

Vyhodnocení kontrolního cyklu SEKK Gamapatie za období let 1996–2005

Tichý M.¹, Budina M.², Andrýs C.³, Maisnar V.⁴, Vávrová J.¹, Šerclová H.¹, Bartoková J.¹, Hájek R.⁵, Palička V.¹

¹Ústav klinické biochemie a diagnostiky LF UK a FN, Hradec Králové

²SEKK s.r.o., Pardubice

³Ústav klinické imunologie a alergologie LF UK a FN, Hradec Králové

⁴II. interní klinika, Oddělení klinické hematologie, LF UK a FN, Hradec Králové

⁵Česká myelomová skupina

SOUHRN

Cíl studie: Vyhodnotit výsledky kontrolního cyklu SEKK „Gamapatie“, který hodnotí úspěšnost klinických laboratoří při určení typu monoklonálních imunoglobulinů, za léta 1996–2005.

Typ studie: Studie v přehledu uvádí výsledky dvaceti kontrolních cyklů „Gamapatie“ v průběhu deseti let. Kontrolní cykly jsou organizovány 2krát ročně.

Materiál a metody: Pacienti pro odběr vzorků pro jednotlivé kontrolní cykly SEKK „Gamapatie“ jsou vytipováni v rámci běžné diagnostiky ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové. Plazma je po centrifugaci a po konzervaci azidem sodným uchovávána do termínu kontrolního cyklu při -30 °C. Pro udělení certifikátu je vyžadována správná typizace paraproteinu v obou kontrolních vzorcích, A i B (plazma, sérum nebo moč). Nepovinným krokem je určení koncentrace paraproteinů.

Výsledky: Počet zúčastněných laboratoří postupně narůstal z 26 v r. 1996 na 79 v r. 2005 (6 ze Slovenska). K typizaci paraproteinu většina laboratoří používá imunofixační elektroforézu, v r. 2005 již jen jedna laboratoř použila imuno-elektroforézu. Úspěšnost typizace v prvních 3 cyklech byla asi 70% a v r. 2005 dosáhla až 96 %. Výjimkou byl cyklus GP1/02 se vzorkem s poměrně vzácným paraproteinem IgD-lambda, kdy úspěšnost laboratoří byla jen 38%. Celkem 4krát byl rozeslán vzorek plazmy bez paraproteinu a vždy několik laboratoří chybně identifikovalo fibrinogen jako paraprotein. V cyklu GP1/03 byly použity vzorky s nízkými koncentracemi paraproteinu v séru (1,46 g/l) a v moči (0,113 g/l) s velmi dobrým výsledkem 89 % správných typizací. V cyklu GP2/03 byly naopak rozeslány vzorky s extrémními koncentracemi paraproteinů (57,8 g/l u IgM-kappa a 42,2 g/l u IgG-lambda) také s úspěšností 89 %. Postupně se zlepšuje i stanovení koncentrace paraproteinů, kterého se dobrovolně účastní v průměru 68 % laboratoří.

Závěr: Výsledky kontrolního cyklu „Gamapatie“ za posledních deset let potvrdily užitečnost a oprávněnost zavedení tohoto kontrolního cyklu do systému externí kontroly laboratoří SEKK. Tento kontrolní cyklus výrazně přispívá ke kvalitnějšímu průkazu a částečně i kvantifikaci monoklonálních imunoglobulinů v českých i slovenských klinických laboratořích.

Klíčová slova: monoklonální imunoglobulin, paraprotein, externí kontrola kvality, gamapatie.

SUMMARY

Tichý M., Budina M., Andrýs C. et al.: Evaluation of the Czech External Quality Assessment System of monoclonal immunoglobulin in the period of 1996–2005

Objective: To analyse the results of the „Gammopathies“ control system which evaluate a successfulness of clinical laboratories in determination of a type of monoclonal immunoglobulins during the period of 1996–2005.

Design: The study gives a survey of the results of twenty „Gammopathies“ control cycles during the period of ten years. The control cycles are organized twice a year.

Material and Methods: Patients for blood taking samples in the control cycles are selected in the course of a routine diagnostics in the University Hospital, Hradec Králové. After centrifugation, the plasma is stored at -30 °C. A correct typing of paraprotein in both control samples A and B (plasma, serum or urine) is required for conformation of a certificate. The determination of paraprotein concentration is an optional step.

Results: The number of participated laboratories gradually increased from 26 in the year 1996 to 79 in the year 2005 (6 from Slovakia). For typing of paraproteins, immunofixation electrophoresis is applied in most laboratories. Only one laboratory in the Czech Republic used immunoelectrophoresis in the year 2005. A success of typing in the first 3 cycles was around 70% and in the year 2005 reached 96%. The exception was the cycle GP1/02 with relatively rare paraprotein IgD-lambda sample when laboratories succeeded only in 38%. The samples of plasma without paraprotein were sent four times and several laboratories always made a wrong identification of fibrinogen like paraprotein.

In the cycle GP1/03, the samples with low concentrations of paraprotein in blood serum (1.46 g/l) and in urine (0.113 g/l) were used with very good results (89%). On the contrary, the samples with extreme concentrations of paraproteins (57.8 g/l for IgM-kappa and 42.2 g/l for IgG-lambda) were distributed in the cycle GP2/03 also with the efficiency of 89%.

Determination of paraprotein concentrations has been also improving gradually. This determination is voluntary and on average 68% of laboratories take part in there.

Conclusion: The results of „Gammopathies“ control system confirmed usefulness and validity of implementation of this cycle into the national external quality assessment system „SEKK“. The Czech national external quality assessment of monoclonal immunoglobulin markedly contributes to enhancing a quality of determination and partially to a quantification of monoclonal immunoglobulins as well.

Key words: monoclonal immunoglobulin, paraprotein, monoclonal gammopathie, external quality assessment system.

Úvod

Monoklonální gamapatie (MG), nazývané také paraproteinémie nebo dysproteinémie, jsou skupinou onemocnění, která je charakterizována proliferací jednoho nebo více klonů B lymfocytů produkujících imunologicky homogenní monoglobulin, nazývaný paraprotein nebo monoklonální imunoglobulin [3, 7]. Tento M-protein je tvořen buď kompletní imunoglobulinovou molekulou, nebo jen monoklonálními lehkými imunoglobulinovými řetězci či (velmi vzácně) jen monoklonálními řetězci těžkými. Monoklonální gamapatie jsou velmi heterogenní skupinou onemocnění [2, 9, 11], které lze v podstatě rozdělit do dvou velkých skupin – na maligní monoklonální gamapatie (MMG) a monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS). Nejčastější a nejzávažnější MG vůbec je mnohočetný myelom, který představuje asi 1 % všech malignit a 10–15 % malignit hematologických [7, 8].

Paraprotein (M-protein) je tumorový marker specifický pro MG, který reflektuje klonální produkci imunoglobulinu. Jde o nejstarší tumorový marker, který byl popsán Bence Jonesem již v r. 1847. Pro závažnost jeho průkazu, zejména u MMG, bylo před 10 lety rozhodnuto zařadit jeho stanovení do systému externí kontroly kvality SEKK.

Metodika

První kontrolní cyklus „Gamapatie“ proběhl v únoru 1996. Od té doby jsou tyto kontrolní cykly organizovány 2krát ročně SEKK, s. r. o. Kontrolní vzorky jsou připravovány v laboratořích Ústavu klinické biochemie a diagnostiky LF UK a FN Hradec Králové a v laboratořích Ústavu klinické imunologie a alergologie LF UK a FN Hradci Králové. Pacienti na odběr vzorků pro jednotlivé kontrolní cykly SEKK „Gamapatie“ jsou vytipováni v rámci běžné diagnostiky prováděné v laboratoři. Vytipovaný pacient je po domluvě s ošetřujícím lékařem seznámen s odběrem krve 50–100 ml nebo s použitím vzorku, který je získán při terapeutické plazmaferéze. Dále je mu nabídnuta odměna za tento odběr. Pokud nemocný s odběrem souhlasí, je mu v dohodnutém termínu odběr krve proveden. Po centrifugaci jsou získaná plazma nebo sérum rozdělena na dvě části. První část o objemu asi 2 ml je využita pro předběžné ověřovací analýzy, druhá část o větším objemu, která představuje zbytek vzorku, je stažena do vhodné, dobře uzavíratelné nádoby. Kontrolní vzorek je chráněn před bakteriální kontaminací přidáním azidu sodného tak, aby výsledná koncentrace azidu sodného byla 0,01 %. Vzorek je uchováván při -30 °C až do data kontrolního cyklu. Kontrolní vzorek je vždy testován na tyto infekční markery: HbsAg, protilátky proti *Treponema pallidum*, anti-HIV 1,2 a p24 Ag a anti-VHC. Vzorky jsou rozesílány laboratořím přihlášeným do příslušného kontrolního cyklu s požadavkem průkazu nebo vyloučení přítomnosti paraproteinu a s požadavkem jeho typizace – určení imunoglobulinové třídy paraproteinu a antigenního typu lehkých řetězců. Splnění tohoto požadavku je

nezbytné pro udělení certifikátu. Nepovinné je pak určení koncentrace paraproteinu z denzitometrického záznamu elektroforézy nebo z křivky kapilární elektroforézy.

Výsledky

Výsledky všech deseti dosud proběhlých kontrolních cyklů „Gamapatie“ jsou uvedeny v tabulce 1. První dva cykly v r. 1996 byly charakterizovány malým počtem zúčastněných laboratoří a poměrně nízkou úspěšností (69%). K typizaci paraproteinu použila již většina laboratoří imunofixaci, ale v prvním cyklu 6 laboratoří a ve druhém cyklu 4 laboratoře použily ještě imunoelektroforézu. V kvantifikaci paraproteinů u obou cyklů uspělo jen kolem 20 % laboratoří. Při typizaci vzorku plazmy bez paraproteinu v cyklu 92/97 určilo mylně fibrinogen jako paraprotein 7 laboratoří. V obou cyklech r. 1998 se zvýšila úspěšnost jak při typizaci (na asi 90 %), tak i při kvantifikaci (až na 54 %). Od r. 1999 proto začaly být udělovány za úspěšnou typizaci paraproteinu v obou vzorcích (A i B) certifikáty. Typizace v r. 1999 proběhla v obou cyklech úspěšně a určení koncentrace paraproteinů zaznamenalo podstatné zlepšení na 56 %, respektive 74 %. V r. 2000 byla úspěšnost v kvantifikaci velmi dobrá, v obou cyklech kolem 70 %. V r. 2001, v prvním cyklu u negativního vzorku plazmy, 7 laboratoří (10 %) uvedlo přítomnost paraproteinu. V r. 2002 byl v cyklu GP1/02 zaslán vzorek s paraproteinem IgD-lambda, který úspěšně určilo nejméně laboratoří za celou dobu konání kontrolního cyklu „Gamapatie“, tj. 38 %. V cyklu GP1/03 byly použity vzorky s nízkými koncentracemi paraproteinů, což se projeвило zejména při kvantifikaci, kdy bylo úspěšných jen 31 % laboratoří. V cyklu GP2/03, kdy šlo o paraproteiny s vysokou koncentrací, byla kvantifikace velmi úspěšná (94%). Úspěšné byly i další cykly v r. 2004 a 2005 – jak v typizaci, tak i v určení koncentrace paraproteinů.

Diskuse

Suverénní metodou pro určení typu monoklonálních imunoglobulinů byla více než 30 let imunoelektroforéza. Tato metoda byla poměrně náročná jak na provedení, tak i na vyhodnocení. Před 10–12 lety začala být do našich klinických laboratoří zaváděna imunofixační elektroforéza. Tato metoda je oproti imunoelektroforéze jednodušší na provedení, odečtení výsledku a má mnohem nižší časovou náročnost (asi 2 hodiny oproti 2–3 dnům u imunoelektroforézy). Zatímco z uvedených důvodů imunoelektroforézu provádělo v České republice jen poměrně málo laboratoří, imunofixaci rychle zavedla celá řada laboratoří. I když jde o metodu poměrně jednoduchou, přece jen vyžaduje značnou zkušenost jak provádějícího, tak hodnotícího pracovníka. Metoda má četná úskalí a zejména pro laboratoře, které vyšetřují pomocí imunofixace jen několik vzorků za měsíc, může být zdrojem chybných nebo nepřesných výsledků [4, 5, 10]. Z těchto důvodů a z důvodů postupné

Table1. The Czech National External Quality Assessment of Monoclonal Immunoglobulin in the Period of 1996–2005

Year	Survey	Number of Laboratories	Sample	Qualitative determination		Quantitative determination	
				Paraprotein	Successful[%]	Concentration[g/l]	Successful[%]
1996	82/96	29	A Plasma	IgG-lambda	76	21.5	23
			B Urine	free kappa		0.4	
	83/96	26	A Plasma	IgM-kappa	69	37.9	21
			B Urine	free kappa		2.66	
1997	92/97	40	A Plasma	Negative	70	–	33
			B Urine	free kappa		0.22	
	93/97	39	A Plasma	IgG-lambda	90	48.5	40
			B Urine	free kappa		7.67	
1998	096/98	57	A Plasma	free kappa	88	8.05	40
			B Urine	free kappa		0.978	
	097/98	49	A Plasma	IgM-lambda	86	33.8	54
			B Urine	free kappa		1.46	
1999	GP1/99	59	A Plasma	Negative	95	–	56
			B Plasma	IgA-kappa		53.7	
	GP2/99	54	A Plasma	IgG-lambda	91	16.30	74
			B Urine	IgG-lambda		1.28	
2000	GP1/00	72	A Plasma	IgG-lambda	90	49.2	72
			B Urine	free kappa		1.04	
	GP2/00	53	A Plasma	IgM-kappa	96	35.6	68
			B Urine	free kappa		2.14	
2001	GP1/01	70	A Plasma	Negative	86	–	45
			B Urine	free lambda		0.828	
	GP2/01	60	A Plasma	IgG-lambda	95	45.2	54
			B Urine	IgG-lambda		0.844	
2002	GP1/02	73	A Plasma	IgD-lambda	38	3.30	75
			B Urine	free lambda		0.689	
	GP2/02	61	A Plasma	IgM-kappa	93	58.5	55
			B Urine	free lambda		6.06	
2003	GP1/03	78	A Plasma	IgG-lambda	89	1.46	31
			B Urine	free lambda		0.113	
	GP2/03	64	A Plasma	IgM-kappa	89	57.80	94
			B Plasma	IgG-lambda		42.20	
2004	GP1/04	79	A Plasma	IgG-kappa	92	30.7	96
			B Plasma	IgG-lambda		42.3	
	GP2/04	66	A Plasma	Negative	91	–	60
			B Plasma	IgM-lambda free lambda IgA-kappa		62.3 1.15 2.38	
2005	GP1/05	79	A Plasma	IgG-lambda	91	1.98	75
			B Plasma	IgM-kappa		14.20	
	GP2/05	66	A Plasma	IgG-kappa	96	23.2	100
			B Urine	free kappa		1.84	

standardizace laboratoří byl před 10 lety zařazen do kontrolního systému SEKK kontrolní cyklus „Gama-patie“. Zájem laboratoří o tento kontrolní cyklus postupně narůstal a z původních 26 se v současnosti účast pohybuje kolem 80 laboratoří. Jako kontrolní materiál jsou rozesílány jak vzorky plazmy a séra, tak i moči, protože typizace paraproteinů v moči má svá specifika. Koncentraci bílkoviny v moči je často nutné upravit buď zahuštěním, nebo naředěním vzorku na výsledných 1,5–2,0 g/l. Snaha je také zařadit do kontrolního systému pokud možno všechny typy paraproteinů. Zatím se jednalo o paraproteiny IgG-kappa, IgG-lambda, IgA-kappa, IgM-kappa, IgM-lambda, IgD-lambda, kappa free a lambda free. Několikrát byl

zařazen vzorek plazmy bez paraproteinů, a přesto vždy část laboratoří uvedla chybnou typizaci gradientu fibrinogenu a označila ho za paraprotein. Koncentrace paraproteinů ve vzorcích plazmy kolísala od 62,3 g/l (GP2/04, B) až po hodnotu 1,46 g/l (GP1/03, A). U vzorku GP2/04 B byl jako správná typizace hodnocen průkaz přítomnosti převládajícího paraproteinu IgM-lambda. Velmi obtížný byl vzorek GP1/02 A, který byl od nemocného mnohočetným myelomem s paraproteinem IgD-lambda + free lambda. Správně typizovalo tento vzorek 19 laboratoří ze 73 zúčastněných a dalších 9 laboratoří uvedlo, že v takovémto případě (při průkazu jen monoklonálních lehkých řetězců imunoglobulinů) vzorek odesílají do jiné laboratoře k imu-

nofixaci s antiséry proti IgD a IgE. U všech těchto 28 laboratoří (38 %) byla odpověď uznána za správnou. Tímto vzorkem jsme také chtěli upozornit na problematiku průkazu myelomu IgD, protože se na jejich výskyt obecně málo myslí. Vzorky A a B z cyklu GP1/03 respektovaly požadavek Americké asociace klinických patologů, která doporučuje do kontrolního systému občas zařadit vzorky s koncentrací paraproteinu na hranici stanovitelnosti [4]. V plazmě jsou to koncentrace paraproteinu kolem 1 g/l a v moči na hranici normální proteinurie, tj. kolem 0,15 g/l. Tato kontrola dopadla velmi dobře, protože vyhovělo téměř 90 % zúčastněných laboratoří. Nepovinným krokem kontroly gamapatie je určení koncentrace paraproteinů. Tyto výsledky v průměru zasílají 2/3 laboratoří (asi 68 %) a i v této velmi obtížné oblasti pro standardizaci dochází k neustálému zlepšování výsledků a větší srovnatelnosti laboratoří [12]. Stanovení koncentrace paraproteinů v plazmě je provázáno řadou faktorů [6], které tyto výsledky mohou významně ovlivnit (subjektivní hodnocení M-gradientu, použitý typ denzitometru, použití kapilární elektroforézy, překrývání s ostatními proteiny plazmy apod.). Ještě obtížnější je kvantifikace paraproteinu v moči, kde je výsledek ovlivněn především použitou metodou na kvantifikaci proteinurie. I tak je tato nepovinná část kontrolního cyklu „Gamapatie“ užitečná, protože se podařilo u zúčastněných laboratoří zlepšit úspěšnost z původních 21 % na současných 70–90 %.

Částečně můžeme porovnat náš kontrolní systém „Gamapatie“ s francouzským „National External Quality Assessment of Monoclonal Immunoglobulin“. Tento cyklus běží ve Francii od r. 2001 a je při něm rozepisován jednou za rok jeden vzorek séra [1]. Od r. 2004 je organizován společně se Scientific Institute of Public Health (Belgie). Referenčními laboratořemi pro tuto kontrolu je 6 francouzských univerzitních laboratoří. Vzorky jsou získávány z terapeutických plazmaferéz. Počet laboratoří, které se zúčastnily prvního cyklu v r. 2001, byl ve Francii 1118 a v r. 2004 ve Francii 1423 a v Belgii 152 laboratoří. Zajímavý je přehled metodik pro typizaci paraproteinů v r. 2004. Ve Francii použilo imunofixaci 95,8 %, imuno elektroforézu 2,6 % a kapilární elektroforézu 1,5 % laboratoří. V Belgii imunofixaci použilo 80,6 %, imuno elektroforézu 3,9 % a kapilární elektroforézu 15,5 % laboratoří. Kontrolní cyklus byl zahájen ve Francii v r. 2001 velmi obtížným vzorkem s paraproteinem IgD-lambda a tomu odpovídala i úspěšnost 34,9 % laboratoří, která je velmi podobná našemu cyklu GP1/02 – 38 %. V dalších letech byly rozeslány vzorky s paraproteiny: v r. 2002 IgA-kappa, r. 2003 IgM-lambda a v r. 2004 znovu IgM-lambda. Úspěšnost byla 96,6%, 90,9% a 96,3% a je velmi podobná úspěšnosti našich laboratoří při typizaci paraproteinů v posledních dvou letech. U nás v r. 2005 již imuno elektroforézu použila jen 1 laboratoř, všechny ostatní provádějí imunofixační elektroforézu.

Předložené výsledky kontrolního cyklu „Gamapatie“ za posledních deset let potvrdily užitečnost a oprávněnost zavedení tohoto cyklu. Tento kontrolní cyklus výrazně přispěl ke zkvalitnění průkazu a částečně i kvantifikace monoklonálních imunoglobulinů v českých i slovenských (6 laboratoří) klinických laboratořích.

Literatura

1. **Albaréde, S.** Evaluation of the French National External Quality Assessment of Monoclonal Immunoglobulin 2001–2004. In EQALM Symposium, Roma, 9.–11. 10. 2005.
2. **Attalmanan, M., Levinson, S. S.** Understanding and Identifying Monoclonal Gammopathies. *Clin. Chem.*, 2000, 46, 8, p. 1230–1238.
3. **Gupta, S., Comenzo, R. L., Hoffman, B. R., Fleisher, M.** National Academy of Clinical Biochemistry Guidelines for the Use of Tumor Markers in Monoclonal Gammopathies. NACB: Practice Guidelines and Recommendations for Use Laboratory Methods practice guidelines, *Tumor Markers*, 2005, www.aacc.org.
4. **Keren, D. F.** Procedures for the Evaluation of Monoclonal Immunoglobulins. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 1999, 123, 2, p. 126–132.
5. **Keren, D. F., Alexanian, R., Goeken, J. A., Gorevic, P. D., Kyle, R. A., Tomar, R. H.** Guidelines for Clinical and Laboratory Evaluation of Patients with Monoclonal Gammopathies. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 1999, 123, 2, p. 106–107.
6. **Králová, E., Nováková, H.** Problémy kvantitativního stanovení monoklonálních imunoglobulinů. *Klin. Biochem. Metab.*, 1999, 7 (28), 3, s. 149–152.
7. **Kyle, R. A.** The Monoclonal Gammopathies. *Clin. Chem.*, 1994, 40, 11, p. 2154–2161.
8. **Tichý, M., Urban, P., Matěja, F., Hrnčíř, Z., Plíšková, L., Mraček, J.** Laboratorní analýza souboru 3049 monoklonálních imunoglobulinů (paraproteinů). *Klin. Biochem. Metab.*, 2002, 10 (31), 4, s. 257–261.
9. **Tichý, M.** Paraproteinémie nejasného významu. *Klin. Biochem. Metab.*, 1998, 6 (27), 3, s. 172–175.
10. **Tichý, M.** Stanovení monoklonálních imunoglobulinů a jejich fragmentů u monoklonálních gamapatií – editorial. *Vnitř. Lék.*, 2005, 51, 11, s. 1225–1227.
11. **Tichý, M., Řeháček, V., Maisnar, V., Dominiková, K., Palička, V.** Monoklonální gamapatie v souboru 1683 dárců plazmy. *Čas. Lék. čes.*, 2004, 143, 6, p. 401–404.
12. **Tichý, M., Friedecký, B., Vávrová, J., Maisnar, V., Palička, V. et al.** Standardizace biochemických laboratorních vyšetření u mnohočetného myelomu. *Klin. Biochem. Metab.*, 2006, 14 (35), 1, s. 8–13.

Do redakce došlo 6. 4. 2006.

Adresa pro korespondenci:
Prof. RNDr. Miloš Tichý, CSc.
ÚKBD FN a LF Hradec Králové
Sokolská 581
500 05 Hradec Králové
e-mail: tichy@fnhk.cz