

Stanovení monoklonálních imunoglobulinů a jejich fragmentů u monoklonálních gamapatií – editorial

Editorial: Študla V et al. Význam sérových hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinu v diagnostice a hodnocení aktivity mnohočetného myelomu a vybraných monoklonálních gamapatií. Vnitř Lék 2005; 51(11): 1249–1259.

M. Tichý

Ústav klinické biochemie a diagnostiky Lékařské fakulty UK a FN, Hradec Králové, přednosta prof. MUDr. Vladimír Palička, CSc.

Jednou za základních charakteristik onemocnění, které označujeme názvem monoklonální gamapatie (MG), je přítomnost monoklonálního imunoglobulinu (MIg), paraproteinu, v séru a/nebo v moči [1]. Standardním postupem pro průkaz MIg je již po několik desetiletí elektroforéza pro detekci M-gradientu v bílkovinném spektru séra a/nebo moči a v případě pozitivitu nebo podezření na M-gradient následovala imunoelktroforéza, která byla v posledních letech nahrazena imunofixací.

Jako první laboratorní screening pro průkaz MIg jsou doporučovány elektroforetické systémy s vysokou rozlišovací schopností [2]. Elektroforéza zůstává nejdostupnějším, nejjednodušším a nejlevnějším screeningem pro průkaz MIg. Moderní elektroforetické systémy umožňují identifikaci i velmi malých M-gradientů o koncentraci kolem 0,5 g/l. Paraprotein může být pak velmi jednoduše kvantifikován denzitometrickým vyhodnocením elektroforeogramu. Při použití této metody si musíme být vě-

domi, že určení koncentrace MIg má četná úskalí: detekce M-gradientů je subjektivní a závisí velmi na zkušenostech hodnotícího pracovníka. Stanovení je často komplikováno velkou biologickou a analytickou variabilitou MIg – výskyt monomerů, polymerů, agregátů MIg, případně neobvyklých termoprecipitačních vlastností paraproteinů. Do výpočtu koncentrace MIg vstupuje další faktor – nejistota měření celkové bílkoviny séra. Hodnocení může ovlivnit zvolená elektroforetická metoda a přístrojové vybavení laboratoře. V neposlední řadě je stanovená koncentrace MIg zkreslena překrývajícími se proteiny. Proto je při výskytu paraproteinu IgA v β -globulinech, nebo při nízkých koncentracích paraproteinů IgG a IgA kvantifikace paraproteinu přesnější pomocí turbidimetrie nebo nefelometrie [3]. Ať už použijeme k určení koncentrace MIg jakoukoliv metodu, je nezbytné pro monitorování vývoje monoklonální gamapatie, popřípadě pro monitorování terapie, používat u téhož

pacienta výsledky jedné laboratoře, a pokud je to možné, používat i stále stejné metody. Dynamika změn koncentrace MIg by měla být laboratorně hodnocena jedním pracovištěm. Z elektroforetických systémů, které jsou doporučovány a používány v klinických laboratořích, jsou to především automatizované systémy na gelových nosičích (agaróza) a kapilární elektroforéza. I když tzv. „zlatým standardem“ pro průkaz MIg je zatím vysoce rozlišovací elektroforéza na agarózovém gelu s následnou imunofixační elektroforézou, čím dál častěji se v klinických laboratořích setkáváme s kapilární elektroforézou, zejména v laboratořích s velkým počtem vzorků. Kapilární elektroforéza využívá k dělení bílkovin séra elektroosmotického toku [4]. Separace probíhá při 35 °C, proto se není třeba obávat kryoprecipitace. Další výhody kapilární elektroforézy je plná automatizace, která snižuje objem práce na minimum. Odpadá zkreslující faktor různého probarvení jednotlivých bílkovinných frakcí,

vlivy sušení, odbarvování a denzitometrického vyhodnocení. Kapilární elektroforéza má při stanovení Mlg stejnou specifitu, ale vyšší senzitivitu než elektroforéza na agaróze, protože má vyšší rozlišovací schopnost, a umožňuje tak identifikovat i M-gradientsy kolem 0,2 g/l [5].

Imunofixace prakticky úplně nahradila v klinických laboratořích imunoelektroforézu [6]. Je rychlá (výsledek asi za 2 hod při imunofixaci na agaróze, asi za 10 min při imunotypizaci za použití kapilární elektroforézy), jednoduchá na provedení, relativně jednoduchá na odečítání a je asi 10krát citlivější než bývala imunoelektroforéza. Nejčastěji nacházíme nízké koncentrace M-proteinů u monoklonálních gamapatií nejistého významu (MGUS), ale někdy je toto stanovení bez znalosti kliniky nebo bez upozornění klinického lékaře na možné patologické souvislosti pro laboratoř obtížné a spolupráce klinického lékaře s analytikem je proto žádoucí. Velkým problémem jsou M-gradientsy skryté v oblasti β -globulinů (IgA, BJK, BJL). Také přítomnost volných monoklonálních lehkých řetězců imunoglobulinů bývá v séru obtížně prokazatelná (např. u nemoci z lehkých řetězců a AL-amyloidózy). V těchto pozorováních, kdy je nález v séru minimální, může být prokázán někdy i masivní gradient v moči. Proto je důležité vždy se sérem současně vyšetřovat vzorek moči, pokud je pozitivní na přítomnost bílkoviny klasickou zkouškou s kyselinou sulfosalicylovou. Indikátorové papírky jsou nevhodné, protože jejich zóna na stanovení bílkoviny je založena na tzv. proteinové chybě, tj. posunu zabarvení indikátoru za přítomnosti albuminu.

Velmi vhodný a praktický screening na přítomnost Mlg v séru je imunofixace s pentavalentním antisérem, zejména u malých M-gradientsů nebo gradientů skrytých v β -globulinech. U malých M-gradientsů (kolem

3,0 g/l) v séru s negativní močí, ordinujeme imunofixaci opakovaně v intervalech 2–3 měsíců a sledujeme, zda paraprotein vymizí (přechodná paraproteinemie), nezmění se nebo naopak jeho koncentrace začne stoupat. Imunofixace je velmi vhodná metoda pro průkaz vícečetných paraproteinemií. Zatímco při použití imunoelektroforézy se pohyboval průkaz vícečetných paraproteinemií mezi 1–2 %, při použití imunofixace je to kolem 5 %. Také nyní mnohem častěji prokazujeme vedle Mlg i oligoklonální imunoglobuliny, zejména u nemocných po vysokodávkované chemoterapii s autologní transplantací periferních kmenových buněk. V těchto situacích prokazujeme poměrně často změnu izotopu Mlg nebo výskyt dalších paraproteinů.

Uvedené laboratorní metody průkazu a monitorování průběhu a terapie MG jsou v některých pozorováních nedostatečné [7,8,9]. Jsou to především: myelom s produkcí Mlg, který je tvořený izolovanými monoklonálními lehkými řetězci Ig, nesekreční myelom a primární amyloidóza. Další situací, kdy tyto „klasické“ metody jsou málo citlivé, je průkaz zbytkového nádorového onemocnění – „minimal residual disease“. Při kontrolním vyšetření po úspěšné léčbě MM nemá být Mlg prokazatelný ani elektroforeticky ani imunofixací. Stav je hodnocen jako kompletní remise onemocnění. Je ukončena intenzivní léčba a přechází se na pravidelnou udržovací terapii [10]. Zdá se, že všechny výše popsané situace jsou do značné míry řešitelné právě kvantitativním stanovením volných lehkých řetězců imunoglobulinů (VLŘ) v séru a/nebo v moči. Principem je detekce protilátkou proti vnitřnímu epitopu molekul volných lehkých řetězců Mlg. Vnitřní epitop lehkých řetězců kompletních molekul Mlg zůstává pro detekci nepřístupný. Uváděná citlivost stanovení komerčně vyráběného setu (Freelite H, The Binding Site Limited,

Birmingham, UK) je 3 mg/l monoklonálních lehkých řetězců v séru a 0,6 mg/l v moči. Tato metoda svou citlivostí vysoce převyšuje v současnosti používané metody, je asi 100krát citlivější než elektroforéza bílkovin séra a asi 30krát citlivější než imunofixace. To umožňuje prokázat monoklonální lehké řetězce až u 82 % tzv. nesekrečních MM a až u 98 % nemocných primární amyloidózou. Také hodnocení kompletní remise onemocnění a detekce časné progresy (relapsu) je pomocí tohoto testu mnohem reálnější. Správné hodnocení efektu léčby má prognostický význam a může ovlivnit postup při další terapii.

Kvantitativní stanovení sérových hladin VLŘ a indexu lehkých řetězců K/L proniká poněkud váhavě do klinické praxe až v posledních 2–3 letech. Postupně se vymezuje využití těchto nových parametrů v paletě laboratorních vyšetření u MM a monoklonálních gamapatií vůbec.

Zkušeností se stanovením VLŘ, zejména domácích, je zatím velmi málo. Práce prof. Ščudly a spolupracovníků je proto velmi záslužná, protože velmi systematicky, podrobně a precizně zpracovává problematiku klinického významu stanovení VLŘ u MG, dosud v naší literatuře v tomto rozsahu nepopsanou. Tato práce potvrzuje oprávněnost zařazení stanovení VLŘ a indexu K/L do sestavy metod používaných u MG v indikovaných situacích (AL-amyloidóza, hodnocení aktivity a sledování průběhu terapie MM, nesekretorický MM) a současně prokázala, že stanovení VLŘ neumožňuje odlišení MM od MGUS. Tyto poznatky jsou velmi cenné, protože jde o složitou a náročnou tematiku, která nabízí nový pohled na laboratorní diagnostiku některých MG. Po počátečních rozpacích jak pracovníků laboratoří, tak klinických hematologů nachází stanovení VLŘ svoje uplatnění v rámci vyšetřovacích metod používaných u MG. K tomuto závěru práce

prof. Ščudly a spolupracovníků přispívá zásadním způsobem.

Literatura

1. Adam Z, Hájek R, Mayer J et al. Mnohočetný myelom a další monoklonální gamapatie. Brno: Masarykova univerzita 1999.
2. Tichý M, Urban P, Matěja F et al. Laboratorní analýza souboru 3049 monoklonálních imunoglobulinů. *Klinická Biochemie a Metabolismus* 2002; 10: 257–261.
3. Tseng HC, Chang Ch, Liu KS et al. Accuracy of serum IgM and IgA monoclonal protein measurements by densitometry. *Annals of Clinical and Laboratory Science* 2003; 33: 160–166.
4. Petersen JR, Okorodudu AO, Mohammad A et al. Capillary electrophoresis and its application in the clinical laboratory. *Clinica Chimica Acta* 2003; 330: 1–30.
5. Katzman JA, Clark R, Sanders E et al. Prospective study of serum protein capillary zone electrophoresis and immunotyping of monoclonal proteins by immunosubtraction. *American Journal of Clinical Pathology* 1998; 110: 503–509.
6. Tichý M. Identification of monoclonal immunoglobulins by immunofixation electrophoresis – some questions. *Acta Medica (Hradec Králové)* 1999; 42: 145–146.
7. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP et al. Serum test for assessment of patients with Bence Jones myeloma. *The Lancet* 2003; 361: 489–491.
8. Guidelines on the diagnosis and management of AL amyloidosis. *British Journal of Haematology* 2004; 125: 681–700.
9. Bradwell AR. Serum Free Light Chain Analysis. 2nd ed. Birmingham: The Binding Site Ltd. 2004.
10. Špička I. Diagnostika a monitorace vybraných typů monoklonálních gamapatií pomocí metody stanovení volných lehkých řetězců v séru. *Klinický protokol. Česká myelomová skupina, Čejkovice* 16.–17. 4. 2004.

*prof. RNDr. Miloš Tichý, CSc.
Ústav klinické biochemie
a diagnostiky LF UK a FN
www.fnbk.cz
e-mail: tichy@fnbk.cz*

Doručeno do redakce: 7. 4. 2005

www.kardiologickarevue.cz