

# Laboratorní průkaz monoklonálních imunoglobulinů

M. Tichý<sup>1</sup>, V. Maisnar<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Ústav klinické biochemie a diagnostiky Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové, přednosta prof. MUDr. Vladimír Palička, CSc.

<sup>2</sup> Oddělení klinické hematologie II. interní kliniky Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové, přednosta prof. MUDr. Jaroslav Malý, CSc.

**Souhrn:** V poslední dekádě došlo v laboratorní diagnostice monoklonálních gamapatií ke značnému pokroku. Práce stručně uvádí přehled v současnosti používaných metod a diskutuje jejich význam, problémy stanovení a interpretace. Ze základních klinicko-biochemických metod je to elektroforéza na agaróze a kapilární elektroforéza. Pro určení imunoglobulinové třídy a antigenního typu lehkých řetězců paraproteinů imunofixační elektroforéza plně nahradila imunoelektroforézu. Imunofixace je citlivější a rychlejší. Svě místo v algoritmu laboratorních metod používaných u monoklonálních gamapatií nachází i 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 jako nejjednodušší a s největší výpovědní hodnotou. Paletu laboratorních vyšetření doplňuje stanovení viskozity séra a průkaz kryoglobulinů.

**Klíčová slova:** monoklonální imunoglobuliny – elektroforéza – imunofixace – volné lehké řetězce – kryoglobuliny

## Laboratory identification of monoclonal immunoglobulin

**Summary:** In the last decade, laboratory diagnostics of monoclonal gammopathies has taken a huge step forward. The study takes a brief look at the methods currently being used, discussing their significance, the problems faced in their definition and interpretation. Among the primary clinical-biochemical methods, there are agarose electrophoresis and capillary electrophoresis. Immunofixation electrophoresis has completely replaced immunoelectrophoresis in determining immunoglobulin classes and antigen types of paraprotein light chains. Immunofixation is more sensitive and quicker. The determining of the concentration of free light chains (non-secretory myeloma, AL amyloidosis, illness from light chains) has also found its place in the algorithm of laboratory methods used in monoclonal gammopathy. Out of the many prognostic factors, the combination  $\beta_2$ -microglobulin and albumin has been chosen as the easiest and the one with the highest informative value. The spectrum of laboratory examinations is completed by determining the viscosity of serum and identification of cryoglobulins.

**Key words:** monoclonal immunoglobulins – electrophoresis – immunofixation – free light chains – cryoglobulins

## Monoklonální gamapatie – biochemická definice

Monoklonální gamapatie (MG), paraproteinemie nebo dysproteinemie jsou heterogenní skupinou onemocnění, která je charakterizována proliferací jednoho nebo více klonů diferencovaných B-lymfocytů produkujících imunologicky homogenní imunoglobulin, monoklonální protein, paraprotein, M-protein. Cirkulující M-protein se může sestávat z intaktní imunoglobulinové molekuly nebo jen z lehkých řetězců, a ne-

bo (mnohem vzácněji) jen z těžkých řetězců imunoglobulinů. Těžké řetězce patří k jedné z pěti imunoglobulinových tříd G, A, M, D nebo E a lehké řetězce jsou buď antigenního typu  $\kappa$  nebo  $\lambda$ . Monoklonální imunoglobulin náleží vždy k jedné imunoglobulinové třídě (Ig), k jedné podtřídě Ig a má jen 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 nad-

měrná imunitní odpověď, která se vymkla kontrolním mechanismům.

Laboratorní medicína vyžaduje pro průkaz a charakterizaci paraproteinů citlivé, spolehlivé a rychlé metody (tab. 1). Analýza séra a moči je nezbytná u všech paraproteinemií [1]. Na přítomnost paraproteinu nás může upozornit nezvykle vysoká koncentrace celkové bílkoviny séra (90 g/l a více). Nicméně u monoklonálních gamapatií nejasného významu (MGUS), v počátečních stadiích

**Tab. 1. Základní laboratorní metody používané u monoklonálních gamapatií.**

Metoda (marker)	Použití
• elektroforéza bílkovin séra (agarózový gel nebo kapilární elektroforéza)	screening, diagnóza, sledování
• imunofixace bílkovin séra	určení typu paraproteinu, sledování zbytkového onemocnění u MM
• určení koncentrace monoklonálních Ig (denzitometrie, absorpance v UV u CE)	diagnóza a sledování, monitorování terapie
• určení koncentrace polyklonálních Ig (turbidimetrie, nefelometrie)	diagnóza a sledování
• volné lehké řetězce v séru	diagnóza a sledování neseekretorického myelomu, AL amyloidózy, MGUS a nemoci lehkých řetězců
• viskozita séra	hyperviskózní syndrom
• $\beta_2$ -mikroglobulin	stážovací systém, prognóza
• elektroforéza bílkovin moče	screening, diagnóza, sledování
• imunofixace bílkovin moče	určení typu paraproteinu
• volné lehké řetězce v moči	diagnóza a sledování neseekretorického myelomu, AL amyloidózy, MGUS a nemoci lehkých řetězců

Upraveno podle doporučení NACB [1].

mnohočetného myelomu (MM), u myelomů IgD, u nemoci z lehkých a těžkých imunoglobulinových řetězců [2] mohou být koncentrace celkové bílkoviny normální.

### Elektroforéza bílkovin

Nejlepším laboratorním screenin- gem pro průkaz paraproteinu v séru a v moči zůstává kvalitní **elektrofo- réza bílkovin**. Tato metoda je také dostatečně citlivá, rychlá, levná a snadno dostupná. V posledních le- tech je v našich laboratořích neprá- vem opomíjena. Přitom poskytuje řadu cenných informací při interpre- taci elektroforetického obrazu, který může být charakteristický pro hyper- gamaglobulinemii monoklonální, polyklonální, oligoklonální, pro ne- frotický syndrom, pro akutní zánět, chronický zánět, můžeme vyslovit podezření na deficit Ig při hypoga- maglobulinemii, prokázat bisalbumi- nemii apod. Zejména pro průkaz pa- raproteinů je elektroforéza sérových bílkovin a bílkovin moči suverénní screeningovou metodou. Parapro- tein bývá prokazován při rutinní elektroforéze asi v 1% frekvenci [3]. Jako dělicí médium (nosič) se nejčas- těji využívá agaróza a acetylovaná ce-

lulóza. V posledních 2–3 letech pro- niká do velkých rutinních laboratoří klinické biochemie kapilární elektro- foréza (CE). Současné elektroforetic- ké metody jsou velmi citlivé a do- kážou zachytit M-gradients kolem 0,5 g/l. Paraprotein se může v elektro- foretickém obraze nacházet mezi ga- maglobuliny až  $\alpha$ -2 globuliny. Může být pozorován jako ostrý M-gra- dient, někdy má ale charakter širší difuzní zóny nebo může splývat i se zónou betaglobulinů. Tyto parapro- teiny jsou pak běžnou elektrofore- zou těžko odhalitelné. Podobně ob- tížná situace může nastat, jsou-li pří- tomny jen monoklonální lehké řetězce  $\kappa$  nebo  $\lambda$ , kdy M-gradient ne- musí být v elektroforeogramu séra vůbec přítomen. Také průkaz bílko- viny v moči indikátorovými papírky je zde nedostatečný, protože je zalo- žen především na přítomnosti albu- minu v moči. Bílkovinu v moči je vhodné při podezření na přítomnost Bence-Jonesovy bílkoviny (BJB) vy- šetřit klasickou zkouškou s kyseli- nou sulfosalicylovou a v případě po- zitivity elektroforézou s následnou imunofixací. Tento postup využívají- cí přímo elektroforézu a imunofixa- ci je v současnosti častější.

### Příčiny falešně negativního výsledku elektroforézy

Některé paraproteiny tvoří komple- xy s ostatními bílkoviny plazmy, což mění jejich pohyblivost nebo maskuje jejich přítomnost. Elektro- foretický obraz může být modifiko- ván přítomností monomerů, dimerů nebo polymerů IgM, polymerů IgA nebo agregátů IgG. Některé bílko- viny mohou simulovat přítomnost M- proteinu, jako tzv. pseudoparapro- teiny (fibrinogen, CRP, lyzozym, komplex hemoglobinu s haptoglobi- nem, migrační artefakty apod). Proto spolehlivý průkaz monoklonálních Ig v séru anebo v moči poskytuje až imunofixace. Elektroforéza je základ- ní metodou pro screening M-gra- dientů, ale je také základní metodou pro určení koncentrace paraprotei- nu. Elektroforeogram je vyhodnocen denzitometricky, při tomto hodno- cení jsou získána relativní procenta zastoupení jednotlivých frakcí bílko- vin (tedy i paraproteinu) a spolu se stanovením celkové bílkoviny séra lze pak určit koncentraci frakcí včet- ně paraproteinu. Při použití kapilár- ní elektroforézy je přímo měřena ab- sorpance v UV oblasti (200 nm) na ka- todickém konci kapiláry. Koncentraci

monoklonálního Ig sledujeme pro stanovení výchozí diagnosticky důležité hodnoty, a dále pro monitorování dynamiky relativních změn při sledování vývoje MG nebo terapie MM. Je vhodné, aby bylo toto sledování prováděno pokud možno na stejném pracovišti, stejnými osobami a se stejným přístrojovým vybavením [4]. Důvodem je řada faktorů, které mohou stanovení koncentrace paraproteinu ovlivnit (elektroforetická metoda – agaróza, CE, použitý denzimetř, subjektivní detekce M-gradientu apod).

Elektroforetická analýza paraproteinů v jiných tělesných tekutinách než v séru obvykle vyžaduje úpravu analyzovaného materiálu. Nejčastěji se jedná o analýzu bílkovin moči. Moč pro elektroforetickou analýzu sbíráme 24 hod, vhodná je konzervace azidem sodným (2 mg/l) proti růstu bakterií, nebo můžeme použít k analýze druhý ranní vzorek moči. Stanovíme koncentraci bílkoviny a podle potřeby provedeme zahuštění, případně naředění moči na koncentraci bílkoviny 30 g/l pro elektroforézu a 1,5–2,0 g/l pro imunofixaci.

### Imunofixace vzorku krve a vzorku moči

Při průkazu M-gradientu nebo podezření na jeho přítomnost v elektroforeogramu by pro potvrzení nebo vyloučení paraproteinu měla následovat **imunofixační elektroforéza** séra anebo moči. Imunofixace je nezbytná pro určení imunoglobulinové třídy paraproteinu a pro určení antigenního typu lehkých řetězců Ig.

Imunofixace se používá také jako screening např. u podezření na AL amyloidózu, při které kvantita M-proteinů může být tak nízká, že není možná jejich detekce při elektroforéze. Dalšími indikacemi imunofixace je např. negativní rutinní elektroforéza u pacientů s léčeným mnohočetným myelomem (diagnostika zbytkového onemocnění). Určení typu paraproteinu, tzv. imunotypizace, se podle použité laboratorní

techniky dělí na imunofixaci a imunosubtrakci. 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, IgG, IgM a lehkým řetězcům  $\kappa$  a  $\lambda$ . Nenavázané bílkoviny se promytím gelu odstraní a obarví se imunoprecipitáty fixovaných proteinů. Imunofixace detekuje v séru koncentrace M-proteinu kolem 0,2 g/l a v moči kolem 0,04 g/l. Je-li imunofixace negativní s antisérem proti imunoglobulinům A, G, M a jsou přítomny monoklonální lehké řetězce  $\kappa$  nebo  $\lambda$ , měla by následovat ještě imunofixace s antisérem proti IgD a IgE. Velmi vhodný a praktický screening na přítomnost monoklonálního Ig v séru je imunofixace bílkovin s pentavalentním antisérem (A, G, M, K, L), zejména u malých M-gradientů nebo gradientů skrytých při elektroforéze v betaglobulinech.

Při imunosubtrakci jsou před elektroforézou inkubovány vzorky sér s antisérem proti těžkým a lehkým řetězcům Ig. Imunotyp je určen podle elektroforézy s antisérem, u kterých po inkubaci vzorku M-gradient vymizel.

### Kvantitativní stanovení polyklonálních IgG, IgA a IgM

Je rutinně prováděno turbidimetricky nebo nefelometricky na základě reakce těžkých řetězců Ig s polyvalentním antisérem specifickým pro danou třídu těžkých řetězců. Měření je plně automatizováno a využívá se pro detekci a monitorování polyklonální hypogamaglobulinemie, která je výsledkem poškození funkce buněk kostní dřeně u maligních monoklonálních gamapatií v důsledku expanze maligního klonu. Určení kvantity paraproteinů turbidimetricky nebo nefelometricky může být v některých pozorováních přesnější než denzimetrické stanovení z elektroforézy, zejména u vysokých koncentrací monoklonálních Ig (nad 50 g/l).

Na druhou stranu jenom elektroforeticky lze rozlišit biklonální gamapatii, kdy oba klony produkují paraproteiny stejného izotypu. Protože denzimetrie oproti nefelometrii a turbidimetrii může poskytnout odlišné výsledky při kvantifikaci monoklonálních Ig, měli bychom u daného nemocného monitorovat aktivitu onemocnění stále stejnou metodou, aby výsledky byly dobře srovnatelné [4]. Historicky asi 2–5 % nemocných MM nemá v séru anebo v moči monoklonální protein prokazatelný imunofixačními technikami a jedná se o tzv. „nesekretorický myelom“.

### Stanovení volných lehkých řetězců

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 bývají spojeny s maligní proliferací plazmatických buněk, AL amyloidózou a nemocí z lehkých řetězců. Vysoká citlivost metody na stanovení koncentrace volných lehkých řetězců (FLC) v séru i v moči umožňuje jinak obtížnou diagnostiku tzv. nesekretorického myelomu. U těchto nemocných a dále i u MM s paraproteinem tvořeným volnými lehkými monoklonálními řetězci a u AL amyloidózy se jeví jako výhodné sledování **koncentrace volných lehkých řetězců (FLC)** v séru, případně v moči [5,6]. Metoda používá protilátku zaměřenou na vnitřní epitop lehkého řetězce, a tak odliší volné lehké řetězce od vázaných. Jde o citlivou metodu, která stanoví koncentraci FLC od 2 mg/l. Stanovení FLC se doporučuje také k monitorování časně odpovědi na

**Tab. 2. Mezinárodní stážovací systém mnohočetného myelomu (IMWG, 2003).**

Stadium I	$B_2M < 3,5 \text{ mg/l}$ a albumin $\geq 35 \text{ g/l}$
Stadium II	$B_2M < 3,5 \text{ mg/l}$ a albumin $< 35 \text{ g/l}$ nebo $B_2M 3,5\text{--}5,5 \text{ mg/l}$
Stadium III	$B_2M > 5,5 \text{ mg/l}$

*B<sub>2</sub>M –  $\beta_2$ -mikroglobulin*

terapii, protože lehké řetězce Ig mají velmi krátký poločas (2–6 hod) oproti poločasu např. IgG, který je asi 21 dní. Při sledování odpovědi na léčbu u MM jako první vymizí, je-li přítomen, gradient volných lehkých řetězců, a dále je nutné sledovat pro průkaz úspěšné terapie zbytkového onemocnění vymizení kompletní molekuly paraproteinu imunofixací.

### Stanovení $\beta_2$ -mikroglobulinu

Důležitým prognostickým faktorem u MM je stanovení koncentrace  $\beta_2$ -mikroglobulinu v séru.  $\beta_2$ -mikroglobulin ( $B_2M$ ) je glykoprotein (molekulová hmotnost 11 800 daltonů), který je homologní s konstantní částí těžkých Ig řetězců, je součástí HLA systému a je exprimován na všech jaderných buňkách [7]. Koncentrace  $B_2M$  v séru i v moči je závislá na funkci ledvin, protože je odbouráván a vylučován v ledvinách. Referenční meze pro  $B_2M$  jsou pro sérum  $< 2,5 \text{ mg/l}$  a pro moč  $< 0,4 \text{ mg/l}$ . Za velmi nepříznivý ukazatel prognózy u MM je považována hodnota  $> 5,5 \text{ mg/l}$ . V ledvinách je filtrován do primární moči a je téměř 100% resorbován v proximálních tubulech. Protože snížená glomerulární filtrace zvyšuje hodnoty  $B_2M$  v séru a poškození tubulů naopak snižuje jeho hodnoty v séru, musíme hodnoty  $B_2M$  posuzovat ve vztahu k funkci ledvin. Prognostický význam  $B_2M$  se nevytrácí ani po provedení korekce na stav funkce ledvin. Hodnoty  $B_2M$  spolu s koncentrací albuminu v séru jsou využívány v novém mezinárodním stážovacím systému (ISS) doporučeném International Myeloma Working Group (tab. 2).

### Vyšetření viskozity séra

U nemocných monoklonálními gamapatiemi je indikováno stanovení **viskozity séra** při vysoké koncentraci paraproteinu, a to u IgM nad  $40 \text{ g/l}$  a u IgG nad  $60 \text{ g/l}$ . Toto stanovení je nutné také u pacientů s klinickými příznaky hyperviskózního syndromu (oronazální krvácení, nevysvětlitelné městnavé srdeční selhávání, poruchy vizu a další neurologická symptomatologie). V klinických laboratořích měříme obvykle relativní viskozitu vztahenou k viskozitě vody (1,0). Referenční interval je 1,5–1,8 centipoise (cp). Hyperviskozita je nejčastěji pozorována u Waldenströmovy makroglobulinemie spojené 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. Pro pozorování klinických symptomů hyperviskozity se považuje za hraniční viskozita  $4,0 \text{ cp}$ , ale často jsou nemocní asymptomatictí i při hodnotách nad 6–7 cp.

### Vyšetření kryoglobulinemie

**Kryoglobuliny** jsou bílkoviny, které precipitují nebo gelifikují při teplotách nižších než  $37 \text{ °C}$  a po zahřátí se znovu rozpustí. Kryoprecipitační vlastnosti mohou mít monoklonální Ig, polyklonální Ig nebo může jít o smíšenou kryoglobulinemii (mixed cryoglobulinemia) obou těchto složek za účasti komplementu, současně proto někdy bývá pozorováno sníže-

ní některých jeho složek (zejména C4). Klinickými příznaky kryoglobulinemie jsou purpura, artralgie, lymfadenopatie, hepatosplenomegalie a periferní neuropatie. K průkazu kryoglobulinů by měla být krev co nejdříve po flebotomii dopravena do laboratoře, a to při zachování transportní teploty  $37 \text{ °C}$ . Po centrifugaci se sérem naplní hematokritová rourka a ta se umístí do ledničky do teploty  $4 \text{ °C}$ . Po 24 hod zjišťujeme přítomnost kryoprecipitátu. Pokud se nevytvořil, ponecháme sérum v ledničce ještě dalších 3–6 dní. Jestliže je kryoprecipitát přítomen, centrifugujeme hematokritovou rourku 10 min v chlazené centrifuze a odečteme kryokrit v mm. Precipitát můžeme promýt chladným fyziologickým roztokem a analyzovat imunofixací. Je-li v séru prokázán kryoglobulin, měl by být vzorek séra určený pro elektroforézu a imunofixaci předeříván na  $37 \text{ °C}$ . Toto opatření nevyžaduje CE, která probíhá při  $35 \text{ °C}$ . Vzorek séra s kryoglobulinem je vhodné pro tyto analýzy ošetřit inkubací s 2-merkaptóetanolem ( $200 \text{ }\mu\text{l}$  séra +  $40 \text{ }\mu\text{l}$  2-ME) po dobu 10 min při pokojové teplotě. Kryoprecipitaci může vykazovat také za chladu precipitující komplex fibrinu a fibrinogenu, nebo heparin precipitující fibronektinové komplexy. Proto může být kryoglobulin falešně pozitivní u nemocných s antikoagulační terapií, ale jeho koncentrace je nízká (kolem 1–2 g/l). U monoklonálních kryoglobulinů (typ I) bývá prakticky vždy vyšší než 5 g/l [8].

### Závěr

V poslední dekádě došlo v diagnostice a terapii MG k velkému pokroku [9]. Z klinicko-biochemických metod je to především zavedení velmi citlivých elektroforetických metod pro analýzu bílkovin séra [10]. Jedná se o elektroforézu na agaróze a kapilární elektroforézu. Pro typizaci monoklonálních Ig byla zavedena imunofixační elektroforéza místo

imunoelektroforézy séra a moči. Tato metoda je citlivější a rychlejší. Svě místo v paletě laboratorních metod používaných u MG postupně nachází i stanovení koncentrace volných lehkých řetězců imunoglobulinů (nesekretorický myelom, AL amyloidóza, onemocnění z lehkých řetězců). Z řady prognostických faktorů byla vybrána kombinace B<sub>2</sub>M a albuminu jako nejjednodušší a s největší výpočetní hodnotou.

#### Literatura

1. Gupta S, Comenzo RL, Hoffman BR et al. National Academy of Clinical Biochemistry Guidelines for the Use of Tumour Markers in Monoclonal Gammopathies. NACB LMPG, www.nacb.org, 2006, Draft Guidelines.
2. Tichý M, Urban P, Matěja F et al. Laboratorní analýza souboru 3049 monoklonálních imunoglobulinů. *Klin Biochem Metab* 2002; 10: 257–261.
3. Tichý M, Řeháček V, Maisnar V et al. Monoklonální gamapatie v souboru 1683 dárců plazmy. *Čas Lék Čes* 2004; 143: 401–404.
4. Tichý M, Friedecký B, Vávrová J et al. Standardizace biochemických laboratorních vyšetření u mnohočetného myelomu. *Klin Biochem Metab* 2006; 14: 8–13.
5. Tate JR, Mollee P, Dimeski G et al. Analytical performance of serum free light chain assay during monitoring of patients with monoclonal light-chain diseases. *Clin Chim Acta* 2006; in press.
6. Ščudla V, Minařík J, Schneiderka P et al. Význam sérových hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinu v diagnostice a hodnocení aktivity mnohočetného myelomu z vybraných monoklonálních gamapatií. *Vnitř Lék* 2005; 51: 1249–1259.
7. Špička I et al. Mnohočetný myelom a další monoklonální gamapatie. Praha: Galen 2005: 128.
8. Tichý M, Hrnčíř Z, Urban P, Matěja F. Monoklonální kryoglobuliny. *Klin Biochem Metab* 2004; 12(33): 84–87.
9. Adam Z, Hájek R, Mayer J et al. Mnohočetný myelom a další monoklonální gamapatie. Brno: Masarykova Univerzita 1999: 370.
10. Kyle RA. Sequence of testing for monoclonal gammopathies. *Arch Pathol Lab Med* 1999; 123: 114–118.

*prof. RNDr. Miloš Tichý, CSc.*

*www.fnhk.cz*

*e-mail: tichy@fnhk.cz*

*Doručeno do redakce: 29. 8. 2006*

**www.kardiologickarevue.cz**