



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

## **Komplexní diferenciální diagnostika monoklonálních gamapatií**

# **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Studijní program: ZDRAVOTNÍ LABORANT

**Autor:** Ivana Mervartová

**Vedoucí práce:** MUDr. Pavel Malina, Ph.D.

České Budějovice 2017

## **1.1 Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem Komplexní diferenciální diagnostika monoklonálních gamapatií jsem vypracovala samostatně, pouze s použitím pramenů uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3.5.2017

.....

*podpis*

### **Poděkování**

Děkuji svému vedoucímu práce, primáři Oddělení klinické biochemie Nemocnice Písek a.s. MUDr. Pavlu Malinovi, Ph.D. za jeho cenné rady. Především děkuji Mgr. Petře Müllerové a Mgr. Stanislavě Feitové z Oddělení klinické biochemie Nemocnice Písek a.s. za jejich ochotu a čas, který mi při zpracování dané problematiky věnovaly. Dále děkuji své rodině a přátelům, kteří mi byli také velkou oporou.

# Komplexní diferenciální diagnostika monoklonálních gamapatií

## Abstrakt

Monoklonální gamapatie jsou projevem heterogenní skupiny onemocnění vyznačující se přítomností monoklonálního paraproteinu v séru či moči pacienta. Jsou projevem proliferace jediného klonu plazmatických nebo lymfoplazmoidních buněk, který produkuje homogenní imunoglobulin anebo jeho úplné nebo neúplné strukturní komponenty, nejčastěji lehké řetězce. Proliferace klonu těchto buněk má maligní nebo potencionálně maligní charakter, proto je jeho přesná diagnostika velmi důležitá.

Cílem této práce je detekce monoklonálního paraproteinu v patientském séru kvantitativně, případně v moči kvalitativně u skupiny hematologických pacientů vyšetřovaných na Oddělení klinické biochemie Nemocnice Písek a.s. elektroforetickou analytickou metodou (ELFO) a jeho následná specifikace imunofixační analytickou metodou (IFE). Pro komplexnější informaci je u některých pacientů provedena kvantifikace volných lehkých řetězců (VLR) kappa a lambda ze séra imunoanalytickou metodou. Dále jsou kvantitativně stanoveny imunoglobuliny v séru, hodnoty albuminu a celkové bílkoviny, které mohou v případě nálezu monoklonální komponenty přispět k přesnější diagnostice (Maisnar a Tichý, 2012; Engliš a Granátová, 2006).

Podle stanovené hypotézy usuzují, že pacienti, u kterých budou naměřeny patologické hodnoty VLR a jejich poměru, což svědčí pro diagnózu monoklonální gamapatie, budou mít také pozitivní nález monoklonálního imunoglobulinu na ELFO, který bude následně specifikován metodou IFE a diagnóza monoklonální gamapatie tak bude potvrzena.

Z celkového počtu 123 pacientů byly u 32 pacientů nalezeny patologické hodnoty VLR a jejich poměru. U 17 z nich byla zachycena monoklonální komponenta na elektroforéze a imunofixaci (případně jen imunofixaci) a následně potvrzena monoklonální gamapatie. U 15 pacientů k potvrzení monoklonální gamapatie nedošlo. Mnou stanovená hypotéza se tedy potvrdila ve více než 50% případů.

## *Klíčová slova*

Monoklonální gamapatie; monoklonální paraprotein; elektroforéza a imunofixace; volné lehké řetězce; imunoglobuliny; plazmatické a lymfoplazmoidní buňky.

## **Complex differential diagnostics of monoklonal gammopathy**

### ***Abstract***

Monoclonal gammopathy is a manifestation of the form of heterogenic group of illnesses characterized by the presence of the monoclonal paraprotein in the serum or in urine. This is the expression of proliferation of the only clone of plasma or lymphoplasmoid cells, which produces homonegeous immunoglobulin or its complete or incomplete structural components, most commonly light chains. The clone proliferation of those cells has a malign or potencionally malign charakter, therefore it is very important to be accurate by the diagnosis.

The aim of the thesis is a quantitative detection of the monoclonal paraprotein in patients serum, eventually a qualitative detection in urine in group of hematological patients examined at the Department of clinical biochemistry in Hospital Písek a.s. with electrophoretic analytical method (ELFO) and its subsequent specification by immunofixation electrophoresis (IFE). The quantification of free light chains (VLR), kappa and lambda, from the serum is made on some patients for more complex information, and it is made by immunoanalytic method. Futhermore immunoglobulins as well as values of albumin and values of total protein are quantitatively established in the serum, and these values can contribute to more precise diagnosis in case of finding of monoclonal components (Maisnar a Tichý s. 9-11., 2012; Engliš a Granátová, 2006; Adam et al., 2014).

From the stated hypothesis I conclude, that the patients with pathological values VLR and their ratios, which lead to diagnosis of the monoclonal gammopathy, will also have positive finding of monoclonal immunoglobulin on ELFO. The finding will be afterwards specified by IFE method and so the diagnosis of monoclonal gammopathy will be confirmed.

From the total number of 123 patients, pathological values VLR and their ratios were found on 32 of them. Monoclonal components on electrophoresis and immunofixation (alternatively only on immunofixation) were detected on 17 patients, afterwards monoclonal gammopathy was confirmed. Monoclonal gammopathy was not confirmed on 15 patients. So my hypothesis was confirmed on more than 50% of cases.

***Keywords***

Monoclonal gammopathy; monoclonal paraprotein; electrophoresis and immunofixation; free light chains; immunoglobulins; plasma or lymphoplasmoid cells.

## Obsah

Úvod.....	10
1 Teoretická část .....	11
1.1 B lymfocyty .....	11
1.1.1 Aktivace genů pro imunoglobuliny v B prekurzorech: .....	12
1.1.2 Antigenně specifický receptor B lymfocytů (BCR, B cell receptor) .....	13
1.2 Imunita .....	13
1.2.1 Specifická imunita a imunoglobuliny.....	14
1.2.2 Jednotlivé třídy imunoglobulinů .....	14
1.2.3 Struktura imunoglobulinů.....	15
1.3 Interakce antigenu a protilátky .....	17
1.3.1 Imunoglobuliny polyklonální .....	18
1.3.2 Imunoglobuliny monoklonální .....	18
1.4 Monoklonální gamapatie .....	18
1.4.1 Doporučený vyšetřovací postup u prokázané monoklonální gamapatie .....	19
1.4.2 Monoklonální gamapatie z maligních příčin.....	21
1.4.3 Mnohočetný myelom.....	21
1.4.4 Waldenströмова makroglobulinémie .....	24
1.4.5 AL-amyloidóza.....	24
1.5 Monoklonální gamapatie nejasného významu MGUS (Monoklonal gammopathy of undetermined significance).....	25
1.6 Klinické projevy monoklonální gamapatie .....	25
1.6.1 Poškození ledvin při monoklonálních gamapatiích.....	25
1.6.2 Hyperviskózní syndrom .....	26
1.6.3 Kryoglobulinémie.....	26
1.6.4 AL amyloidóza .....	27

2	Metodika a hypotézy .....	27
2.1	Cíl práce .....	27
2.2	Hypotézy .....	27
2.3	Laboratorní průkaz monoklonálních gamapatií .....	28
2.3.1	Stanovení albuminu .....	29
2.3.2	Princip kvantitativního stanovení albuminu v séru na systémech Roche/Hitachi cobas c. ....	30
2.4	Stanovení celkové bílkoviny .....	30
2.4.1	Princip kvantitativního stanovení celkové bílkoviny v séru na systémech Roche/Hitachi cobas c. ....	31
2.5	Elektroforéza bílkovin séra a moče .....	31
2.5.1	Princip elektroforézy bílkovin séra a moče firmy Interlab .....	32
2.5.2	Pracovní postup elektroforézy bílkovin séra firmy Interlab .....	32
2.5.3	Interpretace výsledků elektroforézy bílkovin séra firmy Interlab ....	35
2.6	Imunofixace séra a moče .....	37
2.6.1	Princip imunofixace séra a moče firmy Interlab .....	38
2.6.2	Interpretace výsledků imunofixace séra a moče firmy Interlab .....	39
2.7	Kvantitativní stanovení volných lehkých řetězců v séru na systémech Roche cobas® c .....	42
2.7.1	Princip kvantitativního stanovení volných lehkých řetězců v séru na systémech Roche cobas® c .....	43
2.7.2	Interpretace výsledků kvantitativního stanovení volných lehkých řetězců v séru na systémech Roche cobas® c .....	44
2.8	Kvantitativní stanovení jednotlivých imunoglobulinů .....	46
2.8.1	IgA .....	46
2.8.2	IgG .....	46
2.8.3	IgM .....	47
2.8.4	Princip testu IgA, IgG a IgM na systémech cobas 501/502 .....	47



3	Výsledky .....	48
4	Diskuse .....	50
5	Závěr .....	52
6	Seznam použitých zdrojů .....	53
7	Příloha .....	60
8	Seznam zkratek .....	68

## Úvod

Výskyt monoklonálního paraproteinu v séru nebo v moči je vždy závažným nálezem, protože diagnostikuje širokou škálu onemocnění. Od subletálních, často i celoživotně stabilizovaných onemocnění, přes klinicky nepříliš nápadná, dlouhodoběji probíhající nádorová onemocnění v různé intenzitě, až po značně nediferencované, progredující a generalizované nádorové onemocnění. Vyžaduje tedy podrobné šetření a specifikaci. Touto problematikou se zabývá Mezinárodní pracovní skupina (IMWG - The Internationale Myeloma Working Group). Klasifikace monoklonálních gamapatií, kterou se budu více zabývat v kapitole 3., prošla v posledních letech změnami názvosloví. Zároveň došlo k zavedení nových léčebných postupů tak, aby byly vzájemně srovnatelné výsledky léčby dosažené v klinické praxi.

V klinických laboratořích se neustále rozšiřuje nabídka a také kvalita poskytovaných metod pro diagnostiku a monitorování monoklonálních gamapatií. Jsou to jednak metody základní - elektroforéza proteinů séra a imunofixační elektroforéza. Dále pak metody doplňující diagnostiku - stanovení volných lehkých (popř. těžkých) řetězců.

**Elektroforéza** je analytická metoda, sloužící k separaci nabitých částic (bílkoviny, ionty) podle jejich pohyblivosti ve stejnosměrném elektrickém poli. Rozdělení částic je závislé na velikosti molekuly, velikosti náboje, pH prostředí, iontové síle pufru, vlastnostech nosiče a konformaci molekuly.

**Imunofixační elektroforéza** je založená na vizualizaci specifických proteinů pomocí antisér tvorbou komplexů antigen - protilátka. Vazba antisér navazuje na separaci proteinů elektroforézou.

**Imunoanalytická metoda stanovení volných lehkých řetězců** je založená na principu imunoturbidimetrie. Po interakci specifického antiséra a vzorku se vytváří sraženina. Měří se intenzita světelného toku po průchodu absorbujícím a rozptylujícím prostředím.

Cílem této práce je odhalení monoklonálního paraproteinu v séru nebo v moči a jeho následná specifikace, která je nutná pro přesnější diagnostiku. Pro komplexnější diagnostiku jsou také vyšetřeny volné lehké řetězce kappa a lambda, imunoglobuliny v séru, albumin a celková bílkovina (Bowen, 2000; Vávrová, 2004; Engliš a Granátová, 2006; Maisnar a Hájek, 2008; Maisnar a Tichý, 2012; Příbalová informace: Souprava

Freelite, 2014; Příbalová informace: Acid violet..., 2016; Příbalová informace: Postup elektroforézy..., 2016).

## 1 Teoretická část

### 1.1 B lymfocyty

Vzhledem ke své funkci v imunitních pochodech se lymfocytární řada na rozdíl od myeloidní vyvíjí mnohem komplikovaněji. Lymfocyty jsou hlavními buňkami naší humorální a celulární imunity. Obě řady - nelymfoidní (myeloidní) i lymfoidní - se diferencují ze společné multi(toti)-potentní kmenové buňky. Z lymfoidní kmenové buňky se diferencují T a B lymfocyty v primárních lymfatických orgánech (kostní dřeň, thymus).

Vývoj B lymfocytů (Tab. 2) probíhá u lidí v kostní dřeni a dokončuje se po setkání s antigenem za účasti antigen prezentujících buněk v zárodečném centru sekundárních lymfoidních orgánů (uzliny, slezina, Payerovy plaky), kde dochází k somatické mutaci v oblasti genu pro těžké řetězce imunoglobulinů (IgVH). V případě, že je mutace úspěšná, vede k hyperafinní vazbě receptoru a antigenu. B lymfocyt se poté vyvíjí v plazmatickou buňku (plazmocyt), produkující protilátky nebo buňku paměťovou, které nesou somatickou mutaci v oblasti IgVH. Pokud je mutace neúspěšná a hyperafinní vazba se nevytvoří, hyne B lymfocyt indukci apoptózy. Vývoj může být také dokončen bez spoluúčasti antigen prezentujících buněk mimo zárodečné centrum a takto vzniklé paměťové a plazmatické buňky danou mutaci v IgVH nenesou. Řada nádorových onemocnění je spojená s nenáhodnými translokacemi. Translokace B lymfoproliferací postihují velmi často 14. chromozom, což je oblast genů pro těžké řetězce. U mnohočetného myelomu se vyskytují v 75% případů změny postihující lokus 14q32. Klíčové molekulární genetické a biologické mechanismy vývoje monoklonálních gamapatií ale nejsou zcela objasněné. Za fyziologických podmínek je tvorba imunoglobulinů humorální odpovědí organismu závislá na antigenní stimulaci. Změna polyklonální tvorby na monoklonální je výsledkem somatické mutace genů vlivem epigenetických faktorů zevního prostředí. Tato změna se uskutečňuje na úrovni pre-B lymfocytů ve stádiu, kdy dochází k přeskupení genů pro těžké a lehké řetězce. Tvorba paraproteinu je proto klonální proces různé etiologie. Příčinou onemocnění tedy

mohou být genetické predispozice, chronické infekce, vliv životního prostředí, autoimunitní onemocnění a jiné (Sandecká et al., 2009; Češka et al., 2010; Penka et al., 2011).

Tabulka 2. Vývoj B-lymfocyту po plazmatickou buňku

Nedělící se buňka, vytvářející imunoglobulin, který exprimuje na svém povrchu	B-lymfocyt
Stává se paměťovou buňkou, tvoří imunoglobulin a exportuje jej na povrch	B-lymfoblast
Proliferující buňka, vyvíjí se v plazmatickou buňku	Plazmoblast
Je buňka již neproliferující s typickou vlastností - sekrecí imunoglobulinů	Plazmatická buňka

(Adam, 1999)

### 1.1.1 Aktivace genů pro imunoglobuliny v B prekurzorech:

Jednotlivé klony B lymfocytů poskytují široký repertoár imunoglobulinů. Každá protilátka, jež je těmito klony produkována je namířena proti určitému antigenu nebo antigenní determinantě.

Rozeznáváme 5 tříd imunoglobulinů: IgM, IgG, IgD, IgE a IgA. Tyto protilátky mají velmi specifickou (hyper)variabilní část, kódovanou variabilními úseky genů vykazujících (hyper)mutace. Nejprve se v časném stádiu vývoje B lymfocyту přestavuje gen pro těžké řetězce  $\mu$  (mí) a následně gen pro lehké řetězce  $\kappa$  (kappa) a  $\lambda$  (lambda). Posléze se aktivují geny pro těžké řetězce  $\delta$  (delta),  $\alpha$  (alfa),  $\epsilon$  (epsilon) a  $\gamma$  (gama). Jako první tedy vznikají v cytoplazmě B buněk imunoglobuliny IgM (jsou exprimovány na cytoplazmatickou membránu jako receptory pro antigen) a poté molekuly IgD. Produkce jednotlivých imunoglobulinů je závislá na aktivaci příslušného genu pro těžké řetězce (Penka et al., 2011).

### **1.1.2 Antigeně specifický receptor B lymfocytů (BCR, B cell receptor)**

Receptor B lymfocytů je tvořen dvěma částmi a to povrchovým imunoglobulinem rozpoznávajícím antigen a asociovanými signálními molekulami. Rozebereme-li povrchový imunoglobulin, dostaneme dva lehké a dva těžké řetězce. Těžké H řetězce jsou transmembránové proteiny a jsou v membráně zakotveny úsekem 20 hydrofobních aminokyselin v C-terminální části. Povrchové imunoglobuliny jsou nejčastěji třídy IgM a IgD. Struktura povrchového imunoglobulinu je stejná jako struktura rozpustných (sekretovaných) imunoglobulinů. BCR komplex je konsolidován s transmembránovými proteiny  $Ig\alpha$  (CD79 $\alpha$ ) a  $Ig\beta$  (CD79 $\beta$ ). Tyto proteiny bývají nekovalentně spojeny s cytoplazmatickými protein-tyrosin kinázami (PTK) skupiny Src, což jsou fosforylující enzymy asociující fosfátovou skupinu z ATP na proteiny některých tyrosinových zbytků.

Při současném navázání antigenu na dvě nebo více molekul BCR se „překříží“ (přiblíží) asociované protein-kinázy a spustí vzájemnou fosforylaci, tím se stávají aktivnější. Dále fosforylují další cytoplazmatické proteiny a spouští signální kaskády. Spuštěním složitých signálních kaskád může docházet k přepisu (transkripci) některých genů, buněčnému dělení, diferenciaci B lymfocytu na plazmatickou buňku a sekreci značného množství protilátek (rozpustných imunoglobulinů). Podpoření a výrazné zesílení spuštěné kaskády může být vyvoláno spoluprací BCR s komplementovým povrchovým receptorem CR2 (CD21), který váže degradační produkt C3dg, který se nachází na povrchu B buněk (Penka et al., 2011).

## **1.2 Imunita**

Imunita (imunitní odpověď) je schopnost organismu rozeznat a zničit cizorodé látky (mikroorganismy, parazity, buňky), které se do něj dostaly. Je to jistý druh obrany. Rozeznáváme dva druhy imunitní odpovědi - specifickou imunitu a nespecifickou imunitu. Obě tyto odpovědi mají dva způsoby působení, a to humorální imunitní odpovědi (produkcí protilátek plazmatických buněk nebo komplementového systému) a celulární imunitní odpovědi (T lymfocyty, které napadají buňky s cizím elementem na svém povrchu, fagocytující buňky). Nespecifická imunitní odpověď není namířena na konkrétní antigen, ale je to geneticky podmíněná vlastnost organismu. Spadá sem

fagocytóza a komplementový systém. Specifická imunitní odpověď je proti tomu cíleně mířená proti antigenu nebo její determinantě. Je uskutečňována aktivovanými B lymfocyty, které produkují protilátky, a T lymfocyty v celulární imunitě (Ledvina et al., 2004; Otová a Mihalová, 2012; Hořejší et al., 2013).

### ***1.2.1 Specifická imunita a imunoglobuliny***

Naše humorální imunitní odpověď je sledem mnoha na sebe navazujících reakcí, kde mají velkou roli protilátky - imunoglobuliny. Je to druh specifické imunity. Imunoglobuliny jsou bílkovinné makromolekuly produkované plazmatickými buňkami (konečné stádium vývoje B lymfocytů), reagujícími na antigen. Vyskytují se v krevním séru, kde jsou součástí globulinových frakcí, ale i v tkáních. Největší zastoupení mají v  $\gamma$ -globulinové frakci. Všechny obsahují sacharidy (jsou to glykoproteiny) a řadíme je do pěti tříd podle jejich struktury a imunitní specifity. Jejich biologický poločas je 2-23 dní (Ledvina et al., 2004).

### ***1.2.2 Jednotlivé třídy imunoglobulinů***

Hlavní třídy imunoglobulinů jsou IgG, IgA, IgM, IgD a IgE. Některé se dále dělí na podtřídy.

#### ***IgD***

Imunoglobulin IgD tvoří spolu s monomerním IgM antigenně specifický receptor BCR na buněčném povrchu B lymfocytů. Uvolňuje histamin z mastocytů a bazofilů. Jeho afinita k antigenu je slabá. Po vazbě na antigen se účastní rozvoje senné rýmy a alergického astmatu.

#### ***IgM***

Je to pentamerní molekula (někdy i hexamerní). Jednotlivé monomery jsou spojené do kruhu cystinovými můstky a jedním J řetězcem. Molekulová hmotnost je přibližně 900 kDa. IgM má 10 vazebných míst pro antigen. Spolu s monomerním IgD se nachází na povrchu B buněk. Po setkání s antigenem se IgM protilátky tvoří nejrychleji, teprve poté následují IgG, IgA, IgE. Vůči bakteriím a virům jsou vysoce účinné. IgM startuje klasickou dráhu komplementu a váže komplementový protein C1 (Klasická dráha

komplementu viz dále Hořejší et al., 2013).

### ***IgG***

Vyskytuje se jako monomer a má čtyři podtřídy (IgG<sub>1</sub> - IgG<sub>4</sub>). V plazmě má největší zastoupení. Jako jediný je schopen procházet placentou, proto je významný pro novorozence, jelikož je v prvních týdnech života obranným mechanismem (antibakteriálním faktorem), který podporuje fagocytózu, působí protivirově a proti toxinům. Ve vazbě na C1 komplement (sérový protein, složka komplementu nespecifické imunity) a Fc receptory (vážou Fc části imunoglobulinových molekul) se jednotlivé podtřídy částečně liší. Protilátky tohoto izotopu se váží také na protein A stafylokokových kmenů.

### ***IgA***

Tento imunoglobulin má dvojí zastoupení - slizniční a sérové. Ve velkém množství se nachází na slizničních površích jako ochrana před mikroorganismy. Působí jako opsonin (reaguje s bakteriemi a dělá je náchylnější pro fagocyty) a neaktivuje komplement. Má krátký poločas, proto je jeho produkce v organismu nejvyšší. Máme dvě podtřídy: IgA<sub>1</sub> ze slizničních plazmocytů a IgA<sub>2</sub>, který je syntetizován kostní dření.

### ***IgE***

Imunoglobulin IgE se v séru zdravých lidí nachází ve velmi malých koncentracích. Vyskytuje se ve slezině, tonzilách, GIT a mukózních membránách plic. Jeho zvýšení apeluje na alergické reakce nebo parazitární onemocnění. Receptory pro IgE mají vysokou afinitu a nalézáme je na povrchu bazofilů a žírných buněk. V jejich membráně dochází po vazbě alergenního nebo parazitárního antigenu k degranulaci a vyplavení biologicky aktivních mediátorů (Ledvina et al., 2004; Hořejší et al., 2013).

#### ***1.2.3 Struktura imunoglobulinů***

Makromolekula imunoglobulinu má tvar písmena ypsilon. Jsou tvořeny dvěma lehkými (L) a dvěma těžkými (H) polypeptidovými řetězci. (Obr. 1). Těžké řetězce jsou spojené disulfidickými (cystinovými) můstky a ke každému z nich je cystinovým můstkem připojen jeden lehký řetězec. Řetězce se liší počtem aminokyselin a relativní

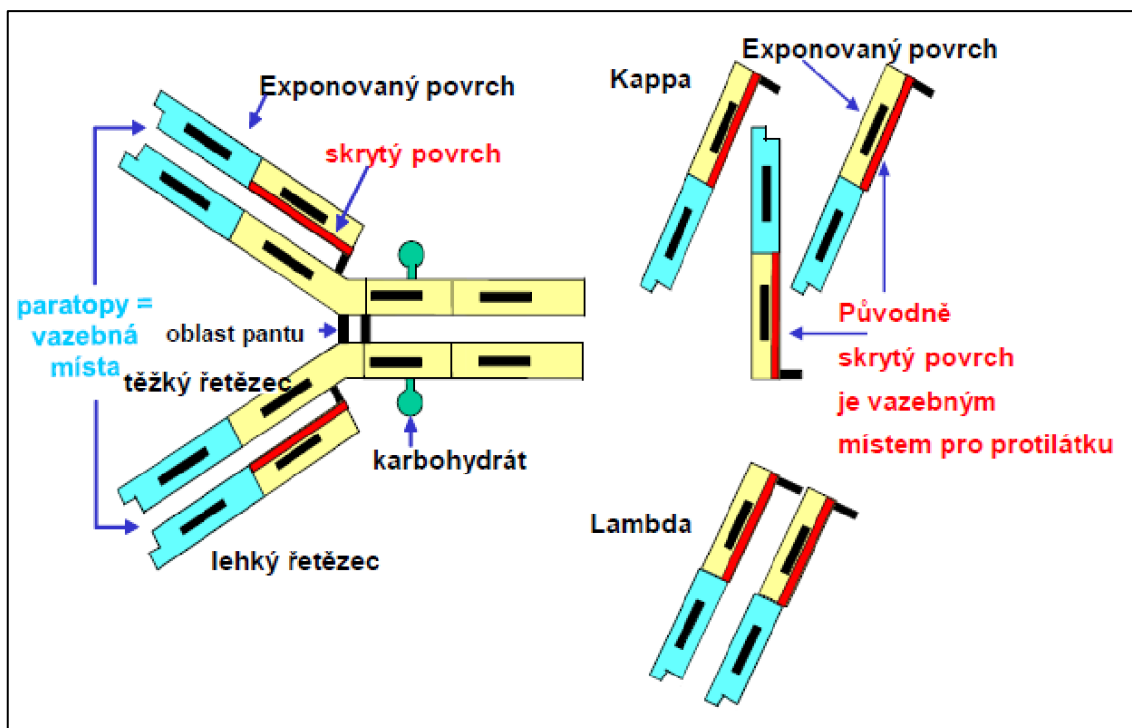
molekulovou hmotností. Cystinové můstky se nacházejí i uvnitř řetězce. Jelikož jsou imunoglobuliny glykoproteiny, jsou na těžkých řetězcích navázány také sacharidy N- i O- glykosidickou vazbou. Řetězce se stáčí do globulí a vytvářejí tzv. imunoglobulinové domény. Lehké řetězce jsou tvořeny dvěma imunoglobulinovými doménami, těžké řetězce mají různé počty domén, nejčastěji pět.

Lehké řetězce se skládají z variabilní ( $V_L$ ) a konstantní ( $C_L$ ) domény. Vyskytují se dva typy lehkých řetězců, a to  $\kappa$  (kappa) a  $\lambda$  (lambda). Liší se v konstantní doméně. Na jedné molekule imunoglobulinu jsou přítomny oba lehké řetězce pouze jednoho typu, buď kappa, nebo lambda.

Těžké řetězce jsou tvořeny z jedné domény variabilní ( $V_H$ ) a ze tří až čtyř domén konstantních ( $C_H 1 - 4$ ). Charakteristiky jednotlivých těžkých řetězců pak určují třídy imunoglobulinů (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE), je známo 5 druhů těžkých řetězců, které jsou označeny písmeny  $\gamma$  (gama),  $\alpha$  (alfa),  $\mu$  (mí),  $\delta$  (delta),  $\epsilon$  (epsilon). Kromě těchto základních typů se vyskytují podtypy, např. u řetězců  $\gamma$  a  $\alpha$ , které vykazují drobné odlišnosti ve struktuře těžkého řetězce. V rámci třídy IgG se tak rozlišují čtyři a ve třídě IgA dvě podtřídy. Jednotlivé druhy těžkých řetězců se liší velikostí i svým složením. Konstantní oblast, která je tvořena konstantními doménami, je stejná pro všechny protilátky téže třídy (Fc fragment). Variabilní oblast se liší podle klonu B-lymfocytů, kterým je produkována.

Variabilní domény těžkých i lehkých řetězců obsahují tzv. N-konec. V této oblasti jsou unikátní sekvence aminokyselin, které odpovídají za vazbu konkrétního antigenu (vazebné místo). Tato místa se nazývají jako hypervariabilní. Odpovědnost za prostorové uspořádání molekuly imunoglobulinu mají zejména části těžkého řetězce, které tvoří pantovou oblast. V této oblasti lze molekulu imunoglobulinu proteolyticky rozštěpit na 2 fragmenty Fab (variabilní doména lehkého a těžkého řetězce, a část těžkého řetězce) a fragment Fc (zbývající části těžkých řetězců spojených disulfidickým můstkem). Fragment Fc je část imunoglobulinu, která antigen neváže, ale je schopna vázat se na Fc receptory (Ferenčík, c2011; Ledvina et al., 2004; Hořejší et al., 2013).





Obrázek 1 Struktura imunoglobulinu (Masopust, 2012)

### 1.3 Interakce antigenu a protilátky

Imunoglobuliny rozeznávají antigen pomocí specifických vazebných míst. Vazba mezi antigenem a imunoglobulinem je nekovalentní, uplatňují se slabé vazebné interakce - síly hydrofobní, iontové a van der Waalsovy síly, a vodíkové můstky. Ke struktuře epitopu na antigenu je vazebné místo protilátky vždy do určité míry komplementární. Afinitu k antigenu určuje rovnovážná asociační konstanta  $K_a$ . Je to poměr rychlostních konstant vzniku a zániku komplexu, jelikož je tato vazba reverzibilní.

Konstanta pro komplex antigenu a protilátky bývá v rozmezí  $10^6$ - $10^{12}$   $l/mol$  a její převrácenou hodnotou je disociační konstanta  $K_d$ . Afinita k protilátce je tím větší, čím je vyšší konstanta  $K_a$ . S afinitou jednoduché interakce konkrétního vazebného místa a počtem zároveň se uplatňujících vazebných míst vzrůstá avidita, což je síla interakce polyvalentní protilátky s polyvalentním antigenem. Vazbou antigen-protilátka vznikají imunokomplexy, jejich velikost a složení je závislé na množství antigenu a protilátek a také na izotypech imunoglobulinů (Hořejší et al., 2013).

### ***1.3.1 Imunoglobuliny polyklonální***

Jsou protilátky namířené proti většímu množství epitopů a jsou polyspecifické. Produkují je B-lymfocyty (Hořejší et al., 2013).

### ***1.3.2 Imunoglobuliny monoklonální***

V případě, že dojde k zvratu plazmatické buňky ve zhoubnou (viz kapitola 1.), vytváří tato buňka své identické kopie, které produkují v nadbytku monoklonální imunoglobulin. Ten se dostává do krve, popřípadě i do moče.

Monoklonální imunoglobuliny jsou imunoglobuliny monospecifické namířené proti konkrétní antigenní determinantě, protože pochází právě z jedné mutací pozměněné plazmatické buňky. In vitro se připravují metodou fúze B-lymfocytů a myelomových buněk pomocí polyethylenglykolu. Tím dochází k takzvané immortalizaci, jelikož B-lymfocyty mají krátkou životnost. Výsledkem této fúze je buněčný hybridom produkující konkrétní monoklonální protilátku (Lab Test Online<sup>®</sup><sup>CZ</sup>, 2010; Ferenčík, c2011; Hořejší et al., 2013).

## ***1.4 Monoklonální gamapatie***

Monoklonální gamapatie je heterogenní skupina onemocnění, která se vyznačuje produkcí monoklonálního imunoglobulinu (M-komponenty, M-gradientu). Charakteristická je proliferace klonu diferencovaných B lymfocytů, které začnou produkovat homogenní protein (monoklonální imunoglobulin). Monoklonální imunoglobuliny jsou tvořeny kompletní molekulou imunoglobulinu s těžkým řetězcem jedné třídy a podtřídy a jedním antigenním typem lehkých řetězců nebo mohou být tvořeny jen fragmenty imunoglobulinových molekul. Většinou jsou to imunoglobuliny z volných lehkých řetězců, vzácněji pak z monoklonálních těžkých řetězců alfa, gama nebo mí.

Monoklonální gamapatie mohou být maligního anebo benigního charakteru, ale je velmi těžké tuto hranici rozlišit. Proto musí být pacienti s hraničními hodnotami před uzavřením diagnózy dlouhodobě sledováni. Pro diagnózu monoklonálních gamapatií je klíčové stanovení přítomnosti monoklonálního imunoglobulinu (tzv. paraproteinu) v séru nebo moči. (Viz dále kapitola 4.3 - laboratorní průkaz monoklonálních imunoglobulinů). Dalším zásadním vyšetřením je stanovení rozsahu

postižení kostní dřeně. K diagnostice monoklonálních gamapatií se také stále více využívá stanovení volných lehkých řetězců (FLC; Free Light Chains) v séru a roste také význam imunofenotypizačního, cytogenetického a celogenomového vyšetření, které dovedou odhalit chromozomové translokace běžně udávané pro mnohočetný myelom. Česká myelomová skupina založila registr monoklonálních gamapatií (RMG), který byl poprvé představen v dubnu roku 2007. Tento projekt byl vytvořen pro monitoring dat nemocných s monoklonálními gamapatiemi z regionu střední a východní Evropy s cílem sledování jejich incidence, využití a efektu léčby, výskytu nežádoucích příhod a toxicity v podmínkách běžné klinické praxe. RMG měl roku 2016 již 22 center. Z toho 18 v ČR a 4 v SR. Celkový výskyt onemocnění k 9.10. 2016 je 5273 MM (mnohočetný myelom) a 2737 MGUS (monoklonální gamapatie nejasného významu). Z toho v ČR 4508 MM, 2526 MGUS a v SR 765 MM, 211 MGUS (Maisnar et al., 2011; Maisnar a Tichý, 2012; Šolcová, 2014; Maisnar, 2006; Leukaemia Foundation Australia, © 2017).

#### ***1.4.1 Doporučený vyšetřovací postup u prokázané monoklonální gamapatie***

U prokázané monoklonální gamapatie provádíme tato vyšetření:

1. Krevní obraz + diferenciální rozpočet buněk + retikulocyty. Dále sedimentace erytrocytů a viskozita séra.
2. Koagulační vyšetření - krvácivost, APTT (activated partial thromboplastintime, aktivovaný částečný tromboplastinový čas), Quick (Quickův test neboli tromboplastinový čas), retrakce koagula (při snížené retrakci koagula a normální hodnotě trombocytů je třeba provést funkční vyšetření trombocytů).
3. Biochemické vyšetření séra jako je: urea, kreatinin, kyselina močová, sodík, draslík, chloridy, vápník, fosfor, bilirubin, alkalická fosfatáza a její kostní frakce, aspartátaminotransferáza, alaninaminotransferáza, laktátdehydrogenáza, celková bílkovina, albumin, C-reaktivní protein, glukóza, elektroforéza bílkovin séra, stanovení volných lehkých řetězců, stanovení izotopu těžkých a lehkých řetězců a hladina beta2-mikroglobulinu.
4. Imunofixační elektroforézu séra a moči a kvantitativní stanovení jednotlivých tříd imunoglobulinů.

5. Vyšetření glomerulární filtrace (při známkách chronické renální insuficience je zvažována biopsie ledvin).

6. Vyšetření kostní dřeně - nejvhodnější je pro první záchyt provést odběr kostní dřeně (trepanobiopsii). Touto metodou lze získat větší množství informací, jelikož umožňuje jak cytologické, tak i imunohistochemické vyšetření, které dokáže zachytit více plazmatických buněk. Až 30% pacientů bývá cytologickým vyšetřením podhodnoceno oproti imunohistochemickému. Pro další vyšetření již stačí sternální punkce.

7. Průkaz kostního postižení - provádíme běžné rentgenové vyšetření osového skeletu, lebky, dlouhých kostí a žeber. Dále vyšetření markerů kostní formace a resorbce (hladina osteokalcinu v séru a Deoxy-Pyridinolinu v moči). V případě, že je RTG nález normální a je zachyceno zvýšení kostního metabolismu, provádíme magnetickou rezonanci páteře. V případě průkazu pouze tzv. "akcelerované" osteoporózy je vhodné provést denzitometrické vyšetření kostí, které nám umožní posouzení v čase.

8. V případě výrazné anémie stanovujeme hladinu erythropoetinu v séru (Maisnar, 2000; Fabian a Moulis, 2006; Blažová, 2012; Dreslerová, 2017).

Tabulka 2. Rozdělení monoklonálních gamapatií

<b>MGUS</b>
Benigní monoklonální gamapatie (IgG, IgA, IgD, IgM a vzácně i volné lehké řetězce)
Asociované s nádory z buněk neprodukujících M-Ig
Biklonální a triklonální gamapatie
Idiopatická Bence Jonesova proteinurie
<b>MALIGNÍ MONOKLONÁLNÍ GAMAPATIE</b>
Mnohočetný myelom (IgG, IgA, IgD, IgE nebo jen volné lehké řetězce)
Asymptomatický mnohočetný myelom
Symptomatický mnohočetný myelom
Plazmocelulární leukemie
Nesekreční mnohočetný myelom
Plazmocytom (solitární kostní nebo extramedulární)

Waldenströmová makroglobulinémie
Onemocnění z těžkých řetězců ( $\gamma$ , $\alpha$ nebo $\mu$ )
Jiné maligní lymfoproliferativní onemocnění (lymfomy nebo B-CLL)
Syndrom POEMS (Polyneuropatie, Organomegalie, Endokrynopatie, Monoklonální imunoglobulin, kožní „Skin” změny
Primární AL amyloidóza

(Maisnar a Tichý, 2012)

Nejčastěji se setkáváme s monoklonálními gamapatiemi z maligních příčin (mnohočetný myelom, AL amyloidózou a Waldenströmovou makroglobulinémií) a s monoklonálními gamapatiemi nejasného významu (MGUS) (Maisnar a Tichý, 2012).

#### **1.4.2 Monoklonální gamapatie z maligních příčin**

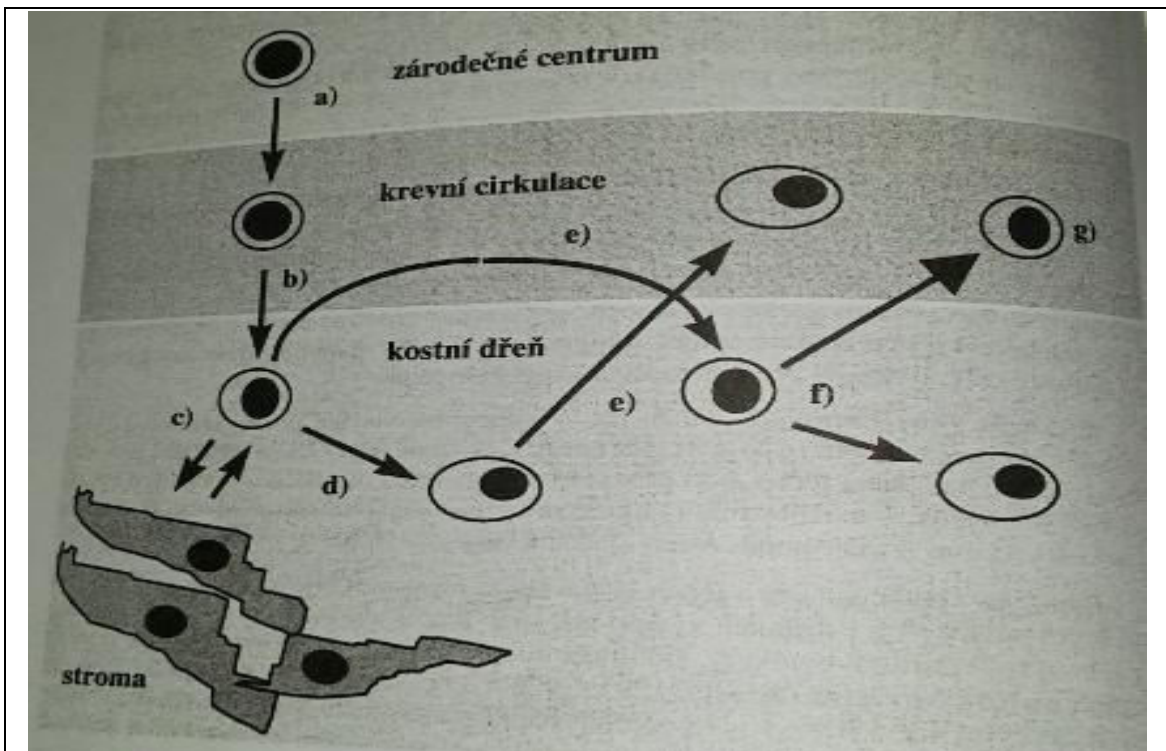
Monoklonální gamapatií z maligních příčin, kde je přítomen monoklonální imunoglobulin je nejčastěji mnohočetný myelom a Waldenströmová makroglobulinemie (lymfoplazmocitární lymfom), u ostatních B-lymfoproliferativních onemocnění se vyskytuje jen v menším procentu. Primární AL amyloidózu potvrzuje a způsobuje přítomnost lehkých řetězců. Do maligních monoklonálních gamapatií patří také nemoci z těžkých řetězců (Adam, 1999).

#### **1.4.3 Mnohočetný myelom**

Prvním záznamem o mnohočetném myelomu byla Bence-Jonesova bílkovina, která byla objevena již v polovině 19.století. Byl to vůbec první objevený nádorový marker. Toto maligní onemocnění je způsobené mutací B-lymfocyty ve folikulu lymfatické tkáně, který nekontrolovaně proliferuje a diferencuje se v plazmablastickou buňku. Plazmablastické buňky jsou ještě schopny proliferace i migrace. Zralá myelomová buňka je terminálním stádiem a k proliferaci již nesměřuje (Adam, 1999).

Myelomové buňky na rozdíl od ostatních nepodléhají programované buněčné smrti, takže jsou prakticky nesmrtelné. Vývojová řada myelomových buněk se od fyziologické liší nekontrolovatelnou proliferací plazmocytů a plazmablastů.

K přeměně na myelomovou buňku dochází již v kostní dřeni (Obr. 2)(Adam, 1999).



Obrázek 2. Vývoj myelomového klonu (Adam,1999).

- a) prvotní onkogenní změna
- b) usídlení již zadané, ale maligní buňky v kostní dřeni
- c) expanze plazmoblastů a jejich interakce se stromatem kostní dřene
- d) diferenciaci na plazmatickou buňku
- e) recirkulace plazmoblastů mezi periferní krví a kostní dřeni s proliferací ve dřeni
- f) pozdní onkogenní změna na buňky proliferující nezávisle na stromatu kostní dřene
- g) extravazace a na dřeni nezávislá proliferace

Buňky stromatu kostní dřene totiž vytvářejí vhodné mikroprostředí a produkují cytokiny, které je stimulují. Další mutační změny jsou již na kostní dřeni nezávislé. Dochází u nich k různým chromozomovým změnám a dalším mutacím, které dávají buňce autonomní růst.

Incidence mnohočetného myelomu v České republice se odhaduje podle Maisnara a Tichého (2012) na 4-6 případů/100.000 obyvatel. Mnohočetný myelom tvoří 1% všech a 10% hematologických malignit. V evropských zemích je v žebříčku hematologických malignit na třetím místě. Celosvětově je zaznamenán pomalý nárůst

jeho výskytu a také častější výskyt u nemocných mladších věkových skupin. V době stanovení diagnózy se medián věku pohybuje mezi 60-65 lety. Velmi zajímavý je dvojnásobný výskyt mnohočetného myelomu u afroameričanů. V léčbě mnohočetného myelomu, počínaje s použitím autologních transplantací kmenových buněk a vznikem dalších nových procedur, jako imunomodulačních léčiv (IMiDS) a inhibitorů proteáz (PI), dochází k prodloužení doby přežití pacientů. Pacientům je nabízena velmi kvalitní péče a v rámci výzkumu jsou k dispozici i léčebné možnosti, které teprve procházejí klinickým testováním. U aktivního, nového onemocnění se díky novým léčebným nástrojům dostávají pacienti do kompletní remise a jejich délka života je prodloužena o déle než 15 let (Adam, 1999; Ion, Medical Tribune, 2011; Maisnar a Tichý, 2012; Cabrera, 2014; Kazandjian, 2016; Oldřichová, 2016).

#### ***1.4.3.1 Klinické příznaky mnohočetného myelomu***

Buňky, jež jsou produkovány z jednoho klonu B-lymfocyty, mají schopnost tvořit monoklonální imunoglobulin. Většinou to bývá kompletní molekula imunoglobulinu. Může se však jednat pouze o lehké řetězce. Zcela mimořádně je tvořen jen J-řetězcem imunoglobulinů nebo jde o nesekreční variantu (Adam, 1999).

##### ***1.4.3.1.1 Příznaky vyvolané monoklonálním imunoglobulinem***

Monoklonální imunoglobuliny vytváří četné a rozmanité patologické projevy. Některé z nich lze spatřit častěji, jiné jsou vysloveně vzácné a obtížně rozpoznatelné. Vzácnou komplikací může být například dušnost vzniklá akumulací paraproteinu v alveolách. Nejčastější z nich jsou: motorická a senzitivní polyneuropatie způsobená monoklonálním imunoglobulinem, myelomová nefropatie a porucha srážení krve (Adam, 1999).

#### **1.4.3.1.2 Příznaky způsobené cytokiny myelomových buněk**

**1. Bolesti kostí:** Osteolytické kostní změny a patologické fraktury jsou typickým příznakem mnohočetného myelomu. Kostní remodelace je jednou ze známek přítomnosti maligního procesu.

**2. Infekce:** Infekce a horečky jsou způsobené poruchou imunity, neschopností tvorby polyklonálních imunoglobulinů, a tím i odpovědi po antigenní stimulaci. Tato komplikace se řeší nitrožilně podávanými gamaglobuliny.

**3. Celková slabost:** Celková slabost, dušnost a nevykonnost jsou příznaky anémie (Adam, 1999).

#### **1.4.4 Waldenströмова makroglobulinémie**

Choroba byla popsána poprvé roku 1944 J. Waldenstömem. Je způsobena maligní proliferací plazmocytoïdních lymfocytů a vyznačuje se přítomností monoklonálního IgM imunoglobulinu. Koncentrace tohoto izotopu je 30 g/l a více. Koncentrace ostatních imunoglobulinů nemusí být snížena, na rozdíl od mnohočetného myelomu. V myelogramu nalézáme zvýšený počet lymfocytů a lymfoplazmocytů. V histologickém preparátu je nalezen lymfoplazmocytární lymfom. Klinickými projevy, které jsou způsobené přítomností monoklonálního paraproteinu jsou hyperviskozita, krvácení, kryoglobulinémie, polyneuropatie, popřípadě i anémie způsobená infiltrací kostní dřeně (Adam, 1999).

#### **1.4.5 AL-amyloidóza**

Je choroba z lehkých řetězců imunoglobulinů spadající do monoklonálních gamapatií. Vyznačuje se depozicí fibril tvořících amyloid (amorfní bílkovinný materiál, mající strukturu  $\beta$  skládaného listu). Je známo asi 30 amyloidogenních proteinů. AL amyloidóza se může vyskytovat v korelaci s mnohočetným myelomem, Waldenströmovou chorobou anebo samostatně. Je to velmi vzácné onemocnění vyskytující se u 5-12 pacientů na milion obyvatel za rok. U pacientů dochází k závažnému poškození tkání a orgánů, podněcené amyloidovým depozitem. Postiženy mohou být ledviny, nervová tkáň, střeva, srdce nebo cévy. Tato poškození mohou vést až k úmrtí pacienta. Typickými příznaky jsou periorbitální hematomy, způsobené



zvýšenou fragilitou cév vlivem amyloidu. Další příznaky jsou velmi rozmanité, jelikož může dojít k poškození kterékoliv části tkáně. Doporučuje se tedy histologické vyšetření s barvením na amyloid (Adam, 1999).

### ***1.5 Monoklonální gamapatie nejasného významu MGUS (Monoklonal gammopathy of undetermined significance)***

U pacientů, u kterých se nachází monoklonální imunoglobulin v séru nebo v moči a nevykazují známky mnohočetného myelomu, primární AL-amyloidózy nebo podobných chorob, mluvíme o monoklonální gamapatii nejasného významu. MGUS je prekanceróza, která se vyznačuje pozvolnou proliferací plazmatických buněk. Riziko progresu MGUS do MM je každoročně 0,5-1%. Kritéria pro MGUS uvádím v tabulce č. 3 (Adam, 1999; Sandecká et al., 2009; Sigurdardottir et al., 2015).

Tabulka č. 3 Nová diagnostická kritéria monoklonální gamapatie nejasného významu MGUS dle IMWG z roku 2003

Koncentrace M-Ig v séru < 30 g/l
Počet klonálních plazmatických buněk v kostní dřeni ≤ 10% a nízký stupeň infiltrace při histologickém vyšetření
Nejsou známky jiného B-lymfoproliferativního onemocnění
Bez známek dysfunkce či konečného poškození orgánů nebo tkání (včetně kostního postižení, amyloidózy či neuropatie)

( Maisnar a Tichý, 2012)

### ***1.6 Klinické projevy monoklonální gamapatie***

#### ***1.6.1 Poškození ledvin při monoklonálních gamapatiích***

U monoklonálních gamapatií je produkován monoklonální paraprotein, který může způsobit postižení ledvin. Jak závažné toto poškození bude, o tom rozhoduje několik aspektů. Je to hlavně charakter imunoglobulinu, jeho nefrotické vlastnosti a jeho kvantita, která je odrazem masy myelomových buněk. Poškození ledvin je v každém případě velmi závažnou komplikací (Adam, 1999).

### **1.6.2 Hyperviskózní syndrom**

Jde o život ohrožující stav způsobený vysokou hodnotou sérových imunoglobulinů nebo vysokou hodnotou krevních elementů. Viskozita je ovlivňována šesti hlavními složkami, kterými je tvořena (hematokritem, fyzikálními vlastnostmi erytrocytů, koncentrací leukocytů, fyzikálními vlastnostmi leukocytů, agregací erytrocytů a viskozitou plazmy). Tyto složky se mohou navzájem ovlivňovat a změna koncentrace plazmatických bílkovin se může projevit změnou agregace erytrocytů i změnou viskozity plazmy. Normální hodnoty viskozity séra jsou v rozmezí 1,4-1,9 cP (centipoise) a příznaky se vyskytují nad 4cP. Nejčastější výskyt hyperviskózního syndromu je u Waldenströmovy makroglobulinémie, méně se vyskytuje u nemocných s IgA a IgG mnohočetným myelomem. Viskozita není závislá pouze na koncentraci monoklonálního imunoglobulinu, ale i na jeho vlastnostech (schopnost agregace, kryoprecipitace) (Adam, 1999; Maisnar a Tichý, 2012).

### **1.6.3 Kryoglobulinémie**

Kryoproteiny jsou proteiny séra precipitující při teplotách nižších než 37°C. Při zahřátí se opět rozpouštějí. Poprvé si jich všimli v roce 1933 Wintrobe a Buell u nemocného s mnohočetným myelomem. Rozeznáváme dva typy - kryoglobuliny a kryofibrinogeny. Kryofibrinogeny precipitují jen v plazmě a kryoglobuliny precipitují v séru i v plazmě, a navíc jsou tvořeny komplexem fibrinogen-fibrin. Kryoglobuliny se dělí na tři typy. Typ I je tvořen jen monoklonálním imunoglobulinem, výjimečně se jedná jen o jeho lehké řetězce. Typ II obsahuje směs monoklonálního a polyklonálního imunoglobulinu a typ III se skládá ze směsi polyklonálních imunoglobulinů. Kryoglobulinémie způsobuje mechanickou obstrukci malých cév v důsledku intravaskulární precipitace. Výsledkem je Raynaudův syndrom a imunokomplexová vaskulitida s kožními projevy, periferní polyneuropatií a poškozením ledvin. Typ I bývá spojený s lymfoproliferativními onemocněními (mnohočetný myelom, Waldenströмова makroglobulinémie). Typ II a III jsou zase asociovány s onemocněními, které stimulují imunitní systém (chronické hepatopatie, revmatoidní artritida, systémový lupus erythematoses). Ze symptomů se objevuje arthralgie, Raynaudův syndrom a purpura (Maisnar a Tichý, 2012).

#### **1.6.4 AL amyloidóza**

Jak již bylo zmíněno, AL amyloidóza se může asociovat s mnohočetným myelomem i s monoklonální gamapatií nejasného významu. Monoklonální imunoglobulin můžeme prokázat v séru asi u 40% a v moči přibližně u 75% nemocných s touto chorobou. Typické klinické příznaky jsou renální poškození a postižení srdce amyloidem, projevující se jako restriktivní kardiomyopatie, arytmie, ortostatická hypotenze či systolická dysfunkce levé komory. Časté bývá i postižení nadledvin, jaterních funkcí, orgánů GIT a neuropatie. S úmrtím jsou nejvíce spojena srdeční selhání a krvácivé stavy s vysokými koagulačními nálezy (Adam, 1999; Maisnar a Tichý, 2012).

## **2 Metodika a hypotézy**

### **2.1 Cíl práce**

Cílem mé práce bylo detekovat monoklonální paraprotein v patientském séru kvantitativně, popřípadě v moči kvalitativně u skupiny hematologických pacientů vyšetřovaných na Oddělení klinické biochemie Nemocnice Písek, a.s. elektroforetickou analytickou metodou. Dále specifikace tohoto paraproteinu imunofixační analytickou metodou. Pro komplexnější diagnostiku byly kvantitativně v séru stanoveny volné lehké řetězce kappa a lambda imunoanalytickou metodou a také kvantitativně stanoveny jednotlivé imunoglobuliny (IgA, IgM a IgG), albumin a celková bílkovina v séru.

V práci jsem popsala jednotlivé metody stanovení prováděné na našem oddělení v Nemocnici Písek, a.s. a uvedla postup zpracování vyšetřovaných vzorků. Na závěr jsem provedla vyhodnocení vzorků a jejich vzájemnou korelaci .

### **2.2 Hypotézy**

Předpokládám, že hodnoty VLR a jejich poměru korelují s nálezem na imunofixaci a elektroforéze. Domnívám se tedy, že pacienti s patologickými hodnotami VLR a jejich poměru budou mít na IFE a elektroforéze nález monoklonální komponenty.

Do souboru byli zařazeny vzorky sér a močí hematologických pacientů, které byly dodány na Oddělení klinické biochemie Nemocnice Písek a.s. s indikací lékaře na vyšetření elektroforézy, imunofixace nebo VLR v období od 1.1. 2016 do 30.4.2016.

### **2.3 Laboratorní průkaz monoklonálních gamapatií**

Monoklonální paraprotein M-Ig má identickou primární strukturu a skládá se z intaktní imunoglobulinové molekuly nebo jen z lehkých řetězců, vzácněji jen z těžkých řetězců. Těžké řetězce patří do imunoglobulinových tříd G, A, M, D nebo E a lehké řetězce se vyskytují ve dvou antigenních typech - kappa nebo lambda.

Laboratorní průkaz a typizace paraproteinu vyžaduje velice citlivé metody stanovení. Analýza séra a moče je dozajista nutná u všech podezření na MG. Přítomnost M-Ig může signalizovat již vysoká koncentrace celkové bílkoviny (CB) v séru pacienta. Hodnoty nad 90 g/l CB nebo vysoká sedimentace vyžadují podrobnější analýzu. Nicméně u počínajících MGUS, mnohočetného myelomu i myelomů IgD a nemoci z lehkých a těžkých imunoglobulinových řetězců může být celková bílkovina v normě.

Pro průkaz monoklonálních gamapatií se odebírá srážlivá krev ráno na lačno. Nedoporučuje se odběr plazmy, jelikož fibrinogen vytváří falešnou pozitivitu M-gradientu mezi beta a gama globuliny. Sérum uchováváme v lednici při 4-8°C (i několik dní). V případě delšího uchovávání (týdny), mrazíme sérum při -20°C. Moč se doporučuje odebírat 24hod. a konzervovat azidem sodným. Na našem oddělení doporučujeme první ranní moč, kde by měla být koncentrace bílkoviny nejvyšší. Bílkovinu v moči stanovujeme kvantitativně a následně moč zahušťujeme tak, aby byla koncentrace bílkoviny optimálně 1 až 2 g/l. Hlavními metodami pro stanovení MG jsou metody elektroforetické a imunochemické (Tab. 4). Pomocné metody, které mohou podpořit nebo zpochybnit diagnostiku monoklonální gamapatie u pacienta uvádím v tabulce č. 4. Metody, které jsem používala pro svou práci, uvádím v kapitolách 4.3.1-4.3.6 (Tichý, 1997; Zima, 2002; Maisnar a Tichý, 2012).

Tabulka č. 4. Základní laboratorní metody k průkazu monoklonálních gamapatií

Metoda	Použití
Elektroforéza bílkovin séra (agarózový gel nebo kapilární elfo)	Screening, diagnóza, sledování
Imunofixace bílkovin séra	Určení typu M-Ig, sledování zbytkového onemocnění u MM
Určení koncentrace monoklonálních Ig (denzitometrie, absorbance 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 nesekrečního myelomu, AL amyloidózy, MGUS a nemoci z těžkých řetězců
Viskozita séra	Hyperviskózní syndrom
Beta <sub>2</sub> -mikroglobulin a albumin	Stážovací systém, prognóza
Elektroforéza bílkovin moče	Screening, diagnóza, sledování
Imunofixace bílkovin moče	Určení typu M-Ig
Volné lehké řetězce v moči	Diagnóza a sledování nesekrečního myelomu, AL amyloidózy, MGUS a nemoci z lehkých řetězců

(Maisnar a Tichý, 2012).

### 2.3.1 Stanovení albuminu

Albumin zaujímá 55-65% celkových plazmatických proteinů. Je zdrojem endogenních aminokyselin, udržuje onkotický tlak a transportuje a skladuje široké spektrum ligandů. Albumin váže různé složky, které tak činí rozpustnými. Je to např. bilirubin, mastné kyseliny s dlouhým řetězcem a vápník. Je také schopen vázat ionty toxických těžkých kovů a rozličné farmaceutické sloučeniny, proto mají jeho nízké koncentrace v krvi vliv na farmakokinetiku. Hyperalbuminémie má s výjimkou případů dehydratace jen malý význam. Hypoalbuminémie se vyskytuje u mnoha nemocí a může být způsobena různými faktory jako je např. pokles syntézy způsobený sníženým přísunem proteinů nebo onemocněním jater, zvýšený katabolismus při poškození tkání, akutní záněty, nádory, akutní stavy, polyklonální (chronický zánět) a monoklonální gamapatie, ztráty do třetího prostoru (otok, ascites), zvětšení distribučního prostoru

(seps, šok), hyperhydratace, analbuminémie (vzácný vrožený defekt syntézy, kdy koncentrace dosahuje maximálně 10% normálu a kompenzačně se zvyšuje tvorba jiných proteinů), malabsorpce aminokyselin (Crohnova choroba), proteinurie v souvislosti s nefrotickým syndromem a ztráty bílkovin stolicí (neoplastické choroby) (Kvasnicová, 2002; Příbalová informace: ALB2, 2015).

### **2.3.2 *Princip kvantitativního stanovení albuminu v séru na systémech***

#### ***Roche/Hitachi cobas c.***

Albumin má při pH 4,1 povahu kationtu, který je schopen vázat se na bromkrezolovou zeleň (BCG) a vytvářet modrozelený komplex. Intenzita modrozelené barvy je přímo úměrná koncentraci albuminu ve vzorku a měří se fotometricky (Příbalová informace: ALB2, 2015).

### **2.4 *Stanovení celkové bílkoviny***

V plazmě můžeme stanovit stovky proteinů, které se liší koncentrací, velikostí molekuly a svou funkcí. Proteiny jsou kvantitativně nejzastoupenější látkou v krvi (v koncentraci 60-80 g/l). Jsou syntetizovány především v játrech, dále v plazmatických buňkách, lymfatických uzlinách, slinivce a kostní dřeni. Hodnota celkové bílkoviny je snížena u ztrát krve, nefrotického syndromu, syndromu zadržování solí, kwashiorkor (akutní deficit proteinu) a při těžkých zánětech. Zvýšena bývá u závažné dehydratace a při onemocnění mnohočetným myelomem nebo Waldenströmovou makroglobulinemií. Změny hodnot však mohou být způsobeny změnou v jedné proteinové frakci, přičemž nedochází k pohybu hodnot celkové bílkoviny.

Na našem oddělení stanovujeme celkovou bílkovinu, neboli TP (total protein) fotometrickým stanovením na analyzátoru Cobas 6000 firmy Roche s.r.o.(Příbalová informace: TP2, 2015).

#### **2.4.1 Princip kvantitativního stanovení celkové bílkoviny v séru na systémech**

##### ***Roche/Hitachi cobas c.***

Principem testu je vznik purpurově zbarveného biuretového komplexu po reakci dvojmocné mědi v alkalickém prostředí s peptidickými vazbami proteinů. Intenzita tohoto zbarvení se měří fotometricky, a je přímo úměrná koncentraci proteinu. (Příbalová informace: TP2, 2015)

#### **2.5 Elektroforéza bílkovin séra a moče**

Elektroforéza patří k nejlepším screeningovým metodám pro průkaz monoklonálního imunoglobulinu. Je rychlá, levná, dostupná a citlivá. Poskytuje široké spektrum nálezů (elektroforetických typů), např. chronický nebo akutní zánět, nefrotický syndrom, hypergamaglobulinémie monoklonální, polyklonální, oligoklonální, deficit Ig (při hypogamaglobulinémii i průkaz bisalbuminémie), atd. Současná elektroforéza je schopna zachytit M-gradienty kolem 0,5 g/l.

Elektroforéza je analytickou metodou separace látek (iontů) v roztoku za účasti elektrického proudu. Je to mechanický přenos hmoty na předem ohraničené zóny. Elektroforéza má více typů a provádí se na různých druzích nosičů. Na Oddělení klinické biochemie v Nemocnici Písek a.s. provádíme zónovou elektroforézu firmy Interlab, která probíhá na agarózovém gelu v alkalickém pufru (pH 8,9). Výsledkem je 6 proužků: albumin a 5 globulinů: alfa1 ( $\alpha_1$ ), alfa2 ( $\alpha_2$ ), beta1 ( $\beta_1$ ), beta2 ( $\beta_2$ ) a gamma ( $\gamma$ ). Každý z proužků obsahuje množství různých proteinů. Výjimkou je proužek albuminu. (Tab. 5). Vyšetření poskytuje hodnotnou diagnostickou pomůcku, protože umožňuje zobrazení většiny proteinů ve fyziologickém i patologickém procesu. Elektroforéza močových proteinů umožňuje určit renální poškození, které odpovídá kvalitativnímu složení a pozici proužků v paternu. Srovnání pozic proužků v paternu, jak sérovém tak močovém, který je přiložen k analýze jako reference, umožňuje identifikaci proteinurií jak glomerulárních, tubulárních i smíšených a také proteinurií, které jsou způsobeny Bence-Jonesovou bílkovinou (Maisnar a Tichý, 2012; Příbalová informace: Interlab. Postup elektroforézy...,2016).

Tabulka č. 5 Složení jednotlivých zón elektroforézy

+ Anoda	←—————→					-Katoda
Albumin	$\alpha_1$ -globulin	$\alpha_2$ -globulin	$\beta$ -globulin	$\beta$ - $\gamma$ -globulin	$\gamma$ -globulin	
Albumin	$\alpha_1$ -antitrypsin	$\alpha_2$ -makroglobulin	$\beta$ -lipoprotein	Fibrinogen	IgG	
	$\alpha_1$ -lipoprotein	$\alpha_2$ -lipoprotein	Transferin		IgA	
	$\alpha_1$ -kyselý glykoprotein (orozomukoid)	Haptoglobin	Plasminogen		IgM	
		Ceruloplasmin	Komplement		IgD	
		Erythropoietin	Hemopexin		IgE	
		Prothrombin				
		Cholinesteráza				

Maisnar a Tichý, 2012

### 2.5.1 Princip elektroforézy bílkovin séra a moče firmy Interlab

Elektroforéza separuje v elektrickém poli sérové proteiny nebo proteiny koncentrované moči dle jejich mobility. Každá molekula má pozitivně a negativně nabitě skupiny, které určují její celkový náboj. Ten pak určuje charakteristiku elektroforetické migrace každého typu proteinu v určitém pH. Separace probíhá v alkalickém prostředí zónovou elektroforézou na agarózových deskách. Po dokončení elektroforetické separace je agarózová deska denaturována, obarvena barvivem Acid blue pro detekci proteinů, odbarvena a poté usušena. Jednotlivé paterny jsou pak skenovány a denzitometrické výsledky zobrazeny současně s grafem (Příbalová informace: Interlab. Postup elektroforézy...,2016).

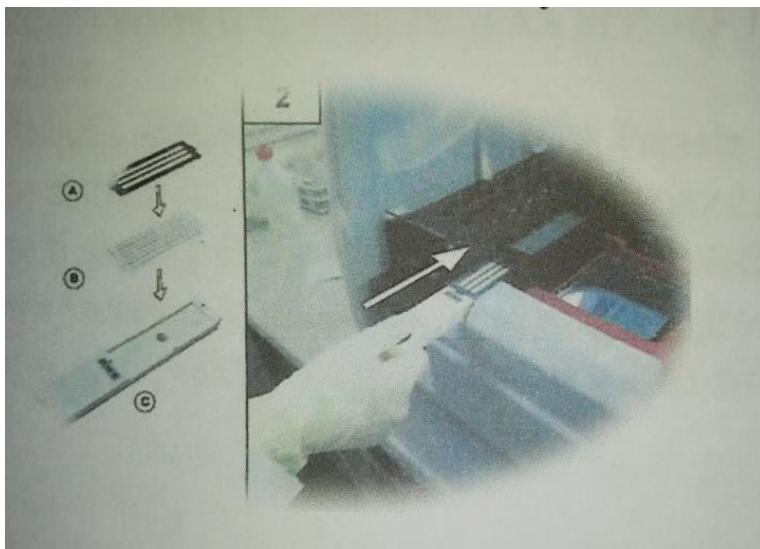
### 2.5.2 Pracovní postup elektroforézy bílkovin séra firmy Interlab

1) Séra pacientů se připraví podle pracovního listu. Zpracovávají se alikvoty sér v mikrozkušnicích (Eppendorf). Před zahájením analýzy se zkontroluje, zda je u všech vzorků změřená celková bílkovina v séru a dále případná hemolýza (nevadí do hodnoty sérového indexu 100, který se měří na analyzátoru Cobas 6000). Minimální množství séra potřebné pro provedení analýzy je alespoň 150  $\mu$ l. Mikrozkušnice se vzorkem se vkládají do zkumavek, které slouží jako nosič a umožňují zároveň načtení vzorků do analyzátoru pomocí čárového kódu, který se na ně nalepí. Připravené a zkontrolované vzorky se vloží do stojánku, celkem je možné provést analýzu 13 vzorků.

2) Příprava analyzátoru: Zkontrolují se reagenty a roztoky - destilovaná voda, odbarvovací roztok, promývací roztok a barva STAIN SOLUTION. Do obdélníkového držáku (Obr. 3) se vloží jednorázová plastová destička na vzorky. Do krajních pozic

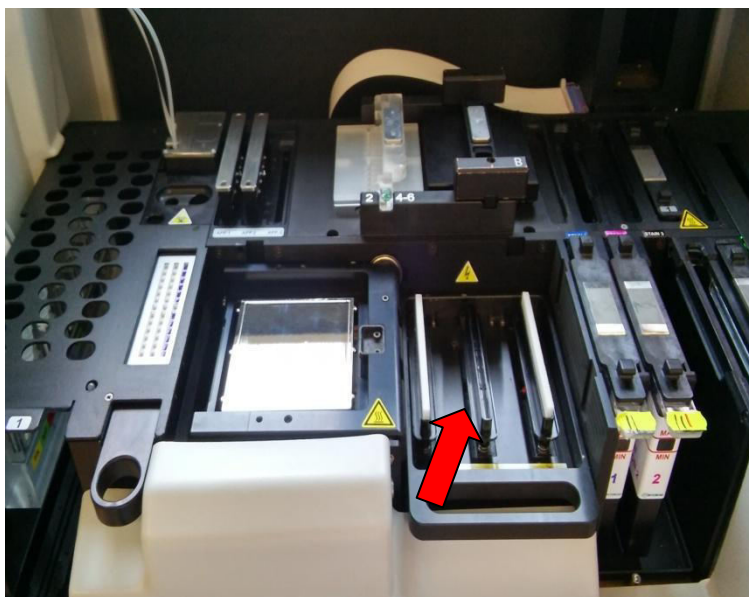


migrační komory se vloží dvě houbičky (Obr. 4). Připraví se gel - vyndá se z krabičky, osuší se filtračním papírem a umístí do držáku gelu č.1 (Obr. 5). Zapne se analyzátor.



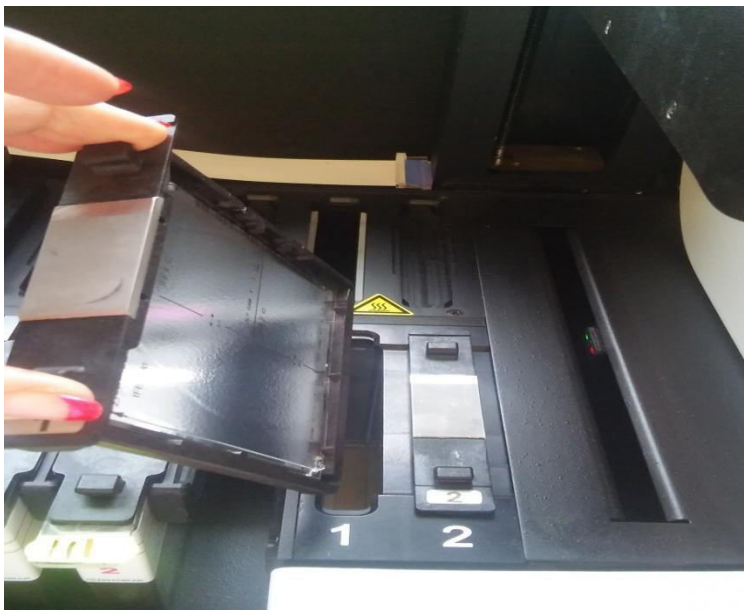
**Obrázek č. 3**  
vkládání obdélníkového držáku s jednorázovou destičkou na vzorky do analyzátoru Interlab G26 (Pracovní postup I-OKB-05, 2013).

Obr. 3 (Foto: autorka)



**Obrázek č. 4** migrační komora s houbičkami napuštěnými pufrem

Obr. 4 (Foto: autorka)



Obr. 5 (Foto: autorka)

**Obrázek č. 5** gelová plotna v držáku č. 1.

3) Příprava programu a zadání pacientů: V počítači se otevře program ELFOLAB a následně analyzátor INTERLAB G 26. Otevře se databáze, zvolí se nová databáze a běh 1, vybere se metoda „SÉROVÉ PROTEINY 6-13”. Poté se připojí komunikace softwaru a analyzátoru. Naběhne nová obrazovka, kde se zvolí program PIPETOVÁNÍ. Zkontroluje se číslo držáku v analyzátoru s číslem držáku v PC a potvrdí se pipetování. Objeví se nová obrazovka pro načtení čárových kódů vzorků. Zasune se stojánek se vzorky a zkontroluje načtení všech zkumavek. Spustí se START NANÁŠENÍ. Zvolí se SOUBOR IMPORT - IMPORT DAT - IMPORT. Provede se kontrola těchto dat (datum, jména, rodná čísla) a také hodnoty celkové bílkoviny séra. Vyplní se a uloží aktuální datum v ID gelu.

4) Vlastní analýza: Vlastní analýza trvá 35 minut. Na obrazovce je možné sledovat jednotlivé fáze a jejich dobu trvání.

5) Konec analýzy: Po provedení analýzy se výsledky zobrazí v programu – graficky i číselně (jednotlivé frakce vyjádřené v gramech a v procentech). Z analyzátoru se vyjme držák s gelem a provede se jeho kontrola. Gel se označí v dolní části datem zpracování a parafou obsluhy, která analýzu provedla. Poté se v programu provede důkladná kontrola výsledků každého vzorku, zda je rozdělení frakcí úplné, zda se nevyskytují abnormality. V případě nálezu monoklonální frakce (píku) vytiskne obsluha výsledek s vyznačením kvantity a předá k vyhodnocení a interpretaci (viz dále). Po kontrole výsledků obsluhou analyzátoru je možné výsledky pokynem EXPORT DAT přenést do laboratorního informačního systému (LIS). Analýza s naměřenými daty

se uloží do softwaru (vyplní se datum), po provedení údržbových kroků spojených s ukončením práce se analyzátor vypne (Pracovní postup I-OKB-05, 2013).

### **2.5.3 Interpretace výsledků elektroforézy bílkovin séra firmy Interlab .**

Gel s rozdělenými frakcemi (albumin, alfa1, alfa2, beta1, beta2 a gama) se nejprve zkontroluje vizuálně. V případě monoklonální frakce je na gelu viditelný, jasně ohraničený ostrý pruh (Obr. 6), nebo může splývat se zónou beta-globulinů (to zejména paraproteiny ve třídě IgA) (Obr. 9) nebo může mít charakter širší difúzní zóny. Monoklonální Ig lze nalézt mezi gama- až alfa-globuliny.

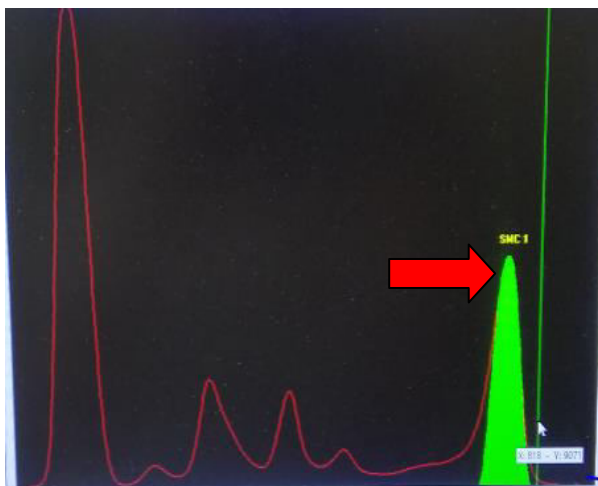
Při denzitometrickém vyhodnocení elektroforeogramu získáme relativní procenta zastoupení jednotlivých frakcí bílkovin (včetně M-Ig) a spolu s hodnotami celkové bílkoviny séra určíme i koncentraci jednotlivých frakcí (i M-Ig) v g/l. Tyto výsledky se přenášejí do softwaru v PC, kde navíc můžeme pozorovat grafické znázornění jednotlivých bílkovinných frakcí a monoklonální komponenty (pokud je přítomna). (Obr. 7, 8, 9).

Po prohlédnutí všech pacientů se exportují výsledky do LIS. V případě patologie se vkládá k výsledkům komentář - popis nálezu a případně se doporučí další vyšetření pro lepší diagnostiku a specifikaci (imunofixace, kvantitativní stanovení volných lehkých řetězců). Nakonec se výsledky potvrzují a odesílají se na oddělení (Maisnar a Tichý, 2012; Interlab: Postup elektroforézy..., 2016).



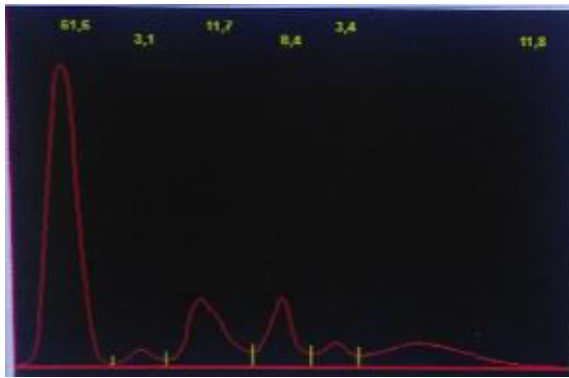
Obr. 6 (Foto: Autorka)

**Obrázek č. 6** gelová plotna s hotovými výsledky elektroforézy. Analyzátor separoval 13 vzorků (13 pacientů). 1 sloupec = 1 pacient. V každém sloupci vidíme jednotlivé zastoupení bílkovin - 6 frakcí: albumin a 5 globulinů - alfa1, alfa2, beta1, beta2 a gama. U prvního vzorku (pozice 1 zleva) nález monoklonální frakce v oblasti gamaglobulinů.



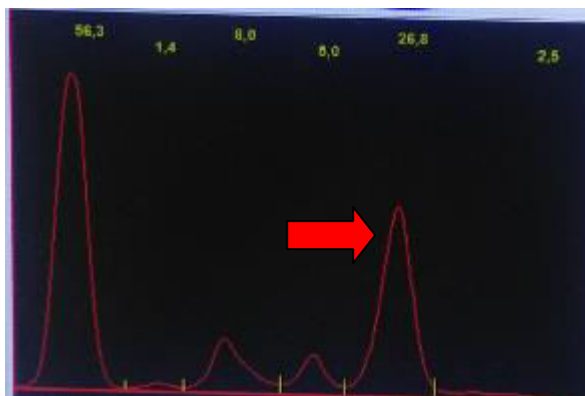
Obr. 7 (Foto: Autorka)

**Obrázek č. 7** graf jednotlivých frakcí (píků) elektroforézy - zleva - albumin, alfa1, alfa2, beta1, beta2 a gama s monoklonální frakcí v oblasti gamaglobulinů.



Obr. 8 (Foto: Autorka)

**Obrázek č. 8** graf jednotlivých frakcí elektroforézy s normálním rozložením imunoglobulinů. Zleva - albumin, alfa1, alfa2, beta1, beta2 a gama.



Obr. 9 (Foto: Autorka)

**Obrázek č. 9** graf jednotlivých frakcí elektroforézy s monoklonální frakcí v oblasti beta2 globulinů. Zleva - albumin, alfa1, alfa2, beta1, beta2 a gama.

## 2.6 *Imunofixace séra a moče*

Imunofixační elektroforetická technika byla použita již v roce 1969 Alperem a Johnsonem k detekci genetických polymorfismů ceruloplasminu a charakterizaci produktů konverze C3 složky komplementu. V roce 1976 byla imunofixace v laboratoři představena pro studium a identifikaci polyklonálních a monoklonálních gamapatií.

Vzorky pacientů s abnormálními výsledky - nadbytečnými proužky od Alfa1 až po Gama zónu elektroforézy sérových a močových proteinů - je nezbytně nutné dále vyšetřit. Imunofixační technika slouží k potvrzení těchto proteinů a specifikaci jejich biochemické identity - určení imunoglobulinové třídy M-Ig a určení antigenního typu lehkých řetězců Ig. Používá se také jako screening např. při podezření na AL amyloidózu, kdy bývá elektroforéza negativní z důvodu nízké kvantity M-Ig.

Monoklonální proužek se vyznačuje přítomností jediného typu imunoglobulinu. Přítomnost proužků jiných proteinů, než imunoglobulinů, nemůže být definována jako monoklonální.

Imunofixace je kombinací elektroforetické separace proteinů a následnou imunoprecipitací s využitím specifických antisér. Její citlivost je asi 50krát vyšší než elektroforéza a detekuje koncentrace M-Ig kolem 0,2 g/l, v moči kolem 0,04 g/l. Umožňuje rychlou interpretaci a rychlé výsledky. V zahuštěném vzorku moči lze lépe detekovat paraprotein typu lehkých řetězců (Bence-Jones protein). Výsledky mohou být ovlivněny stavem renálních funkcí, které jsou u monoklonálních gamapatií často alterovány. Metoda je využívána primárně k detekci monoklonálních gamapatií, dále pak k amplifikaci genetických studií, k výzkumu či forenzní medicíně (Špička et al., 2008; Šolcová, 2014; Příbalová informace: Interlab. Acid violet...,2016).

### **2.6.1 Princip imunofixace séra a moče firmy Interlab**

Princip imunofixační elektroforézy je vizualizace specifických proteinů tvorbou komplexů antigen-protilátka, která navazuje na jejich elektroforetickou separaci. Pacientské vzorky jsou aplikovány na agarózový gel do specifických stop a hlavní skupiny proteinů jsou elektroforézou separovány v alkalickém pH. Po ukončení migrace je ošetřena jedna stopa všech proteinů fixačním roztokem, která slouží jako referenční patern. Ostatní stopy jsou imunofixovány antiséry, které mají rozdílné vazebné specifity k doménám různých lidských imunoglobulinů: těžké řetězce IgG, IgA, IgM a lehké řetězce kappa a lambda. Interakce antigenu (imunoglobulin ve vzorku) a protilátky antiséra vede k tvorbě nerozpustného komplexu, který se v případě, že je vhodný poměr protilátek k antigenům, vysráží jako proužek. Rychlost precipitace závisí na teplotě, iontové síle roztoku a pH. Po imunofixaci se agarózové destičky denaturují a promyjí se od přebytečných rozpustných proteinů. Imunofixované (vysrážené) proteiny se barví a nadbytek barviva se odstraní odbarvovacím krokem. Gel je poté usušen.

Pozice obarvených imunofixačních proužků se porovnávají s proužky referenčního elektroforetického paternu na proteiny a tím se určí biochemická identita proteinů. U monoklonálních gamapatií se po vysrážení vytvoří obvykle přesně definované, ostré a oddělené vysrážené proužky. U polyklonálních gamapatií se na rozdíl od MG vytvoří po vysrážení difúzní vysrážené proužky (Příbalová informace: Interlab. Acid violet, 2016).

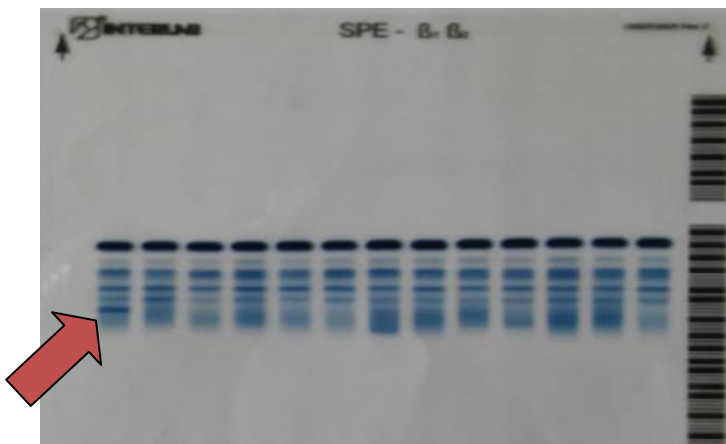
### 2.6.2 Interpretace výsledků imunofixace séra a moče firmy Interlab

Pro potvrzení nebo vyloučení přítomnosti monoklonálního Ig v elektroforeogramu by měla následovat imunofixační elektroforéza. Je nezbytná pro identifikaci imunoglobulinové třídy a určení antigenního typu řetězců Ig. Metodou imunofixace lze také stanovit M-protein, který nelze při elektroforéze detekovat z důvodu jeho nízké koncentrace. Slouží tedy i jako screening např. u podezření na AL amyloidózu. Další indikací také může být negativní rutinní elektroforéza u pacientů s léčeným MM (potvrzení kompletní remise) (Maisnar et al., 2012).

Výsledky imunofixace hodnotí na našem oddělení vysokoškolsky vzdělaný pracovník, se kterým jsem výsledky konzultovala.

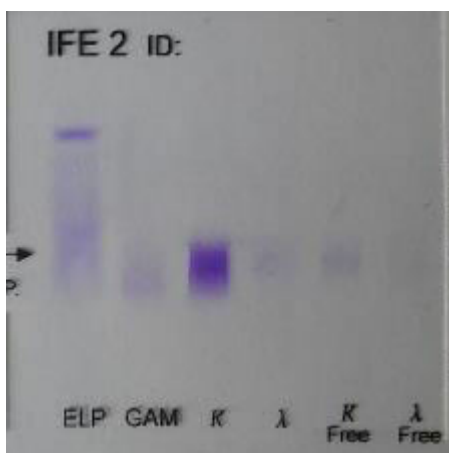
Přikládám vybrané obrázky s výsledky 4 pacientů. Na obrázcích můžeme vidět výsledky elektroforézy, došetření imunofixace séra a případně imunofixace moče.(Obr. 10 - 18)

#### Pacient s pořadovým číslem 113.



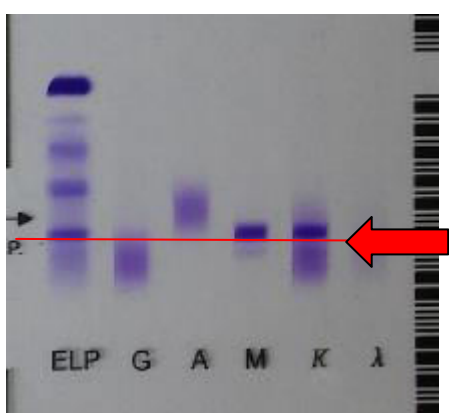
**Obrázek č. 10** výsledek elektroforézy - monoklonální frakce v oblasti gamaglobulinů - paraprotein 9,24% (6,3 g/l) na pozici 1.

Obr.10 (Foto: autorka)



Obr.11 (Foto: autorka)

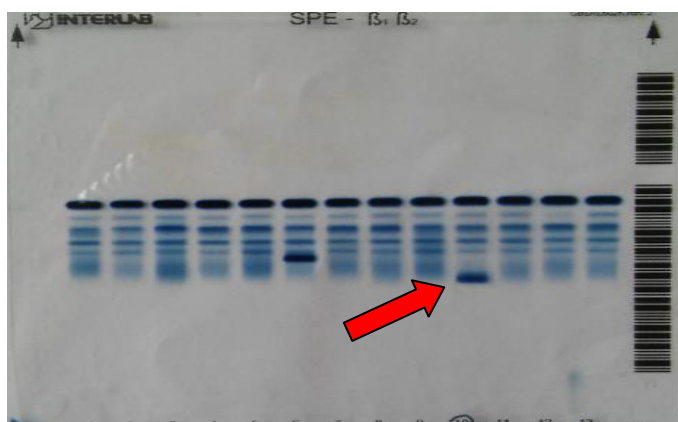
**Obrázek č. 11** imunofixační elfo moče - kvantitativní proteinurie 0,157 g/l. Albuminurie 10,6 mg/l. Moč zahuštěna na koncentraci celkové bílkoviny 0,808 g/l. Na imunofixační elektroforéze močových proteinů přítomen albumin, gamaglobuliny a lehké+volné lehké řetězce kappa. Monoklonální frakce nenalezena.



Obr.12 (Foto: autorka)

**Obrázek č. 12** imunofixační elektroforézy séra - na imunofixační elektroforéze sérových proteinů zjištěna monoklonální frakce v oblasti IgM a lehkých řetězců kappa. Dle elfo séra je koncentrace paraproteinu 6,3 g/l.

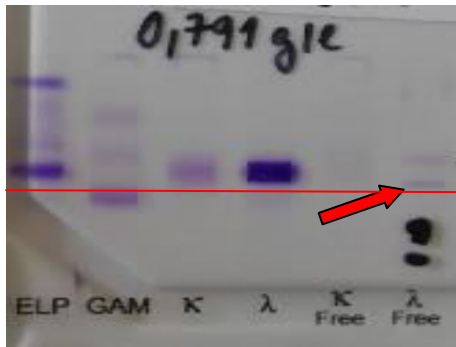
### Pacient s pořadovým číslem 93.



Obr. 13 (Foto: autorka)

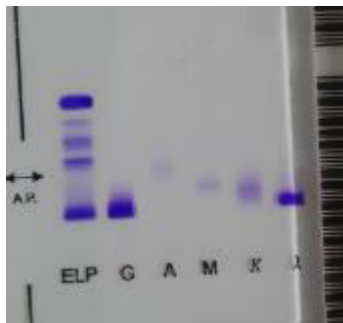
**Obrázek č. 13** výsledek elektroforézy - silná monoklonální frakce v oblasti gamaglobulinů - paraprotein 18,1% (15,5 g/l) na pozici 10.





Obr. 14 (Foto: autorka)

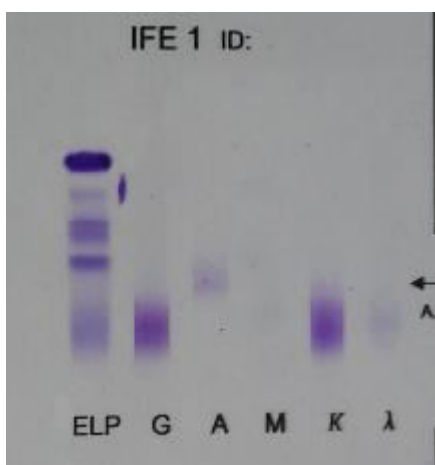
lehkých řetězců lambda (Bence-Jonesova bílkovina), její koncentrace je přibližně 0,1 g/l.



Obr. 15 (Foto: autorka)

Obrázek č. 15 výsledek imunofixační elektroforézy séra - na imunofixační elektroforéze sérových proteinů zjištěna monoklonální frakce v oblasti IgG a lehkých řetězců lambda. Dle elfo séra je koncentrace paraproteinu 15,5 g/l.

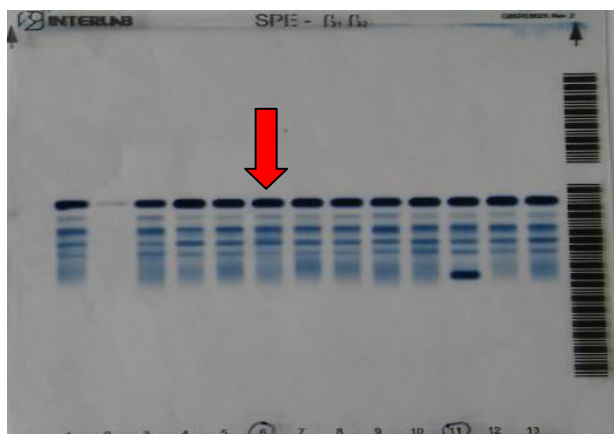
#### Pacient s pořadovým číslem 107.



Obr. 16 (Foto: autorka)

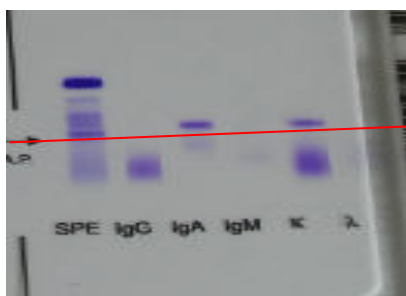
Obrázek č. 16 výsledek imunofixační elektroforézy séra - na imunofixační elektroforéze sérových proteinů přítomno standardní rozložení imunoglobulinů a lehkých řetězců, monoklonální frakce nenalezena.

## Pacient s pořadovým číslem 92



Obr. 17 (Foto: autorka)

**Obrázek číslo 17** výsledek elektroforézy - na elektroforeogramu sérových proteinů (pozice 6) není monoklonální frakce viditelná, avšak následná imunofixace bílkovin séra prokázala výskyt monoklonální frakce v oblasti beta2 globulinů. Dle doporučení se paraprotein kvantifikuje jako celá beta2 frakce, tzn. 4,5% (2,7 g/l), reálně je však hodnota nižší.



Obr. 18 (Foto: autorka)

**Obrázek č. 18** výsledek imunofixační elektroforézy - na imunofixační elektroforéze sérových proteinů zjištěna monoklonální frakce v oblasti IgA a lehkých řetězců kappa. Dle elfo séra je koncentrace paraproteinu 2,7 g/l.

### 2.7 Kvantitativní stanovení volných lehkých řetězců v séru na systémech Roche cobas® c

Imunoglobuliny se skládají ze dvou identických těžkých řetězců ( $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  nebo  $\mu$ ), které určují třídu imunoglobulinu, a ze dvou identických lehkých řetězců ( $\kappa$  nebo  $\lambda$ ). Dva těžké řetězce jsou kovalentně spojeny v tzv. pantové (hinge) oblasti a každý z lehkých řetězců je kovalentně vázaný na těžký řetězec.

U zdravých lidí se v séru vyskytují většinou lehké řetězce vázané právě na těžké řetězce, ale mohou se vyskytovat i nízké hladiny volných řetězců (free light chains, FLC). To je důsledkem nadprodukce a sekrece FLC plazmatickými buňkami. Molekulová hmotnost obou lehkých řetězců je 22,5 kDa. Sérové volné lehké řetězce kappa se vyskytují jako monomery a volné lehké řetězce lambda se vyskytují jako kovalentně spojený dimer s molekulovou hmotností 45 kDa. Proto mají odlišnou

rychlost glomerulární filtrace a rozdílný poměr v séru u volných lehkých řetězců  $\kappa$ -FLC/ $\lambda$ -FLC (0,625) a u vázaných lehkých řetězců (2,0). Tento test je mnohem citlivější než metody SPE (serum protein electrophoresis) a IFE. Jeho zavedení bylo průlomem v diagnostice a léčbě MG, především pak pro diagnózu MM. Pacienti s abnormálně vysokým poměrem volných lehkých řetězců mívají agresivnější progresi a nepříznivou prognózu.

Zvýšené hodnoty monoklonálních FLC v séru jsou spojeny s maligní proliferací plazmatických buněk, AL amyloidózou a chorobou, která je spojená s tvorbou depozit lehkých řetězců. Zvýšené hodnoty polyklonálních FLC mohou být asociovány s autoimunitními chorobami, jako je např. systémový lupus erythematoses (SLE). (Příbalová informace: Souprava Freelite..., 2014; Wang et al., 2016; Milani et al., 2016)

### ***2.7.1 Princip kvantitativního stanovení volných lehkých řetězců v séru na systémech Roche cobas® c***

Metoda je založena na turbidimetrickém stanovení koncentrace rozpustného antigenu s testovaným vzorkem, který obsahuje příslušnou protilátku v reakční nádobce nebo kyvetě. Kyvetou prochází světelný paprsek, který je rozptýlen v důsledku vytváření nerozpustných imunokomplexů. Rozptyl světla je monitorován měřením snížení intenzity dopadajícího světelného paprsku. Protilátka v kyvetě je v nadbytku, proto množství vzniklých imunokomplexů je úměrné koncentraci antigenu.

Nejprve se provede měření řady kalibrátorů o známých koncentracích antigenu, které jsou nezbytné pro konstrukci kalibrační křivky, kdy je vynášen měřený rozptyl světla oproti koncentraci antigenu. Neznámé koncentrace vzorků se odečítají z kalibrační křivky.

Citlivost turbidimetrických stanovení se může zvýšit použitím tzv. částicového zesílení, kde principem je navázání protilátky na částice o vhodné velikosti. To zvyšuje relativní signál rozptylu světla při reakci antigenu s protilátkou. (Příbalová informace: Souprava Freelite..., 2014)

### ***2.7.2 Interpretace výsledků kvantitativního stanovení volných lehkých řetězců v séru na systémech Roche cobas® c***

Po ukončení analýzy se výsledky importují do LIS, kde jsou kontrolovány, potvrzovány a následně odesílány vysokoškolsky vzdělaným pracovníkem, se kterým jsem výsledky konzultovala.

Výsledky volných řetězců kappa, lambda a jejich poměr se hodnotí podle fyziologického rozmezí hodnot, které nalezneme v (Tab. 6). Hodnoty VLR a poměru odečítáme dle tabulky dodané od výrobce The Binding Site Group Ltd - interpretace měření koncentrace volných lehkých řetězců v séru (Tab. 5).

Tabulka č. 5 Interpretace měření koncentrace volných lehkých řetězců v séru.

Kappa	Lambda	Poměr $\kappa/\lambda$	Interpretace
normální	normální	normální	normální sérum
nízké	nízké	normální	suprese BM bez MG
		vysoké	monoklonální gamapatie
		nízké	
	normální	normální	normální sérum
		nízké	monoklonální gamapatie
vysoké	nízké		
normální	nízké	vysoké	normální sérum
		normální	
	normální	vysoké	monoklonální gamapatie
		nízké	
		vysoké	normální
nízké	monoklonální gamapatie		
vysoké	nízké	vysoké	monoklonální gamapatie
	normální	vysoké	monoklonální gamapatie
		normální	plg nebo renální poškození
	vysoké	normální	
		vysoké	MG s renálním poškozením
		nízké	

(Příbalová informace: Freelite™, 2011)

MG = monoklonální gamapatie

BM = kostní dřeň

plg = polyklonální imunoglobulin



s útlumem kostní dřeně



bez útlumu kostní dřeně

Tabulka č. 6 Rozmezí normálních hodnot pro stanovení Freelite

<b>Dospělí, normální sérum</b>	<b>Průměrná koncentrace</b>	<b>Medián koncentrace</b>	<b>Rozsah 95. percentilu</b>
Volné kappa	8,36 (mg/l)	7,30 (mg/l)	3,30-19,40 (mg/l)
Volné lambda	13,43 (mg/l)	12,40 (mg/l)	5,71-26,30 (mg/l)
Poměr* kappa/lambda	<b>Průměr</b>	<b>Medián</b>	<b>Rozmezí</b>
	0,63	0,60	0,26-1,65

(Příbalová informace: Freelite™, 2011)

## 2.8 Kvantitativní stanovení jednotlivých imunoglobulinů

### 2.8.1 IgA

Zvýšené hladiny polyklonálního IgA mohou provázet chronické infekce, autoimunitní poruchy (revmatoidní artritida, systémový lupus erythematoses), chronická jaterní onemocnění, Wiscott-Aldrichův syndrom a sarkoidózy. Monoklonální IgA narůstá v případě IgA myelomu.

Snížené hladiny IgA mohou být způsobeny gastroenteropatiemi se ztrátami proteinů nebo ztrátami kůží (popáleniny). Dále při snížené syntéze IgA u kongenitálních imunodeficitních poruch, jakou je agamaglobulinemie Brutonova typu. Snížené hodnoty se mohou také vyskytovat jako opožděný začátek syntézy IgA u dětí ve srovnání s dospělými. (Příbalová informace: IGA-2, 2015).

### 2.8.2 IgG

Zvýšená hodnota polyklonálních IgG v séru se vyskytuje u systémového lupusu erythematoses, infekčních chorob, cystické fibrózy a chronického onemocnění jater. Monoklonální IgG narůstá při IgG-myelomu.

Snížená syntéza IgG se vyskytuje při deficitech jednotlivých podtříd IgG, jako je agamaglobulinemie Brutonova typu, u získaných kongenitálních imunodeficitních

poruch. Snížené hodnoty IgG v séru je možné pozorovat při jejich ztrátách (enteropatie, nefrotický syndrom, popáleniny), dále při zvýšeném metabolismu (Wiskott-Aldrichův syndrom, přítomnost protilátek proti imunoglobulinům, myotonická dystrofie). (Příbalová informace: IGG-2, 2015).

### **2.8.3 IgM**

Zvýšené koncentrace polyklonálního IgM se vyskytují u parazitické, virové nebo bakteriální infekce, revmatoidní artritidy, onemocnění jater, cystické fibrózy, lupénky a heroinové toxikémie. Monoklonální IgM je zvýšený u Waldenströmovy makroglobulinémie.

Snížené hladiny mohou být způsobeny zvýšenou ztrátou IgM (popáleniny, enteropatie se ztrátou proteinů), sníženou syntézou IgM (kongenitální a získané formy imunodeficiency), opožděný začátek syntézy IgM z důvodu nižších koncentrací IgM u dětí ve srovnání s dospělými. (Příbalová informace: IGM-2, 2015).

### **2.8.4 Princip testu IgA, IgG a IgM na systémech cobas 501/502**

Principem testu je imunoturbidimetrické stanovení. Protilátky proti IgA reagují s antigenem ve vzorku. Výsledkem je aglutinace, vznik komplexu antigen/protilátka a jeho turbidimetrické měření. Urychlení reakce a dosažení jejího koncového bodu dosáhneme přidáním PEG (polyethylenglykol). Ten také zvyšuje citlivost metody a snižuje nebezpečí falešně negativních výsledků při nadbytku antigenu. (Příbalová informace: IGA-2, IgM-2, IgG-2, 2015).

### 3 Výsledky

Celkem bylo vyšetřeno na Oddělení klinické biochemie Nemocnice Písek a.s. od ledna 2016 do dubna 2016 123 vzorků na přítomnost monoklonálního imunoglobulinu. Fyziologických bylo 65 vzorků. 8 bylo s nálezem polyklonálního zmnožení imunoglobulinů. Vzorků s nálezem paraproteinu v séru, v moči nebo s patologickými hodnotami VLR a jejich poměru bylo celkem 50. Z této skupiny měli 3 pacienti fyziologické výsledky VLR a nálezy na ELFO a IFE. Pacientů, kteří měli patologické hodnoty VLR a jejich poměru a byli bez nálezu paraproteinu na ELFO a IFE bylo celkem 15. Pacientů, kteří byli zařazeni do kategorie jiný rozpor, jelikož měli nález monoklonální komponenty pouze v moči nebo jim některá z metod nebyla vůbec indikována lékařem, bylo celkem 32. Ze souboru těchto 32, bylo 17 pacientů, kteří měli nález paraproteinu na ELFO, IFE i patologické hodnoty VLR a jejich poměru. U 2 pacientů byla nalezena Bence-Jonesova bílkovina (volné lehké řetězce) na IFE v moči, sérum bylo fyziologické a VLR nebylo indikováno lékařem. U dalších 13 pacientů nebylo vyšetření VLR vůbec indikováno lékařem a proto nelze posoudit korelaci jejich výsledků s nálezy na ELFO a IFE. Hodnoty jednotlivých vyšetření uvádí tabulka č. 7 a diagnostické nálezy tabulka č. 8 (viz příloha). Vzorky byly rozděleny do čtyř kategorií a čtvrtá kategorie dále do osmi podkategorií. Jednotlivé kategorie patologických nálezů s počtem pacientů uvádí tabulka č. 9.



Tabulka 9. Jednotlivé kategorie patologických nálezů s počtem pacientů

Kategorie	Popis kategorie	Počet
1	negativní ELFO, negativní IFE/pozitivní VLR	15
2	pozitivní ELFO, pozitivní IFE/negativní VLR	3
3	jiná polyklonální zmnožení imunoglobulinů	8
4	jiné rozpory ve výsledcích	33
4.1	pozitivní ELFO, pozitivní IFE/VLR nevyšetřeno	9
4.2	pozitivní moč/negativní sérum	2
4.3	pozitivní ELFO, pozitivní IFE, pozitivní VLR/moč nevyšetřena	11
4.4	negativní ELFO, pozitivní IFE, pozitivní VLR	1
4.5	negativní ELFO, pozitivní IFE/VLR nevyšetřeno	1
4.6	pozitivní ELFO, pozitivní IFE, pozitivní VLR/negativní moč	2
4.7	vše pozitivní	3
4.8	pozitivní ELFO, pozitivní IFE, pozitivní moč/VLR nevyšetřeno	3

## 4 Diskuse

Monoklonální gamapatie je stále aktuálnější téma. Diagnostika i terapie onemocnění s ní spojených má neustávající progres. Její včasný záchyt je velmi důležitý pro zahájení léčby a pro delší přežití pacienta (Tichý, 2012).

Tato porucha se vyskytuje u 3,2% osob ve věku > 50 let. Zvýšení pouze jednoho typu volného lehkého řetězce imunoglobulinu ( $\kappa$  nebo  $\lambda$ ) je zjištěno u 0,7-0,8% osob starších 50 let. Většina osob s nálezem monoklonálního imunoglobulinu splňuje kritéria tzv. monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS). Toto onemocnění však není pro svého nositele závažné jen zvýšeným rizikem transformace v MM nebo jinou vážnou hematologickou chorobu, ale i toxicitou monoklonální komponenty. Ta může poškozovat organismus svou autoprotilátkovou aktivitou, svými depozity v orgánech (např. poškození ledvin), vazbou na určité antigeny (např. nemoc chladových aglutininů), anebo svými fyzikálními vlastnostmi (např. kryoglobulinémie). Pokud je pacientovi diagnostikována MGUS je doporučeno sledování, jehož cílem je včasné podchycení nejen transformace do symptomatického MM nebo jiného závažného maligního onemocnění, ale i zamezení vzniku těchto komplikací. Premaligní klon plazmocytů v kostní dřeni také způsobuje její změny a ty mají přímé dopady na postižené osoby. U osob s MGUS je častý výskyt osteoporózy a oproti ostatní populaci také zvýšené riziko fraktur kostí. Dále je u postižených s MGUS zaznamenáno větší riziko bakteriálních infekcí a tromboembolických komplikací oproti stejně staré populaci bez MGUS (Adam et al., 2014).

Nejdůležitějšími metodami pro stanovení a kvantifikaci monoklonálního Ig jsou elektroforéza sérových proteinů, imunofixační elektroforéza bílkovin séra a moče, imunoturbidimetrie a imunonefelometrie (Šumná et al., 2006)

Celkem bylo vyšetřeno na Oddělení klinické biochemie Nemocnice Písek a.s. od ledna 2016 do dubna 2016 123 vzorků na přítomnost monoklonálního imunoglobulinu. Fyziologických bylo 65 vzorků. 8 bylo s nálezem polyklonálního zmnožení imunoglobulinů. Vzorků s nálezem paraproteinu v séru, v moči nebo s patologickými hodnotami VLR a jejich poměru bylo celkem 50. Z této skupiny měli 3 pacienti fyziologické výsledky VLR a nálezy na ELFO a IFE. Pacientů, kteří měli patologické hodnoty VLR a jejich poměru a byli bez nálezu paraproteinu na ELFO a IFE bylo celkem 15. Pacientů, kteří byli zařazeni do kategorie jiný rozpor, jelikož měli nález monoklonální komponenty pouze v moči nebo jim některá z metod nebyla vůbec

indikována lékařem, bylo celkem 32. Ze souboru těchto 32, bylo 17 pacientů, kteří měli nález paraproteinu na ELFO, IFE i patologické hodnoty VLR a jejich poměru. U 2 pacientů byla nalezena Bence-Jonesova bílkovina (volné lehké řetězce) na IFE v moči, sérum bylo fyziologické a VLR nebylo vyšetřeno. U dalších 13 pacientů nebylo vyšetření VLR vůbec indikováno lékařem a proto nelze posoudit korelaci jejich výsledků s nálezy na ELFO a IFE.

V souboru pacientů jsem si všímala především korelace VLR a jejich poměru k nálezu na ELFO a IFE. V literatuře jsem si našla údaje o hodnocení kategorií výsledků stanovení hodnot VLR a jejich poměru a i podle mých výsledků usuzuji (viz stanovená hypotéza), že abnormální hodnoty poměru  $\kappa/\lambda$  a jejich zvýšené koncentrace spíše podporují diagnózu monoklonální gamapatie (a předpokládala bych pozitivní nález monoklonální komponenty i na ELFO a IFE). Abnormální hodnoty poměru  $\kappa/\lambda$  a jejich zvýšené koncentrace tedy vyžadují podrobnější šetření (pokud diagnóza není přesně určena), jelikož hraničně zvýšené hodnoty VLR se mohou vyskytovat např. také při poškození ledvinových funkcí. V každém případě bych doporučila, pokud jsou zvýšené koncentrace  $\kappa$  a  $\lambda$  a hodnoty jejich poměru ( $\kappa/\lambda$ ) jsou abnormální, provést také příslušné testy renální funkce.

I když se v mém souboru vyskytli pacienti s nefrologickou diagnózou (chronické onemocnění ledvin), v 99% případů se jednalo o pacienty s diagnózou hematologickou. Ti jsou pro své onemocnění nadále sledováni a vyšetřováni v hematologické poradně. Dále jsem zjistila, že pacientům, kteří mají nález monoklonálního imunoglobulinu na ELFO, IFE a zároveň patologické hodnoty VLR a jejich poměru, bylo ve většině případů diagnostikováno onemocnění monoklonální gamapatie nejasného významu.

## 5 Závěr

Závěrem mohu říci, že všechny tři metody k průkazu, kvantifikaci a specifikaci monoklonálních imunoglobulinů, i metody podporující diagnostiku monoklonálních gamapatií (stanovení CB, albuminu a jednotlivých imunoglobulinů) jsem si řádně vyzkoušela. Získala jsem zkušenosti o zpracování vzorku, přípravě a manipulaci s analyzátořem v praxi. Seznámila jsem se se všemi fázemi laboratorního procesu (preanalytická, analytická i postanalytická fáze) od příjmu a kontroly žádanky a dodaného materiálu, zápisu požadavků do LIS, přípravu pracovního listu a pomůcek pro provedení analýzy, dále zpracování vzorků a ukončení analýzy. Po celou dobu jsem dodržovala pracovní postupy a zásady správné laboratorní praxe při manipulaci se vzorky, jejich zpracování i uchování po analýze. Po ukončení analytické fáze jsem získané výsledky vyhodnocovala a konzultovala s odbornými pracovníky (lékaři a VŠ analytiky) Oddělení klinické biochemie Nemocnice Písek a.s.

Komplexní diferenciální diagnostika monoklonálních gamapatií je velmi důležitá pro včasný záchyt nemoci a pro následné monitorování průběhu. Jako pozitivní vnímám fakt, že Oddělení klinické biochemie Nemocnice Písek a.s. má ve své nabídce metody nejen základní, ale i metody doplňující diagnózu monoklonálních gamapatií. Ke komplexní diagnostice přispívá také to, že jsou vyšetřovány nejen séra, ale i vzorky močí pacientů.

V souboru pacientů, s jejichž daty jsem pracovala, korelovalo 17 výsledků naměřených sérových hladin volných lehkých řetězců kappa a lambda a jejich poměru s nálezy na elektroforéze bílkovin a následné imunofixační elektroforéze. U 15 pacientů výsledky hodnot VLR (a jejich poměru) s nálezy na ELFO a IFE nekorelovalo. Jednou z příčin může být poškození ledvin, při kterém mohou být hodnoty VLR a poměru rovněž zvýšené, přitom nález M-Ig a diagnóza MG nemusí být vůbec prokázána.

## 6 Seznam použitých zdrojů

1. ADAM, Z., 1999. *Mnohočetný myelom a další monoklonální gamapatie*. Brno: Masarykova univerzita. 19-23, 39-40, 42, 57, 65, 67-68, 71, 257 s. ISBN 80-210-2034-2

2. ADAM, Z., et al., 2014. *Monoklonální gamapatie nejistého významu a asymptomatický mnohočetný myelom z pohledu roku 2014* [online]. Praha: Vnitřní lékařství [cit. 2017-03-20]. Dostupné z: [http://www.vnitrnilekarstvi.eu/vnitri-lekarstvi-clanek/monoklonalni-gamapatie-nejisteho-vyznamu-a-asymptomaticky-mnohocetny-myelom-z-pohledu-roku-2014-50195?confirm\\_rules=1](http://www.vnitrnilekarstvi.eu/vnitri-lekarstvi-clanek/monoklonalni-gamapatie-nejisteho-vyznamu-a-asymptomaticky-mnohocetny-myelom-z-pohledu-roku-2014-50195?confirm_rules=1)

3. BLAŽOVÁ, K., 2012. *Základní koagulační vyšetření* [online]. Propedeutika [cit. 2017-03-16]. Dostupné z: <http://new.propedeutika.cz/?p=534>

4. BOWEN R. A. DVM PhD, 2000. *Principles of Gel Electrophoresis* [online]. Fort Collins: Department of Biomedical Sciences [cit. 2017-03-12]. Dostupné z: <http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/genetics/biotech/gels/principles.html>

5. CARBERA, Q., MAKRO, M., HEBERT, B., CORNET, E., COLLIGNON, TROUSSARD, X., 2014. *Epidemiology of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance (MGUS): The experience from the specialized registry of hematologic malignancies of Basse-Normandie (France)* [online]. Caen, France: Service d'hematologie Clinique, CHU de Caen [cit. 2017-04-16]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24880205>

6. ČEŠKA R., et al., 2010. *Onemocnění lymfoproliferativní nádorová*. [online]. Praha: Interna [cit. 2017-04-05]. Dostupné z: [http://www.medicabaze.cz/index.php?sec=term\\_detail&categId=14&cname=Hematologie+a+transfuzn%C3%AD+1%C3%A9ka%C5%99stv%C3%AD&pgn=60&termId=3528&tname=Onemocn%C4%9Bn%C3%AD+lymfoproliferativn%C3%AD+n%C3%A1dov%C3%A1&h=empty#jump](http://www.medicabaze.cz/index.php?sec=term_detail&categId=14&cname=Hematologie+a+transfuzn%C3%AD+1%C3%A9ka%C5%99stv%C3%AD&pgn=60&termId=3528&tname=Onemocn%C4%9Bn%C3%AD+lymfoproliferativn%C3%AD+n%C3%A1dov%C3%A1&h=empty#jump)

7. DRESLEROVÁ, E., 2017. *Monoklonální gamapatie - diagnostika a monitorování stanovením volných lehkých řetězců (FLC)* [online]. Synlabianer [cit. 2017-04-04]. Dostupné z: <http://www.synlabianer.cz/clanky/monoklonalni-gamapatie-diagnostika-a-monitorovani-stanovenim-volnych-lehkych-retezcu-flc>

8. ENGLIŠ, M., GRANÁTOVÁ, J., 2006. *Monoklonální gamapatie* [online]. MZ ČR: Datový standard [cit. 2017-03-20]. Dostupné z: <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/hypertext/200610/hypertext/MEABT.htm>

9. FABIAN, P., MOULIS, M., 2006. Možnosti histologického vyšetření kostní dřenež při diagnostice mnohočetného myelomu [online]. *Vnitřní Léč* 2006. 52 (S2), 67 [cit. 2017-03-16]. ISSN 0042-773X. Dostupné z [http://www.prolekare.cz/pdf?ida=vl\\_06\\_11\\_26.pdf](http://www.prolekare.cz/pdf?ida=vl_06_11_26.pdf)

10. FERENČÍK, M., c2011. *Ilustrovaný slovník imunologie a alergologie*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Galén. 173, 175-176, 285 s. ISBN 978-80-7262-762-2.

11. HOŘEJŠÍ, V., BARTŮŇKOVÁ J., BRDIČKA T., ŠPÍŠEK R., 2013. *Základy imunologie*. 5. vydání. Praha: Triton. 24-25, 64-67, 69-70, 164-165 s. ISBN 978-80-7387-713-2.

12. ION, MEDICAL TRIBUNE, 2011. *Zlom u mnohočetného myelomu - vyléčení je reálné* [online]. Praha: Medical Tribune [cit. 2017-03-20]. Dostupné z: <http://www.tribune.cz/clanek/25075-zlom-u-mnohocetneho-myelomu-vyleceni-je-realne>

13. KAZANDJIAN, D., 2016. *Multiple myeloma epidemiology and survival: A unique malignancy* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, US National Library of Medicine [cit. 2017-03-16]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28061985>

14. KVASNICOVÁ V., 2002. *Albumin v plazmě* [online]. Praha: Odbor informatiky. Ministerstvo zdravotnictví ČR [cit. 2017-03-18]. Dostupné z <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD/hypertext/KVABL.htm>
15. Lab Test Online®<sup>CZ</sup>, 2010. *Mnohočetný myelom* [online]. Praha: Lab Test Online®<sup>CZ</sup> [cit. 2017-03-20]. Dostupné z: [http://www.labtestsonline.cz/condition/Condition\\_MultipleMyeloma.html?idx=1](http://www.labtestsonline.cz/condition/Condition_MultipleMyeloma.html?idx=1)
16. LEDVINA, M., STOKLASOVÁ M., CERMAN J., 2004. *Biochemie pro studující medicíny*. Praha: Karolinum. 2 sv. 385-389, 391 ISBN 80-246-0850-2.
17. Leukaemia Foundation Australia, © 2017. Monoclonal gammopathy of unknown significance (MGUS) [online]. Sydney: Leukaemia Foundation [cit. 2017-03-20]. Dostupné z: <http://www.leukaemia.org.au/blood-cancers/myeloma/mgus>
18. MAISNAR, V., 2000. *Diagnostika monoklonálních gamapatií - GUIDELINES* [online]. Hradec Králové: OKH FN Hradec Králové [cit. 2017-03-16]. Dostupné z: <https://www.fnhk.cz/kliniky/okh/diagnostika%20monoklonalnich%20gamapatii.htm>
19. MAISNAR, V., HÁJEK, R., 2008. Změny v diagnostických kritériích a kritériích léčebné odpovědi u mnohočetného myelomu [online]. *Klinická biochemie a metabolismus*. 16 (2), 84 [cit. 2017-03-20]. ISSN 1210-7921. Dostupné z: [http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2008/2-08/2008-2\\_84\\_Maisnar.pdf](http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2008/2-08/2008-2_84_Maisnar.pdf)
20. MAISNAR, V. et al., 2011. RMG- Registr Monoklonálních Gamapatií [online]. *Onkologie*. 5 (3), 138 [cit. 2017-03-16]. ISSN 1802-4475. Dostupné z: <http://www.solen.cz/pdfs/xon/2011/03/04.pdf>
21. MAISNAR, V., TICHÝ M., 2012. *Monoklonální imunoglobuliny - výskyt, význam a možnosti jejich průkazu*. Praha: Nucleus HK. 9-11, 22-27, 30, 38, 43-45, 79, 81, 86, s. ISBN 978-80-87009-87-1.

22. MAISNAR, V., 2016. *Česká Myelomová Skupina na poli mnohočetného myelomu* [online]. Lázně Bělohrad: IV. interní hematologická klinika LF UK a FN Hradec Králové. 19 s [cit. 2017-03-20]. Dostupné z: <http://www.myeloma.cz/res/file/2016/pacient/2-cmg-a-mm--2016-maisnar.pdf>

23. MAISNAR V., 2016. Nová diagnostická kritéria mnohočetného myelomu[online]. *Klinická biochemie a metabolismus*. 24 (3), 127 [cit. 2017-03-20]. ISSN 1210-7921. Dostupné z: <http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2016/2016-3/KBM-3-2016-Maisnar-127.pdf>

24. MILANI, P., PALLADINI, G., MERLINI, G., 2016. *Serum-free light-chain analysis in diagnosis and management of multiple myeloma and related conditions* [online]. Pavia, Italy: University of Pavia [cit. 2017-04-16]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27467897>

25. MASOPUST, J., 2012. *Využití stanovení volných lehkých řetězců v diagnostice a monitorování léčby mnohočetného myelomu* [online]. Ústí nad Labem: Krajská zdravotní a.s. - Masarykova nemocnice. 12 s [cit. 2017-04-16]. Dostupné z: <http://klinickabiochemia.sk/download/seminare/sem02.pdf>

26. OLDŘICHOVÁ, T., 2016. *Léčba mnohočetného myelomu je v ČR na špičkové úrovni* [online]. Praha: Medical Tribune [cit. 2017-03-20]. Dostupné z: <http://www.tribune.cz/clanek/38793>

27. OTOVÁ, B., MIHALOVÁ R., 2012. *Základy biologie a genetiky člověka*. 3. vydání. V Praze: Karolinum. 141-142 s. ISBN 978-80-246-2109-8.

28. PENKA, M., TESAŘOVÁ E. a kol., 2011. *Hematologie a transfuzní lékařství I, Hematologie*. Praha: Grada. 24-26 s. ISBN 978-80-247-3459-0.

29. Pracovní postup: I-OKB-05. *Návod na elektroforézu bílkovin-InterlabG26*. Verze č.:01. 2013



30. Příbalová informace: Interlab *Acid violet immunofixation postup pro sérum a koncentrovanou moč na: Interlab G26, Interlab G26 Easy Fix*. Revize PK119.16. Interlab S.r.l. Itálie. 2016
31. Příbalová informace: Interlab *Postup elektroforézy sérových proteinů  $\beta$ 1- $\beta$ 2 a koncentrované moči - pro: Interlab G26*. Revize PK127.14. Interlab S.r.l. Itálie. 2016
32. Příbalová informace: Roche s.r.o *ALB2 pro analyzátory cobas c 311/501 a c 502*. Verze 10. Roche s.r.o. 2015
33. Příbalová informace: Roche s.r.o. *IGA-2 pro analyzátory cobas c 311/501 a c502*. Verze 10. Roche s.r.o. 2015
34. Příbalová informace: Roche s.r.o. *IgG-2 pro analyzátory cobas c 311/501 a c502*. Verze 10. Roche s.r.o. 2015
35. Příbalová informace: Roche s.r.o. *IGM-2 pro analyzátory cobas c 311/501 a c502*. Verze 10. Roche s.r.o. 2015
36. Příbalová informace: Roche s.r.o *TP2 pro analyzátory cobas c 311/501 a c 502*. Verze 9. Roche s.r.o. 2015
37. Příbalová informace: The Binding Site *Freelite<sup>TM</sup>. Serum Free Light Chains Assays*. The Binding Site s.r.o. Česká republika. 2011
38. Příbalová informace: The Binding Site *Souprava Freelite<sup>®</sup> pro stanovení lidských volných řetězců lambda na Systémech Roche cobas<sup>®</sup>c*. Verze 27. The Binding Site Group Ltd. Velká Británie. 2014

39. SANDECKÁ V., RADOCHA J., MAISNAR V., HÁJEK R., 2009. MGUS 2010 – výzkumný projekt zaměřený na identifikaci vysoce rizikové prekancerózy [online]. *Klinická biochemie a metabolismus*. 38 (2), 75 [cit. 2017-04-17]. ISSN 1210-7921. Dostupné z: [http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2009/2-09/KBM0209\\_Sandacka.pdf](http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2009/2-09/KBM0209_Sandacka.pdf)
40. SIGURDARDOTTIR, E. E., TURESSON, I., LUND, S.H., LINDQVIST, E.K., MAILANKODY, S., KORDE, N., BJORKHOLM, M., LANDGREN, O., KRISTINSSON, S.Y., 2015. *The Role of Diagnosis and Clinical Follow-up of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance on Survival in Multiple Myeloma* [online]. Reykjavik, Island: Faculty of Medicine, University of Iceland [cit. 2017-04-16]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26181017>
41. ŠOLCOVÁ I., 2014. Monoklonální gamapatie [online]. *FONS*. 24 (1), 24 [cit. 2017-04-01]. ISSN 1211–7137. Dostupné z: <http://www.bulletinfons.cz/12014/klin1.pdf>
42. ŠPIČKA I., MECL J., BENÁKOVÁ H., NOHEJLOVÁ A., STRAUB J., NOVOTNÁ E., ZIMA T., 2008. Srovnání detekce monoklonálního proteinu pomocí současně dostupných biochemických metod [online]. *Klinická biochemie a metabolismus*. 16 (2), 89 [cit. 2017-04-13]. ISSN 1210-7921. Dostupné z: [http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2008/2-08/2008-2\\_89\\_Spicka.pdf](http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2008/2-08/2008-2_89_Spicka.pdf)
43. ŠUMNÁ E. et al., 2006. Význam hodnocení sérových hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinů u monoklonálních gamapatií [online]. *Interní medicína pro praxi*. 8 (11), 502 [cit. 2017-04-18]. ISSN 1803-5256. Dostupné z: <http://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2006/11/09.pdf>
44. TICHÝ, M., 1997. *Laboratorní analýza monoklonálních imunoglobulinů (paraproteinů)*. Český Těšín: FINDR. 28-29 s. ISBN 80-902022-1-7.
45. TICHÝ M., 2012. Monoklonální gamapatie - téma stále aktuální. *Klinická biochemie a metabolismus*. 20 (2), 51. ISSN 1210-7921.

46. VÁVROVÁ J., 2004. *Turbidimetrie* [online]. Pardubice: Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi [cit. 2017-03-12]. Dostupné z: <http://enclabmed.cz/encyklopedie/A/JVABU.htm>

47. WANG, P.F., XU, Y., YAN, S., YAO, Y., ZHENG, H.F., MA, L., JIN, S., GONG, F.R., ZHOU, J.Z., CHANG, H.R., FU, C.C., 2016. *The roles of serum freelight chain ratio in the diagnosis and prognosis of newly diagnosed multiple myeloma* [online]. Suzhou, China: First Affiliated Hospital of Soochow University, Jiangsu Institute of Hematology, Key Laboratory of thrombosis and hemostasis of Ministry of health , Hematology Collaborative Innovation Center [cit. 2017-04-16]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27210871>

48. ZIMA, T., 2002. *Laboratorní diagnostika*. Praha: Galén. 500 s. ISBN 80-7262-201-3

## 7 Příloha

Tabulka č. 7 hodnoty jednotlivých vyšetření

pořadí	nález	TP(g/)	ALB(g/l)	Kappa(g/l)	Lambda(g/l)	Poměr ( $\kappa/\lambda$ )	IGA(g/l)	IGG(g/l)	IGM(g/l)	monokloná lní frakce(g/l)
1	bez nálezu	50,5	33,5	----	----	----	----	<30	0,34	-----
2	bez nálezu	75,3	47,4	----	----	----	2,92	10,16	0,98	-----
3	bez nálezu	71,0	34,4	----	----	----	4,99	16,65	0,49	-----
4	bez nálezu	64,9	45,6	----	----	----	0,85	6,74	0,18	-----
5	bez nálezu	69,3	42,6	----	----	----	----	----	----	-----
6	bez nálezu	56,0	29,7	----	----	----	3,60	11,00	0,70	-----
7	bez nálezu	68,2	40,9	33,47	21,31	1,57	2,65	7,94	1,58	-----
8	bez nálezu	50,6	24,9	----	----	----	----	----	----	-----
9	bez nálezu	63,5	41,6	----	----	----	1,67	7,21	0,36	-----
10	bez nálezu	72,1	41,3	----	----	----	3,51	11,24	0,66	-----
11	bez nálezu	73,4	45,1	----	----	----	----	----	----	-----
12	bez nálezu	78,0	42,0	----	----	----	----	----	----	-----
13	bez nálezu	72,3	37,2	----	----	----	3,13	15,48	1,38	-----
14	bez nálezu	66,3	44,3	----	----	----	----	----	----	-----
15	bez nálezu	62,2	35,4	----	----	----	1,84	9,12	0,67	-----
16	bez nálezu	67,3	46,9	----	----	----	1,75	5,32	0,22	-----
17	bez nálezu	65,2	43,6	----	----	----	----	----	----	-----
18	bez nálezu	70,8	44,3	----	----	----	----	----	----	-----
19	bez nálezu	54,5	36,3	----	----	----	2,21	4,74	1,05	-----
20	bez nálezu	60,9	33,3	----	----	----	----	----	----	-----
21	bez nálezu	78,6	46,0	----	----	----	4,27	17,57	0,52	-----
22	bez nálezu	73,8	46	24,14	14,72	1,64	4,16	10,41	1,17	-----
23	bez nálezu	67,0	33,9	----	----	----	----	----	----	-----
24	bez nálezu	77,0	43,7	----	----	----	----	----	----	-----
25	bez nálezu	60,9	33,8	----	----	----	3,27	9,44	0,61	-----
26	bez nálezu	67,8	44,4	----	----	----	1,40	9,18	0,80	-----
27	bez nálezu	78,3	38,4	----	----	----	5,61	18,60	2,51	-----
28	bez nálezu	67,2	44,0	----	----	----	0,95	9,30	1,21	-----
29	bez nálezu	76,7	46,7	----	----	----	----	----	----	-----
30	bez nálezu	72,4	41,6	----	----	----	4,21	12,53	0,63	-----
31	bez nálezu	72,2	42,7	----	----	----	----	----	----	-----
32	bez nálezu	49,4	33,1	----	----	----	0,07	2,65	0,37	-----
33	bez nálezu	75,3	44,6	----	----	----	2,45	13,01	0,38	-----
34	bez nálezu	68,8	43,1	----	----	----	2,57	9,58	1,17	-----
35	bez nálezu	72,1	44,5	----	----	----	2,43	10,68	0,50	-----
36	bez nálezu	68,2	45,8	----	----	----	0,90	7,16	0,84	-----
37	bez nálezu	71,1	48,7	----	----	----	1,44	7,47	0,43	-----
38	bez nálezu	68,7	43,9	----	----	----	----	----	----	-----

pořadí	nález	TP(g/)	ALB(g/l)	Kappa(g/l)	Lambda(g/l)	Poměr (κ/λ)	IGA(g/l)	IGG(g/l)	IGM(g/l)	monokloná lní frakce(g/l)
39	bez nálezu	62,4	31,8	27,9	17,88	1,56	2,51	8,51	0,66	-----
40	bez nálezu	59,1	28,3	----	----	----	4,35	11,49	0,67	-----
41	bez nálezu	59,8	33,6	----	----	----	----	----	----	-----
42	bez nálezu	72,8	46,6	----	----	----	3,16	10,79	0,61	-----
43	bez nálezu	70,7	40,4	----	----	----	4,10	11,50	1,20	-----
44	bez nálezu	64,6	45,5	----	----	----	0,96	5,48	0,47	-----
45	bez nálezu	63,4	34,1	----	----	----	----	----	----	-----
46	bez nálezu	61,9	40,3	----	----	----	----	----	----	-----
47	bez nálezu	64,8	34,0	----	----	----	----	----	----	-----
48	bez nálezu	67,5	41,3	----	----	----	1,54	13,14	0,66	-----
49	bez nálezu	72,3	44,0	18,42	13,65	1,35	2,40	14,20	2,00	-----
50	bez nálezu	71,6	45,6	----	----	----	2,69	9,54	1,31	-----
51	bez nálezu	67,2	39,1	----	----	----	3,92	8,98	0,32	-----
52	bez nálezu	71,0	42,6	25,08	18,16	1,38	1,67	7,65	1,72	-----
53	bez nálezu	71,3	45,5	----	----	----	----	----	----	-----
54	bez nálezu	66,0	49,6	6,05	6,52	0,93	0,10	3,20	0,40	-----
55	bez nálezu	64,7	40,2	----	----	----	2,93	7,42	0,52	-----
56	bez nálezu	76,6	43,8	----	----	----	4,70	11,80	1,67	-----
57	bez nálezu	69,5	43,3	----	----	----	2,45	10,64	0,56	-----
58	bez nálezu	62,9	41,2	----	----	----	----	----	----	-----
59	bez nálezu	70,1	43,3	----	----	----	2,18	11,22	1,20	-----
60	bez nálezu	61,1	34,1	----	----	----	----	----	----	-----
61	bez nálezu	77,8	35,0	----	----	----	----	----	----	-----
62	bez nálezu	68,8	38,4	----	----	----	----	----	----	-----
63	bez nálezu	60,7	34,3	----	----	----	2,30	7,80	0,80	-----
64	bez nálezu	63,7	38,8	----	----	----	2,00	8,90	1,30	-----
65	bez nálezu	68,6	46,5	----	----	----	----	----	----	-----
66	bez nálezu	74,6	44,9	----	----	----	2,87	14,64	1,75	-----
67	bez nálezu	78,7	37,6	----	----	----	----	----	----	-----
68	bez nálezu	72,9	44,7	----	----	----	----	----	----	-----
69	bez nálezu	72,8	45,1	35,68	21,84	1,63	1,94	11,89	0,54	-----
70	bez nálezu	74,8	34,9	37,21	30,91	1,20	6,05	17,02	2,71	-----
71	bez nálezu	80,1	36,8	----	----	----	4,42	24,12	0,61	-----
72	bez nálezu	66,3	43,1	----	----	----	1,29	8,91	0,64	-----
73	bez nálezu	70,4	46,4	----	----	----	2,43	9,67	0,30	-----
74	nález	71,9	48,1	18,62	9,36	1,99	----	----	----	-----
75	nález	74,3	47,6	----	----	----	----	----	----	4,1
76	nález	74	40,6	70,72	51,43	1,38	3,55	14,66	0,84	3,7
77	nález	66,7	49,5	----	----	----	0,85	6,18	0,19	3,7
78	nález	69,7	37,9	----	----	----	0,12	5,38	22,35	9,2
79	nález	69,1	46,2	----	----	----	2,15	8,73	----	2,5

pořadí	nález	TP(g/)	ALB(g/l)	Kappa(g/l)	Lambda(g/l)	Poměr (κ/λ)	IGA(g/l)	IGG(g/l)	IGM(g/l)	monokloná lní frakce(g/l)
80	nález	70,6	47,0	----	----	----	----	----	----	4,6
81	nález	66,6	43,1	58,3	26,96	2,16	3,10	6,27	1,15	-----
82	nález	74,7	42,5	32,98	12,88	2,56	----	----	----	13,0
83	nález	72,8	44,0	36,71	20,44	1,80	----	----	----	-----
84	nález	68,7	47,6	----	----	----	0,68	6,53	0,38	-----
85	nález	58,8	41,3	----	----	----	0,58	5,12	0,63	< 1
86	nález	57,4	37,3	129,18	44,21	2,92	2,70	5,85	0,49	1,7
87	nález	76,2	50,3	26,7	11,52	2,32	0,65	10,49	1,11	-----
88	nález	78,4	43,3	49,26	18,86	2,61	4,24	14,62	1,65	-----
89	nález	58,4	41,6	24,38	13,13	1,86	1,24	6,09	0,29	-----
90	nález	66,5	43,4	67,18	22,76	2,95	2,14	7,98	0,87	-----
91	nález	65,7	38,3	----	----	----	----	11,27	----	2,1 a 0,5
92	nález	64,0	39,7	79,98	28,13	2,84	4,42	----	----	2,7
93	nález	85,6	45,9	30,35	499,95	0,06	0,91	24,27	1,46	15,5
94	nález	77,1	45,6	----	----	----	----	----	8,29	1,5 -2 a 1,0
95	nález	73,2	44,6	50,4	19,38	2,60	2,39	12,23	0,60	-----
96	nález	65,4	40,4	37,15	31,58	1,18	1,48	8,55	0,81	1,0 a 1,0
97	nález	62,1	33,4	----	----	----	----	----	19,50	12,3
98	nález	92,1	26,2	----	----	----	39,10	3,32	0,20	40,7
99	nález	69,1	44,3	----	----	----	5,59	7,97	0,75	7,1
100	nález	68,9	43,3	41,08	18,63	2,21	1,63	10,45	1,82	3,2
101	nález	75,3	44,7	30,96	17,60	1,76	5,92	11,37	0,48	-----
102	nález	74,9	46,6	----	----	----	3,01	10,94	0,73	2,3
103	nález	86,9	47,1	----	----	----	0,33	27,45	0,48	19,4
104	nález	80,3	46,7	34,83	17,11	2,04	4,52	13,58	1,18	5,0
105	nález	70,2	44,8	31,97	17,99	1,78	2,13	8,73	1,38	-----
106	nález	68,8	41,8	100,85	47,03	2,14	3,25	9,11	0,52	-----
107	nález	63,8	42,9	----	----	----	----	----	----	-----
108	nález	69,1	40,3	55,3	16,03	3,45	1,15	9,57	3,38	4,6
109	nález	87,6	48,7	402,13	10,98	36,93	----	----	----	15,4
110	nález	76,5	46,5	27,01	12,44	2,17	3,20	12,41	0,65	6,1
111	nález	72,1	46,4	32,59	17,19	1,90	1,38	11,03	0,58	-----
112	nález	71,3	42,1	27,4	14,79	1,85	3,53	7,58	8,71	6,1
113	nález	70,5	42,2	34,08	13,96	2,44	5,09	8,30	0,48	3,7 a 6,4
114	nález	75,4	43,1	39,68	11,35	3,50	3,60	16,40	0,60	5,3
115	nález	70,9	40,8	23,43	12,72	1,84	1,50	14,40	1,00	2,5
116	nález	75,4	45,3	27,9	41,81	0,67	0,78	16,39	0,76	9,1
117	nález	52,9	28,0	65,33	35,82	1,82	3,01	10,79	0,87	-----
118	nález	74,9	35,8	97,81	30,52	3,20	4,24	22,23	0,60	-----
119	nález	73,2	46,1	38,27	17,66	2,17	1,38	13,90	0,21	3,6 a 3,4
120	nález	72,4	42,2	82,29	29,78	2,76	1,44	15,85	0,22	-----
121	nález	72,6	41,9	58,29	21,2	2,75	3,80	11,23	0,68	1,4

122	nález	74,0	40,6	53,32	46,66	1,14	3,73	14,00	0,86	3,7
123	nález	68,2	45,0	23,64	14,22	1,66	1,98	8,83	0,61	-----

Tabulka č. 8 jednotlivé diagnostické nálezy

pořadí	nález	kategorie	ELFO	IFE	U/IFE	typ frakce, popis nálezu
1	bez nálezu		negativní	----	----	----
2	bez nálezu		negativní	----	----	----
3	bez nálezu	3	negativní	----	----	na IFE zjištěno polyklonální zmnožení gamaglobulinů s převahou IgG, IgA a lehkých řetězců kappa
4	bez nálezu		negativní	----	----	----
5	bez nálezu		negativní	----	----	----
6	bez nálezu		negativní	negativní	negativní	----
7	bez nálezu		negativní	negativní	negativní	podle VLR a poměru svědčí pro monoklonální gamapatií
8	bez nálezu		negativní	negativní	negativní	----
9	bez nálezu		negativní	negativní	----	----
10	bez nálezu		negativní	----	----	----
11	bez nálezu		negativní	----	----	----
12	bez nálezu		negativní	----	----	----
13	bez nálezu	3	negativní	negativní	----	na IFE zjištěno polyklonální zmnožení gamaglobulinů s převahou IgG a lehkých řetězců kappa
14	bez nálezu		negativní	----	----	----
15	bez nálezu		negativní	negativní	----	----
16	bez nálezu		negativní	----	----	----
17	bez nálezu		negativní	----	----	----
18	bez nálezu		negativní	----	----	----
19	bez nálezu		negativní	negativní	----	----
20	bez nálezu		negativní	----	----	----
21	bez nálezu		negativní	----	----	----
22	bez nálezu	3	negativní	----	----	hodnoty VLR a poměru svědčí pro produkci polyklonálních Ig nebo pro renální poškození
23	bez nálezu		negativní	----	----	----
24	bez nálezu		negativní	----	----	----
25	bez nálezu		negativní	negativní	negativní	----
26	bez nálezu		negativní	negativní	negativní	----
27	bez nálezu		negativní	----	----	----
28	bez nálezu		negativní	negativní	----	----
29	bez nálezu		negativní	----	----	----
30	bez nálezu		negativní	----	----	----

pořadí	nález	kategorie	ELFO	IFE	U/IFE	typ frakce, popis nálezu
31	bez nálezu		negativní	----	----	----
32	bez nálezu		negativní	----	----	----
33	bez nálezu		negativní	----	----	----
34	bez nálezu		negativní	negativní	----	----
35	bez nálezu		negativní	negativní	negativní	----
36	bez nálezu		negativní	negativní	----	----
37	bez nálezu		negativní	----	----	----
38	bez nálezu		negativní	----	----	----
39	bez nálezu	3	negativní	negativní	negativní	hodnoty VLR a poměru svědčí pro produkci polyklonálních Ig nebo pro renální poškození
40	bez nálezu		negativní	negativní	----	----
41	bez nálezu		negativní	----	----	----
42	bez nálezu		negativní	----	----	----
43	bez nálezu		negativní	negativní	negativní	----
44	bez nálezu		negativní	----	----	----
45	bez nálezu		negativní	----	----	----
46	bez nálezu		negativní	----	----	----
47	bez nálezu		negativní	----	----	----
48	bez nálezu		negativní	----	----	----
49	bez nálezu		negativní	negativní	----	----
50	bez nálezu		negativní	----	----	----
51	bez nálezu		negativní	----	----	----
52	bez nálezu	3	negativní	negativní	----	hodnoty VLR a poměru svědčí pro produkci polyklonálních Ig nebo pro renální poškození
53	bez nálezu		negativní	----	----	----
54	bez nálezu		negativní	negativní	----	----
55	bez nálezu		negativní	----	----	----
56	bez nálezu		negativní	----	----	----
57	bez nálezu		negativní	----	----	----
58	bez nálezu		negativní	----	----	----
59	bez nálezu		negativní	----	----	----
60	bez nálezu		negativní	----	----	----
61	bez nálezu		negativní	----	----	----
62	bez nálezu		negativní	----	----	----
63	bez nálezu		negativní	negativní	----	----
64	bez nálezu		negativní	negativní	----	----
65	bez nálezu		negativní	negativní	negativní	----



pořadí	nález	kategorie	ELFO	IFE	U/IFE	typ frakce, popis nálezu
66	bez nálezu		negativní	----	----	----
67	bez nálezu		negativní	----	----	----
68	bez nálezu		negativní	----	----	----
69	bez nálezu	3	negativní	----	----	hodnoty VLR a poměru svědčí pro produkci polyklonálních Ig nebo pro renální poškození
70	bez nálezu	3	negativní	negativní	negativní	hodnoty VLR a poměru svědčí pro produkci polyklonálních Ig nebo pro renální poškození
71	bez nálezu	3	negativní	negativní	negativní	na IFE zjištěno polyklonální zmnožení gamaglobulinů s převahou IgG a lehkých řetězců kappa
72	bez nálezu		negativní	----	----	----
73	bez nálezu		negativní	----	----	----
74	nález	1	negativní	negativní	negativní	podle VLR a poměru svědčí pro monoklonální gamapatii
75	nález	4	pozitivní	pozitivní	----	IgA a lehké kappa řetězce v oblasti beta2globulinů
76	nález	2	pozitivní	pozitivní	----	IgG a lehké řetězce lambda
77	nález	4	negativní	negativní	pozitivní - v oblasti kappa přítomna monoklonální frakce	IgG a lehké lambda řetězce
78	nález	4	pozitivní	pozitivní	----	IgM a lehké kappa řetězce
79	nález	4	pozitivní	pozitivní	----	IgG a lehké kappa řetězce
80	nález	4	pozitivní	pozitivní	negativní	IgA a lehké kappa řetězce
81	nález	1	negativní	negativní	----	podle VLR a poměru svědčí pro monoklonální gamapatii s renálním poškozením
82	nález	4	pozitivní	pozitivní	----	IgG a lehké kappa řetězce
83	nález	4	negativní	pozitivní	----	IgG a lehké kappa řetězce
84	nález	4	pozitivní	pozitivní	negativní	IgG a lehké kappa řetězce
85	nález	4	negativní	pozitivní	negativní	IgM a lehké kappa řetězce
86	nález	4	pozitivní	pozitivní	negativní	IgG a lehké lambda řetězce
87	nález	1	negativní	negativní	negativní	podle VLR a poměru svědčí pro monoklonální gamapatii
88	nález	1	negativní	negativní	----	podle VLR a poměru svědčí pro monoklonální gamapatii
89	nález	1	negativní	negativní	negativní	podle VLR a poměru svědčí pro monoklonální gamapatii
90	nález	1	negativní	negativní	negativní	podle VLR a poměru svědčí pro monoklonální gamapatii
91	nález	4	pozitivní	pozitivní	negativní	obě frakce IgG a lehké kappa řetězce
92	nález	4	pozitivní	pozitivní	----	IgA a lehké kappa řetězce

pořadí	nález	kategorie	ELFO	IFE	U/IFE	typ frakce, popis nálezu
93	nález	4	pozitivní	pozitivní	pozitivní 0,1g/l v oblasti gamaglobulinů a lehkých + volných lehkých řetězců lambda	IgG a lehké lambda řetězce
94	nález	4	pozitivní	pozitivní	----	obě frakce IgM a lehké kappa řetězce
95	nález	1	negativní	negativní	negativní	podle VLR a poměru svědčí pro monoklonální gamapatii
96	nález	4	pozitivní	pozitivní	----	obě frakce IgG a lehké kappa řetězce
97	nález	4	pozitivní	pozitivní	pozitivní-2frakce volných lehkých řetězců kappa	IgM a lehké kappa řetězce
98	nález	4	pozitivní	pozitivní	---	IgA a lehké kappa řetězce
99	nález	4	pozitivní	pozitivní	pozitivní do 0,05g/l v oblasti lehkých a volných lehkých kappa řetězců	IgA a lehké kappa řetězce
100	nález	4	pozitivní	pozitivní	----	IgG a lehké kappa řetězce
101	nález	1	negativní	negativní	----	podle VLR a poměru svědčí pro monoklonální gamapatii
102	nález	4	pozitivní	pozitivní	----	IgG a lehké kappa řetězce
103	nález	4	pozitivní	pozitivní	pozitivní-2frakce v oblasti gamaglobulinů a lehkých + volných lehkých řetězců kappa	IgG a lehké kappa řetězce
104	nález	4	pozitivní	pozitivní	----	IgG a lehké kappa řetězce
105	nález	1	negativní	negativní	negativní	podle VLR a poměru svědčí pro monoklonální gamapatii
106	nález	1	negativní	negativní	----	podle VLR a poměru svědčí pro monoklonální gamapatii s renálním poškozením
107	nález	4	negativní	negativní	pozitivní v oblasti lehkých volných řetězců lambda, frakce 20-30 mg	----
108	nález	4	pozitivní	pozitivní	----	IgM a lehké kappa řetězce
109	nález	4	pozitivní	pozitivní	----	IgM a lehké kappa řetězce
110	nález	4	pozitivní	pozitivní	----	IgG a lehké kappa řetězce
111	nález	1	negativní	negativní	----	podle VLR a poměru svědčí pro monoklonální gamapatii
112	nález	4	pozitivní	pozitivní	negativní	IgM a lehké kappa řetězce
113	nález	4	pozitivní	pozitivní	pozitivní-2frakce v oblasti gamaglobulinů a lehkých volných řetězců kappa	IgG, IgA a lehké kappa řetězce
114	nález	4	pozitivní	pozitivní	----	IgG a lehké kappa řetězce
115	nález	4	pozitivní	pozitivní	----	IgG a lehké lambda řetězce
116	nález	2	pozitivní	pozitivní	----	IgG a lehké lambda řetězce
117	nález	1	negativní	negativní	negativní	podle VLR a poměru svědčí pro monoklonální gamapatii s renálním poškozením

pořadí	nález	kategorie	ELFO	IFE	U/IFE	typ frakce, popis nálezu
118	nález	1	negativní	negativní	negativní	podle VLR a poměru svědčí pro monoklonální gamapatii s renálním poškozením
119	nález	4	pozitivní	pozitivní	pozitivní v oblasti lehkých volných řetězců kappa	obě frakce v IgG a lehké kappa řetězce
120	nález	1	negativní	negativní	----	podle VLR a poměru svědčí pro monoklonální gamapatii s renálním poškozením
121	nález	4	pozitivní	pozitivní	----	IgG a lehké kappa řetězce
122	nález	2	pozitivní	pozitivní	negativní	IgG a lehké lambda řetězce
123	nález	1	negativní	negativní	negativní	podle VLR a poměru svědčí pro monoklonální gamapatii

## 8 Seznam zkratek

a.s.	akciová společnost
APC	antigen prezentující buňka
APTT	aktivovaný parciální tromboplastinový čas (activated partial thromboplastin time)
ATP	adenosintrifosfát
B-CLL	chronická lymfatická leukemie z B lymfocytů
BCR	antigenně specifický receptor B lymfocytů
BCG	Bromkrezlova zeleň (Bromocresol green)
CB	celková bílkovina
CE	kapilární elektroforéza (capillar electrophoresis)
cP	centipoise
ČR	Česká republika
ELFO	elektroforéza
Fab	fragment vázající antigen (fragment antigen binding)
Fc	krystalizující fragment (fragment crystallizable)
FLC	volné lehké řetězce (free light chains)
GIT	gastrointestinální trakt
g/l	gram na litr
IFE	imunofixační elektroforéza
Ig	imunoglobulin
IgA	imunoglobulin A
IgD	imunoglobulin D
IgE	imunoglobulin E
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
Ka	asociační konstanta
Kd	disociační konstanta
KDa	kilodalton
l/mol	litr na mol
LIS	laboratorní informační systém
MG	monoklonální gamapatie
mg/l	miligramy na litr

MGUS	monoklonální gamapatie nejasného významu (Monoklonal gammopathy of undetermined significance)
M-Ig	monoklonální imunoglobulin
M-IgA	monoklonální imunoglobulin A
M-IgG	monoklonální imunoglobulin G
MM	mnohočetný myelom
např.	například
PC	počítač
PEG	polyethylenglykol
PTK	protein-tyrozin kináza
Quick	tromboplastinový čas, Quickův test
RMG	registr monoklonálních gamapatií
RTG	rentgen
Sc	sekreční komponenta
SLE	systémový lupus erythematosus
SPE	elektroforéza sérových proteinů (serum protein electrophoresis)
SR	Slovenská republika
S_TP	celkový protein v séru (total serum protein)
TP	celkový protein (total protein)
U_TP	celkový protein v moči (total urine protein)
UV	ultrafialové-viditelné spektrum (ultraviolet spectrum)
IMiDS	imunomodulační léčiva (immunomodulatory drugs)
PI	inhibitor proteáz (protease inhibitor)