

Porovnání různých elektroforetických systémů v laboratorní diagnostice monoklonálních gamapatií

Kušnierová P.^{1,2}, Zeman D.^{1,2}, Faruzelová I.¹, Všianský F.¹, Švagera Z.^{1,2}, Šafarčík K.^{1,2}

¹Ústav laboratorní diagnostiky, Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice Ostrava

²Katedra biomedicínských oborů, Lékařská fakulta, Ostravská univerzita

SOUHRN

Cíl studie: Porovnání denzitometrických/absorbančních hodnot jednotlivých elektroforetických frakcí a koncentrací přítomných paraproteinů s využitím tří elektroforetických systémů.

Typ studie: Metodická studie.

Materiál a metody: Do studie bylo zařazeno 206 patientských vzorků Oddělení klinické biochemie, Ústavu laboratorní diagnostiky, Fakultní nemocnice Ostrava s podezřením/diagnostikovanou monoklonální gamapatií. K elektroforetické separaci proteinů v séru byly použity tři analytické systémy: Hydrasys, Capillarys 2 Flex-Piercing a Interlab G26 Easy Fix. Ke statistickému zpracování dat byl využit program MedCalc, verze 16.1.2.

Výsledky: Pomocí t-testu bylo prokázáno, že nejlepší výsledky preciznosti za podmínek opakovatelnosti vykazuje Capillarys (CV < 4,1 %), následován Interlabem G26 (CV < 5,7 %) a Hydrasysem (CV < 10 %). Při hodnocení vzájemných diferencí mezi přístroji pomocí neparametrického Friedmanova testu byl u patientských vzorků zjištěn statisticky významný rozdíl mezi všemi třemi analyzátory u frakce albuminu, α_2 -, β_1 - a β_2 -globulinů. V případě frakce α_1 -globulinů nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi Interlabem G26 a Hydrasysem, u γ -globulinů mezi Interlabem G26 a Capillarysem. Monoklonální komponenta byla prokázána u 79 studovaných vzorků všemi třemi systémy. Koncentrace paraproteinů nevykazovaly statisticky významné rozdíly mezi Hydrasysem a Interlabem G26 a nebyly závislé na typu paraproteinu.

Závěr: Systémy pracující na principu gelové elektroforézy poskytují srovnatelné výsledky a jsou vzájemně zaměnitelné.

Klíčová slova: gelová elektroforéza sérových proteinů, kapilární elektroforéza, monoklonální gamapatie.

SOUHRN

Kušnierová P., Zeman D., Faruzelová I., Všianský F., Švagera Z., Šafarčík K.: Comparison of different electrophoretic systems in the laboratory diagnosis of monoclonal gammopathy

Objective: Comparison of densitometric/absorbance values of individual electrophoretic fractions and paraprotein concentrations using three electrophoretic systems.

Type: Methodical study.

Material and methods: 206 samples of patients with suspected or diagnosed monoclonal gammopathy that had been sent for serum protein electrophoresis to the Dept. of Clinical Biochemistry, Institute of Laboratory Diagnostics, University Hospital Ostrava, were included in the study. For serum protein electrophoresis, three systems were used: Hydrasys, Capillarys 2 Flex-Piercing and Interlab G-26 Easy-Fix. For statistical analysis, programme MedCalc Version 16.1.2 was used.

Results: T-test showed that best precision in condition of repeatability had been achieved by Capillarys (CV < 4.1 %) followed by Interlab G26 (CV < 5.7 %) and Hydrasys (CV < 10 %). For the analysis of differences between the instruments by a non-parametric Friedman's test, statistically significant differences were found in each comparison for albumin, α_2 -, β_1 - and β_2 -globulins. For α_1 -globulins, no significant difference was found between Interlab G26 and Hydrasys; for γ -globulins, no significant difference was found between Interlab G26 and Capillarys. Monoclonal component was found in 79 samples by all the systems used. No significant differences in paraprotein concentrations between Hydrasys and Interlab G26 were found, and these concentrations were not dependent on the paraprotein type.

Conclusion: Systems working on the principle of gel electrophoresis provide comparable results and they are interchangeable.

Keywords: serum protein gel electrophoresis, capillary electrophoresis, monoclonal gammopathy.

Úvod

Pojem monoklonální gamapatie (MG) představuje komplexní spektrum onemocnění, projevující se klonální proliferací plazmatických nebo lymfoplazmocytoidních buněk (imunokompetentních buněk), většinou provázené tvorbou homogenního imunoglobulinu (M-proteinu, paraproteinu) nebo jeho úplné nebo i neúplné strukturální komponenty. Proliferace produkujícího klonu má maligní nebo potenciálně maligní charakter [1–4]. V naprosté většině případů průkazu MG jde o tzv. benigní paraproteinémii, monoklonální gamapatii nejis-

tého významu (MGUS), s prokázaným monoklonálním proteinem, který může být přítomen v séru již deset let před stanovením diagnózy mnohočetného myelomu (MM) [5–6]. Detekce, charakterizace a kvantifikace M-proteinů je důležitá pro stanovení diagnózy, stratifikaci rizika progresu a monitorování léčebné odpovědi [1]. Za tímto účelem mají mimořádný a nezastupitelný význam biochemická vyšetření jako je elektroforéza proteinů v séru a moči, stanovení koncentrace monoklonálního imunoglobulinu v séru a moči, volných lehkých řetězců imunoglobulinů v séru a stanovení třídy a antigenního typu monoklonálního imunoglobulinu [7].

K elektroforetické separaci proteinů séra a moči (SPE, UPE) se v klinické praxi nejčastěji využívá elektroforéza na gelových nosičích, především na agaróze, nebo kapilární elektroforéza. Stanovení koncentrace monoklonálního imunoglobulinu pak provádíme u gelové elektroforézy z denzitometrického záznamu, u kapilární elektroforézy ze záznamu absorbanční křivky při 200 nm.

Sofistikované počítače a specializované softwary automaticky vymezují hlavní zóny: albumin, alfa1-globuliny, alfa2-globuliny, beta (beta1-/ beta2-) globuliny, gama-globuliny a současně umožňují manuální či automatické vymezení přítomného monoklonálního imunoglobulinu [8]. Citlivost záchytu monoklonální komponenty je závislá na použité metodě (gelová/kapilární elektroforéza), na účinnosti separace (metody s vysokým rozlišením separují proteiny do β 1- a β 2- frakce; metoda s nízkým rozlišením jen do β - frakce) a na pohyblivosti monoklonální komponenty (alfa, beta či gama-frakce) [9-10]. Naším cílem bylo porovnání různých elektroforetických systémů, jimi získaných denzitometrických/absorbančních hodnot jednotlivých frakcí a koncentrace prokázaných paraproteinů.

Metodika

Do studie bylo zařazeno 206 vzorků pacientů s podezřením/diagnostikovanou monoklonální gamapatií z Fakultní nemocnice Ostrava. K elektroforetické separaci proteinů v séru byly použity tři analytické systémy a příslušné diagnostické soupravy: Hydrasys (Hydragel 30 Protein β 1- β 2, kat. č: S-4141, SEBIA), Capillarys 2 Flex-Piercing (Capillarys Protein(E) 6,

kat. č. 2003, SEBIA) a Interlab G26 Easy Fix (Kit for B1-B2 serum proteins and concentrated urines, kat. č. SRE 603K, INTERLAB). K posouzení preciznosti a pravdivosti analyzátorů byl použit kontrolní materiál: Normal Control Serum, kat. č. 4785, SEBIA. Ke statistickému zpracování dat byl využit program MedCalc, verze 16.1.2. U všech použitých testů byla statistická významnost posuzována na hladině $p = 0,05$.

Výsledky

Při vzájemném hodnocení preciznosti jednotlivých analyzátorů pomocí t-testu bylo prokázáno, že nejnižší variační koeficienty pro jednotlivé frakce poskytl analyzátor Capillarys, následován Interlabem G26 a Hydrasys (Tabulka 1). K ověření správnosti metody byl použit kontrolní materiál firmy Sebia s atesty pro Hydrasys a Capillarys. Výsledky byly posuzovány vzhledem k přijatelným rozdílům v procentech pro kvantitativní zkoušky programu externí kontroly kvality SEKK pro parametry albumin (elfo) a γ -globuliny (elfo). Oba analyzátoři poskytly uspokojivé výsledky (Tabulka 2).

Při hodnocení vzájemných diferencí výsledků patientských vzorků pomocí neparametrického Friedmanova testu byl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi všemi třemi analyzátoři v případě frakce albuminu, α 2-, β 1- a β 2-globulinů (Tabulka 3). V případě frakce α 1-globulinů nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi Interlabem G26 a Hydrasys, u gama-globulinů mezi Interlabem G26 a Capillarysem.

U 79 vzorků byl prokázán všemi třemi systémy monoklonální imunoglobulin. U 35 z nich se jednalo o paraprotein IgG kappa, u 24 IgG lambda, u 6 IgA kappa,

Table 1: Precision assessment of individual analyzers, (H) Hydrasys, (C) Capillarys, (I) Interlab G26.

Analyzer	Fraction (%)	Mean	CV (%)	Precision	
				Combination analyzer	F-test (p)
Hydrasys	ALB	61.56	1.32	H-C	0.00000
	Alpha 1	2.72	8.63	H-C	0.00005
	Alpha 2	9.68	4.46	H-C	0.00456
	Beta 1	7.14	3.57	H-C	0.07163
	Beta 2	4.96	8.72	H-C	0.00000
	Gama	13.59	9.95	H-C	0.00000
Capillarys	ALB	61.67	1.03	C-I	0.00001
	Alpha 1	3.98	1.59	C-I	0.11036
	Alpha 2	9.15	2.37	C-I	0.02852
	Beta 1	6.32	3.06	C-I	0.00270
	Beta 2	4.47	4.09	C-I	0.00116
	Gama	14.41	1.95	C-I	0.00000
Interlab G26	ALB	58.71	1.44	H-I	0.14917
	Alpha 1	2.5	4.99	H-I	0.00252
	Alpha 2	11.33	3.65	H-I	0.22631
	Beta 1	8.87	3.68	H-I	0.08247
	Beta 2	6.34	3.66	H-I	0.00002
	Gama	12.61	5.69	H-I	0.00190

Table 2: Assessment of trueness of analyzers Hydrasys and Capillarys.

Analyzer	Fraction (%)	Bias (g/l)	Bias (%)
Hydrasys	ALB	-0.44	-0.71
	Alpha 1	0.32	11.76
	Alpha 2	-0.12	-1.24
	Beta 1	-1.06	-14.85
	Beta 2	0.06	1.21
	Gama	0.79	5.81
Capillarys	ALB	0.57	0.92
	Alpha 1	-0.02	-0.50
	Alpha 2	2.13	23.28
	Beta 1	-0.18	-2.85
	Beta 2	-0.23	-5.15
	Gama	-0.09	-0.62

Table 3: Results of comparison of the electrophoretic fractions between the three electrophoretic systems using non-parametric Friedman's test. (H) Hydrasys, (C) Capillarys, (I) Interlab.

Fraction	Combination of analyzers	p
ALB	H-C	0.0006
	I-C	<0.0001
	I-H	<0.0001
Alpha-1	H-C	<0.0001
	I-C	<0.0001
	I-H	0.2539
Alpha-2	H-C	0.0357
	I-C	<0.0001
	I-H	<0.0001
Beta-1	H-C	<0.0001
	I-C	<0.0001
	I-H	<0.0001
Beta-2	H-C	0.0044
	I-C	<0.0001
	I-H	<0.0001
Gamma	H-C	<0.0001
	I-C	0.1152
	I-H	<0.0001
Paraproteins	H-C	<0.0001
	I-C	<0.0001
	I-H	0.1150

u 5 IgA lambda, u 5 IgM kappa a u 4 IgM lambda. Při porovnání denzitometrických/absorbančních hodnot jednotlivých paraproteinů nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi Hydrasysem a Interlabem G26 a současně bylo prokázáno, že tyto rozdíly nejsou závis-

lé na typu paraproteinu (Tabulka 4, obr. 1). Nicméně při hledání a denzitometrickém vyhodnocení monoklonální komponenty z jednotlivých elektroforetických záznamů bylo patrné, že Capillarys je citlivější než testované systémy pracující na principu gelové elektroforézy, jejichž

Table 4: Dependency of differences among analyzers on the type of paraprotein using one-way ANOVA.

ANOVA	Combination of analyzers		
	H-C	H-I	C-I
F-krit.	10.6921	1.4489	8.3679
p	0.0000	0.2172	0.0000
Conclusion	Significant	Non-significant	Significant

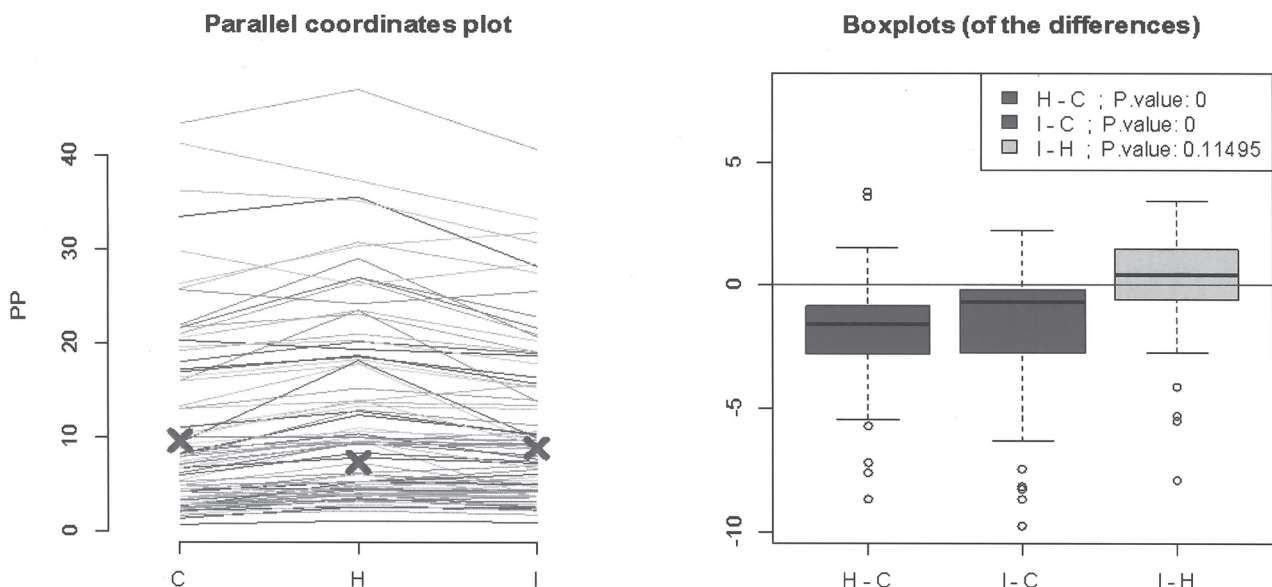


Fig. 1. Assessment of mutual differences between analyzers on the type of paraprotein using parallel coordinates plot and boxplots.

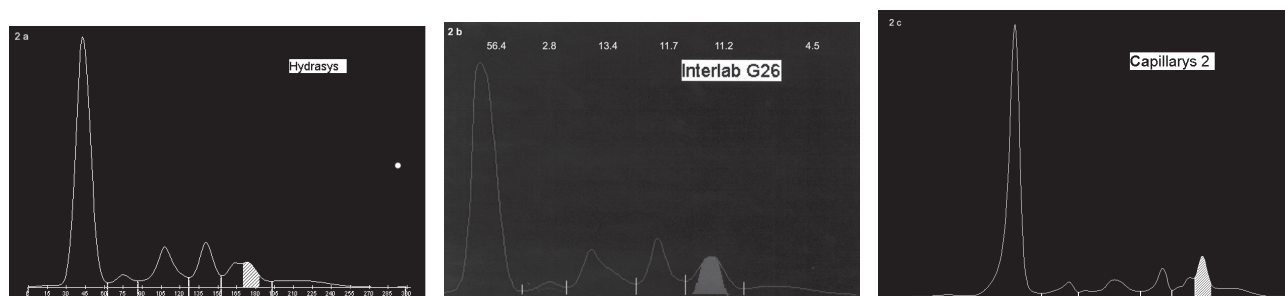


Fig. 2. Illustration of serum protein electrophoresis showing M-components identified as IgA kappa migrating in the beta2-globulin region. M-component concentration from Hydrasys was 2.55 g/l (2a), from Interlab G26 6.02 g/l (2b), from Capillars 5.20 g/l (2c). Immunonephelometric assay showed an IgA concentration of 6.42 g/l. DM values obtained from Hydrasys and Capillars directly reflected the real concentration of the paraprotein, while DM values obtained from Interlab includes not only the concentration of paraprotein but also the concentration of proteins physiologically migrating in the beta2- fraction. In this case, the concentration of total IgA is especially valuable, since it can provide a better tool for monitoring therapeutic response than densitometry/absorbance values.

citlivost/separační účinnost se lišila v závislosti na typu paraproteinu a s ním související migrační pohyblivosti (obr. 2).

Diskuse

Byly testovány a srovnávány tři elektroforetické systémy, dva pracující na principu gelové elektroforézy, Hydrasys (SEBIA) a Interlab G26 Easy Fix (INTERLAB), a jeden na principu kapilární elektroforézy, Capillars (SEBIA). V případě elektroforézy sérových proteinů, jsou všechny tři systémy uživatelsky přívětivé. Hydrasys je poloautomatický systém vyžadující manuální nanášení vzorků do aplikátorů a jejich umístění do migrační části analyzátorů. Po automatizovaném nanášení vzorků na gel, elektroforetické migraci a sušení vyžaduje manuální přenesení gelové plotny k barvení, odbarvování a osušení do druhé části analyzátoru. Naproti tomu Interlab G26 je plně automatizovaný systém umožňující

automatické pipetování vzorků z primárních zkumavek společně s identifikací vzorku pomocí čárového kódu, identifikaci gelu a příslušné metody pomocí čárového kódu, automatickou aplikaci vzorků na gel, migraci, denaturaci, barvení, odbarvení a skenování, vše v jednom běhu bez zásahu obsluhy. Oba tyto systémy umožňují pomocí uvedených diagnostických souprav paralelní analýzu vzorků moči, ať už nativních či zahuštěných pomocí speciálních koncentrátorů moči, což je výhodné především při pátrání po přítomné monoklonální komponentě v séru a moči téhož pacienta.

Na rozdíl od toho Capillars 2 Flex-Piercing je multikapilární elektroforetický plně automatizovaný systém, umožňující rychlou a účinnou separaci sérových proteinů s vysokým rozlišením a pravděpodobně i vyšším zachytem paraproteinů. Obtížnější a časově náročnější je pak analýza proteinů v moči vyžadující v několika krocích odsolení/zkoncentrování vzorků, odstředění, postupné naředění destilovanou vodou či dialyzačním tlumivým roztokem, trvající cca 2 hod. Další nevýhodou

je separátní analýza močových vzorků za použití speciálních dilučních segmentů neumožňující porovnání přítomné monoklonální komponenty s nálezem v séru.

V případě imunofixční elektroforézy umožňují oba gelové systémy Hydrasys a Interlab G26 typizaci monoklonální komponenty s možností použití antisér proti IgD, IgE a volným lehkým řetězcům free kappa, free lambda, zatímco systém Capillarys typizaci těchto monoklonálních komponent neumožňuje. Takže v případě podezření na paraprotein třídy IgD či IgE nebo nemoc lehkých řetězců je nutné opět využít gelový elektroforetický systém.

Závěr

Všechny tři testované analyzátoři jsou precizní a uživatelsky přívětivé. Na základě získaných výsledků lze konstatovat, že systémy pracující na principu gelové elektroforézy poskytují srovnatelné výsledky a jsou vzájemně zaměnitelné. Naproti tomu multikapilární elektroforetický systém je s gelovou elektroforézou nezaměnitelný, nicméně vyniká svou rychlostí a účinnou separací a eliminuje možné chyby způsobené barvením a denzitometrickým hodnocením. V případě volby nejvhodnějšího analyzátoři, je nutné přihlídnout k portfoliu nabízených metod.

Literatura

1. **Katzmann, J. A.** Screening Panels for Monoclonal Gammopathies: Time to Change. *Clin Biochem Rev.*, 2009, 30(3), p. 105-111.
2. **Attalmanan, M., Levinson, S. S.** Understanding and identifying monoclonal gammopathies. *Clin Chem.*, 2000, 46(8), p. 1230-1238.
3. **Sethi, S., Rajkumar, S. V.** Monoclonal gammopathy-associated proliferative glomerulonephritis. *Mayo Clin. Proc.*, 2013, 88(11), p. 1284-1293.
4. **Pika, T., Lochman, P., Minařík, J., Bačovský, J., Ščudla, V.** Úskalí interpretace výsledků společné analýzy hladin volných lehkých řetězců a elektroforézy séra. *Klin. Biochem. Metab.*, 2012, 20(41), p. 59-62.
5. **Landgren, O., Kyle, A. R., Pfeiffer, R. M., Katzmann, J. A., Caporaso, N. E., Hayes, R. B., Dispenzieri, A., Kumar, S., Clark, R. J., Baris, D., Hoover, R., Rajkumar, S. V.** Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood*, 2009, 113(22), p. 5412-5417.
6. **Maisnar, V.** Riziko přechodu monoklonální gamapatie nejasného významu do maligní monoklonální gamapatie. *Klin. Biochem. Metab.*, 2013, 21(42), p. 93-96.
7. **Keren, D. F., Schroeder, L.** Challenges of measuring monoclonal proteins in serum. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2016, 54(6), p. 947-961.
8. **Katzmann, J. A., Snyder, M. R., Rajkumar, S. V., Kyle, R. A., Therneau, T. M., Benson, J. T., Dispenzieri, A.** Long-Term Biological Variation of Serum Protein, Electrophoresis M-Spike, Urine M-Spike, and Monoclonal Serum Free Light Chain Quantification: Implications for Monitoring Monoclonal Gammopathies. *Clin. Chem.*, 2011, 57(12), p. 1687-1692.
9. **Mussap, M., Pietrogrande, F., Ponchia, S., Stefani, P. M., Sartori, R., Plebani, M.** Measurement of serum monoclonal components: comparison between densitometry and capillary zone electrophoresis. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2006, 44(5), p. 609-611.
10. **Schild, C., Wermuth, B., Trapp-Chiappini, D., Egger, F., Nuoffer, J. M.** Reliability of M protein quantification: comparison of two peak integration methods on Capillarys 2. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2008, 46(6), p. 876-877.

Střet zájmů: Autoři prohlašují, že nejsou ve střetu zájmů.

Do redakce došlo 3. 10. 2017

*Adresa pro korespondenci:
RNDr. Pavlína Kušnierová, Ph.D.
OKB, Ústav laboratorní diagnostiky
Fakultní nemocnice Ostrava
17. listopadu 1790/5, 708 52 Ostrava-Poruba
e-mail: pavlina.kusnierova@fno.cz*