

## **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. Své místo v algoritmu laboratorních metod používaných u monoklonálních gamapatií zaujímá také stanovení koncentrace volných lehkých řetězců (neseekretorický 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“, „paraprotein“ 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 vztahením 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 dělících 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.
- Vzorok vyžadující typizaci IFE by měly být předány k dovyšetření do referenční laboratoře, pokud laboratoř metodu IFE sama neprovádí, nebo neprovádí-li 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)/imunoturbidimetrie (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 pozitivitu, 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-merkaptotanolem, případně s jiným redukčním činidlem (např. dithiotreitol). Postup s přidavkem 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 provázeny 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-merkaptotanolem. 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 K/L (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 nesekretorickým myelomem se jeví sledování FLC v séru výhodné. Ve většině tuzemských laboratoří 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.

## **β2–mikroglobulin**

Stanovení koncentrace β2–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 posuzovány 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	β2–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	imunturbidimetrická 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 Slavětínské a MUDr. Janu Lackovi.*

## **Přílohy:**

- Tabulka 1. Iniciální 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: 242–256.
2. Tate J.R., Smith J.D., Wijeratne N., Moleel P.: Proposed addendum to 2012 recommendations for standardized reporting of protein electrophoresis in Australia and New Zealand. *Clin Biochem Rev* 2019. 40: 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: 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; 31-42.
5. Hájek R. (ed.) et al.: Doporučení vypracované Českou myelomovou skupinou, Myelomovou sekcí České hematologické společnosti a Slovenskou Myelómovou Spoločnosťou pro diagnostiku a léčbu mnohočetného myelomu. *Transfúze Hematol dnes* 2018; 24: suplement 1; 2-157.
6. Tichý M., Maisnar V.: Laboratorní průkaz monoklonálních imunoglobulinů. *Vnitř Lék* 2006; 52; S2: s. 41-45.
7. Tichý M., Friedecký B., Vávrová J. et al. Standardizace biochemických laboratorních vyšetření u mnohočetného myelomu. *Klin Biochem Metab* 2006; 14 (35): 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, 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., Hrnčír 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 respobse in light-chain multiple myeloma. Blood 2016,128:2941-2948

## Přílohy:

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

<b>Biochemické testy v diagnostice monoklonálních gamapatií</b>	
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].**

<b>MGUS</b>	<b>Doutnající myelom</b>	<b>Mnohočetný myelom</b>
Koncentrace monoklonálního imunoglobulinu v séru < 30 g/L	Koncentrace monoklonálního imunoglobulinu v séru $\geq$ 30 g/L a/nebo počet klonálních plazmocyťů 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	< 35	Nejsou splněna kritéria R-ISS I ani III
	nebo 3,5 – 5,5		
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 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 průkazu 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 ≥90% snížení koncentrace PP v séru a PP v moči < 100 mg/24 hod	Nezaměňovat s oligoklonalitou
Parciální remise	PR	≥50 % pokles původní koncentrace PP v séru a ≥90 % pokles původní koncentrace PP v moči nebo PP v moči < 200 mg za 24 hodin a ≥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 o ≥ 5 g/L) nebo více jak 25% zvýšení koncentrace PP v moči (změna minimálně o ≥ 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**

<b>Nález</b>	<b>Komentář</b>
Normální nález	Paraprotein neprokázán
Normální nález (klinický kontext naznačuje podezření na dyskrazii 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 $\beta$ 2- 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**

<b>Situace</b>	<b>Laboratorní diagnostika</b>
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**

<b>Nález</b>	<b>Komentář</b>
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**

<b>Zkouška</b>	<b>Doporučené rutinní metody stanovení</b>	<b>Nedoporučené metody</b>
<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).*