakcí,
    - jako hmotnostní koncentraci albuminu v g/L (podíl frakce albuminu z celku se násobí naměřenou koncentrací celkové bílkoviny).
  - Hodnotu frakce gama-globulinů (zastoupení z celku, nebo hmotnostní zastoupení frakce gama-globulinů; hodnotí se stejně jako albumin jako podíl z celku, nebo hmotnostně přenásobením podílu z jedné hodnotou naměřené koncentrace celkové bílkoviny v g/L).
  - V případě nálezu pozitivitu paraproteinu(ů) se hodnotí hmotnostní zastoupení PP opět přepočtem zastoupení PP z celkové bílkoviny v g/L.

### Kvantitativní hodnocení paraproteinu odečtem ze SPE

- Paraproteiny v oblasti gama se kvantifikují z profilu frakcí sérových proteinů, kvantitativně se hodnoty uvádí v g/L a zaokrouhlují se na jedno desetinné místo.
- Paraproteiny viditelné na SPE nebo CZE o kvantitě do 1 g/L nemohou být spolehlivě kvantifikovány, pokud jsou obklopeny polyklonálním gamaglobulinovým pozadím, a měly by být proto vykazovány jako „<1 g/L“ nebo „stopa“ s event. komentářem, že „malý pás nemůže být spolehlivě kvantifikován.“
- Kromě stanovení celkového proteinu v moči se doporučuje, aby laboratoř poskytovala také informaci, zda se jedná o glomerulární a/nebo tubulární proteinurii, a poznámku, zda je BJP detekován či nikoliv.
- Koncentraci BJP je vhodné vyjadřovat ve vztahu ke koncentraci kreatininu v moči - BJP / kreatinin v mg/mmol (= g/mol).
  - Předpokladem pro uvedený postup je současné stanovení hodnoty kreatininu v moči, hodnota koncentrace PP v moči v mg/L je vydělena hodnotou koncentrace kreatininu v moči v mmol/L.
  - Pro porovnatelnost výsledků v databázi centrálního registru pacientů s MM je požadováno vydávání výsledků koncentrace PP v moči v jednotkách mg/24 hod. Podmínkou pro uvedené zadání je správný sběr moči v období 24 hod podle instrukcí laboratoře. V moči je stanovena

koncentrace celkové bílkoviny rutinně používanou fotometrickou metodou. Postupem UPE a IFE je typizován PP a kvantifikován jako podíl koncentrace celkové bílkoviny ve vzorku moči sbírané 24 hodin.

- Kvantifikace paraproteinů pomocí SPE a imunochemických metod neposkytuje vždy srovnatelný výsledek. Metody imunonefelometrie (INA)/imunturbidimetrie (ITA) měří jak monoklonální, tak polyklonální imunoglobuliny, zatímco hodnocení PP z elektroforeogramu je pro paraprotein specifitější. Kvantifikace imunoglobulinů pomocí INA/ ITA může poskytnout výsledky odlišné od SPE, což může být způsobeno vlastnostmi monoklonálních proteinů nebo přítomností jiných polyklonálních imunoglobulinů stejné třídy jako paraprotein.
- INA nadhodnocuje IgM při vyšších koncentracích, pravděpodobně díky pentamerní struktuře IgM, IgG a IgA mohou být také metodami INA a ITA nadhodnocovány.
- Nejvýraznější důsledky nelinearity se vyskytují při velmi vysokých koncentracích paraproteinu, kde sérové ředění vzorků může mít za následek vyšší hladiny než koncentrace globulinu.

### Typizace paraproteinů

- IFE nebo imunosubtrakce jsou nezbytnými postupy pro typizaci všech nových pásů v profilu sérových proteinů a pro potvrzení jejich monoklonality.
- Vyšetření IFE je nutné k potvrzení absence dříve prokázaného paraproteinu - „kompletní remise“.
- Vyšetření IFE není nezbytné při každém následujícím odběru, pokud není viditelný nový pás v SPE nebo pokud není výslovně požadováno IFE.
- U malých paraproteinů v non-gama oblasti nebo v polyklonálním pozadí je třeba provádět průkaz přítomnosti paraproteinu metodou IFE při každém odběru.
- Pokud je paraprotein detekován v séru pouze imunofixací, je třeba to uvést v komentáři.
- Pokud je paraprotein detekován v moči pouze imunofixací, je třeba uvést hodnocení kvalitativní positivity, případně komentář, že je viditelný pouze imunofixací.
- Problematické vzorky vyžadující upřesnění identifikace malých proteinových pásů v UPE je třeba předat do referenční laboratoře pro IEF, pokud laboratoř tuto metodu neprovádí.
- V případě polymerizace některých monoklonálních proteinů je výsledkem „monoklonální“ frakce ve všech drahách imunofixační analýzy. V tomto případě je třeba opakovat analýzu po inkubaci vzorku s 2-merkaptetanolem, případně s jiným redukčním činidlem (např. dithiotreitolem). Postup s přidávkem roztoku fluidilu není v těchto případech 100% úspěšný [11].
- Inkubace s ME, případně fluidilem se používá také k ředění viskózních vzorků nebo vzorků, které vykazují kryogenní vlastnosti.

## Kryoproteiny

Kryoproteiny jsou sérové proteiny, které precipitují při teplotách nižších než 37 °C a při zahřátí se opět rozpouštějí. Kryoprecipitace je jev velmi variabilní. Kryoprecipitační vlastnosti mohou mít monoklonální imunoglobuliny, polyklonální imunoglobuliny nebo může jít o smíšenou kryoglobulinemii (mixed cryoglobulinemia) obou těchto složek. Rozeznávají se dva typy kryoproteinů, a to kryoglobuliny a kryofibrinogeny. Kryoglobuliny jsou imunoglobuliny, které precipitují v séru i v plazmě. Kryofibrinogeny precipitují jenom v plazmě a jsou tvořeny komplexy fibrinogen-fibrin. Kryoglobuliny se dělí podle komponent tvořících kryoprecipitát na tři typy:

- Kryoglobuliny typu I jsou tvořeny monoklonálním imunoglobulinem (paraproteinem), precipitují obvykle již do 24 hodin v ledničce při 2-8 °C, bývají provázány hyperviskozitou a jejich koncentrace bývá vyšší než 5 g/L.
- Kryoglobuliny typu II jsou tvořeny monoklonální komponentou, obvykle paraproteinem IgM s protilátkovou aktivitou proti polyklonálním imunoglobulinům, obvykle proti IgG. Precipitují většinou do 24 hodin při 2-8 °C a jejich koncentrace bývá nižší než u typu I ( $\geq$  1 g/L).
- Kryoglobuliny typu III jsou tvořeny polyklonálními imunoglobuliny, k jejich precipitaci je zapotřebí několika dnů při 2-8 °C a jejich koncentrace bývá nízká ( $\leq$  1 g/L).

Je-li v séru prokázán kryoglobulin, měl by být vzorek séra určený pro elektroforézu a imunofixaci předeříván na 37 °C. Toto opatření nevyžaduje CZE, která probíhá při 35 °C. Vzorek séra s kryoglobulinem je vhodné pro tyto analýzy ošetřit inkubací s 2-merkaptotetanol. V řadě postupů je v současnosti k inkubaci doporučován uživatelsky příjemnější roztok fluidilu, nicméně při inkubaci vzorků s kryogenními vlastnostmi není tento postup 100% úspěšný [11]. Kryoglobulin může být falešně pozitivní u nemocných s antikoagulační terapií, ale jeho koncentrace je nízká (kolem 1–2 g/L). U monoklonálních kryoglobulinů bývá prakticky vždy vyšší než 5 g/L [10].

## Hyperviskózní séra

U pacientů s monoklonálními gamapatiemi je stanovení viskozity séra indikováno při vysoké koncentraci paraproteinu, a to u IgM nad 40 g/L a u IgG nad 60 g/L. Toto stanovení je nutné také u pacientů s klinickými příznaky hyperviskózního syndromu (oronazální krvácení, nevysvětlitelné městnavé srdeční selhávání, poruchy vizu a další neurologická symptomatologie). Hyperviskozita je nejčastěji pozorována u Waldenströmovy makroglobulinemie ve spojení s vysokou koncentrací monoklonálního IgM (až v 33 % pozorování). V mnohem menší frekvenci je hyperviskozita spojena s vysokou koncentrací monoklonálních IgG a IgA. Poměr mezi hodnotami sérové viskozity a koncentrací paraproteinu IgM je nelineární a závisí na molekulárních charakteristikách a na stupni agregace paraproteinu [6].

## Volné lehké řetězce

Denní produkce volných polyklonálních lehkých řetězců imunoglobulinů u zdravých jedinců je asi 500 mg. Tyto lehké řetězce jsou vylučovány glomeruly a prakticky kompletně absorbovány v proximálních tubulech, takže denně je vylučováno močí asi 1–10 mg volných lehkých řetězců. Zvýšené hodnoty polyklonálních volných lehkých řetězců mohou být spojeny s autoimunitními onemocněními. Zvýšené hodnoty monoklonálních volných lehkých řetězců a jejich indexu  $\kappa/\lambda$  (kappa/lambda) jsou spojovány s maligní proliferací plazmatických buněk, AL amyloidózou a nemocí z lehkých řetězců.

U nemocných s MM s paraproteinem tvořeným volnými lehkými monoklonálními řetězci, u AL amyloidózy a zejména u pacientů s obtížně diagnostikovatelným neseekretorickým myelomem se jeví sledování FLC v séru výhodné. Ve většině tuzemských laboratořích používaná metoda používá protilátku zaměřenou na vnitřní epitop lehkého řetězce, a tak odliší volné lehké řetězce od vázaných.

Molekuly volných lehkých řetězců jsou obvykle monomery a dimery, často se však mohou vyskytovat také polymerní formy. Tyto pak při imunoprecipitačních testech způsobují urychlení tvorby agregátů vedoucí k nadhodnocení koncentrací antigenu. Naopak elektroforetické analýzy mohou podceňovat koncentrace polymerizovaných monoklonálních volných lehkých řetězců, důsledkem toho může polymerací dojít k rozostření monoklonálních linií na gelech. Kombinace těchto faktorů způsobuje, že u některých pacientů dochází k nesouladu mezi průkazem na ELFO a kvantitativním měřením.

- Měření volných lehkých řetězců imunoglobulinů (FLC) v séru se v diagnostice a léčbě pacientů s MM stalo praktickou možností dostupného, mezilaboratorně porovnatelného stanovení, u něhož hodnota FLC představuje některé výhody oproti tradičnímu elektroforetickému hodnocení, kde se nepříznivě odráží nižší citlivost a subjektivní hodnocení přítomnosti volných lehkých řetězců. Testy FLC jsou citlivé k identifikaci abnormální produkce FLC a jsou tedy velmi důležitým indikátorem závažného renálního postižení.
- Přestože FLC je citlivější metodou pro diagnostiku onemocnění ve srovnání s UPEP [12], pro screening je i nadále metodou dostupné volby UPEP [5].
- Monitorování a hodnocení pacientů měřením FLC v séru by měly zajišťovat minimálně laboratoře při hematologických centrech.

## $\beta$ 2-mikroglobulin

Stanovení koncentrace  $\beta$ 2-mikroglobulinu (B2M) je důležitým prognostickým faktorem u pacientů s MM. Koncentrace B2M v séru i v moči je závislá na funkci ledvin. Protože snížená glomerulární filtrace zvyšuje hodnoty B2M v séru a poškození tubulů naopak snižuje jeho hodnoty v séru, musí být hodnoty B2M posu-

zovány ve vztahu k funkci ledvin. Hodnoty B2M spolu s koncentrací albuminu v séru jsou využívány v mezinárodním stážovacím systému (ISS) doporučeném International Myeloma Working Group [5,7].

## Seznam zkratk

BJP	Bence Jonesova bílkovina (Bence Jonesův protein)
B2M	$\beta$ 2-mikroglobulin
CZE	kapilární zónová elektroforéza
CMG	Česká myelomová skupina
FLC	volné lehké řetězce
FISH	fluorescenční in situ hybridizace
IFE	imunofixační elektroforéza
INA	imunonefelometrická analýza
ITA	imunoturbidimetrická analýza
ISS	mezinárodní prognostický index
LDH	laktátdehydrogenáza
mAb	monoklonální protilátka
MM	mnohočetný myelom
MIG	monoklonální imunoglobulin
PP	paraprotein
SPE	elektroforéza proteinů v séru
UPE	elektroforéza proteinů v moči

Výborem České společnosti klinické biochemie ČLS JEP schváleno 23. 10. 2019.

*Autoři děkují za spolupráci a cenné připomínky kolegům: MUDr. Zdeňce Čermákové, Ph.D., Mgr. Janě Gottwaldové, MUDr. Tomáši Fraňkovi, Ph.D., RNDr. Pavlu Lochmanovi, Ph.D., MUDr. Martině Slavětinové a MUDr. Janu Lackovi.*

## Přílohy:

Tabulka 1.	Iničiální vyšetření u pacienta s mnohočetným myelomem
Tabulka 2.	Srovnání kritérií MGUS, asymptomatického a symptomatického mnohočetného myelomu
Tabulka 3.	Mezinárodní prognostický index (ISS a R-ISS) pro mnohočetný myelom
Tabulka 4.	Klasifikace monoklonálních gamapatií neurčeného významu
Tabulka 5.	Kritéria hodnocení klinické odpovědi pro mnohočetný myelom (MM) v kontextu s obvyklým laboratorním algoritmem průkazu a kvantifikace paraproteinu.
Tabulka 6.	Obecná interpretační doporučení: všechny vzorky
Tabulka 7	Standardizovaný text závěru IFE vyšetření
Tabulka 8.	Postup laboratoře a komentáře k laboratornímu nálezu

Tabulka 9. Obecné interpretační komentáře: vzorky s paraproteinem a/nebo malým abnormálním pásmem

Tabulka 10. Certifikace cyklu GP v systému SEKK EHK

## Literatura

1. **Tate, J. R. et al.** Recommendations for standardized reporting of protein electrophoresis in Australia and New Zealand. *Ann. Clin. Biochem.*, 2012, 49, p. 242–256.
2. **Tate, J. R., Smith, J. D., Wijeratne, N., Moleel, P.** Peropose addendum to 2012 recommendations for standardized reporting of protein electrophoresis in Australia and New Zealand. *Clin. Biochem. Rev.*, 2019, 40, p. 23–30.
3. **Genzen, J. R. et al.** Screening and Diagnosis of Monoclonal Gammopathies. An International Survey of Laboratory Practice. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 2018, 142, p. 507–515.
4. **Wijeratne, N., Tate, J. R., Wienholt, L., Mollee, P.** Report of the Survey Conducted by RCPAQAP on Current Practice for Paraprotein and Serum Free Light Chain Measurement and Reporting: a Need for Harmonisation. *Clin. Biochem. Rev.*, 40(1) 2019, p. 31–42.
5. **Hájek, R. (ed.) et al.:** Doporučení vypracované Českou myelomovou skupinou, Myelomovou sekcí České hematologické společnosti a Slovenskou Myelomovou Spoločnosťou pro diagnostiku a léčbu mnohočetného myelomu. *Transfúze Hematol dnes* 2018, 24, suplement 1, p. 2–157.
6. **Tichý, M., Maisnar, V.:** Laboratorní průkaz monoklonálních imunoglobulinů. *Vnitř. Lék.* 2006, 52, S2, p. 41–45.
7. **Tichý, M., Friedecký, B., Vávrová, J. et al.** Standardizace biochemických laboratorních vyšetření u mnohočetného myelomu. *Klin. Biochem. Metab.*, 2006, 14 (35), p. 8–13.
8. **Bachmann, L. M. et al.** State of Harmonization of 24 Serum Albumin Measurement Procedures and Implications for Medical Decisions. *Clin. Chem.*, 2017, 63, 3, p. 770–779.
9. **Friedecký, B., Kratochvíla, J.** Stanovení albuminu v séru a plasmě. Harmonizace výsledků měření a klinická doporučení u pacientů s renálními chorobami. *Klin. Biochem. Metab.*, 25 (46), 2017, No. 3, p. 108–111.
10. **Tichý, M., Maisnar, V., Hrnčič, Z. et al.** Kryoglobuliny v souboru 3 392 monoklonálních imunoglobulinů. *Klin. Biochem. Metab.*, 17 (38), 2009, No. 2, p. 77–78.
11. **Čermáková, Z., Gottwaldová, J.** Kryoglobulinémie a její rizika při laboratorním vyšetřování – kazuistika. *Klin. Biochem. Metab.*, 17 (38), 2009, No. 2, p. 79–80.
12. **Dejoie, T., Corre, J., Caillon, M. et al.** Serum free light chains, not urine specimens should be used to evaluate response in light-chain multiple myeloma. *Blood* 2016, 128, p. 2941–2948

## Přílohy:

**Tabulka 1.** Iničiální vyšetření u pacienta s mnohočetným myelomem

Biochemické testy v diagnostice monoklonálních gamapatií	
Screeningové – lékař prvního kontaktu	Elektroforéza séra a moči
Potvrzení diagnózy	Volné lehké řetězce v séru, Imunofixace
Zjištění velikosti myelomové masy, prognóza	Ca, albumin, $\beta$ 2-mikroglobulin
Zjištění poškození tkání a orgánů myelomem	Kreatinin, Ca, ALT, AST, ALP, LD, CRP

**Tabulka 2.** Srovnání kritérií MGUS, asymptomatického a symptomatického mnohočetného myelomu [5].

MGUS	Doutnající myelom	Mnohočetný myelom
Koncentrace monoklonálního imunoglobulinu v séru < 30 g/L	Koncentrace monoklonálního imunoglobulinu v séru $\geq$ 30 g/L a/nebo počet klonálních plazmocytů v kostní dřeni $\geq$ 10 %	Přítomen monoklonální imunoglobulin v séru a/nebo v moči + známky poškození orgánů při základní diagnóze

**Tabulka 3.** Mezinárodní prognostický index (ISS a R-ISS) pro mnohočetný myelom [5, 7].

Klinické stadium	$\beta$ 2-mikroglobulin (mg/L)	Albumin (g/L)	Poslední revize (R-ISS)
I	< 3,5 a současně	$\geq$ 35	ISS stadium I a standardně riziková cytogenetika při vyšetření iFISH a normální koncentrace LDH
II	< 3,5 a současně nebo 3,5 – 5,5	< 35	Nejsou splněna kritéria R-ISS I ani III
III	> 5,5		ISS stadium III a současně vysoce rizikové cytogenetické změny při vyšetření iFISH nebo zvýšené LDH

**Tabulka 4.** Klasifikace monoklonálních gamapatií neurčeného významu [5].

Riziko	podmínky
Nízké	MIG < 15 g/L, typ IgG, poměr FLC (K/L) v normě <i>Ve skupině nízkého rizika je pouze 5% riziko přechodu do obrazu maligní monoklonální gamapatie do 20 let od stanovení diagnózy MGUS</i>
Nízké-střední	1 podmínka nesplněna
Vysoké-střední	2 podmínky nesplněny
Vysoké	Nesplněna žádná podmínka <i>V této skupině je až 58% riziko přechodu přechodu do obrazu maligní monoklonální gamapatie do 20 let od stanovení diagnózy MGUS</i>

**Tabulka 5.** Kritéria hodnocení klinické odpovědi pro mnohočetný myelom (MM) v kontextu s obvyklým laboratorním algoritmem průřezu a kvantifikace paraproteinu.

Kategorie	Zkratka	Kritérium	Pozn.
Kompletní remise	CR	IFE negativní v séru i v moči	IFE vyšetřit, není-li PP viditelný v SPE
Velmi dobrá parciální remise	VGPR	PP prokázán IFE, ale nezřetelný v SPE a v UPE Nebo $\geq$ 90% snížení koncentrace PP v séru a PP v moči < 100 mg/24 hod	Nezaměřovat s oligoklonalitou
Parciální remise	PR	$\geq$ 50 % pokles původní koncentrace PP v séru a $\geq$ 90 % pokles původní koncentrace PP v moči nebo PP v moči < 200 mg za 24 hodin a $\geq$ 50 % zmenšení velikosti event. plazmocytomu	
Minimální remise	MR	25–49% pokles původní koncentrace PP v séru a 50–89% pokles původní koncentrace PP v moči a 25–49% zmenšení velikosti event. plazmocytomu	
Progrese onemocnění	PD	Více jak 25% zvýšení koncentrace PP v séru (změna minimálně $\geq$ 5 g/L) nebo více jak 25% zvýšení koncentrace PP v moči (změna minimálně $\geq$ 200 mg/24 hod)	
Stabilní onemocnění	SD	Nedosažení kritérií CR, VGPR, PR, MR nebo PD	

SPE, elektroforéza sérového proteinu; UPE, elektroforéza proteinů v moči; IFE, imunofixační elektroforéza; FLC, volné lehké řetězce; PP, paraprotein

**Tabulka 6.** Obecná interpretační doporučení: všechny vzorky

Nález	Komentář
Normální nález	Paraprotein neprokázán
Normální nález (klinický kontext naznačuje podezření na dyskrázii plazmatických buněk)	Paraprotein neprokázán. Doporučujeme elektroforézu proteinů v moči, imunofixaci a/nebo FLC v séru
Snížená frakce alfa-1 globulinů	Snížené alfa-1 globuliny. Pokud je to klinicky indikováno, navrhněte kvantifikaci alfa-1 antitrypsinu a genotypizaci/fenotypizaci
Snížený albumin a zvýšená frakce alfa-2 a beta globulinů	Nález svědčí pro nefrotický syndrom
Zvýšená frakce alfa-1 a alfa-2 a/nebo gamaglobulinů	Nález svědčí pro akutní zánětlivý proces
Zvýšená frakce beta-1 globulinů (paraprotein vyloučen provedením IFE)	Paraprotein neprokázán. Pokud je to indikováno, doporučujeme podrobné vyšetření metabolismu železa
Polyklonální hypergamaglobulinémie	Polyklonální hypergamaglobulinémie
Polyklonální hypergamaglobulinémie a zvýšeno zastoupení proteinů akutní fáze	Nález svědčí pro chronický zánětlivý proces
Beta-gama přemostění	Beta-gama přemostění přítomno kvůli zvýšenému IgA nebo někdy IgM. Příčiny mohou zahrnovat cirhózu, slizniční nebo kožní zánět. Doporučujeme IFE.
Hypogamaglobulinémie (první záchyt)	Hypogamaglobulinémie. Doporučujeme IFE séra a elektroforézu proteinů v moči, včetně imunofixace (nebo vyšetření sérových volných lehkých řetězců), spolu s kvantifikací celkových sérových imunoglobulinů (pokud ještě nebyly vyšetřeny)
Hypogamaglobulinémie (opakovaný nález)	Hypogamaglobulinémie přítomna
Anomální gradient v SPE, negativní IFE	Pravděpodobně přítomný fibrinogen. V případě podezření na přítomnost fibrinogenu lze opakovaně analyzovat vzorek po reakci s trombinem, nebo vyžádat opakovaný odběr, pokud laboratoř metodu s trombinem nepoužívá.
Oligoklonální pruhy s 2 nebo více proužky na pozadí polyklonálních imunoglobulinů	Přítomny oligoklonální pásy. K tomu může dojít v řadě infekčních nebo autoimunitních stavů. Pokud je to klinicky indikováno, opakujte vyšetření za 3–6 měsíců
Nález „zánětlivého typu“ se zvýšenými tubulárními proteiny, tj. alfa-1, alfa-2 a/nebo β2-mikroglobuliny, a polyklonální FLC na IFE (gama nález typu „žebříkový typ“ na UPE)	Polyklonální volné lehké řetězce přítomné na imunofixaci. Navrhněte opakované vyšetření po odeznění akutního onemocnění

Nejčastěji užívaná synonyma pro kvalitativní popis přítomnosti monoklonální komponenty: monoklonální imunoglobulin (MIG), paraprotein (PP).

**Tabulka 7.** Standardizovaný text závěru IFE vyšetření

Imunofixačně detekován paraprotein IgA kappa méně než 1 g/L
Imunofixačně detekován paraprotein IgA kappa.
Imunofixačně detekován paraprotein IgA lambda méně než 1 g/L
Imunofixačně detekován paraprotein IgA lambda.
Imunofixačně detekován paraprotein IgG kappa méně než 1 g/L
Imunofixačně detekován paraprotein IgG kappa
Imunofixačně detekován paraprotein IgG lambda méně než 1 g/L
Imunofixačně detekován paraprotein IgG lambda
Imunofixačně detekován paraprotein IgM kappa méně než 1 g/L
Imunofixačně detekován paraprotein IgM kappa
Imunofixačně detekován paraprotein IgM lambda méně než 1 g/L
Imunofixačně detekován paraprotein IgM lambda
Imunofixačně detekován paraprotein kappa free méně než 1 g/L
Imunofixačně detekován paraprotein kappa free
Imunofixačně detekován paraprotein lambda free méně než 1 g/L
Imunofixačně detekován paraprotein lambda free
Imunofixačně detekována oligoklonalita
Imunofixačně detekovány 2 paraproteiny ..... o kvantitách ..... g/L a méně než 1 g/L
Imunofixačně detekován IgG kappa, který odpovídá terapeuticky podané monoklonální protilátce
Imunofixačně paraprotein neprokázán

Nejčastěji užívaná synonyma pro kvalitativní popis přítomnosti monoklonální komponenty: monoklonální imunoglobulin (MIG), paraprotein (PP).

**Tabulka 8.** Postup laboratoře a komentáře k laboratornímu nálezu

Situace	Laboratorní diagnostika
Zpráva o prvním záchytu malého abnormálního pásu při požadavku na vyšetření SPE (u pacienta bez dříve prokázaného a typizovaného paraproteinu)	Komentovaný výsledek upozorňující na pravděpodobnost přítomnosti monoklonálního gradientu s doporučením provedení IFE
Screening monoklonální gamapatie	SPE a následně <ul style="list-style-type: none"> <li>• pokud je nalezen paraprotein, provést IFE, FLC, imunoglobuliny.</li> <li>• UPE, BJP</li> </ul>
Průkaz lehkých řetězců (kappa nebo lambda) bez odpovídajícího těžkého řetězce v séru metodou IFE bez dostupné historie průkazu těžkých řetězců	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vyloučit přítomnost IgE a IgD. Odeslat do referenční laboratoře pro potvrzení, pokud laboratoř sama vyšetření neprovádí</li> <li>• Žádoucí je také vyšetření FLC v séru</li> </ul>
Testy sledování léčeného myelomu s paraproteinem migrujícím ve frakci gama a ve frakcích beta/alfa-2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kvantifikace paraproteinu ze SPE</li> <li>• IFE, pokud paraprotein na rozdíl od předchozího vyšetření již není viditelný na SPE</li> <li>• FLC kappa a lambda, výpočet indexu kappa/lambda</li> <li>• UPE a kvantifikace BJP, nevyšetřuje-li laboratoř FLC v séru</li> </ul>
Rutinní testování k rozlišení mezi endogenním paraproteinem a interferencí způsobenou terapeutickou mAb	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rutinně se netestuje.</li> <li>• Na specializovaných pracovištích je doporučena dostupnost specifické imunofixační elektroforézy (např. DIRA) pro detekci interferencí terapeutickou mAb</li> </ul>



**Tabulka 9.** Obecné interpretační komentáře: vzorky s paraproteinem a/nebo malým abnormálním pásmem

Nález	Komentář
První detekce paraproteinu	Prokázán ..... , doporučujeme dovyšetřit celkové sérové imunoglobuliny a elektroforézu bílkovin v moči s imunofixací (pokud ještě nebyla provedena)
Sledování již známého paraproteinu	Není třeba nic doplňovat [Poznámka by měla být provedena na původním pásmu a jeho aktuálním stavu, např. „Byl zjištěn dříve prokázaný IgG kappa paraprotein“]
Paraprotein byl detekován pouze imunofixační elektroforézou	Dříve prokázaný paraprotein ..... je nyní prokazatelný pouze imunofixací
Paraprotein vymizel	Pro potvrzení nepřítomnosti dříve detekovaného paraproteinu, např. „Dříve popsany IgG kappa paraprotein nebyl prokázán imunofixací“
Nový, malý abnormální pás s odlišnou elektroforetickou mobilitou od původního paraproteinu u pacienta se známým paraproteinem	Na pozadí polyklonálního a/nebo oligoklonálního nálezu je prokázán (typ: např. IgG kappa) pás (přibližně 1 g/L). Tento pás se liší od původního paraproteinu. Může se objevit např. při dnes častém léčebném využití některé z monoklonálních protilátek.
První prezentace malého abnormálního pásu (a bez známého paraproteinu)	Prokázán paraprotein (typ: např. IgG kappa, množství: např. 1 g/L). Klinický význam je nejistý. Doporučujeme elektroforézu proteinů v moči s imunofixací a FLC v séru. Opakujte elektroforézu sérových proteinů ve 3–6 měsících.
První prezentace malých abnormálních pásů v polyklonálním / oligoklonálním pozadí (a žádný známý paraprotein)	Na pozadí polyklonálního a / nebo oligoklonálního vzoru je prokázán (typ: např. IgG kappa) pás (přibližně 1 g /L). Jeho klinický význam je nejistý, ale může odrážet zánětlivý / reaktivní proces. Doporučujeme elektroforézu proteinů v moči s imunofixací (nebo vyšetření volných lehkých řetězců v séru). Opakujte elektroforézu sérových proteinů ve 3–6 měsících, pokud je to klinicky indikováno

Nejčastěji užívaná synonyma pro kvalitativní popis přítomnosti monoklonální komponenty: monoklonální imunoglobulin (MIG), paraprotein (PP).

**Tabulka 10.** Certifikace cyklu GP v systému SEKK EHK

Zkouška	Doporučené rutinní metody stanovení	Nedoporučené metody
<b>Gamapatie (typizace)</b> Určení typu a izotypu monoklonálního imunoglobulinu (paraproteinu) v krevním séru nebo v moči. Jedná se tedy o kvalitativní průkaz.	Elektroforéza na agaróze Kapilární elektroforéza Imunofixace	Imunonefelometrie Imunoturbidimetrie Imunoelektroforéza
<b>Kvantifikace monoklonálního imunoglobulinu</b>	Elektroforéza na agaróze Kapilární elektroforéza Stanovení celkové bílkoviny krevního séra metodou s biuretovým činidlem	
<b>FLC kappa, FLC lambda</b>	Imunonefelometrie Imunoturbidimetrie	

Hodnotí se konsenzem účastníků. Zprávy pro účastníky: osvědčení o účasti, certifikát, výsledkový list (kvalitativní výsledky), výsledkový list (kvantitativní výsledky), histogramy (ev. komplexní statistika).