

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Nauk o Zdrowiu



Aleksandra Maleszka

**Rozbieżności badań laboratoryjnych
w diagnostyce chorób związanych z dyskracją komórek plazmatycznych**

Praca doktorska

Promotor: dr hab. Ryszard Drożdż

Promotor pomocniczy: dr n. med. Joanna Tisończyk

Praca wykonana w Zakładzie Diagnostyki Medycznej
Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum
Kierownik Zakładu: dr hab. Ryszard Drożdż

oraz

w Zakładzie Diagnostyki Szpitala Uniwersyteckiego
w Krakowie
Kierownik Zakładu: dr med. Barbara Maziarz

Kraków, 2023 rok

*Pragnę złożyć wyrazy szczerzej wdzięczności mojemu promotorowi
Panu dr hab. Ryszardowi Drożdżowi za merytoryczne ukierunkowanie
niniejszej rozprawy doktorskiej, cenne rady i poświęcony czas.*

*Serdecznie dziękuję Pani promotor dr Joannie Tisończyk za okazaną
życzliwość i pomoc w trakcie realizacji i redagowania pracy.*

*Składam podziękowania Pani dr Barbarze Maziarz, Kierownikowi
Zakładu Diagnostyki Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie za
możliwość wykonania niniejszej pracy i nieustającą motywację.*

Dziękuję mojej Rodzinie za wsparcie.

Spis treści

Wykaz skrótów	6
1. Wstęp	8
1.1 Klasyfikacja i charakterystyka dyskracji plazmocytowych	8
1.2 Oznaczanie białek w dyskracjach plazmocytowych	11
1.3 Problemy w oznaczaniu białka monoklonalnego metodą elektroforetyczną	20
1.4 Możliwe nieprawidłowości, interferencje oraz problemy metodyczne w badaniach laboratoryjnych u pacjentów z dyskracjami plazmocytowymi	24
1.4.1 Najczęstsze nieprawidłowości w wynikach podstawowych badań laboratoryjnych	25
1.4.2 Oznaczanie stężenia albuminy u chorych z dyskracjami plazmocytowymi	25
1.4.3 Charakterystyczne właściwości materiału biologicznego uzyskiwanego od pacjentów z dyskracjami plazmocytowymi – interferencje w badania laboratoryjne	26
1.5 Trudności metodyczne oznaczania łańcuchów lekkich immunoglobulin	27
1.5.1 Testy służące do półilościowego oznaczania białka w moczu – czy mierzą białko „Bence-Jonesa”?	28
1.5.2 Oznaczanie wolnych łańcuchów (FLC) w surowicy	28
1.5.3 Niespójności dotyczące oznaczania wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin w surowicy testem Freelite®	32
1.5.4 Testy FLC oparte o przeciwciała monoklonalne	32
1.6 Zjawisko przemijających i wtórnych gammapatii monoklonalnych	33
1.7 Gammapatie monoklonalne u pacjentów z zaburzeniami neurologicznymi	34
1.8 Wpływ krioglobulin i zespołu nadlepkości na wyniki laboratoryjne	35
1.9 Daratumumab-przełomowy lek w terapii celowanej a interferencje w badaniach laboratoryjnych	40
1.10 Nieprawidłowości w przesiewowych testach krzepnięcia u pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym	42
2. Cel pracy i problemy badawcze	43
3. Pacjenci, materiały i metody badawcze	44
3.1 Grupa badana	44

3.2 Materiały	45
3.3 Metodyka badań	45
3.3.1 Metody analityczne oraz aparatura	45
3.3.2 Wyznaczenie czułości analitycznej testów paskowych dla wolnych łańcuchów lekkih	46
3.3.3 Opracowanie statystyczne wyników	48
4. Wyniki	50
4.1 Różnice w stężeniu albuminy w zależności od wybranej metody	50
4.2 Ilościowe oznaczanie białka monoklonalnego metodą elektroforetyczną	54
4.3 Czułość testów paskowych dla łańcuchów lekkih immunoglobulin	58
4.4 Nieśpójności dotyczące oznaczania wolnych łańcuchów lekkih immunoglobulin w surowicy testem Freelite®	62
4.5 Przemijające i wtórne gammapatie monoklonalne	67
4.6 Gammapatie monoklonalne u pacjentów z zaburzeniami neurologicznymi	73
4.7 Wpływ krioglobulin i zespołu nadlepkości na wyniki laboratoryjne	77
4.8 Problemy w interpretacji wyników pacjentów poddawanych immunoterapii	87
4.9 Problem nieprawidłowych wyników badań przesiewowych testów krzepnięcia u pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym	92
5. Dyskusja	95
5.1 Zależne od metody rozbieżności wyników oznaczania stężenia albuminy	95
5.2 Ilościowe oznaczanie białka monoklonalnego metodą elektroforetyczną	96
5.3 Czułość testów paskowych do analizy moczu dla łańcuchów lekkih immunoglobulin	98
5.4 Rozbieżności związane z oznaczaniem wolnych łańcuchów lekkih immunoglobulin w surowicy	100
5.5 Przemijające i wtórne gammapatie monoklonalne	102
5.6 Gammapatie monoklonalne u pacjentów z zaburzeniami neurologicznymi	105
5.7 Krioglobuliny	107
5.8 Daratumumab – interferencje w badaniach elektroforetycznych	111
5.9 Nieprawidłowości w przesiewowych testach krzepnięcia u pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym	113
6. Wnioski	116
7. Streszczenie	119

8. Abstract	121
9. Spis Tabel.....	123
10. Spis Rycin.....	125
11. Piśmiennictwo.....	131

Wykaz skrótów

PCDs - dyskracje plazmocytowe (*Plasma Cell Disorders*)

PCM - szpiczak plazmocytowy (*Plasma Cell Myeloma*)

MGUS - gammapatia monoklonalna o nieustalonym znaczeniu (*monoclonal gammopathy of undetermined significance*)

MGRS - gammapatia monoklonalna o nerkowym znaczeniu (*monoclonal gammopathy of renal significance*)

MGCS - gammapatia monoklonalna o klinicznym znaczeniu (*monoclonal gammopathy of clinical significance*)

SMM - szpiczak bezobjawowy (*smouldering multiple myeloma*)

AL - amyloidoza łańcuchów lekkich (*light chain amyloidosis*)

LCDD - choroba depozytowa łańcuchów lekkich (*light chain deposition disease*)

HCDD - choroba depozytowa łańcuchów ciężkich (*heavy chain deposition disease*)

WM - makroglobulinemia Waldenströma

HVS - zespół nadlepkości (*hyperviscosity syndrome*)

ISS - międzynarodowa klasyfikacja prognostyczna szpiczaka plazmocyтового (*International Staging System for plasma cell myeloma*)

R-ISS - zmodyfikowana międzynarodowa klasyfikacja prognostyczna szpiczaka plazmocyтового (*Revised International Staging System for plasma cell myeloma*)

Białko M - białko monoklonalne

SMC - stężenie białka monoklonalnego (*serum monoclonal concentration*)

SPE - rozdział elektroforetyczny białek surowicy (*serum protein electrophoresis*)

UPE - rozdział elektroforetyczny białek moczu (*urine protein electrophoresis*)

IFE - immunofiksacja (*immunofixation electrophoresis*)

CE - elektroforeza kapilarna (*capillary electrophoresis*)

LC - łańcuchy lekkie immunoglobulin (*light chains*)

TLC - całkowite łańcuchy lekkie immunoglobulin (*total light chains*)

FLC - wolne łańcuchy lekkie immunoglobulin (*free light chains*)

FLCr - stosunek stężenia wolnych łańcuchów lekkich kappa do lambda (*FLC ratio*)

IMWG - Międzynarodowa Grupa Robocza ds. Szpiczaka Mnogiego (*International Myeloma Working Group*)

IPSSWM - Międzynarodowy Indeks Prognostyczny dla makroglobulinemii Waldenströma
(*International Prognostic Staging System for Waldenström's Makroglobulinemia*)

WBLDCT - niskodawkowa tomografia komputerowa całego ciała (*Whole-Body Low-Dose Computer Tomography*)

PMR - płyn mózgowo – rdzeniowy

OUN - ośrodkowy układ nerwowy

WBC - leukocyty (*white blood cells*)

RBC - erytrocyty (*red blood cells*)

HGB - hemoglobina (*hemoglobin*)

HCT - hematokryt (*hematocrit*)

PLT - płytki krwi (*platelets*)

CR - remisja całkowita (*complete remission*)

VGPR - bardzo dobra remisja częściowa (*very good partial remission*)

PR - remisja częściowa (*partial remission*)

OS - całkowity czas przeżycia (*overall survival*)

PFS - czas wolny od progresji (*progression – free survival*)

HDT - terapia wysokodawkowana (*high dose therapy*)

autoHSCT - autologiczne przeszczepienie komórek krwiotwórczych (*autologous hematopoietic stem cell transplant*)

Dara - daratumumab

Wbrane protokoły leczenia szpiczaka plazmocytowego:

TAL-DEX - talidomid i deksametazon

CTX+VEP - cyklofosfamid z etopozydem

VTD - bortezomib, talidomid, deksametazon

CyBorD - cyklofosfamid, bortezomib, deksametazon

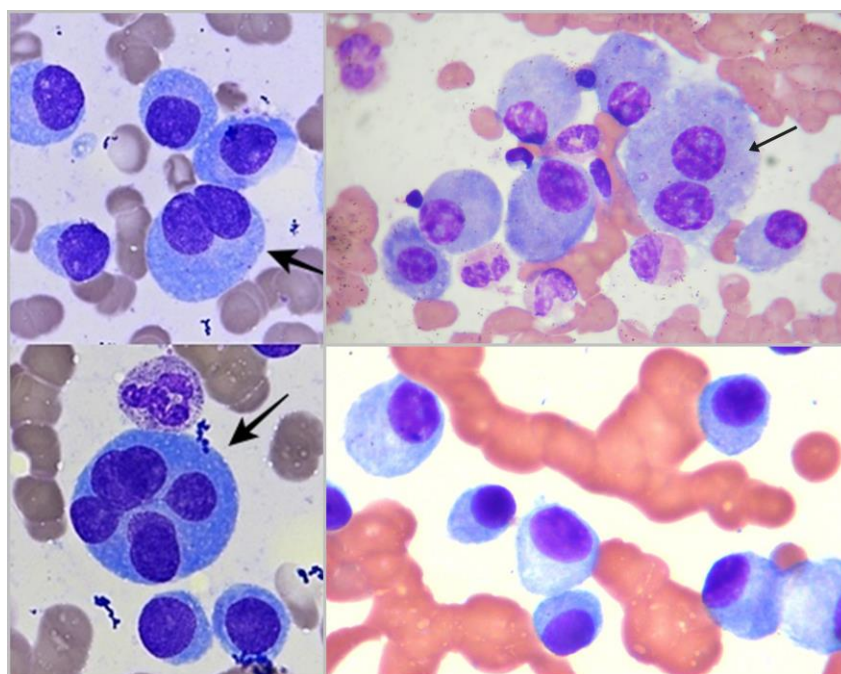
DVd - daratumumab, bortezomib, deksametazon

1. Wstęp

1.1 Klasyfikacja i charakterystyka dyskracji plazmocytowych

Dyskracje plazmocytowe (*Plasma Cell Disorders* - PCDs) to grupa chorób, charakteryzująca się nowotworowym rozrostem plazmocytów, któremu w wielu przypadkach towarzyszy wytwarzanie jednorodnego białka - monoklonalnej immunoglobuliny (białka M) oraz/lub jej podjednostek: monoklonalnych wolnych łańcuchów lekkich lub ciężkich.

Rozrosty plazmatyczne stanowią 1 % wszystkich nowotworów oraz 15 % nowotworów krwi. Obejmują trzy grupy chorób: szpiczak plazmocytowy (dawniej zwany mnogim), plazmocytoza (guz plazmatyczno-komórkowy kości oraz postać pozakostna) oraz choroby depozytowe z odkładania immunoglobulin, tzn: pierwotna układowa amyloidoza łańcuchów lekkich (*light-chain amyloidosis* - AL), choroba depozytowa łańcuchów lekkich (*light-chain deposition disease* - LCDD) oraz choroba depozytową łańcuchów ciężkich (*heavy-chain deposition disease* - HCDD) (1) (2). Sam szpiczak plazmocytowy (*Plasma Cell Myeloma* - PCM) jest złośliwą chorobą nowotworową, która charakteryzuje się klonalną proliferacją atypowych plazmocytów w szpiku kostnym. Przykładowy obraz szpiku kostnego (z licznymi plazmocydami) w przebiegu szpiczaka przedstawia Ryc. 1.



Ryc. 1 Rozmaz aspiratu szpiku kostnego u pacjenta ze szpiczakiem plazmocytowym. Widoczne skupiska plazmocytów i rulonizacja erytrocytów. Fot. dr Marta Szostek, Katedra i Klinika Hematologii Collegium Medicum Uniwersytet Jagielloński.

PCM jest najczęściej występującym nowotworem wywodzącym się z komórek plazmatycznych. Zachorowalność na tą chorobę w Europie wynosi 4,5 do 6 na 100 000 mieszkańców na rok. W Polsce jest drugą pod względem liczby nowych przypadków chorobą nowotworową układu limfoidalnego u osób dorosłych. Chorzy to przeważnie osoby po 50 rż., nieco częściej mężczyźni ($M/K = 1,21$), mediana wieku w momencie rozpoznania wynosi 72 lata. (1), (3).

Szpiczak plazmocytowy pod względem klinicznym jest chorobą bardzo niejednorodną - może dawać zróżnicowane objawy kliniczne. Zwykle opieka nad pacjentem jest interdyscyplinarna - angażuje lekarzy takich specjalności jak: hematologia, immunologia, ortopedia, nefrologia, neurologia i inne. Szpiczak plazmocytowy może mieć bardzo różną dynamikę rozwoju. Prawie zawsze poprzedzony jest wystąpieniem gammapatii o nieustalonym znaczeniu (*Monoclonal Gammopathy of Unknown Significance* - MGUS), która określana jest jako stan przednowotworowy, a jedyną nieprawidłowością stwierdzoną w badaniach laboratoryjnych jest obecność piku białka monoklonalnego w rozdziale elektroforetycznym surowicy krwi. Pomimo występowania białka monoklonalnego w surowicy pacjentów (w ilości nie większej niż 30 g/l), nie obserwuje się uszkodzenia narządowego, które wynika z rozrostu plazmocytów. MGUS występuje u 3% osób w wieku powyżej 50 lat i u 5% osób w wieku ponad 70 lat. Ryzyko progresji MGUS w kierunku szpiczaka wynosi 1% na rok.

Obok pełnoobjawowego szpiczaka plazmocyтового, zgodnie z klinicznie wykorzystywaną klasyfikacją WHO, wśród nowotworów wywodzących się z komórek plazmatycznych można wyodrębnić także szpiczaka bezobjawowego, szpiczaka niewydzielającego oraz białaczkę plazmatyczno-komórkową.

Szpiczak bezobjawowy, tlący (*Smoldering Multiple Myeloma* – SMM) jest stanem pośrednim między MGUS a szpiczakiem plazmocytowym. Diagnoza SMM dotyczy pacjentów, którzy nie spełniają kryteriów diagnostycznych szpiczaka plazmocyтового, m.in. zawartość plazmocytów w szpiku kostnym lokuje się w przedziale 10-60%, a stężenie białka M w ich surowicy jest równe lub większe niż 30 g/l. W takich przypadkach ryzyko progresji do szpiczaka objawowego to ok. 10% na rok.

Szpiczak niewydzielający, charakteryzujący się brakiem białka M pomimo zwiększonej zawartości komórek plazmatycznych w szpiku kostnym (> 10 %), stanowi natomiast blisko 2% przypadków szpiczaka (4).

Białaczka plazmatycznokomórkowa jest najbardziej agresywną formą szpiczaka i występuje w 2-5% jego przypadków. Warunkiem rozpoznania jest stwierdzenie co najmniej

5% klonalnych plazmocytołów w rozmazie krwi obwodowej ze współistniejącym szpiczakiem plazmocytowym (5), (6).

W grupie dyskrazji plazmocytowych można wyodrębnić także makroglobulinemię Waldenströma. W tym przypadku rozrost nowotworowy dotyczy komórek limfoplazmocytowych, natomiast białko monoklonalne wytwarzane jest w klasie IgM. Dodatkowo choroba ma nieco odmienny przebieg kliniczny niż szpiczak plazmocytowy, a nowotworowo zmienione komórki lokalizują się nie tylko w szpiku kostnym, ale także w np. węzłach chłonnych.

Obok przedstawionej powyżej klasyfikacji (1) w piśmiennictwie można spotkać również innego typu klasyfikację, stworzoną w oparciu o objawy kliniczne.

W 2012 wyodrębniono grupę gammopatii monoklonalnych o nerkowym znaczeniu (*monoclonal gammopathy of renal significance* –MGRS) (7). Zespół ekspertów zebranych w ramach działań grupy International Kidney and Monoclonal Gammopathy Research zaproponował ten termin dla opisu chorób nerek spowodowanych obecnością białka monoklonalnego, natomiast ich kryteria diagnostyczne zostały zaktualizowane w 2019 roku (8). Pod względem hematologicznym pacjenci z MGRS spełniają kryteria MGUS.

W przypadku MGRS do uszkodzenia nerek dochodzi na drodze mechanizmu bezpośredniego (kumulacja białka monoklonalnego w nerkach prowadząca do dysfunkcji narządu) lub mechanizmu pośredniego (upośledzenie kaskady dopełniacza przez monoklonalne immunoglobuliny) (9).

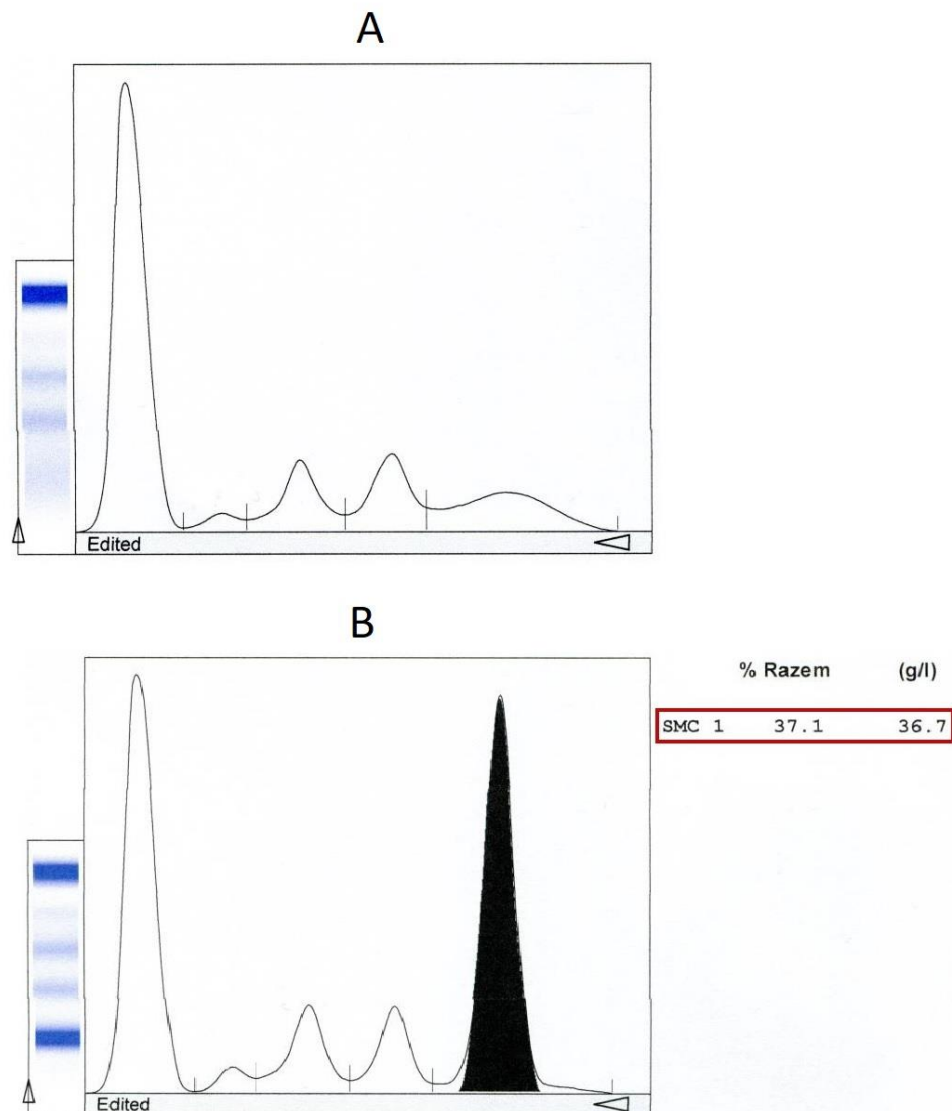
MGRS został dobrze opisany i przez jakiś czas budził duże zainteresowanie klinicystów i naukowców zajmujących się tematyką dyskrazji plazmocytowych. Zauważono również, że samo wydzielanie oraz odkładanie się w tkankach białka M może stać się przyczyną uszkodzenia wielu narządów. W ten sposób, w roku 2018 powstało pojęcie MGCS - *monoclonal gammopathy of clinical significance*, które używane jest do opisu niezłośliwych gammopatii monoklonalnych powodujących poważne uszkodzenie narządów (najczęściej nerek, nerwów obwodowych, skóry) (10). Najszerzej opisanym, znanym już od dawna zespołem klinicznym klasyfikowanym jako MGCS jest zespół POEMS charakteryzujący się współistnieniem: polineuropatii (P), powiększenia organów: wątroby, śledziony i węzłów chłonnych (O - organomegalia), endokrynopatii (E), gammopatii monoklonalnej (M) oraz zmian skórnych (S) (11) (12).

1.2 Oznaczanie białek w dyskrazjach plazmocytowych

Jednym z najbardziej charakterystycznych objawów chorobowych w przebiegu szpiczaka plazmocyтового, a także w gammapatiach poprzedzających pełnoobjawowego szpiczaka, jest obecność białka monoklonalnego (białka M). Najczęściej jest to immunoglobulina klasy IgG (56 %), w dalszej kolejności immunoglobulina klasy IgA (27%) oraz łańcuchy lekkie immunoglobulin (ok.13%). Rzadziej spotykanymi formami rozrostu komórek plazmatycznych są plazmocyty produkujące immunoglobuliny klasy IgD (ok 2%). Dyskrazje, w których nie mamy do czynienia z wydzielaniem białka monoklonalnego (szpiczak niewydzielający) stanowią ok. 2% przypadków choroby (13). Natomiast wytwarzanie białka monoklonalnego w klasie IgE jest niezwykle rzadkie - opisano jedynie nieco ponad 60 takich przypadków na świecie (14).

Chociaż, zgodnie z nowymi wytycznymi diagnozowania pełnoobjawowego szpiczaka plazmocyтового, oznaczenie stężenia immunoglobuliny monoklonalnej nie jest już niezbędne, lekarze-praktycy wciąż zlecają to oznaczenie, zarówno podczas diagnozowania, jak i monitorowania choroby (15). Jednym z badań wykonywanych zwykle w przebiegu diagnozowania dyskrazji plazmocytowych jest oznaczenie stężenia całkowitych cząsteczek immunoglobulin (Intact Ig): IgG, IgA, IgM, IgE, IgD. Metodami referencyjnymi są tu metody immunochemiczne (metoda nefelometryczna lub turbidymetryczna). U chorych stężenie immunoglobuliny monoklonalnej jest zwykle podwyższone, natomiast pozostałych klas pozostaje w granicach referencyjnych, bądź jest obniżone w wyniku supresji prawidłowych plazmocytów przez klon nowotworowy (16). Jednak używając metod immunochemicznych nie uzyskujemy odpowiedzi na pytanie, czy dane białko jest monoklonalne (a tylko takie jest oznaką rozrostu nowotworowego). W związku z tym istnieje konieczność uzupełnienia o badanie elektroforetyczne surowicy, w którym można zobaczyć, czy występuje immunoglobulina monoklonalna, która ze względu na jednolity skład aminokwasowy, a więc i ładunek, migruje jako jeden prążek i przybiera zwykle charakterystyczny wygląd ostrego, dobrze zdefiniowanego piku.

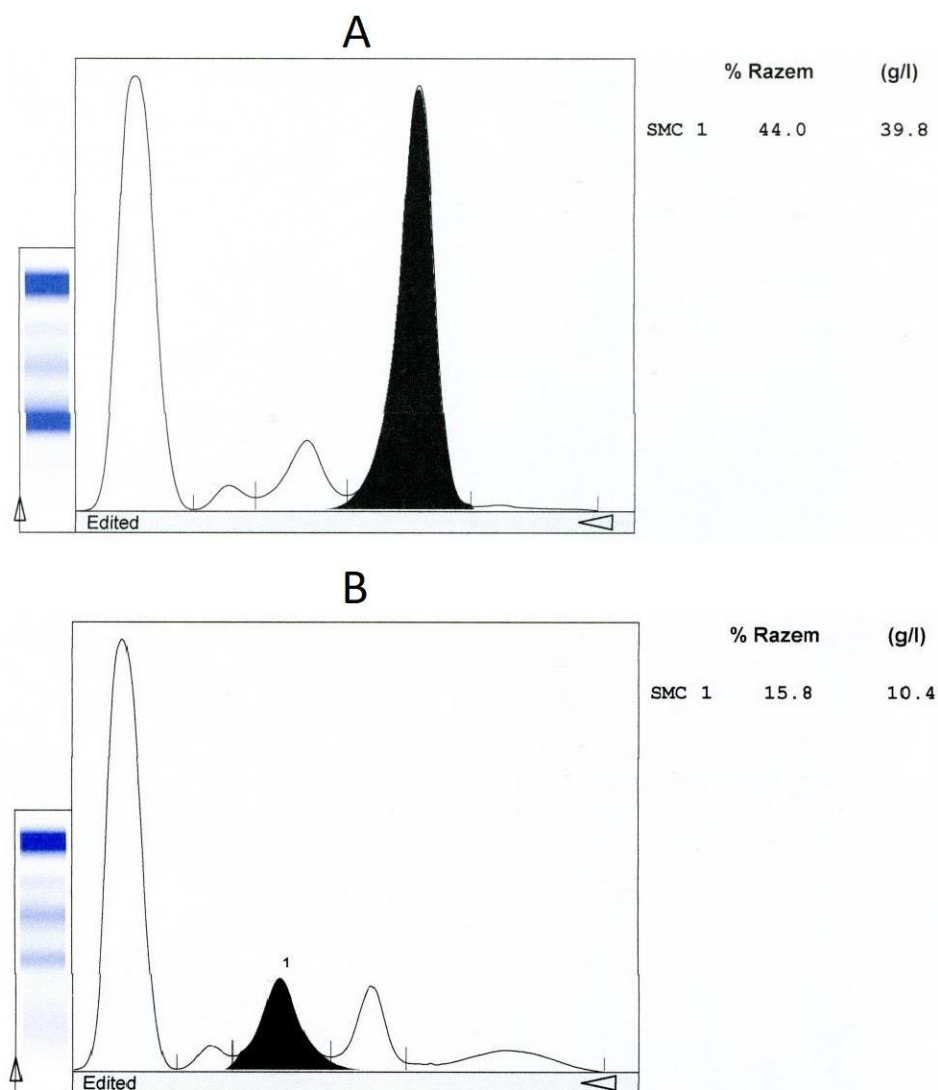
Obok informacji o obecności/braku białka M, metoda elektroforetyczna (*Serum Protein Electrophoresis* - SPE) może służyć również do ilościowego oznaczania białka monoklonalnego w surowicy (Ryc. 2).



Ryc. 2 Wynik rozdziału elektroforetycznego białek surowicy: prawidłowy (A) oraz z widoczną strefą białka monoklonalnego we frakcji gamma-globulin (B). Na rycinie podkreślono różnicę w sposobie migracji frakcji gamma. W prawidłowej surowicy różnorodność ładunku immunoglobulin powoduje powstanie „rozszerzonej” frakcji białkowej. Immunoglobulina monoklonalna jest produktem jednego klonu plazmacytów, a więc białkiem o jednorodnym ładunku – stąd charakterystyczny wzór migracji w postaci ostrego, odgraniczonego piku. Czerwoną ramką zaznaczono parametr SMC (*Serum Monoclonal Concentration*) –wyliczone na podstawie intensywności piku elektroforetycznego stężenie białka monoklonalnego.

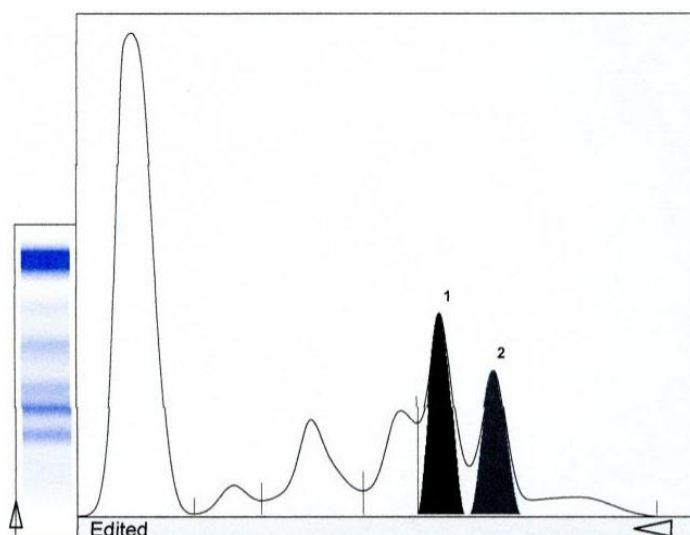
Rzadziej zdarza się, że nowotworowe białko M umiejscowione jest we frakcji beta-globulin, frakcji alfa-2 (Ryc. 3) lub pomiędzy tymi frakcjami. Zjawisko migracji białka monoklonalnego wraz z innymi białkami nazywamy komigracją. W takich przypadkach ilościowe oznaczenie białka M w oparciu o rozdział elektroforetyczny jest utrudnione,

ponieważ niemożliwe jest odseparowanie monoklonalnego piknu od prawidłowych białek frakcji beta czy alfa 2.



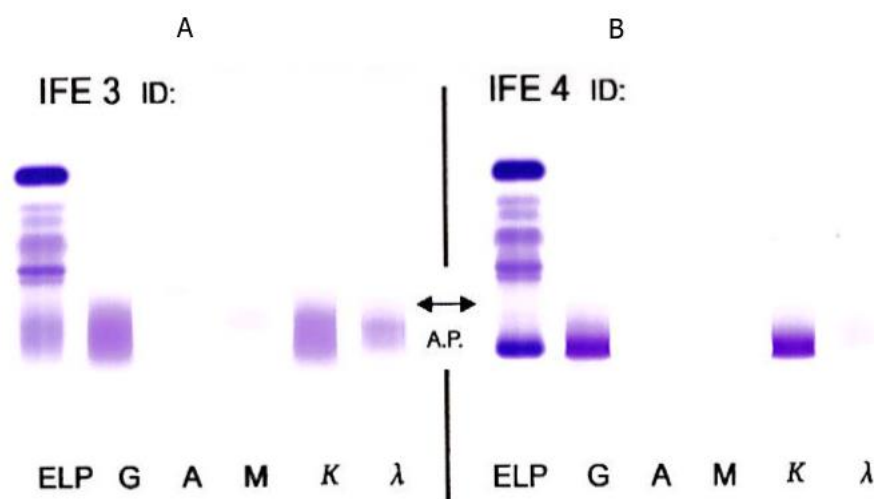
Ryc. 3 Elektroforegram ze strefą białka monoklonalnego we frakcji beta (A) i w paśmie alfa-2 (B). Zawartość białka monoklonalnego wyliczone łącznie z frakcją odpowiednio: beta i alfa-2.

W jeszcze rzadszych przypadkach białko M może być wytwarzane przez dwa niezależne klony komórek plazmatycznych. Na proteinogramie uzyskamy wówczas dwa piki białka monoklonalnego (Ryc. 4).



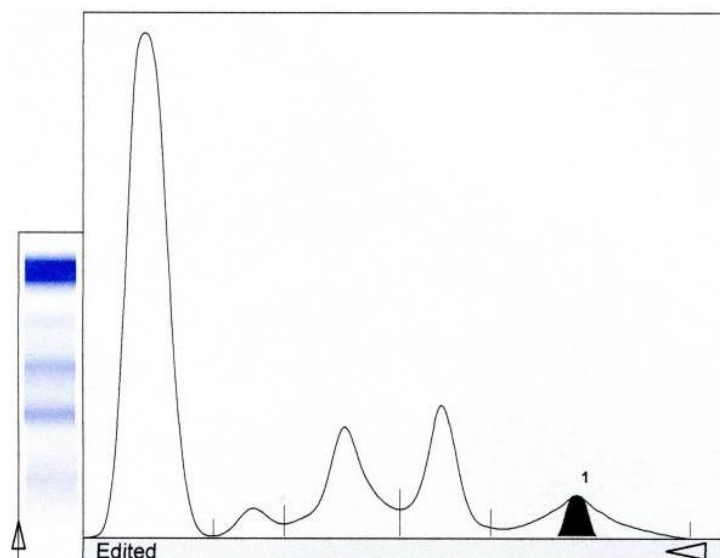
Ryc. 4 Wynik elektroforezy białek surowicy przedstawiający białko biklonalne. Obie frakcje monoklonalne migrują jako dwa dobrze odgraniczone piki, co umożliwia niezależne oznaczenie każdego z nich w sposób ilościowy.

Badaniem pozwalającym na określenie rodzaju białka monoklonalnego jest technika elektroforetyczna zwana immunofiksacją (*Immunofixation Electrophoresis* - IFE). Metoda badania polega na równoległym rozdziale próbki surowicy na sześciu ścieżkach, a następnie selektywnym utrwaleniu przy pomocy odpowiednich przeciwciał immunoglobulin klasy IgG, IgA, IgM oraz łańcuchów kappa i lambda (Ryc. 5).



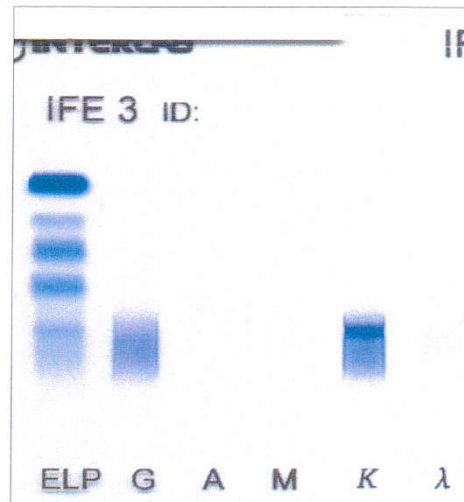
Ryc. 5 Immunofiksacja białek surowicy: ujemna tzn. bez obecności monoklonalnej immunoglobuliny (A) i z obecnością białka monoklonalnego: klasy IgG typu kappa (B). Na ścieżce G oraz κ widoczny charakterystyczny wzór migracji białka monoklonalnego – jako ostry odgraniczony pik. Dodatkowo o nieprawidłowej klonalności świadczą zaburzone proporcje intensywności prążków kappa oraz lambda (ścieżka κ i λ).

Niejednokrotnie ilość białka monoklonalnego jest niewielka, a całkowite stężenie immunoglobulin nie przekracza zakresów referencyjnych i wynik rozdziału elektroforetycznego białek surowicy może stwarzać problemy interpretacyjne lub nawet może zostać uznany za prawidłowy (Ryc. 6).



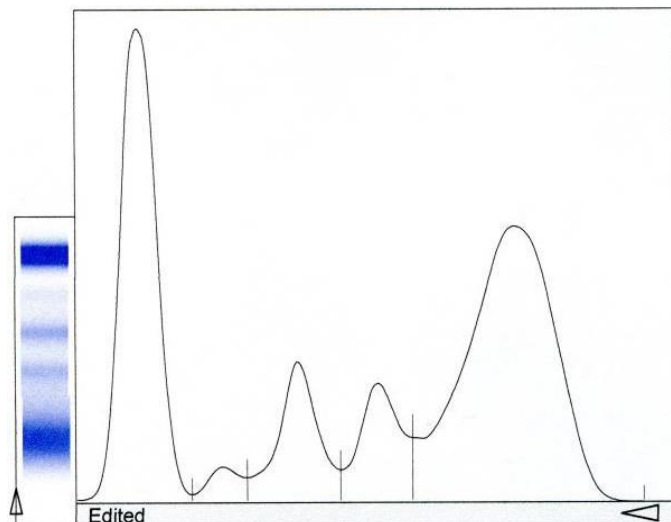
Ryc. 6 Proteinogram z niewielkim pikiem białka monoklonalnego w strefie gamma.

Opierając się jedynie na rozdziale elektroforetycznym białek surowicy można przeoczyć przypadki z niewielkim stężeniem białka monoklonalnego, dlatego w trakcie diagnostyki i podczas monitorowania leczenia zalecane jest wykonanie IFE, która jest metodą o większej czułości. Używając metody SPE można wykryć białko monoklonalne przy stężeniu co najmniej 500 mg/l, natomiast IFE ujawnia obecność białka M już przy stężeniu 100 mg/l (17). W przypadku przedstawionym na powyższej rycinie (Ryc. 6), immunofiksacja surowicy pacjenta ukazała obecność wolnych łańcuchów lekkich typu kappa (Ryc. 7).



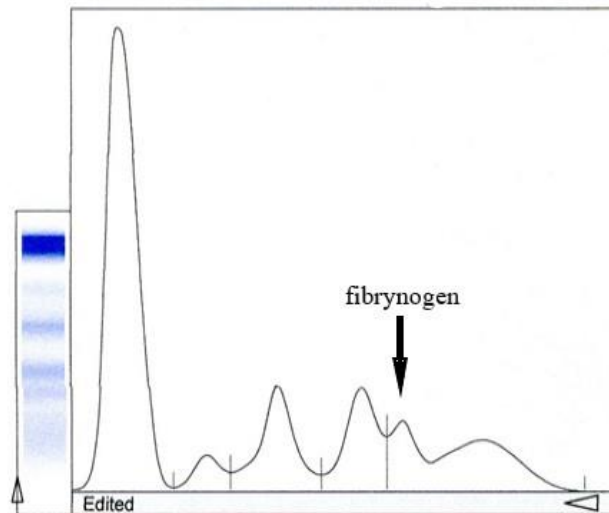
Ryc. 7 Immunofiksacja surowicy z widocznym prążkiem odpowiadającym wolnym łańcuchom lekkim kappa.

Przy pomocy elektroforezy możemy również wykluczyć obecność białka monoklonalnego, mimo podwyższonego całkowitego stężenia immunoglobulin (Ryc. 8).



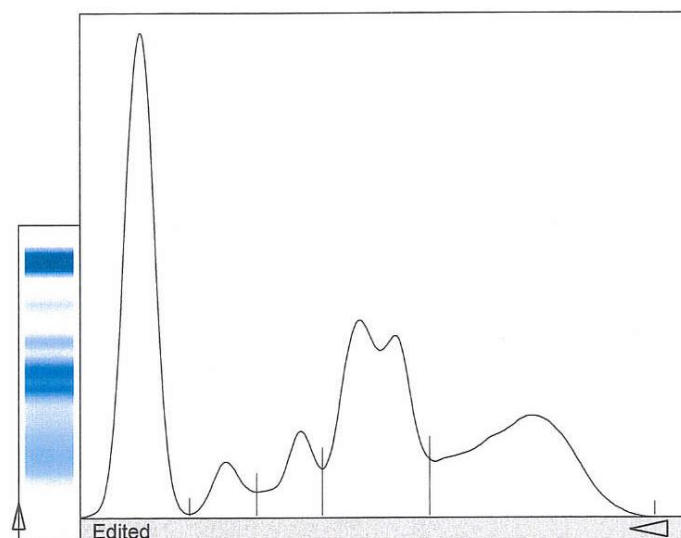
Ryc. 8 Proteinogram przedstawiający wzrost stężenia immunoglobulin poliklonalnych (hypergammaglobulinemia poliklonalna), brak białka monoklonalnego. Pomimo, że frakcja gamma jest podwyższona, rozlany sposób migracji wskazuje na immunoglobuliny poliklonalne, których obecność towarzyszy przewlekłym stanom zapalnym.

Tak jak w każde badanie laboratoryjne, również elektroforeza może być obciążona błędem związanym z fazą przedanalityczną. Materiałem do badania jest surowica. Obecny w osoczu fibrynogen migruje we frakcji gamma-globulin i może imitować prążek monoklonalny (Ryc. 9).



Ryc. 9 Elektroforeza białek wykonana w osoczu. Widoczny pik pochodzący od fibrynogenu w paśmie gamma-globulin – komponenta pseudomonoklonalna.

Należy również pamiętać, że znaczna hemoliza dyskwalifikuje próbkę. W przypadku zignorowania obu tych zaleceń, osoba interpretująca badanie napotyka problemy, które związane są z potencjalną obecnością piku przypominającego białko monoklonalne (tzw. komponenta pseudomonoklonalna). Obecność wolnej hemoglobiny w zhemolizowanej próbce powoduje pojawienie się prążka we frakcji alfa-2 lub beta (Ryc. 10), który może zostać uznany za białko M.

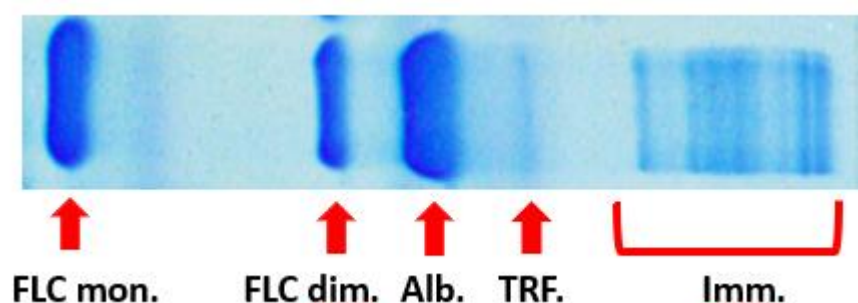


Ryc. 10 Elektroforeza białek w surowicy ze znaczną hemolizą. Na rycinie widoczna jest podwójna frakcja beta. W tym przypadku wolna hemoglobina migruje we frakcji beta dając dodatkowy prążek, który może być mylnie uznany za białko M. U pacjenta nie stwierdzono obecności białka monoklonalnego.

W razie wątpliwości i uzyskania niejednoznacznych proteinogramów należy zawsze wykonać badanie immunofiksacji surowicy.

Z powyższych informacji wynika, że badanie SPE mimo, że niezbędne i wykonywane jako badanie „pierwszego rzutu” w diagnostyce dyskracji plazmocytowych, obarczone jest ograniczeniami: niską czułością i koniecznością wykonania z surowicy bez oznak hemolizy.

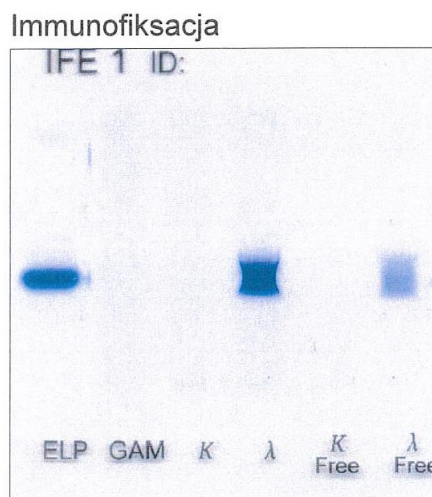
Innym badaniem rutynowo zlecanym przy podejrzeniu gammapatii monoklonalnych jest elektroforeza białek moczu (*Urine Protein Electrophoresis* - UPE), którą można wykonywać na żelach poliakrylamidowych z dodatkiem siarczanu dodecylu sodu (*Sodium Dodecyl Sulphate* - SDS) (Ryc. 11). Główną zaletą tego systemu jest rozdział zgodnie z masą cząsteczkową białek.



Ryc. 11 Badanie elektroforetyczne białkomoczu pacjenta z gammapatią monoklonalną. Widoczna intensywna, podwójna strefa monomeru i dimeru wolnych łańcuchów lekkich (FLC mon. /dim.) oraz obecność prążków białkowych w strefach migracji: albuminy (Alb.), transferyny (TRF.) oraz immunoglobulin (Imm). Obraz jest charakterystyczny dla białkomoczu nieselektywnego. W moczu widoczne są również prążki w strefie białek drobnocząsteczkowych. Dwa z nich mają charakterystyczną dla wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin lokalizację.

Wadą tej metody jest brak pewności czy białka migrujące w strefie białek drobnocząsteczkowych to rzeczywiście wolne łańcuchy lekkie immunoglobulin (FLCs – free light chains) i czy one są monoklonalne. Stąd następnym krokiem w diagnostyce laboratoryjnej powinna być immunofiksacja moczu.

Jednym z kryteriów całkowitej remisji choroby (*Complete Remission* - CR) jest brak obecności białka monoklonalnego w wynikach immunofiksacji surowicy i moczu (1). W związku z tym coraz więcej ośrodków zajmujących się diagnozowaniem dyskracji plazmocytowych, w tym Zakład Diagnostyki Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie, wprowadził badanie immunofiksacji moczu do panelu badań rutynowych (Ryc. 12).



Ryc. 12 Immunofiksacja białek moczu - widoczne wolne łańcuchy lekkie lambda (ścieżka λ oraz free λ).

Kolejnym badaniem laboratoryjnym o dużym znaczeniu w diagnostyce dyskracji plazmocytowych jest ilościowe oznaczenie stężenia wolnych łańcuchów lekkich w surowicy (*Free Light Chains* - FLC). Parametr FLC pierwszy raz został wprowadzony do rutynowej diagnostyki dyskracji plazmocytowych w USA w roku 2001 (18). Jest czułym i uznanym testem do monitorowania przebiegu choroby i określenia odpowiedzi na leczenie. Oznaczenie FLC jest niezbędne, szczególnie w przypadku chorób, w których badania elektroforetyczne dają wynik ujemny (szpiczak niewydzielający, choroba łańcuchów lekkich) (15). Oznaczenie wykonuje się techniką nefelometryczną lub turbidymetryczną. W teście użyte są poliklonalne lub monoklonalne przeciwciała swoiste dla epitopów znajdujących się tylko na niezwiązanych z łańcuchem ciężkim łańcuchach lekkich, zatem oznaczane są wyłącznie wolne łańcuchy lekkie. Badanie to cechuje wysoka czułość (3–4 mg/l) w porównaniu z immunofiksacją, gdzie obecność łańcuchów lekkich można stwierdzić jeśli ich stężenie wynosi co najmniej 100 mg/l (17). Ze względu na krótki okres półtrwania (2-6 godzin) stężenie FLC w surowicy dynamicznie się zmienia, więc badanie to używane jest jako wczesny marker odpowiedzi na terapię.

Najnowszym testem diagnostycznym w ocenie klonalności immunoglobulin w dyskracjach plazmocytowych jest test służący do oznaczania łańcuchów ciężkich (*Heavy Chain/Light Chain immunoassays* - "Hevlyte" - HLC)(19). Wykorzystane w nim zostały przeciwciała rozpoznające wiązanie pomiędzy łańcuchem ciężkim i lekkim konkretnej klasy i typu immunoglobuliny. Pomiaru dokonuje się parami dla każdej z trzech głównych klas immunoglobulin. Test HLC obejmuje 6 parametrów: IgGκ, IgGλ, IgAκ, IgAλ, IgMκ, IgMλ.

W kolejnym kroku oblicza się współczynnik stosunku stężeń tych cząsteczek w każdej klasie (*Heavy/Light Chain ratio* - HLCr) i odnosi się do zakresu wartości referencyjnych. HLCr stanowi wskaźnik klonalności immunoglobulin. Testy HLC dostarczają zatem ilościowej informacji o stężeniu monoklonalnego izotypu immunoglobuliny oraz o immunosupresji nienowotworowego izotypu (20). Dla przykładu pacjent z monoklonalnym białkiem IgA lambda będzie miał zwiększone stężenie izotypu IgA λ , supresję izotypu IgA κ i obniżony współczynnik IgA κ /IgA λ .

HLC mają szczególne zastosowanie w szpiczakach niewydzielających, w których oznaczenia białka monoklonalnego za pomocą elektroforezy i nefelometrii nie jest możliwe, oraz w szpiczakach IgA, w których obecność dimerów IgA oraz zjawisko komigracji z innymi białkami surowicy mogą utrudniać dokładną kwantyfikację densytometryczną białka monoklonalnego (21).

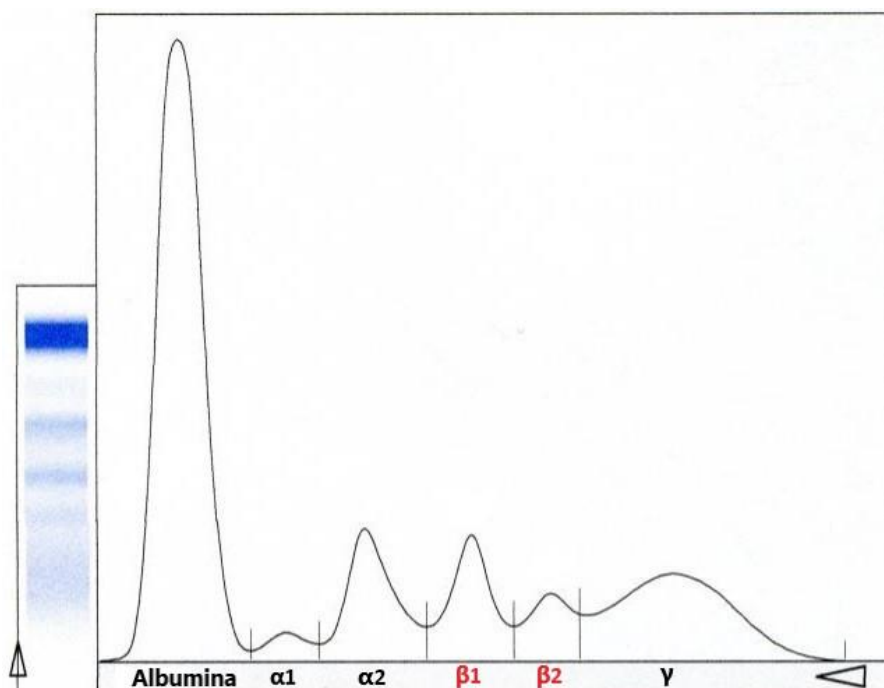
Kolejnymi białkami użytecznymi w diagnostyce dyskracji plazmocytowych są β 2-mikroglobulina oraz albumina, których stężenia są uwzględniane w międzynarodowej klasyfikacji prognostycznej szpiczaka plazmocyтового (22). β 2-mikroglobulina (β 2-M) jest białkiem o niskiej masie cząsteczkowej, obecnym na powierzchni komórek jądrzastych. Białko to jest uznawane za wskaźnik masy nowotworowego klonu komórek plazmatycznych. Podwyższone stężenie β 2-M wskazuje na dużą agresywność choroby (23). Obniżone stężenie albuminy z kolei może świadczyć o zajęciu nerek przez proces chorobowy, co zawsze jest czynnikiem niekorzystnym rokowniczo. Niskie stężenie albuminy jest także symptomem uogólnionego wyniszczenia organizmu.

Zmiany białkowe towarzyszące szpiczakowi są charakterystyczne dla tej choroby. Jednak użycie rutynowych testów laboratoryjnych wymaga szczególnej uwagi, gdyż zwykle zaprojektowane są do innych celów diagnostycznych niż diagnostyka stosunkowo rzadkiego szpiczaka plazmocyтового. Niewłaściwa interpretacja wyników lub użycie niewłaściwych metod może zaowocować poważnymi błędami opóźniającymi rozpoznanie choroby, lub dającymi błędne informacje w procesie leczenia/monitorowania.

1.3 Problemy w oznaczaniu białka monoklonalnego metodą elektroforetyczną

Elektroforeza białek surowicy (SPE) jest jednym z podstawowych narzędzi w diagnostyce chorych z dyskracjami plazmocytowymi. Jest badaniem szeroko dostępnym i stosunkowo (w porównaniu z innymi testami stosowanymi w diagnozowaniu chorych z

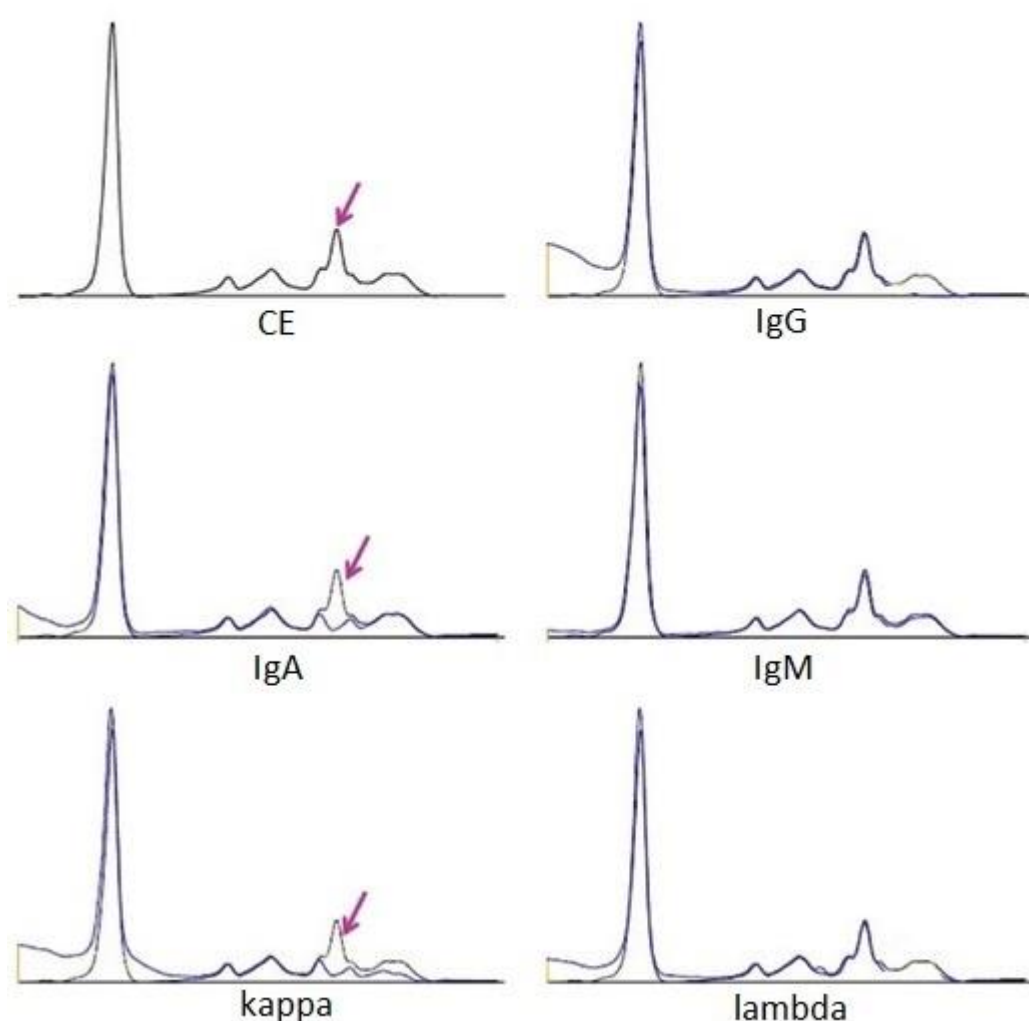
gammopatiami monoklonalnymi) niedrogim. W znaczącym odsetku chorych w rozdzielach elektroforetycznych białek surowicy wykrywa się obecność dodatkowego piku. Czułość diagnostyczna SPE dla szpiczaka mnogiego wynosi 87,6 % (24). Najczęściej wykorzystywaną techniką jest elektroforeza na podłożach agarozowych, która rozdziela białka surowicy na pięć podstawowych frakcji - albuminy, alfa-1, alfa-2, beta i gamma-globuliny. Coraz bardziej popularny w laboratoriach diagnostycznych staje się system elektroforetyczny, w którym białka rozdzielane są na sześć frakcji – zamiast jednorodnej frakcji beta, uzyskuje się frakcję beta 1 oraz beta 2 (Ryc. 13). Ten system jest szczególnie pomocny w przypadku migracji białka M we frakcji beta – rozbitcie jej na dwie frakcje ułatwia wychwycenie próbek z ewentualną obecnością białka M. Istnieją zalecenia sugerujące, aby każdy przypadek podwyższonej frakcji beta1 lub beta 2 sprawdzić przy pomocy immunofiksacji na obecność białka monoklonalnego. Tego typu diagnostyką powinny być również objęte próbki, gdzie prążek frakcji beta 2 jest bardziej intensywny od frakcji beta 1 (typowe dla białka M klasy IgA) (25).



Ryc. 13 Elektroforeza białek surowicy na żelu agarozowym – rozdział na 6 frakcji.

Rozdziały na 6 frakcji jest typowy dla elektroforezy kapilarnej (CE), gdzie tradycyjny żel agarozowy został zastąpiony cienką kapilarą. Pomimo wielu zalet, system CE posiada jednak pewne ograniczenia, gdzie najważniejszym dla diagnostyki dyskrazji plazmocytowych jest mniejsza czułość detekcji białka M i większy odsetek wyników fałszywie ujemnych dla

niskich stężeń białka M. Podczas wykonywania tego rodzaju elektroforezy stosuje się tzw. immunosubtrakcję. Wstępna inkubacja surowicy z odpowiednim przeciwciałem skutkuje „zniknięciem” piku białka monoklonalnego z rozdziału. Porównując tak zmodyfikowany rozdział z rozdziałem oryginalnym, uzyskujemy informacje o klasie łańcucha ciężkiego i typie łańcucha lekkiego białka M danego pacjenta. Metodę immunosubtrakcji można również wykorzystywać w celu dokładniejszego oszacowania białka M migrującego w regionie $\beta 1$ lub $\beta 2$ (Ryc. 14). CE niweluje błąd szacowania spowodowany włączeniem do pomiaru białka M prawidłowych białek frakcji $\beta 1$ lub $\beta 2$ takich jak transferyna lub białko dopełniacza C3.



Ryc. 14 Oznaczenie białka M techniką elektroforezy kapilarnej – u pacjenta wykryto immunoglobulinę monoklonalną IgA kappa.
Opracowano na podstawie: (26).

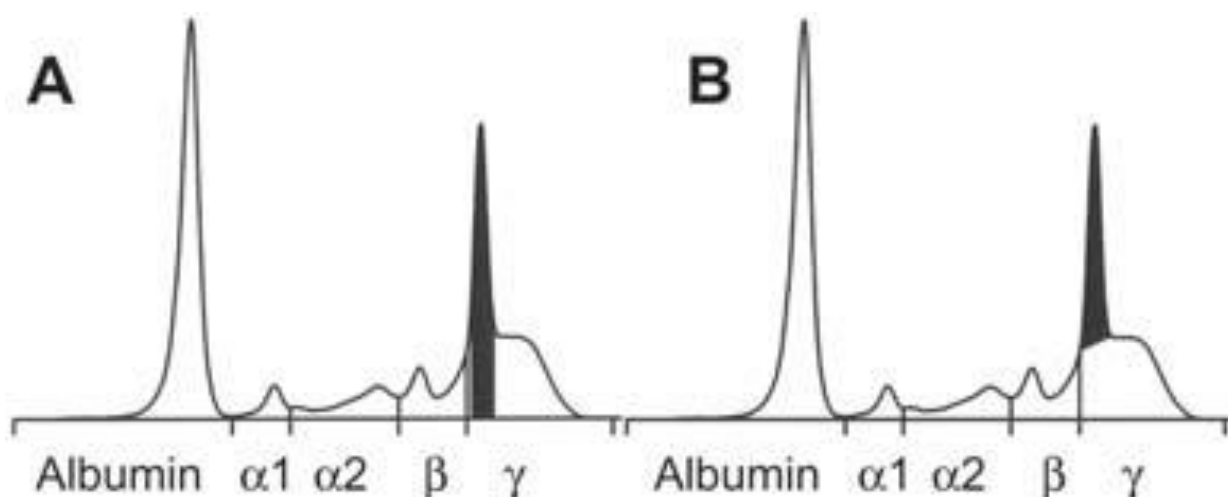
Doświadczenia kliniczne oraz nowe możliwości metodyczne sprawiają, że kryteria rozpoznawania gammapatii monoklonalnych, w tym szczególnie najczęstszej z nich - szpiczaka

plazmocytoowego, ulegają ciągłym zmianom. W 2014 r. Międzynarodowa Grupa Robocza ds. Szpiczaka Mnogiego (*International Myeloma Working Group* – IMWG) ogłosiła nowe wytyczne kładące mniejszy nacisk na późne zmiany narządowe, ale włączające wcześniejsze patologiczne zmiany, takie jak odsetek klonalnych plazmocytów w szpiku kostnym $\geq 60\%$ oraz wartość surowiczego stosunku zaangażowanych/niezaangażowanych w proces nowotworowy wolnych łańcuchów lekkich co najmniej 100 (22). Pomimo wspomnianych zmian oraz postępu technicznego elektroforeza białek surowicy jest nadal bardzo ważnym badaniem diagnostycznym i wykorzystywana jest razem z oznaczeniem wolnych łańcuchów lekkich jako badanie pierwszego rzutu.

Ocena proteinogramu może dostarczyć cennych informacji dotyczących przyczyny zaburzeń poziomu immunoglobulin. Dodatkowo rozdział elektroforetyczny pozwala na określenie ilości białka monoklonalnego poprzez odczytanie na densytogramie wysokości piku, który jest proporcjonalny do stężenia białka monoklonalnego. Oszacowanie stężenia białka monoklonalnego ma kluczowe znaczenie w monitorowaniu i leczeniu chorych z gammopatiami monoklonalnymi. Niestety jest obarczone znacznym błędem oraz charakteryzuje się dużą zmiennością międzylaboratoryjną. Jest to związane z m.in. niemożliwością oddzielenia białka monoklonalnego od innych białek migrujących w tej samej frakcji, a także z dostępnością różnych metod opracowywania wyniku proteinogramu.

Nie ma jednoznacznych wytycznych, które zalecałyby stosowanie konkretnej metody, dlatego mogą pojawić się rozbieżności interpretacyjne i istotne jest, aby wiedzieć w jaki sposób stężenie białka monoklonalnego zostało oszacowane. Niedopuszczalne jest porównywanie dwóch wyników, w których wykorzystano odmienne metody szacowania stężenia białka M. Najczęściej stosowaną metodą elektroforetycznego opracowania ilości białka monoklonalnego jest metoda odcięcia na osi densytogramu piku we frakcji immunoglobulin zawierającego zarówno monoklonalne białko jak i tło poliklonalnych immunoglobulin (tzw. metoda rzutu prostopadłego – *perpendicular drop method* - PD) (Ryc.15 A). Stosowanie tej metody może skutkować fałszywym zawyżaniem ilości białka monoklonalnego, szczególnie przy stężeniu białka monoklonalnego poniżej 15g/l (27). Metodą alternatywną jest odcięcie tylko piku białka monoklonalnego na proteinogramie odpowiednio ustawiając znaczniki frakcji oddzielające immunoglobulinę monoklonalną od poliklonalnego tła (metoda stycznej z odcięciem tła poliklonalnego - *tangent skimming method* - TS) (26) (Ryc. 15 B).

Metoda TS może być także obarczona błędem, z uwagi na brak możliwości precyzyjnego odcięcia tła poliklonalnego od monoklonalnej komponenty. Zwykle obserwuje się niedoszacowanie stężenia białka monoklonalnego.



Ryc. 15 Porównanie metod ilościowego oznaczania białka monoklonalnego metodą elektroforetyczną. **A**- metoda rzutu prostopadłego; **B** - metoda stycznej z odcięciem tła poliklonalnego. Źródło: (27).

Współczesne poglądy na diagnostykę dyskracji plazmocytowych wskazują na chromatografię cieczową sprzężoną z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS) jako rozwiązanie dla przedstawionych powyżej problemów i wyzwań w diagnostyce dyskracji plazmocytowych (26), (28).

1.4 Możliwe nieprawidłowości, interferencje oraz problemy metodyczne w badaniach laboratoryjnych u pacjentów z dyskracjami plazmocytowymi

Rozpoznanie szpiczaka plazmocyтового nie jest łatwym zadaniem. U większości pacjentów objawy kliniczne choroby są bardzo nieswoiste, a u 20-30% chorych nieobecne, nawet w momencie postawienia diagnozy (29), (30). Z drugiej strony wczesne wykrycie choroby wiąże się z dłuższym przeżyciem i lepszą jakością życia pacjenta. Weryfikacja objawów klinicznych jest ważna, jednak najczęściej pierwsze nieprawidłowości związane z chorobą są widoczne w podstawowych badaniach laboratoryjnych. Zanim pacjent zostanie skierowany na specyficzne dla diagnostyki szpiczaka badania takie jak, np. immunofiksacja surowicy, czy oznaczenie wolnych łańcuchów lekkich, wykonywane są liczne badania rutynowe, jak np. badania biochemiczne, oznaczenie morfologii krwi, OB, czy badanie ogólne moczu. Dlatego niezwykle istotne jest, aby lekarz pierwszego kontaktu potrafił zauważyć typowe dla pacjentów z dyskracjami plazmocytowymi nieprawidłowości w podstawowych badaniach laboratoryjnych. W takich sytuacjach w pierwszej kolejności jego rolą jest zlecenie

wykonania elektroforezy białek surowicy oraz jej interpretacja pod kątem obecności immunoglobuliny M oraz skierowanie „podejrzanych” pacjentów do lekarza hematologa. Takie postępowanie znacznie przyspiesza postawienie prawidłowej diagnozy i wdrożenie odpowiedniego leczenia (30).

1.4.1 Najczęstsze nieprawidłowości w wynikach podstawowych badań laboratoryjnych

W morfologii krwi obwodowej u 20-60 % chorych już przy rozpoznaniu wykrywa się łagodną lub umiarkowaną postać niedokrwistości, przeważnie normocytowej (31) (32).

Badanie OB (odczyn Biernackiego, szybkość opadania erytrocytów) jest u tych chorych przedłużone, mediana to około 80 mm/godzinę (33). W jednym z badań wykazano, że na rok przed postawieniem rozpoznania, aż 85% chorych miało podwyższone OB, w porównaniu z 46% osób w grupie kontrolnej. W tym miejscu warto podkreślić, że wbrew obiegowym opiniom wynik trzycyfrowy wcale nie jest tak często spotykany (34).

Znaczenie badań biochemicznych w diagnostyce szeregu chorób jest nie do przecenienia. Wśród badań, których nieprawidłowe wyniki mogą nasunąć podejrzenie szpiczaka plazmocytozy możemy wymienić: podwyższone stężenie kreatyniny wraz z obniżonym współczynnikiem przesączania kłębuszkowego GFR (markery uszkodzenia nerek), podwyższona aktywność dehydrogenazy mleczanowej - LDH (element klasyfikacji rokowniczej R-ISS), podwyższony poziom stężenia wapnia - Ca (hiperkalcemia jest jednym z objawów szpiczaka) (1) oraz nieprawidłowe stężenie elektrolitów (może wystąpić pseudohiponatremia) (35).

1.4.2 Oznaczanie stężenia albuminy u chorych z dyskracjami plazmocytozowymi

Albumina jest użytecznym parametrem białkowym w diagnostyce gammapatii monoklonalnych. Stężenie albuminy jest jednym z elementów stosowanych w międzynarodowej klasyfikacji prognostycznej ISS (International Staging System) szpiczaka plazmocytozy (Tab. 1).

Tab. 1 Międzynarodowa klasyfikacja prognostyczna szpiczaka plazmocytoowego
b2-M – beta-2-mikroglobulina.
Źródło: (1)

Stadium	Parametr	Mediana czasu przeżycia
ISS 1	albumina > 3,5 g/dl b2-M < 3,5 mg/l	62 miesiące
ISS 2	albumina < 3,5 g/dl b2-M < 3,5 mg/l lub b2-M: 3,5-55 mg/l	44 miesiące
ISS 3	b2-M > 5,5 mg/l	29 miesiące

Stężenie albuminy jest mierzone w medycznych laboratoriach diagnostycznych najczęściej metodą kolorymetryczną z zastosowaniem zieleni bromokrezolowej lub czerwieni pirogalolowej. Są to barwniki selektywnie wiązane przez albuminę. Parametr ten można również oznaczyć metodą elektroforetyczną za pomocą pomiarów densytometrycznych frakcji białkowych i stężenia białka całkowitego. Zauważono, że stężenie albuminy oznaczane kolorymetrycznie i elektroforetycznie może znamienne różnić się między sobą, szczególnie u chorych z gammopatiami monoklonalnymi (36). Problem rozbieżności w oznaczaniu stężenia albuminy w surowicy chorych na szpiczaka plazmocytoowego jest niezwykle istotny. Błędne oznaczenie albuminy, związane z niedoskonałościami metodycznymi, może skutkować nieprawidłowym przypisaniem danego pacjenta do odpowiedniej grupy klasyfikacji prognostycznej, a co za tym idzie wdrożeniem nieodpowiedniej farmakoterapii.

1.4.3 Charakterystyczne właściwości materiału biologicznego uzyskiwanego od pacjentów z dyskracjami plazmocytoowymi – interferencje w badania laboratoryjne

Należy także pamiętać, że z uwagi na specyfikę choroby, a potem wdrożone leczenie, u rozważanej grupy chorych istnieje wiele czynników mogących interferować w metody oznaczania powyższych badań laboratoryjnych.

- a) wysokie stężenia białka monoklonalnego, szczególnie klasy IgM oraz zespół nadlepkości mogą uniemożliwić oznaczenie liczby leukocytów i płytek krwi przez analizatory hematologiczne (37). Mogą również zaburzać pracę aparatów oznaczających parametry hemostazy wpływając na fałszywe przedłużanie czasów krzepnięcia (38). U osób z wysokim stężeniem paraprotein można czasem zaobserwować rzekomą hiponatremię w surowicy (35), (39).
- b) krioglobuliny (immunoglobuliny, które wytrącają się w niskiej temperaturze) występujące niekiedy u chorych z dyskracjami plazmocytowymi mogą precypitować in vitro po pobraniu krwi i ekspozycji na obniżoną temperaturę, zaburzając rozdziały elektroforetyczne (40).
- c) Stosowane w leczeniu szpiczaka nowoczesne leki terapeutyczne będące przeciwciałami (np. daratumumab - monoklonalne przeciwciało anty-CD38) w badaniach elektroforetycznych imitują białko monoklonalne utrudniając prawidłową ocenę odpowiedzi pacjenta na leczenie (41).

Trudności w interpretacji badań laboratoryjnych u chorych z dyskracjami plazmocytowymi może przysporzyć również sama aparatura badawcza, mnogość metod i dostępnych analizatorów na rynku diagnostycznym.

Niniejsza praca rozwija powyższe zagadnienia i analizuje wspomniane rozbieżności w celu optymalizacji procesu diagnostyki pacjentów z dyskracjami plazmocytowymi.

1.5 Trudności metodyczne oznaczania łańcuchów lekkich immunoglobulin

W diagnostyce i monitorowaniu chorych z dyskracjami plazmocytowymi szczególnie istotną rolę odgrywa oznaczenie łańcuchów lekkich immunoglobulin (szczególnie ich wolnej frakcji). Mogą one być obecne zarówno w surowicy jak i moczu, a ich obecność jest wykrywana zarówno metodami elektroforetycznymi, jak i metodami opartymi o tworzenie kompleksów immunologicznych wywołujących zmętnienie próbki. Jednocześnie niewielka masa cząsteczkowa oraz podyktowana zmiennością przeciwciał, ogromna różnorodność budowy pierwszorzędowej tego białka powoduje, że badanie łańcuchów lekkich immunoglobulin jest obarczone wieloma trudnościami metodycznymi. Dlatego problemom związanym z oznaczeniem łańcuchów lekkich immunoglobulin poświęcono oddzielny rozdział.

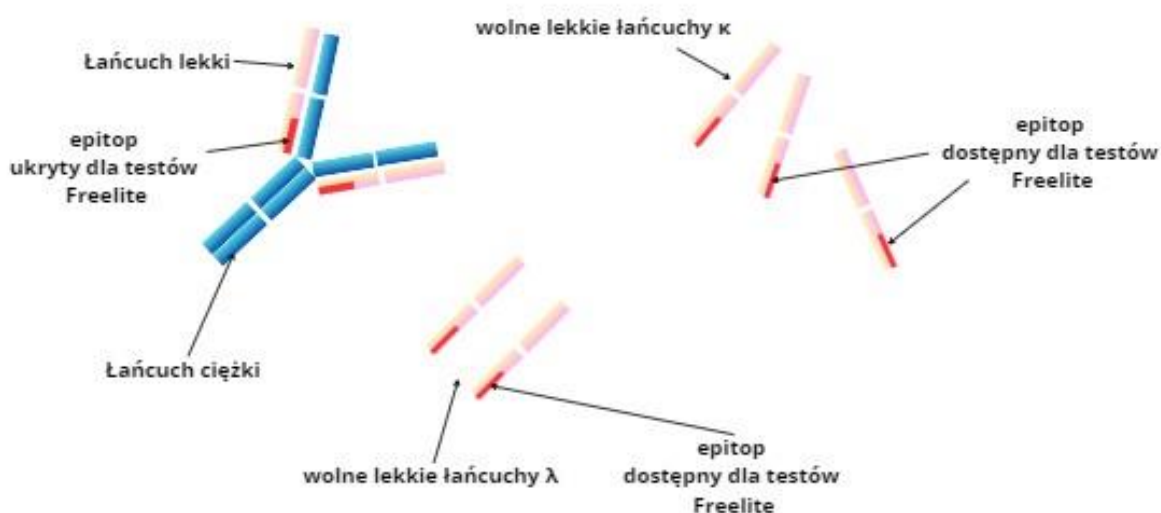
1.5.1 Testy służące do półilościowego oznaczania białka w moczu – czy mierzą białko „Bence-Jonesa”?

U pacjentów z gammapatią monoklonalną poważnym problemem są zaburzenia funkcji nerek, a jednym z pierwszych objawów jest pojawienie się białka w moczu. U części pacjentów w początkowym okresie choroby obserwuje się białkomocz nadmiarowy – w moczu pojawia się tylko białko Bence-Jonesa, czyli wolne łańcuchy lekkie immunoglobulin (FLCs). Taka sytuacja dotyczy zwykle pacjentów ze stosunkowo wysokim stężeniem białka M, gdzie dobowe wytwarzanie monoklonalnych FLCs przewyższa zdolności cewek nerkowych do reabsorpcji i wewnątrzkomórkowej proteolizy. Ponieważ wolne łańcuchy lekkie wykazują działanie nefrotoksyczne, rozpoczyna się kaskada zdarzeń, która może prowadzić do postępującego uszkodzenia nerek. Warto zauważyć, że niejednokrotnie pojawienie się białka Bence-Jonesa w moczu jest pierwszym objawem choroby. W piśmiennictwie dotyczącym badania ogólnego moczu za pomocą testów paskowych pojawiają się informacje o problemach związanych z oznaczeniami białka Bence-Jonesa przy użyciu półilościowych testów opartych o metodę Sorensona (42). Testy te najczęściej mają zdefiniowaną czułość w stosunku do albuminy – 150 mg, natomiast są mniej czułe dla innych białek np. drobnocząsteczkowych (43). Zgodnie z naszymi obserwacjami, nawet próbki moczu z obecnym jedynie białkiem Bence-Jonesa, w teście paskowym na obecność białka również mogą dawać wynik dodatni. Jednak czułość testów paskowych dla białka Bence-Jonesa jak dotąd nie została zdefiniowana. Jest to jeden z celów niniejszej rozprawy doktorskiej.

1.5.2 Oznaczanie wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin (FLC) w surowicy

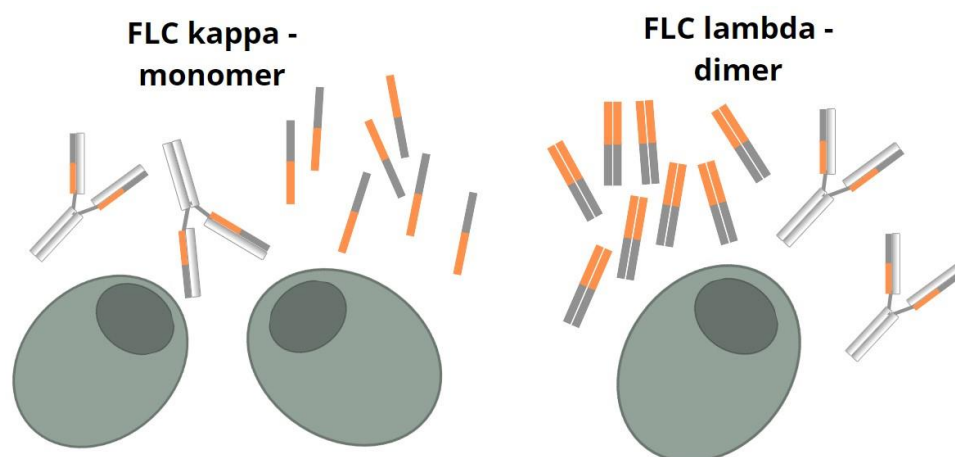
W 2001 roku wprowadzono nowy test immunochemiczny umożliwiający ilościowe oznaczanie stężenia wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin w surowicy i w moczu - Freelite® Binding Site (18). Test oparty na technologii lateksowej wyróżniał się dużą czułością - pozwalał na oznaczanie stężenia wolnych łańcuchów rzędu kilku mg/l: 5,9 mg/l dla FLC kappa oraz 5,0 mg/l dla FLC lambda. Obecnie używane testy laboratoryjne wykrywają jeszcze niższe stężenia FLC: 0,17 mg/l dla FLC kappa i 0,47 mg/l dla FLC lambda (N Latex FLC assay, Siemens). Wkrótce po wprowadzeniu testu FreeLite®, ukazało się wiele publikacji podkreślających użyteczność tego badania (44) (45) (46). Test FreeLite®, stosowany do oznaczenia wolnych łańcuchów lekkich w surowicy, wykorzystuje poliklonalne przeciwciała

skierowane przeciwko ukrytym epitopom, znajdującym się w miejscu połączenia łańcuchów lekkich z łańcuchem ciężkim. Te epitopy są odsłonięte (a więc dostępne dla odczynnika) tylko wtedy, gdy cząsteczki łańcucha lekkiego nie są związane z łańcuchem ciężkim immunoglobuliny (13) (Ryc. 16).



Ryc. 16 Cząsteczka przeciwciała z widoczną strukturą łańcucha ciężkiego i lekkiego immunoglobuliny wraz z epitopami, FLC kappa i lambda.
Opracowano na podstawie: (13) .

Łańcuchy lekkie immunoglobulin wytwarzane są przez limfocyty B/plazmocyty w pewnym nadmiarze w stosunku do łańcuchów ciężkich (ok. 40%) i jako wolne łańcuchy lekkie (FLC) są wydzielane do krwi. U zdrowych osób wytwarzanie dobowe FLC to ok. 500 mg. Łańcuchy typu kappa występują zazwyczaj jako monomery, natomiast łańcuchy lambda zwykle w postaci dimeru, aczkolwiek zdarzają się również formy polimeryczne. Łańcuchy kappa wytwarzane są w dwukrotnie większej ilości niż lambda (Ryc. 17).



Ryc. 17 Diagram przedstawiający plazmocyty produkujące cząsteczki immunoglobulin, monomery łańcuchów lekkich kappa oraz dimery lambda. Opracowano na podstawie: (13).

W dyskracjach plazmocytowych zmieniony nowotworowo klon komórek zaczyna wytwarzać jeden typ łańcucha w nadmiarze (klonalne/*involved* FLC), co skutkuje zmianą prawidłowego stosunku wolnych łańcuchów lekkich kappa do lambda (FLCr). Warto zaznaczyć również, że wolne łańcuchy lekkie mogą być wytwarzane jednocześnie z kompletną cząsteczką monoklonalnego przeciwciała lub jako jedyny produkt zmienionego nowotworowo klonu plazmocytów.

Pomiar stężenia FLC w surowicy już od kilkunastu lat jest niezbędnym badaniem biochemicznym w diagnostyce, prognozowaniu i monitorowaniu chorych z gammopatiami monoklonalnymi (47), (48). W 2014 roku, zgodnie z rekomendacjami Międzynarodowej Grupy Roboczej ds. Szpiczaka Mnogiego, oznaczanie FLC zostało włączone w kryteria rozpoznawania gammapatii monoklonalnych oraz uszkodzenia narządowego w szpiczaku plazmocytowym (SLiM CRAB) (22). W akronimie tym Li (*Light Chains*) to wolne łańcuchy lekkie. Kryteria zostały ujęte w tabeli (Tab. 2).

Tab. 2 Zmodyfikowane kryteria narządowego uszkodzenia związanego ze szpiczakiem plazmocytowym (SLiM CRAB).
Źródło: (22).

C (Calcium – wapń)	Skorygowane stężenie wapnia w surowicy $>0.25\text{mmol/l}$ ($>1\text{mg/dl}$) powyżej górnej granicy wartości referencyjnej lub $>2.75\text{mmol/l}$ ($>11\text{mg/dl}$)
R (Renal Insufficiency – niewydolność nerek)	Stężenie kreatyniny w surowicy $>177\mu\text{mol/l}$ ($>2\text{mg/dl}$) lub klirens kreatyniny $<40\text{ml/min}$ (mierzony lub wyliczony)
A (Anemia–niedokrwistość)	Stężenie hemoglobiny 2g/dl poniżej dolnej wartości referencyjnej lub $<10\text{g/dl}$
B (Bones – kości) tomografia	Jedno lub więcej ognisko osteolityczne w klasycznym badaniu radiologicznym, tomografii komputerowej (CT) lub badaniu pozytonowej tomografii emisyjnej (PET-CT)
S (Sixty – 60)	Odsetek klonalnych plazmocytów w szpiku lub biopsji tkankowej co najmniej 60%
Li (Light Chains – łańcuchy lekkie)	Stosunek stężenia klonalnych do nieklonalnych (ang. involved/uninvolved) wolnych łańcuchów lekkich w surowicy ocenianego przy pomocy metody opartej o przeciwciała poliklonalne (Binding Site, UK) co najmniej 100, przy czym stężenie łańcucha klonalnego w surowicy (ang. involved) wynosi co najmniej 100mg/l
M (Magnetic Resonance – tomografia rezonansu magnetycznego)	Obecność co najmniej dwóch ogniskowych nacieków w badaniu rezonansu kośćca (Whole Body STIR) o wymiarze co najmniej 5mm każdy

W przypadku stwierdzenia obecności co najmniej jednego z wymienionych kryteriów, który jest skutkiem klonalnego rozrostu plazmocytów i tym samym nie może być tłumaczony inną chorobą, rozpoznaje się szpiczaka plazmocytowego.

Najnowsze rekomendacje IMWG oraz Polskiej Grupy Szpiczakowej wprowadzają również oznaczanie FLC do panelu oceny odpowiedzi na leczenie postaci wydzielających szpiczaka oraz choroby łańcuchów lekkich (15), (49).

1.5.3 Niespójności dotyczące oznaczania wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin w surowicy testem Freelite®

Rekomendacje IMWG oparte są na oznaczaniu FLC pierwszym dostępnym komercyjnie testem wykorzystującym przeciwciała poliklonalne Freelite® (The Binding Site, United Kingdom). Wiele autorów tematycznych publikacji podkreśla kliniczną przydatność testu Freelite® w szerokim zakresie dyskrazji komórek B. Jednak w literaturze naukowej pojawiają się także coraz liczniejsze krytyczne publikacje zwracające uwagę na problemy w oznaczaniu FLCs tym testem. Dotyczą one przede wszystkim:

- ✓ braku liniowości metody przy stosowaniu różnych zakresów rozcieńczeń – problem ten dotyczy przede wszystkim próbek z wysokimi stężeniami FLCs (50);
- ✓ zawyżania lub zaniżania stężeń FLCs;
- ✓ efektu nadmiaru antygeny (efektu Hooka) (51),(52),(53),(54);
- ✓ reaktywności krzyżowej (55);
- ✓ wysokiej zmienności typu „lot-to-lot” (między seriami odczynników) (56).

1.5.4 Testy FLC oparte o przeciwciała monoklonalne

W ciągu ostatnich lat na rynku diagnostycznym pojawiły się testy oparte na wykorzystaniu przeciwciał monoklonalnych: N Latex FLC assay (Siemens) i Seralite® (Abingdon Health) (57).

Test N Latex FLC wprowadzono do użycia w 2011. Oparty został o wykorzystanie przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko FLC kappa i FLC lambda i dodatkowo kowalencyjnie związanych z cząsteczkami polisterynowymi (58). Przeciwciała te rozpoznają jeden charakterystyczny epitop w regionie stałym (C – constant) łańcuchów FLC. Powstają małe rozpuszczalne kompleksy immunologiczne, dobrze mierzalne metodą nefelometryczną.

Stwierdzono dobrą korelację testu N Latex FLC z testem Freelite®: 87% dla FLC kappa, 73% dla FLC lambda i 76% dla FLC ratio (59). Według innych doniesień ta korelacja jest jeszcze lepsza, odpowiednio: 91 % dla FLC κ , 85 % dla FLC λ oraz 95% dla FLC ratio (58). Opisywane testy nie są jednak ekwiwalentne i nie powinno się ich stosować zamiennie w monitorowaniu choroby. Każdy pacjent powinien być monitorowany jednym wybranym testem.

Zaobserwowano różnice pomiędzy testami N Latex i Freelite® przy wysokich stężeniach FLC λ lub FLC κ . Stężenia FLC λ są istotnie wyższe mierzone testem N Latex niż

testem Freelite®. Natomiast przy wysokich stężeniach FLC κ test Freelite® podaje wyższe wartości. Pomimo braku błędu systematycznego stałego lub proporcjonalnego, różnica między metodami rośnie wraz ze wzrostem stężenia λ lub κ sFLC (60).

Każda z metod ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów ma swoje ograniczenia: N Latex FLC charakteryzuje się lepszą swoistością, a Freelite® lepszą czułością (ustalone w oparciu o metodę referencyjną -IFE) (58)

Test oparty o przeciwciała monoklonalne jest mniej podatny na błąd związany z rozcieńczeniem, nie wykazuje też trudności z oznaczeniem niskich stężeń ($FLC < 7 \text{ mg/l}$), które często zdarzają się w teście Freelite® (57).

Inną zaletą testów opartych o przeciwciała monoklonalne jest brak reakcji krzyżowych ze związanymi łańcuchami lekkimi (LC) i innymi białkami osocza. Nie stwierdzono też przeszacowań oznaczanych stężeń FLCs (61).

W teście N Latex zniwelowano efekt nadmiaru antygeny wprowadzając tzw. protokół „pre-reakcji”. Próg detekcji dla pre-reakcji to najwyższa wartość sygnału zdefiniowana przez krzywą kalibracyjną. Gdy stężenie FLCs przekracza zakres ($3,5\text{--}112 \text{ mg/l FLC } \kappa$ oraz $2,0\text{--}60 \text{ mg/l FLC } \lambda$) system pomiarowy automatycznie rozpoczyna oznaczenie z wyższego zakresu rozcieńczeń (61). Pomimo powyższych zalet test N Latex nie został ujęty w rekomendacjach IMWG, ponieważ istnieje obawa, że ze względu na duże zróżnicowanie patologicznych monoklonalnych epitopów w próbkach pacjentów, monoklonalna przeciwciała mogą nie wykrywać wszystkich patologicznych klonów FLC.

1.6 Zjawisko przemijających i wtórnych gammopatii monoklonalnych

Gammopatie monoklonalne, obok dyskracji plazmocytowych, mogą także towarzyszyć innym chorobom np.: reumatycznym, neurologicznym, endokrynnym, chorobom tkanki łącznej oraz innym chorobom nowotworowym (17). Wyraźny, odgraniczony prążek białka monoklonalnego można również spotkać w surowicy w przypadku niektórych zakażeń wirusowych, grzybiczych lub bakteryjnych. Mówimy wówczas o przejściowej lub przemijającej gammopatii monoklonalnej (*transient monoclonal gammopathy*) (62). Niezwykle istotne jest aby klinicysta był świadomy tego faktu i umiał dokonać właściwej interpretacji wyniku badania laboratoryjnego wraz ze zleceniem dodatkowej diagnostyki różnicowej.

Transplantacja autologicznych komórek krwiotwórczych (*autologous haematopoietic stem cell transplantation* - autoHSCT) poprzedzona terapią mieloablacyjną - terapią

wysokodawkowaną (*high dose therapy* - HDT) pozostaje metodą leczenia z wyboru szpiczaka plazmocytozy i innych złośliwych dyskracji plazmocytozy u chorych spełniających ustalone kryteria kwalifikacji (1). Priorytetem leczenia pierwszoliniowego jest uzyskanie zupełnej remisji choroby, a jeśli nie jest to możliwe, to uzyskanie częściowej remisji oraz zredukowanie białka monoklonalnego w surowicy i w moczu o co najmniej 50 procent, przy równoczesnym braku postępu degradacji tkanki kostnej (1). Dokładne monitorowanie poziomu białka monoklonalnego jest zatem niezmiernie istotne w przebiegu leczenia chorych. Niejednokrotnie jest to utrudnione np. pojawieniem się nowych prążków białka monoklonalnego w proteinogramie. Z taką sytuacją mamy do czynienia po transplantacjach komórek krwiotwórczych auto- lub allogenicznych. U części pacjentów można obserwować wtedy pojawienie się nieprawidłowego prążka białka monoklonalnego niezwiązanego z paraproteiną wydzielaną pierwotnie przez złośliwy klon komórek plazmatycznych (63). Część badaczy określa to zjawisko mianem wtórnej gammapatii o nieustalonej istotności (wtórna MGUS – *secondary MGUS*) (64), (65). Pojawienie się nowego białka monoklonalnego może niekiedy powodować niepewność w ocenie odpowiedzi na zastosowaną terapię.

1.7 Gammapatie monoklonalne u pacjentów z zaburzeniami neurologicznymi

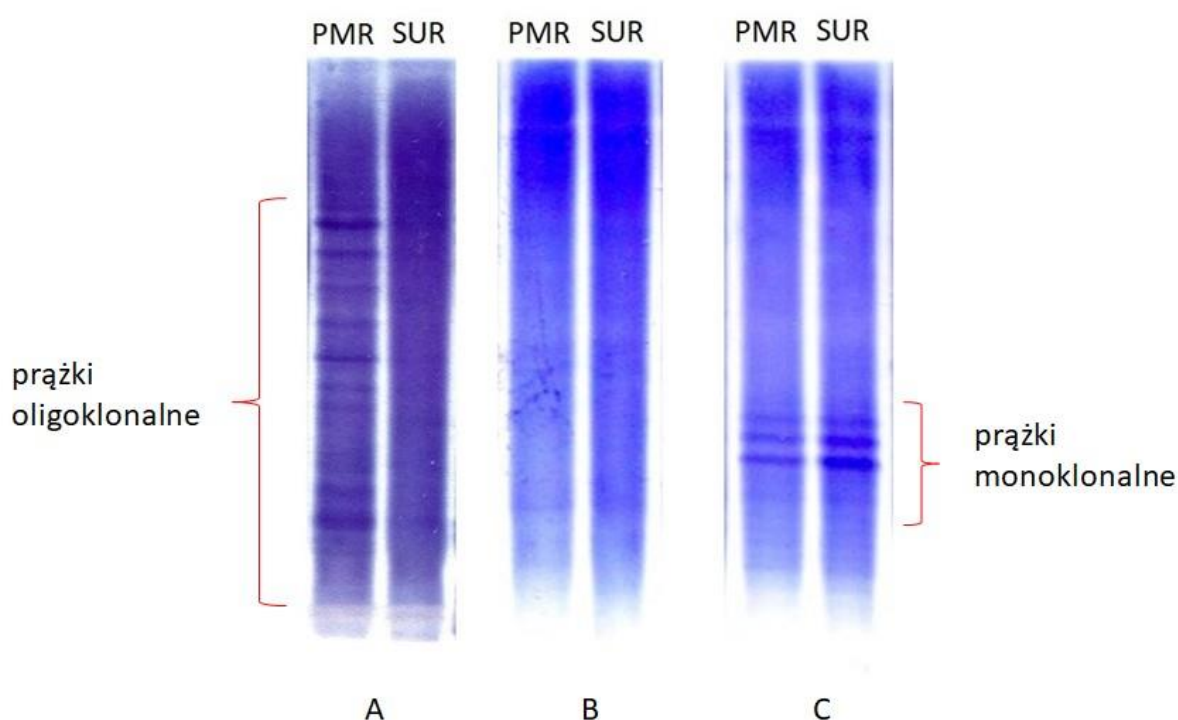
Zaburzenia neurologiczne są częstym problemem w przebiegu szpiczaka plazmocytozy (17). Mogą być spowodowane nadlepkością krwi, naciekami komórek plazmatycznych lub krwawieniem do OUN (ośrodkowego układu nerwowego). Może wystąpić też polineuropatia obwodowa.

Neurolog jest pierwszym lekarzem, do którego trafia pacjent cierpiący na nietypowe objawy neurologiczne niewiadomego pochodzenia, które mogą okazać się manifestacją chorób związanych z dyskracją komórek plazmatycznych. Wykonanie u tych chorych badania elektorforetycznego płynu mózgowo-rdzeniowego (PMR) i surowicy metodą ogniskowania izoelektrycznego w kierunku wewnątrzpłynowej syntezy globulin jest nie do przecenienia i może wnieść wiele cennych informacji na temat stanu pacjenta. W metodzie tej immunoglobuliny ulegają rozdziałowi w polu elektrycznym w zależności od ich punktów izoelektrycznych. Obecność tzw. prążków oligoklonalnych w PMR z równoczesnym ich brakiem w surowicy pacjenta świadczy o migracji plazmocytozy lub limfocytów B do PMR i wewnątrzoponowej syntezie immunoglobulin. Prążki oligoklonalne są wynikiem nadmiernego wytwarzania przeciwciał w klasie G przeciwko białkom mieliny oraz oligodendrocytozy, takich

jak: mielinowe białko oligodendrocytów (*myelin oligodendrocyte protein* - MOG); zasadowe białko mieliny (*myelin basic protein* - MBP); białko proteolipidu (*proteolipid protein* - PLP), glikoproteinie skojarzonej z mieliną (*myelinassociated glycoprotein* - MAG) (66).

Natomiast obecność prążków monoklonalnych w PMR i identycznych prążków w surowicy świadczy o dysproteinemii z dyfuzją bierną immunoglobulin.

Poniżej umieszczono elektroforegramy przedstawiające wynik typowy dla stwardnienia rozsianego (*łac. sclerosis multiplex – SM*) (A), wynik prawidłowy (B) oraz obraz znamieny dla dysproteinemii np. MGUS, szpiczaka plazmocytoowego czy też makroglobulinemii Waldenströma (C) (Ryc. 18).



Ryc. 18 Badanie PMR i surowicy metodą ogniskowania izoelektrycznego: wynik typowy dla SM (A), wynik prawidłowy (B) oraz charakterystyczny dla dysproteinemii (C).
SUR- surowica, PMR –płyn mózgowo – rdzeniowy

1.8 Wpływ krioglobulin i zespołu nadlepkości na wyniki laboratoryjne

Krioglobuliny są immunoglobulinami, które wytrącają się w niskich temperaturach. Mogą być monoklonalne lub poliklonalne i precypitować zarówno *in vivo* jak i *in vitro* po ekspozycji na niską temperaturę krwi we włośniczkach oraz w probówkach po jej pobraniu.

Brouet i wsp. sklasyfikowali krioglobuliny w latach 70 i ten podział oparty na klonalności obowiązuje do dziś (67).

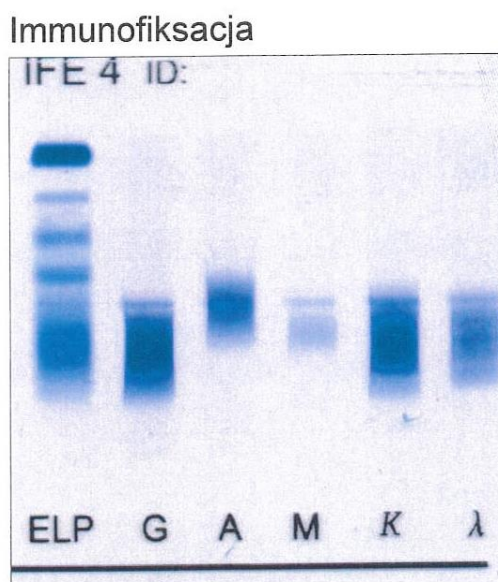
- A) Typ I to immunoglobuliny monoklonalne wytwarzane przez klon plazmocytołów w przebiegu chorób limfoproliferacyjnych - najczęściej szpiczaka plazmocytołowego. Uważa się, że krioglobulinemia występuje u blisko 1% chorych z gammapatią monoklonalną, a nawet 10% pacjentów z makroglobulinemią Waldenströma, ponieważ szczególną tendencją do krioprecypitacji wyróżniają się immunoglobuliny klasy IgM (68).
- B) Typ II to poliklonalne immunoglobuliny klasy IgG wiążące się z antygenami patogenów lub z autoantygenami. Metodami elektroforetycznymi, w surowicy można wykryć również intensywną strefę immunoglobuliny IgM imitującą strefę białka monoklonalnego. Krioglobuliny typu II IgM, ze względu na wysokie powinowactwo do immunoglobulin IgG, mają charakter czynnika reumatoidalnego. Towarzyszą wielu chorobom zakaźnym - najczęściej wirusowemu zapaleniu wątroby typu C, a także chorobom autoimmunologicznym.
- C) Typ III krioglobulin to poliklonalne immunoglobuliny klasy IgG oraz poliklonalne IgM, które nie wykazują cech czynnika reumatoidalnego. Krioglobulinemia typu III może towarzyszyć wielu przewlekłym infekcjom wirusowym, bakteryjnym jak i chorobom autoimmunologicznym. Krioglobulinemia typu II oraz III jest przez część badaczy określana mianem krioglobulinemii mieszanych (69).

Krioglobulinemia może zostać wykryta w laboratorium w trakcie opracowania materiału do badań diagnostycznych (40). U części pacjentów z typem I krioglobulinemii można zaobserwować, że obecne w próbce monoklonalne immunoglobuliny przyczyniają się do powstawania żelu po oziębieniu próbki. Zjawisko to uniemożliwia oddzielenie składników komórkowych od osocza w procesie wirowania oraz prawidłowe pobieranie materiału przy pomocy pipety czy igły w analizatorze. U niektórych pacjentów po ochłodzeniu próbki surowicy wytrąca się kłaczkowaty osad, który można oddzielić od reszty surowicy.

Obserwowane *in vitro* zjawisko krioglobulinemii nie zawsze powoduje objawy kliniczne wywołane zwykle zwiększoną lepkością osocza. Niemniej u dużej grupy pacjentów występują typowe objawy, takie jak: plamica, żyłki siatkowate, owrzodzenia skórne i zgorzel oraz objawy naczynioruchowe, np. zespół Raynauda i akrocyjanoza. Często są również powikłania neurologiczne, które charakteryzują się głównie neuropatią obwodową, chociaż można zaobserwować objawy uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego. Z powodu

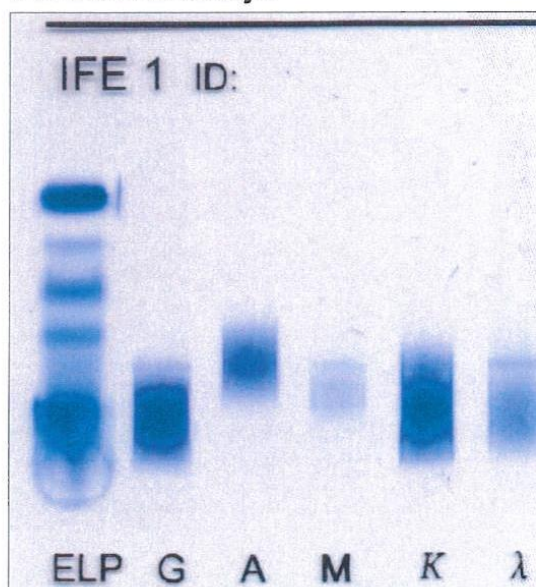
wytrącania się krioglobulin może wystąpić uszkodzenie nerek w postaci kłębuszkowego zapalenia nerek. Wielu pacjentów doświadcza również bólu stawów (70).

Rozdziały elektroforetyczne i immunofiksacja surowicy często dają charakterystyczne obrazy „krioglobulinowe” takie jak: wytrącanie białka w miejscu nałożenia (Ryc. 19), rozmazane rozdziały, hypergammaglobulinemia poliklonalna z pojedynczymi lub licznymi prążkami klasy IgM i/lub IgG (Ryc. 20). Tego rodzaju obrazy elektroforetyczne oraz obniżone stężenie składowych dopełniacza sugerują prawdopodobieństwo występowania precypitujących krioglobulin. Zdaniem wielu badaczy elektroforegramy są istotnym narzędziem diagnostycznym w badaniu krioglobulinemi (71).



Ryc. 19 Immunofiksacja surowicy z silnie zaznaczoną strefą gamma-globulin poliklonalnych. Obecność prążków we wszystkich klasach immunoglobulin sugeruje obecność krioglobulin.

Immunofiksacja



Ryc. 20 Immunofiksacja surowicy z klasycznym obrazem krioglobulinowym: wytrącanie białka w miejscu nałożenia, rozmazane rozdziały.

Należy pamiętać, że w trakcie ogrzewania krioglobuliny mogą zmieniać stopień agregacji, swoją konformację oraz ruchliwość elektroforetyczną (71). Ogrzanie próbek z zawartością krioglobulin jest działaniem rekomendowanym w opracowywaniu surowicy do wielu badań w celu eliminacji pochodzących od nich interferencji. Obecnie brak jest standaryzacji w wykrywaniu i ilościowym oznaczaniu krioglobulin (brak materiałów kontrolnych, brak wystandaryzowanych procedur ilościowych, subiektywna interpretacja wyników) (72). Przy podejrzeniu występowania krioglobulinemii rekomenduje się pobieranie krwi do wstępnie ogrzanych do 37 °C probówek oraz transport i wykrzepianie w temperaturze nie niższej niż 37°C. Po otrzymaniu takiej próbki w laboratorium należy umieścić ją lodówce w temperaturze 4°C i obserwować do 7 dni pod kątem pojawienia się krioprecypitatu. Krioglobuliny typu I wytrącają się szybko, już po kilkunastu godzinach, natomiast w przypadku krioglobulin mieszanych proces może trwać do kilku dni. Ponowne rozpuszczenie się osadu po ogrzaniu w 37°C ma świadczyć o obecności w surowicy krioglobulin (73). Istnieje możliwość ilościowego badania krioglobulin za pomocą metody elucji osadu krioglobulinowego, jednak niewiele laboratoriów wykonuje takie procedury z uwagi na brak standaryzacji oraz ich pracochłonność. Oznacza się białko w oczyszczonym krioprecypitacie metodą spektrofotometryczną, biuretową czy Lowry'ego. Cennym badaniem mogącym pomóc w potwierdzeniu występowania krioglobulinemii jest oznaczenie białek dopełniacza

(składowej C3 i C4). W przypadku krieglobulinemii mieszanych stężenie białka C3 jest prawidłowe natomiast C4 obniżone, co jest związane z aktywacją kaskady dopełniacza na kompleksach immunologicznych. Przydatnym parametrem jest też czynnik reumatoidalny RF (*Rheumatoid Factor*). W krieglobulinemiach mieszanych tworzeniu kompleksów immunologicznych towarzyszą wysokie miana RF.

Relatywnie częstym zaburzeniem rozpatrywanym w kontekście chorych z dyskracjami plazmocytowymi jest zespół nadlepkości (*hyperviscosity syndrome* - HVS). Jest to zaburzenie mikrokrazenia związane ze wzrostem lepkości krwi. Zmiana właściwości reologicznych krwi u pacjentów zależy przede wszystkim od stężenia immunoglobulin monoklonalnych. Pojawiające się w stanach patologicznych paraproteiny mogą wywierać wpływ upośledzający mikrokrazenie, zarówno w sposób bezpośredni, jak i pośredni poprzez tworzenie agregatów krwinek czerwonych (74). Przyczyną podwyższonej lepkości osocza u pacjentów z dyskracją komórek plazmatycznych jest zwiększona zawartość białka, nieprawidłowa polimeryzacja i nieprawidłowy kształt cząsteczek immunoglobulin. Objawowa nadlepkość jest znacznie częstsza w makroglobulinemii Waldenströma (10 do 30%) niż w szpiczaku (2 do 6%). Obok oznaczenia stężeń immunoglobulin istotną rolę w diagnostyce HVS odgrywa badanie lepkości surowicy. Najczęściej stosowaną w tym celu techniką jest metoda z użyciem wiskozymetru Ostwalda, jednostką pomiaru jest centypuaz (cp). Cechy nadlepkości zwykle pojawiają się, gdy lepkość surowicy osiąga 4 -5 cp, [prawidłowa: 1,4 - 1,8 cp] co odpowiada stężeniu immunoglobuliny monoklonalnej klasy IgM w surowicy co najmniej 30 g/l, IgG 40 g/l lub IgA 60 g/dl (75). Kliniczne manifestacje zespołu nadlepkości to najczęściej objawy neurologiczne, które mogą obejmować: ból i zawroty głowy, zmiany widzenia, objawy otępienia. Mogą pojawić się też niewydolność nerek i serca, częste są powikłania zakrzepowe. Paradoksalnie występują też powikłania krwotoczne z powodu upośledzenia funkcji płytek krwi. Usunięcie paraprotein poprzez wymianę osocza (plazmaferezę) może skutecznie zmniejszyć nadmierną lepkość. Długoterminową kontrolę produkcji monoklonalnych immunoglobulin można osiągnąć za pomocą chemioterapii. Wczesne rozpoznanie objawów nadlepkości, potwierdzone laboratoryjnie podwyższoną zawartością paraprotein i zwiększoną lepkością krwi, ma kluczowe znaczenie dla prawidłowego postępowania w tej grupie chorych.

1.9 Daratumumab-przełomowy lek w terapii celowanej a interferencje w badaniach laboratoryjnych

Pomimo dużych postępów w leczeniu w ciągu ostatnich lat, szpiczak plazmocytowy pozostaje chorobą nieuleczalną. Oprócz wprowadzenia do terapii leków immunomodulujących i inhibitorów proteasomu, obecnie leczenie zmierza w kierunku immunoterapii biernej z użyciem przeciwciał monoklonalnych. Przełomowym lekiem okazał się daratumumab (*Dara*) - monoklonalne przeciwciało anti-CD38 (76),(77),(78).



Ryc. 21 Lek daratumumab (Darzalex).

Źródło: <https://www.clinicaltrialsarena.com/projects/darzalex-daratumumab-treatment-multiple-myeloma/>

Daratumumab został zarejestrowany przez Amerykański Urząd ds. Żywności i Leków (*Food and Drug Administration* - FDA) po raz pierwszy w listopadzie 2015 roku do stosowania w monoterapii u chorych na szpiczaka plazmocyтового, którzy otrzymali wcześniej przynajmniej trzy linie leczenia, oraz u chorych opornych zarówno na inhibitor proteasomu (np. bortezomib) jak i lek immunomodulujący (np. talidomid lub lenalidomid). W 2016 roku daratumumab został zatwierdzony przez Europejską Agencję ds. Leków (*European Medicines Agency* - EMA) do leczenia szpiczaka plazmocyтового, a od lipca 2019 roku lek ten znajduje się na liście refundacyjnej Narodowego Funduszu Zdrowia w Polsce.

CD38 to receptor powierzchniowy znajdujący się na większości komórek szpiczakowych i wpływający na ich zdolności do zasiedlania organu pochodzenia, migracji i adhezji.

Anti-CD38 - *Dara* posiada szeroki zakres aktywności indukującej śmierć komórek nowotworowych poprzez różne mechanizmy: cytotoksyczności zależnej od układu dopełniacza

(*complement-dependent cytotoxicity* - CDC), cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał (*antibody dependent cellular cytotoxicity* - ADCC) oraz zależną od przeciwciał fagocytozę komórkową (*antibody - dependent cellular phagocytosis* - ADPC). Obserwowano cytotoksyczną aktywację i ekspansję komórek T po monoterapii w nawrotowej lub opornej na leczenie chorobie, co sugeruje możliwą rolę immunomodulacyjną daratumumabu (79). Istnieją również doniesienia, że zastosowanie *Dara* może „przesterować” ochronną funkcję makrofagów związanych z nowotworem na efektywną aktywność przeciwnowotworową. Kilkuletnie doświadczenia kliniczne ze stosowania *Dara* wyglądają obiecująco zarówno pod względem profilu toksyczności jak i skuteczności w leczeniu opornego i nawrotowego szpiczaka plazmocytozowego (76).

Daratumumab jest monoklonalnym przeciwciałem IgG-kappa, więc rozważania dotyczące zastosowania tego leku w terapii szpiczaka plazmocytozowego obejmują również możliwość jego interferencji w badanie elektroforezy białek (SPE) i immunofiksacji surowicy (IFE) (80), (81), (41). Jest to niezwykle istotne ze względu na fakt, że zgodnie z rekomendacjami Polskiej Grupy Szpiczakowej monitorowanie poziomu białka monoklonalnego jest zalecane w przebiegu oceny odpowiedzi na terapię, a ujemna immunofiksacja surowicy i moczu jest jednym z kryteriów całkowitej remisji choroby (1).

Daratumumab może wpływać na wyniki badań przedtransfuzyjnych oraz utrudniać dobór krwi do przetoczenia (82). Na erytrocytach obecne są antygeny CD38 więc lek przyłącza się do nich, powodując dodatni bezpośredni test antyglobulinowy (83). *Dara* może maskować również klinicznie istotne alloprzeciwciała (84). Dodatnie reakcje mogą utrzymywać się do 6 miesięcy od podania leku. Informacja o leczeniu chorego *Dara* jest kluczowa, aby wdrożyć odpowiednią procedurę badań przedtransfuzyjnych. Najpowszechniejsza jest procedura z użyciem DTT (ditiotreitol), który niszczy glikoproteinę CD38 na powierzchni panelowych krwinek czerwonych (85). Daratumumab obecny w osoczu pacjenta nie reaguje wówczas z krwinkami, co nie zaburza wykrywania alloprzeciwciał. Metoda ta ma jednak istotne ograniczenie – DTT niszczy też inne antygeny krwinek czerwonych, w tym bardzo istotny klinicznie antygen K. Dostępna jest alternatywna metoda z odczynnikiem DaraEx blokującym swoiście tylko antygen CD38 na krwinkach czerwonych (86). Wadą metody jest duży koszt odczynnika.

1.10 Nieprawidłowości w przesiewowych testach krzepnięcia u pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym

U chorych na dyskrację komórek plazmatycznych istnieje zwiększone ryzyko wystąpienia zarówno skazy krwotocznej jak i zakrzepicy żyłnej oraz choroby zatorowo-zakrzepowej tętnic.

Czynniki prozakrzepowe w szpiczaku to: wytwarzane przez komórki nowotworowe autoprzeciwciała skierowane przeciw naturalnym antykoagulantom (np. białku S i C) oraz wytwarzane przez komórki podścieliska cytokiny takie jak interleukina 6 (IL-6), czynnik wzrostu śródbłoka naczyniowego (*vascular endothelial growth factor* - VEGF), czy czynnik martwicy nowotworów (*tumor necrosis factor α* - TNF- α), które indukują wzrost stężenia czynnika VIII i czynnika von Willebranda oraz ekspresję czynnika tkankowego (*tissue factor* – TF) na komórkach śródbłoka.

Zwiększona tendencja do zakrzepicy u pacjentów z dyskracjami plazmocytowymi może być związana również ze zwiększoną lepkością krwi spowodowaną wysokim stężeniem białka monoklonalnego, co może zaburzać strukturę fibryny (17). Szacuje się, że u 10% nowozdiagnozowanych pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym rozwinie się zakrzepica żylna (87).

Krwawienia występują w około 15% pacjentów z białkiem monoklonalnym IgG i ponad 30% pacjentów z IgA oraz IgM (38). Pojawienie się skazy krwotocznej u pacjentów z dyskracjami plazmocytowymi może przebiegać w wyniku różnych mechanizmów, między innymi: niedoborów czynników krzepnięcia spowodowanych adsorpcją amyloidu, wytwarzaniem białka monoklonalnego o działaniu hamującym czynniki krzepnięcia, upośledzonej polimeryzacji fibryny lub fibrynolizy układowej (38).

U części chorych bez objawów skazy krwotocznej lub, u których występują skąpe objawy, mamy do czynienia z nieprawidłowymi wynikami testów hemostazy takimi jak: przedłużone, czy wręcz nieoznaczalne czasy krzepnięcia, czy obniżone stężenie fibrynogenu. Problem ten poruszany był w wielu publikacjach (88), (89), (90) jednak nadal stanowi duże wyzwanie interpretacyjne wyników badań laboratoryjnych w odniesieniu do aktualnego stanu pacjenta.

2. Cel pracy i problemy badawcze

Celem pracy jest analiza trudności diagnostycznych oraz przyczyn rozbieżności wyników badań laboratoryjnych u pacjentów z gammapatią monoklonalną. Analiza wspomnianych zagadnień jest krokiem do optymalizacji procesu diagnostyki pacjentów z dyskracjami plazmocytowymi. Powinna być także pomocna w interpretacji wyników rozbieżnych lub niespójnych.

Cele szczegółowe:

1. Wykazanie rozbieżności wyników stężenia albuminy w surowicy krwi oznaczanej z użyciem zieleni bromokrezolowej oraz w oparciu o pik albuminowy w rozdziale elektroforetycznym na żelu agarozowym
2. Porównanie oznaczania stężenia białka monoklonalnego metodą elektroforezy 5 i 6 - frakcyjnej.
3. Analiza czułości analitycznej wykrywania wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin w moczu za pomocą testów paskowych.
4. Zbadanie niespójności analitycznych dotyczących wyników oznaczania wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin w surowicy.
5. Analiza wyników badań laboratoryjnych w trakcie występowania tzw. przejściowych i wtórnych gammapatii monoklonalnych.
6. Specyfika wykrywania gammapatii monoklonalnych u pacjentów z zaburzeniami neurologicznymi.
7. Zbadanie wpływu krioglobulin i zespołu nadlepkości na wyniki badań laboratoryjnych oraz opisanie procedur postępowania z materiałem badanym w celu eliminacji interferencji.
8. Ocena wpływu daratumumabu (przeciwciała monoklonalnego stosowanego w leczeniu szpiczaka plazmocytozowego) na wyniki badań laboratoryjnych.
9. Przedstawienie możliwych interferencji w badaniach układu krzepnięcia u chorych na dyskrację plazmocytozową i sposobów ich ograniczania.

3. Pacjenci, materiały i metody badawcze

3.1 Grupa badana

W ramach pracy doktorskiej przeanalizowano wyniki badań 99 pacjentów, u których wykryto w surowicy białko monoklonalne. Materiał do badań był kierowany do centralnego laboratorium krakowskiego Szpitala Uniwersyteckiego z klinik: Hematologii, Chorób Wewnętrznych oraz Nefrologii. U większości grupy badanej (n=97) zostało postawione rozpoznanie dyskracji plazmocytowych, w szczególności: gammapatii monoklonalnej (D47.2 – wg. klasyfikacji ICD-10), szpiczaka plazmocyowego (C90.0), makroglobulinemii Waldenstroma (C88.0) oraz amyloidozy (E85.9 – 84). U pozostałych 2 pacjentów (czterdziestoletniej kobiety oraz trzyletniej dziewczynki), pomimo obecności białka monoklonalnego w surowicy, diagnoza dyskracji plazmocytowych została wykluczona w toku dalszych badań.

Do analizy rozbieżności wyników oznaczaniu albuminy w surowicy krwi wykorzystano wyniki 50 pacjentów z dyskracjami plazmocytowymi. Włączono także grupę kontrolną, którą stanowiło 157 pacjentów bez dyskracji plazmocytowych oraz bez białka monoklonalnego w surowicy.

W celu wyznaczenia czułości testów paskowych dla łańcuchów lekkich w moczu przeanalizowano wyniki 21 pacjentów.

W celu porównania oznaczania stężenia białka monoklonalnego metodą elektroforezy 5 i 6-frakcyjnej analizowano wyniki 12 pacjentów.

Wyniki pozostałych pacjentów z dyskracjami plazmocytowymi zostały przedstawione w formie analizy przypadków do zobrazowania zjawisk:

- trudności w oszacowaniu stężenia białka M występującego w strefie beta-globulin (n=1)
- niespójności analityczne w oznaczaniu wolnych łańcuchów lekkich w surowicy (n = 4);
- opis zjawiska przemijającej i wtórnej gammapatii monoklonalnej (n=3).
- trudności w badaniu surowicy pacjentów z zespołem nadlepkości i krioglobulinemią (n=3).
- problemy w interpretacji wyników chorych leczonych daratumumabem (n=2)
- opis interferencji monoklonalnych immunoglobulin w testy krzepnięcia (n=1)

Dodatkowo, badano z jaką częstością wśród pacjentów z objawami neurologicznymi, którzy kierowani są na badanie na obecność prążków oligoklonalnych w płynie mózgowo-rdzeniowym, występują prążki monoklonalne w PMR. W tym celu przeanalizowano wyniki elektroforegramów płynu mózgowo-rdzeniowego i surowicy 1442 pacjentów (z Kliniki

Neurologii, Hematologii i Chorób Zakaźnych). Spośród nich opisano przypadki 2 pacjentów, u których w trakcie diagnostyki neurologicznej wykryto MGUS.

3.2 Materiały

Próbki krwi zostały pobrane od pacjentów do odpowiednich probówek systemu zamkniętego (Sarstedt, Germany). Surowicę otrzymano wirując krew 5 minut, z prędkością 4 tysiące obrotów/min w temperaturze 20°C używając wirówki Heraeus Multifuge X3 FR (ThermoFisher Scientific, Germany). Osocze otrzymano wirując krew 15 minut, z prędkością 3,5 tysiąca obrotów/min w temperaturze 20°C używając wirówki Heraeus Multifuge X3 FR (ThermoFisher Scientific, Germany). Mocz był zbierany do dedykowanych zestawów do pobierania i transportu moczu (Cormay Diagnostics, Poland). Badania laboratoryjne zostały wykonane dniu pobrania krwi i moczu.

3.3 Metodyka badań

3.3.1 Metody analityczne oraz aparatura

Ilościowe oznaczenie stężenia albuminy oraz łańcuchów lekkich kappa i lambda w moczu zostało wykonane metodą immunonefelometryczną na analizatorze BN II (Siemens, Germany).

Całkowite stężenie łańcuchów lekkich w surowicy oznaczano testem Total Light Chains (TLC) Siemens, metodą immunonefelometryczną, stężenie wolnych łańcuchów lekkich oznaczano testem Freelite® Binding Site, oraz N Latex FLC assay, Siemens. Pomiarów dokonano na nefelometrze BNII (Siemens, Germany).

Stężenie białka całkowitego w moczu oznaczono metodą turbidymetryczną z zastosowaniem kwasu trichlorooctowego (metoda strąceniowa) na analizatorze Cobas 501 (Roche, Switzerland) oraz przy użyciu półilościowych testów paskowych opartych o metodę Sorensona na aparatach: Cobas u 411 (Roche, Switzerland) oraz Sysmex UC-3500 (Sysmex, Japan).

Analizę białkomoczu wykonano na żelach poliakrylamidowych z dodatkiem siarczanu dodecyłu sodu (SDS), która jest metodą dedykowaną do analizy białek moczu (14), (15) na aparacie Mini Protean 3 (Bio-Rad, USA).

Rozdział białek surowicy wraz z ilościowym oznaczeniem stężenia białka monoklonalnego w surowicy oraz immunofiksację surowicy i moczu wykonano metodami

elektroforetycznymi na żelach agarozowych na analizatorze Interlab G 26 easy fix (Interlab, Italy).

Stężenie albuminy w surowicy mierzono na analizatorze Cobas c 501 (Roche, Switzerland) testem kolorymetrycznym z zielenią bromokrezolową oraz na analizatorze Interlab G 26 easy fix (Interlab, Italy), metodą elektroforetyczną na żelach agarozowych.

Stężenie białka całkowitego w surowicy mierzono testem kolorymetrycznym z odczynnikiem biuretowym na analizatorze Cobas c 501 (Roche, Switzerland).

Morfologia krwi obwodowej wykonana była na analizatorze hematologicznym Sysmex XN-1000 (Sysmex, Japan) metodą impedancyjną i metodą fluorescencyjnej cytometrii przepływowej.

Rozdziały elektroforetyczne płynów mózgowo-rdzeniowych przeprowadzono techniką ogniskowania izoelektrycznego na aparacie Hydrasys 2 Scan (Sebia, France).

Oznaczenie czasów krzepnięcia osocza metodą koagulometryczną i aktywności czynników krzepnięcia VII i VIII metodą chromogenną przeprowadzono na analizatorze BCS XP (Siemens, Germany) oraz metodą pomiaru optomechanicznego na aparacie BFT II (Siemens Healthcare Diagnostics, Germany).

Fibrynogen oznaczono dodatkowo metodą turbidymetryczną na analizatorze Atellica Coag 360 Siemens (Germany).

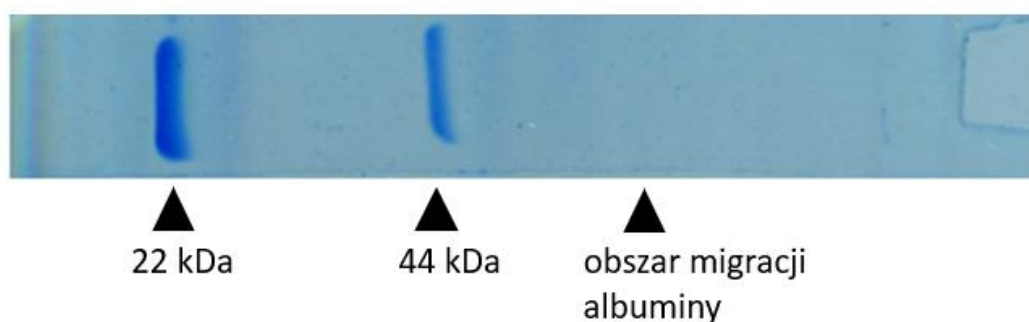
Krioglobuliny wykryto przechowując surowicę w temperaturze 4°C w lodówce przez 48 godzin, a następnie ogrzewając osad w temperaturze 37°C w ciepłarni przez godzinę (jakościowy test wykrywania krioglobulin).

3.3.2 Wyznaczenie czułości analitycznej testów paskowych dla wolnych łańcuchów lekkich.

Do wyznaczenia czułości analitycznej oznaczania wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin w moczu za pomocą testów paskowych wykorzystano liofilizowane preparaty wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin typu kappa oraz lambda. Naważkę preparatu rozpuszczono w odpowiedniej objętości buforowanej soli fizjologicznej, aby otrzymać wyjściowy roztwór o stężeniu 5 g/l (c0). Wyjściowy roztwór został odpowiednio rozcieńczony, aby otrzymać roztwory o stężeniach: c1 = 2,5g/l; c2 = 1,67, c3 = 1 g/l, c4 = 0,75 g/l; c5 = 0,5 g/l; c6 = 0,3 g/l; c7 = 0,15 g/l; c8 = 0,1 g/l. W próbkach c0-c8 zostało oznaczone białko za pomocą testu paskowego, stężenie wolnych łańcuchów lekkich za pomocą testu TLC Siemens oraz stężenie białka całkowitego metodą turbidymetryczną.

Uzyskane na podstawie liofilizowanych FLC wyniki porównywano z danymi otrzymanymi od pacjentów. Do eksperymentu włączono wyniki badań od pacjentów (n = 21) spełniających następujące kryteria:

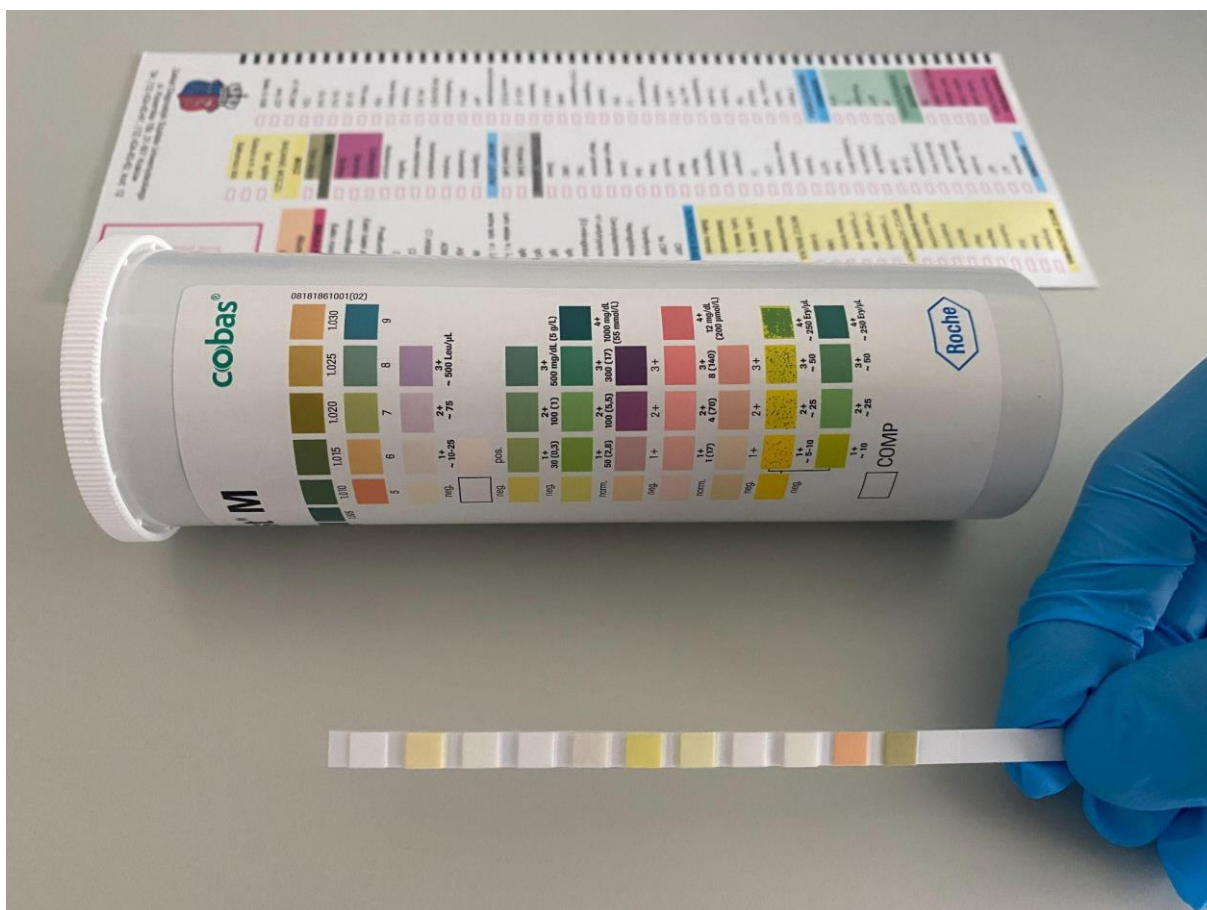
1. Obecność podwójnej lub pojedynczej strefy białkowej o masie cząsteczkowej 44kDa lub/i 22kDa (obszar migracji odpowiednio: dimeru oraz monomeru wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin) oraz brak wyraźnego prążka w strefie migracji albuminy (ok. 67 kDa) w obrazie elektroforetycznym białek moczu (Ryc. 22).



Ryc. 22 Rozdział elektroforetyczny białek moczu na żelu poliakrylamidowym z dodatkiem SDS. Widoczna strefa monomeru oraz dimeru wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin. U pacjenta nie zaobserwowano prążka pochodzącego od albuminy.

2. Stężenie albuminy w moczu poniżej 150 mg/l (czułość minimalna pasków testowych w stosunku do albuminy). W ten sposób wyeliminowano wpływ obecności albuminy na wynik białka oznaczonego za pomocą testu paskowego.

W celu półilościowej analizy białka w moczu użyto dwóch rodzajów pasków testowych: Meditape UC-9A Sysmex oraz Combur-Test® strip Roche (Ryc. 23).



Ryc. 23 Testy paskowe firmy Roche do oznaczeń parametrów fizyko-chemicznych w moczu.

Wyniki przyjmowały następujące wartości skokowe: wynik ujemny (białko w stężeniu niewykrywalnym), wynik + (stężenie białka powyżej 0,25 g/l), wynik ++ (stężenie białka powyżej 0,75 g/l), wynik +++ (stężenie białka powyżej 1,5 g/l).

3.3.3 Opracowanie statystyczne wyników

Analizę statystyczną wykonano przy użyciu pakietu statystycznego Statistica (wersja 13,3).

W statystyce opisowej podawano odsetek grupy (liczbę) dla zmiennych nominalnych, zakres wartości (min – max), medianę (dolny-górny kwartył) oraz średnią +/- odchylenie standardowe. Do badania normalności rozkładu stosowano test Shapiro-Wilka. W przypadkach, gdzie nie potwierdzono zgodności z rozkładem normalnym, do porównań między grupami użyto testów nieparametrycznych. Porównując stężenia albumin mierzone metodami elektroforetyczną oraz kolorymetryczną zastosowano test nieparametryczny dla zmiennych zależnych (test Wilcoxona). Porównując różnice stężeń albuminy wykorzystano

nieparametryczny test dla zmiennych niezależnych (test Manna Whitney'a). W celu porównania stężenia białka M oszacowanego na podstawie elektroforezy 5 vs 6 frakcyjnej zastosowano test t-Studenta dla zmiennych zależnych. Analizę statystyczną wykonano przy użyciu pakietu statystycznego Statistica (wersja 13,3).

4. Wyniki

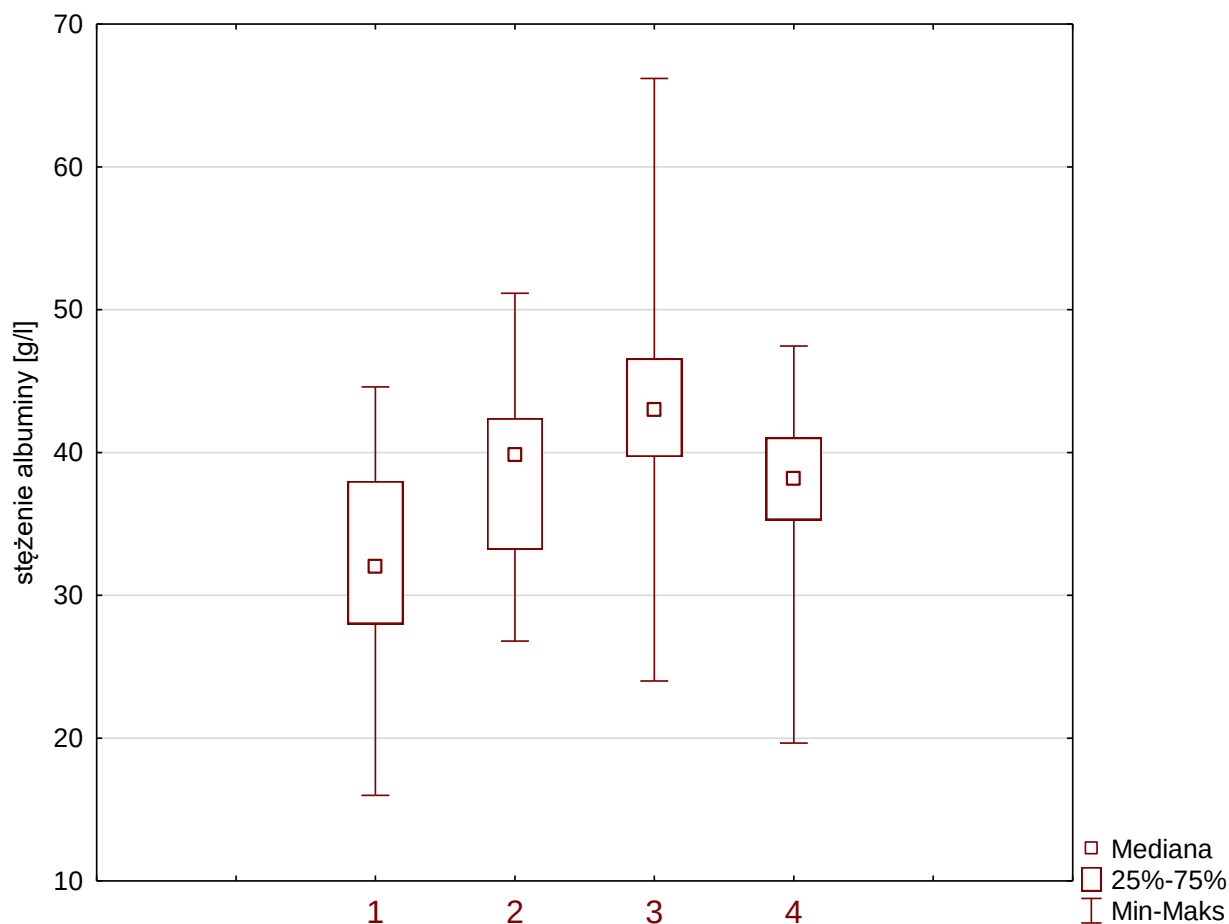
4.1 Różnice w stężeniu albuminy w zależności od wybranej metody

W pracy porównywano stężenie albuminy oznaczone metodą kolorymetryczną (z użyciem zieleni bromokrezolowej) oraz metodą elektroforetyczną u pacjentów z rozpoznaniem dyskrazji plazmocytowych (n = 50 osób) oraz w grupie kontrolnej (n = 157 osób). Zarówno w grupie pacjentów z dyskrazjami, jak i w grupie kontrolnej, wykazano, że stężenia albuminy mierzonej metodą kolorymetryczną oraz elektroforetyczną różnią się statystycznie (w obu grupach $p < 0,001$). Analiza opisowych danych statystycznych wskazuje, że w grupie pacjentów z dyskrazjami plazmocytowymi stężenia albuminy mierzone metodą elektroforetyczną są wyższe. Odwrotnie jest w przypadku grupy kontrolnej – oznaczenie metodą kolorymetryczną daje wyższy wynik niż metodą elektroforetyczną (Tab. 3). W dalszej analizie, w obu grupach obliczono różnice stężeń albuminy oznaczonych dwiema używanymi metodami zgodnie ze wzorem: [stężenie albuminy oznaczone metodą kolorymetryczną] – [stężenie albuminy oznaczone metodą elektroforetyczną]. Przeprowadzono analizę wspomnianych różnic wykazując ich istotność statystyczną ($p < 0,01$).

Tab. 3 Wybrane parametry statystyczne dotyczące stężenia albuminy oznaczanego metodami: kolorymetryczną (ALB_met. kolorym.) oraz elektroforetyczną (ALB_met. elektrof.) u pacjentów z dyskrazjami plazmocytowymi oraz w grupie kontrolnej.

	Pacjenci z dyskrazjami plazmocytowymi (n = 50)		Grupa kontrolna (n = 157)	
	ALB_met. kolorym.	ALB_met. elektrof.	ALB_met. kolorym.	ALB_met. elektrof.
Mediana (dolny – górny kwartył); g/l	32,0 (28,0-38,0)	39,9 (33,2 – 42,4)	43 (39,7-46,6)	38,2 (35,3-41,1)
Średnia +/- SD	32,3 +/-6,5	38,4 +/-6,4	42,9 +/- 5,4	37,8 +/-4,3
Min – Max; g/l	16-44,6	26,8-51,15	24-66,2	19,7-47,7

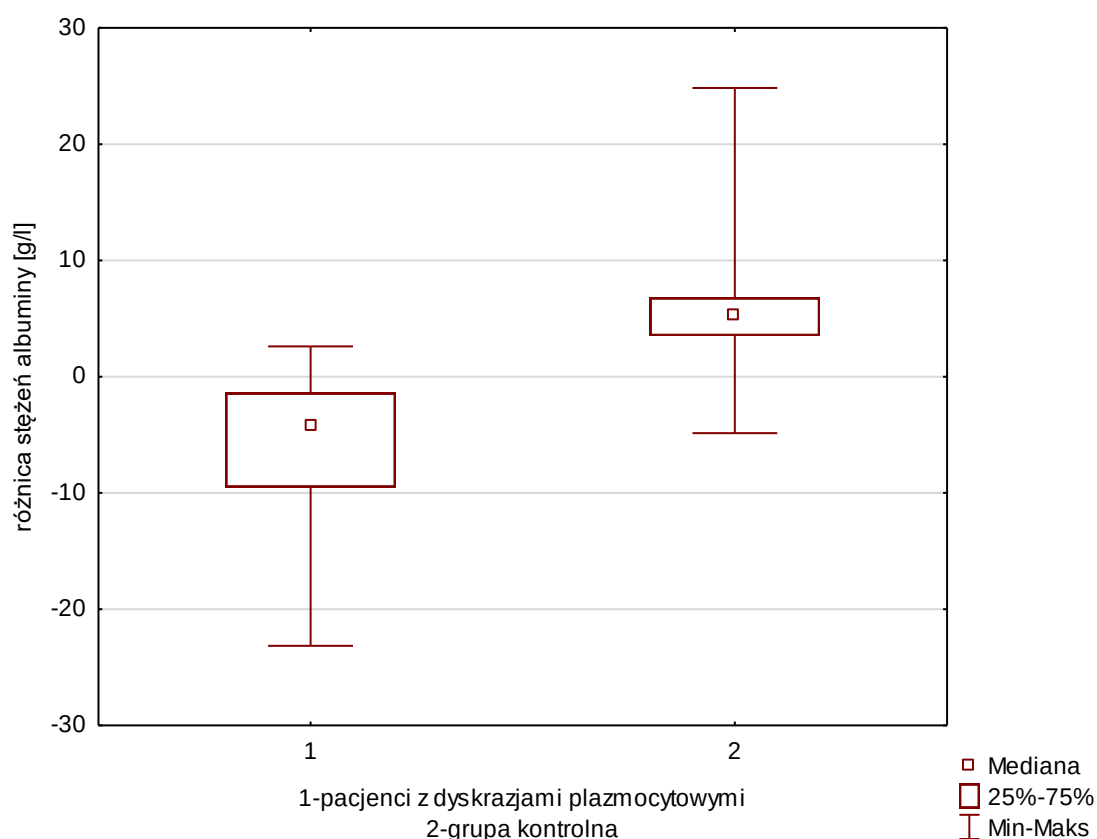
Aby lepiej zobrazować opisane zależności stworzono wykres ramka – wąsy dla albuminy zmierzonej obiema metodami dla grupy pacjentów (1,2) oraz dla grupy kontrolnej (3,4) (Ryc. 24).



Ryc. 24 Stężenie albuminy zmierzonej obiema metodami w grupie pacjentów oraz w grupie kontrolnej 1 - Stężenie albuminy u pacjentów z dyskracjami plazmocytowymi, metoda kolorymetryczna 2 - Stężenie albuminy u pacjentów z dyskracjami plazmocytowymi, metoda elektroforetyczna 3 - Stężenie albuminy u pacjentów z grupy kontrolnej, metoda kolorymetryczna 4 - Stężenie albuminy u pacjentów z grupy kontrolnej, metoda elektroforetyczna.

Na wykresie ramka wąsy można zauważyć, że w grupie pacjentów z dyskracjami plazmocytowymi, dla obu używanych metod 50% wartości stężeń albumin (zakresy: 25%-75%) mieści się w szerszych zakresach niż w przypadku osób z grupy kontrolnej: 28,0-38,0 oraz 33,2 – 42,4 vs 39,7-46,6 oraz 35,3-41,1.

Na wykresie ramka-wąsy zobrazowano również różnice stężeń albuminy zmierzonych dwiema metodami dla obu grup badanych (pacjenci vs kontrolna) (Ryc. 25).



Ryc. 25 Różnice stężeń albuminy zmierzonych dwiema metodami dla pacjentów badanych i grupy kontrolnej.

Na wykresie można zaobserwować, że większość różnic stężeń albuminy dla pacjentów z dyskracjami lokuje się w obszarze wartości ujemnych, co jest związane z podkreślanym wcześniej zjawiskiem zawyżania wyniku w metodzie elektroforetycznej w tej grupie. Dla grupy kontrolnej jest odwrotnie. Jednak bezwzględna wartość rozstępów (max-min) różnic stężenia albuminy w obu grupach jest bardzo podobna: 25,8 vs 29,7 (wykresy przypominają swoje odbicia lustrzane).

Wybrane parametry statystyczne analizy różnic stężeń albuminy oznaczonych obiema metodami przedstawiono w tabeli (Tab. 4).

Tab. 4 Wybrane parametry statystyczne różnic stężenia albuminy dla obu badanych grup (pacjentów i grupy kontrolnej).

	Różnice stężeń albuminy u pacjentów z dyskracjami plazmocytowymi (n = 50)	Różnice stężeń albuminy w grupie kontrolnej (n = 157)
Mediana (dolny – górny kwartył); g/l	-4,3 (-9,5– [-1,4])	5,3 (3,5 – 6,8)
Min – Max (rozstęp); g/l	-23,2 – 2,6 (25,8)	-4,9 – 24,8 (-29,7)

Dokonano także analizy różnic stężenia albuminy w badanej grupie pacjentów z dyskracjami plazmocytowymi (n=50) uwzględniając ewentualną zmianę stopnia zaawansowania klinicznego pacjenta zgodnie z międzynarodową klasyfikacją prognostyczną szpiczaka plazmocytoowego (ISS) (Tab. 1). W przypadku 26% pacjentów (n=13) metoda oznaczania albuminy wpływa na zaklasyfikowanie pacjenta do odmiennych kategorii (ISS 2 lub ISS 1). Można wnioskować, że w tych przypadkach wykorzystanie metody elektroforetycznej do oznaczenia stężenia albuminy wiąże się z niedoszacowaniem ciężkości stanu klinicznego pacjentów. Omówione wyniki przedstawiono w tabeli (Tab. 5).

Tab. 5 Porównanie oznaczenia stężenia albuminy dwoma metodami, które kwalifikują pacjenta do odmiennych kategorii klasyfikacji szpiczaka ISS.

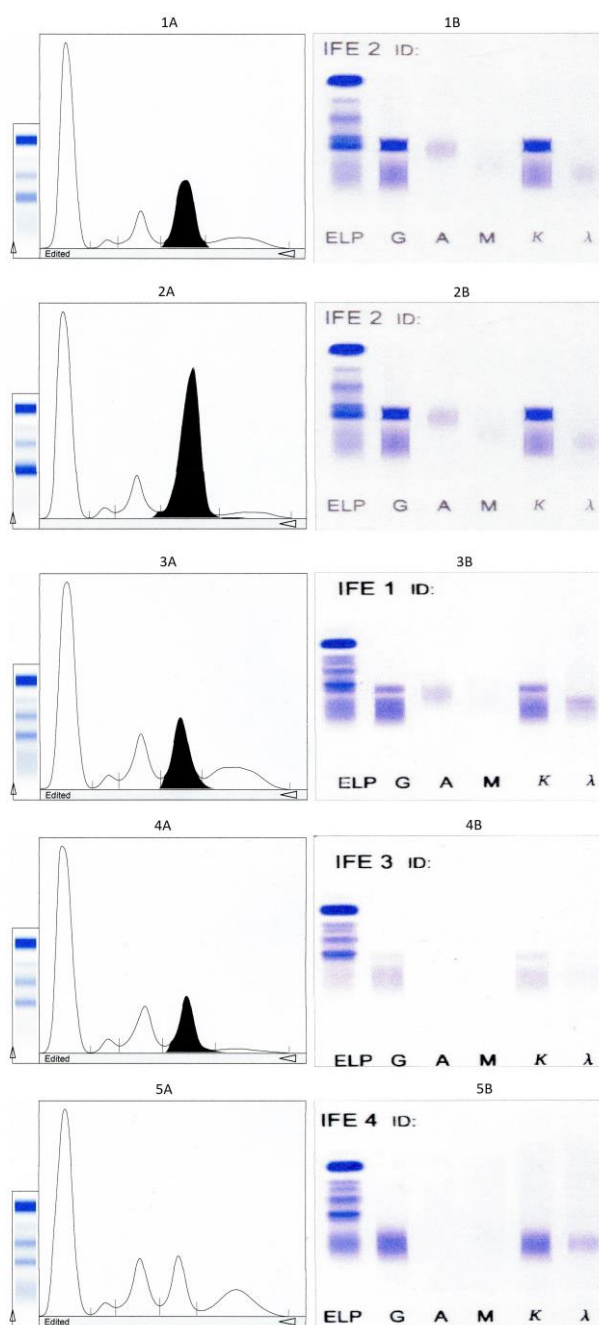
Stężenie albuminy (g/l)		
Metoda kolorymetryczna	Metoda elektroforetyczna	Różnica
21	35,5	-14,5
26	38,27	-12,27
34	38,4	-4,4
32	38,6	-6,6
28	39,3	-11,3
33,1	40,9	-7,8
29,4	41,7	-12,3
29,1	42,04	-12,94
30,2	44,5	-14,3
26	45,2	-19,2
27	48,2	-21,2
29,2	49,9	-20,7
28	51,15	-23,15

4.2 Ilościowe oznaczanie białka monoklonalnego metodą elektroforetyczną

Przypadek 1 (*pacjentka 1*)

W celu pokazania trudności w kwantyfikacji białka M metodą elektroforetyczną szczególnie w sytuacji umiejscowienia białka monoklonalnego w paśmie beta-globulin przedstawiono przypadek 66 – letniej kobiety, która od 4 lat była monitorowana w poradni hematologicznej z powodu MGUS IgG kappa. Białko monoklonalne o stężeniu 17 g/l we frakcji beta-globulin zostało wykryte podczas rutynowych badań kontrolnych (Ryc. 26 1A,1B). Pod koniec 2020 roku u chorej nastąpił szybki wzrost białka M do poziomu 35 g/l (Ryc. 26 2A,2B) oraz pojawiły się drobne ogniska lityczne kości czaszki. Pomimo obecności jedynie 8% plazmocytów w badaniu trepanobiopsatu szpiku kostnego uznano, że spełnia kryteria rozpoznania szpiczaka plazmocytozy w stadium I wg ISS. W celu ustalenia ryzyka cytogenetycznego wykonano analizę techniką FISH z zastosowaniem podstawowego zestawu sond szpiczaka plazmocytozy. Nie wykazano niekorzystnie rokującej utraty genu TP53 i nie wykazano rearanżacji genu IGH więc chorą zakwalifikowano do grupy standardowego ryzyka. W 2021 roku rozpoczęto chemioterapię, a na początku 2022 u chorej przeprowadzono zabieg transplantacji autologicznych komórek krwiotwórczych (autoHSCT). Początkowo uzyskano poprawę stanu chorej i spadek białka M do wartości 12,6 g/l (Ryc. 26 3A,3B), natomiast po 2 miesiącach nastąpił ponowny wzrost białka M i stwierdzono wznowę. Z uwagi na brak oczekiwanej remisji po przeszczepieniu szpiku kostnego chorą zakwalifikowano do leczenia elranatamabem w ramach programu sponsorowanego. Elranatamab to humanizowane przeciwciało bispecyficzne skierowane przeciwko komórkom szpiczaka wykazującym ekspresję antygenu dojrzewania komórek B (*B-cell maturation antigen* - BCMA) i limfocytom T wykazującym ekspresję CD3. W otwartym, wieloośrodkowym, nierandomizowanym badaniu II fazy oceniającym bezpieczeństwo i skuteczność monoterapii elranatamabem - MegnetisMM-3 oceniono, że Elranatamab jest skutecznym lekiem na szpiczaka u pacjentów z chorobą oporną na leczenie (91). Po 3 miesiącach stężenie białka M utrzymywało się na poziomie 10 g/l w badaniu elektroforetycznym i jako ślad w badaniu immunofiksacji surowicy (Ryc. 26 4A,4B). Niepokój budziły bardzo niskie stężenia immunoglobulin: IgA: <0,27 g/l [0,7-4,0], IgM g/l: <0,18 [0,4-2,3], IgG: 2,66 g/l [6,3-17,0]. Wolne łańcuchy immunoglobulin były poniżej zakresu oznaczalności: FLC κ < 0,06 mg/l [3,3-9,4], FLC λ < 0,05 mg/l [5,71-26,30]. W rezultacie terapii u pacjentki doszło do rozwoju wtórnego niedoboru odporności, pomimo tego kontynuowano leczenie elranatamabem w celu uzyskania całkowitej eradykacji białka M. Z

komentarza umieszczonego przez diagnostę na wyniku badania proteinogramu wynikało, że oszacowane stężenia białka M (10 g/l) w surowicy jest przybliżone z uwagi na brak możliwości oddzielenia go od innych prawidłowych białek komigrujących we frakcji beta. Z uwagi na niebezpiecznie niskie stężenia immunoglobulin chorą zakwalifikowano do leczenia substytucyjnego wlewami immunoglobulin, utrzymano leczenie podtrzymujące elranatamabem i po 3 miesiącach uzyskano remisję choroby - brak białka M na wynikach proteinogramu i immunofiksacji surowicy (Ryc. 26 5A, 5B).



Proteinogram z widoczną strefą białka monoklonalnego we frakcji beta-globulin o stężeniu 17 g/l (**1A**). Metodą immunofiksacji stwierdzono obecność białka monoklonalnego IgG kappa (**1B**) (Diagnoza: MGUS IgG kappa). Stężenie IgG intact: 19,1 g/l. Marzec 2017 r.

Proteinogram ze strefą białka monoklonalnego we frakcji beta-globulin o stężeniu 35 g/l (**2A**). Metodą immunofiksacji potwierdzono obecność białka monoklonalnego IgG kappa (**2B**) (Diagnoza: szpiczak plazmocytowy). Stężenie IgG intact: 35,0 g/l. Grudzień 2020 r.

Wynik proteinogram (**3A**) i immunofiksacji (**3B**) u pacjentki po chemioterapii i leczeniu autoHSCT. Stężenie białka monoklonalnego: 12,6 g/l. Stężenie IgG intact: 12,0 g/l. Maj 2022 r.

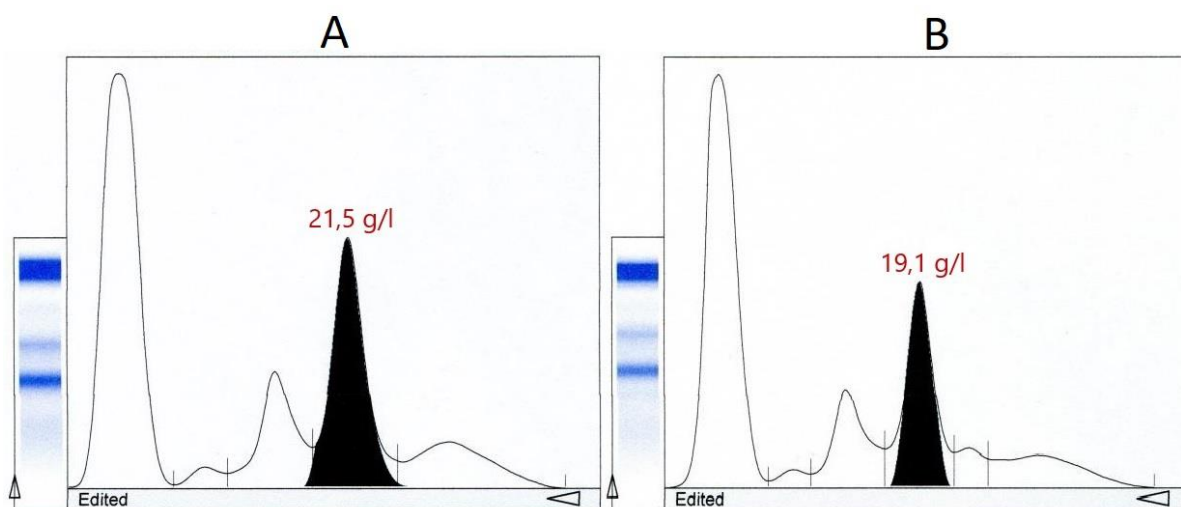
Wynik elektroforezy surowicy po wprowadzeniu do leczenia pacjentki elranatamabu (**4A**). W immunofiksacji ślad białka monoklonalnego (**4B**). Stężenie białka monoklonalnego: 10,0 g/l (liczone z całą frakcją beta-globulin). Stężenie IgG intact: 2,6 g/l. Październik 2022 r.

Proteinogram (**5A**) i immunofiksacja (**5B**) surowicy pacjentki po uzyskaniu remisji – brak białka monoklonalnego. Stężenie frakcji beta-globulin: 9,3 g/l. Stężenie IgG intact: 6,2 g/l. Styczeń 2023 r.

Ryc. 26 Zestawienie wyników SPE oraz IFE pacjentki 1 ze szpiczakiem plazmocytowym z białkiem M we frakcji beta-globulin, podczas monitorowania terapii.

W pracy porównano dwie metody oznaczania stężenia białka M: 5 i 6 - frakcyjną elektroforezę na żelu agarozowym. Celem porównania było zbadanie czy w technika 6 pasmowa zmniejsza wpływ białek komigrujących z białkiem M na oszacowanie jego stężenia. Wykonano równoległe rozdziały w 12 surowicach chorych ze szpiczakiem plazmocytowym z immunoglobuliną monoklonalną we frakcji beta-globulin i obliczono oraz porównano stężenia białka M (Tab. 6). Stężenie białka monoklonalnego oszacowanego na podstawie rozdziałów elektroforetycznych mieściło się w zakresie: 1,3 – 33,2 g/l dla elektroforezy 5-frakcyjnej oraz 1,1 – 31,1 g/l dla elektroforezy 6-frakcyjnej. U 25% (n = 3) białko monoklonalne było zlokalizowane we frakcji beta 1, natomiast u pozostałych 75% (n = 9) we frakcji beta 2. Przy pomocy testu t-Studenta dla prób zależnych udowodniono, że stężenia białka M oszacowane na podstawie różnych systemów elektroforetycznych różnią się istotnie statystycznie ($p=0,000074$). U wszystkich pacjentów stężenia białka M oszacowane metodą 6-frakcyjną było niższe niż w przypadku techniki 5-frakcyjnej (średnia: 19,59 $\pm$ 9,78 vs 15,59 $\pm$ 8,77).

Przykładowe rozdziały elektroforetyczne w surowicy pacjenta X pokazano na Ryc. 27.



Ryc. 27 Wynik elektroforezy białek u pacjenta X: A - rozdział 5 - frakcyjny, B - rozdział 6 - frakcyjny. Białko monoklonalne znajduje się we frakcji β 1.

Tab. 6 Stężenia białka M we frakcji beta-globulin wykonanych w surowicy pacjentów równolegle w rozdzielach elektroforetycznych 5 i 6 - frakcyjnych.

Pacjent	Stężenie białka M [g/l] Elektroforeza 5 pasmowa	Stężenie białka M [g/l] Elektroforeza 6 pasmowa
I	7,3	5,9
II	1,3	1,1
III	9,6	7,3
IV	27,6	20,0
V	26,2	21,5
VI	32,1	27,5
VII	20,3	14,1
VIII	33,2	31,1
IX	16,0	10,9
X	21,5	19,1
XI	20,5	14,4
XII	19,5	14,2

4.3 Czułość testów paskowych dla łańcuchów lekkich immunoglobulin

Aby określić czułość testów paskowych dla łańcuchów lekkich, przeanalizowano mocze 21 pacjentów, dla których stężenie albuminy było niższe od 150 mg/l (2,9 - 145 mg/l; mediana = 35,1 mg/l). U 66,67% pacjentów (n = 14) dominującym typem łańcuchów lekkich obecnych w moczu były łańcuchy kappa (Tab. 7). Stężenie LC kappa mieściło się w granicach: 31,9 – 5090 mg/l, mediana wynosiła 197,000 mg/l (dolny kwartył: 85,275 mg/l, górny kwartył: 659,500 mg/l). U pozostałych 33,33% pacjentów (n = 7) dominującą formą LC był typ lambda (Tab. 8) mieszczące się w granicach stężeń: 1480 – 5370 mg/l). Mediana stężeń łańcuchów lekkich lambda wynosiła 1170,000 mg/l (dolny kwartył: 471 mg/l; górny kwartył: 5040 mg/l).

Tab. 7 Stężenia białek w moczu pacjentów zawierających łańcuchy lekkie kappa. LC – łańcuchy lekkie kappa (metoda nefelometryczna); ALB – albumina (metoda nefelometryczna); PROT – białko całkowite (test paskowy); TP_U – białko całkowite (metoda turbidymetryczna); uj – wynik ujemny; NA – nie analizowano. Kolorem czerwonym zaznaczono stężenie LC w moczu, dla którego test paskowy pokazał obecność białka.

Pacjent	LC kappa [mg/l]	ALB. [mg/l]	PROT	TP_U [g/l]
Pacjent A	31,9	11,7	uj	0,14
Pacjent B	59,7	2,9	uj	0,08
Pacjent C	71,4	18,9	uj	0,13
Pacjent D	89,9	3,2	uj	0,15
Pacjent E	100,0	4,2	uj	0,10
Pacjent F	116,0	6,4	uj	0,40
Pacjent G	160,0	74,4	uj	0,87
Pacjent H	234	53,2	1+	NA
Pacjent I	261,0	35,1	uj	0,91
Pacjent J	351,0	42,4	2+	1,04
Pacjent K	356,0	18,7	1+	0,46
Pacjent L	1570	55,1	1+	NA
Pacjent M	3640,0	28,6	3+	2,90
Pacjent N	5090	80,4	2+	NA

Tab. 8 Stężenia białek w moczu pacjentów zawierających łańcuchy lekkie lambda: LC – łańcuchy lekkie lambda (metoda nefelometryczna); ALB – albumina (metoda nefelometryczna); PROT – białko całkowite (test paskowy); TP_U – białko całkowite (metoda turbidymetryczna); uj – wynik ujemny; NA – nie analizowano. Kolorem czerwonym zaznaczono stężenie LC w moczu, dla którego test paskowy pokazał obecność białka.

Pacjent	LC lambda [mg/l]	ALB. [mg/l]	PROT	TP_U [g/l]
Pacjent O	148,0	117,0	ujemny	0,34
Pacjent P	471,0	3,2	ujemny	NA
Pacjent R	1100,0	80,5	2+	NA
Pacjent S	1170,0	14,9	1+	1,50
Pacjent T	1440,0	50,0	1+	2,89
Pacjent U	5040,0	145,0	1+	3,52
Pacjent W	5370,0	45,0	1+	7,75

Dla łańcuchów lekkich kappa najniższe stężenie (oznaczone metoda nefelometryczną), dla którego zaobserwowano dodatni wynik testu paskowego wynosiło 234 mg/l (wynik 160 mg/l został oznaczony jako ujemny). Jednak w próbce ze stężeniem LC kappa 261 mg/l za pomocą testu paskowego nie zostało wykryte białko. We wszystkich próbkach o stężeniu LC kappa >350 mg/l wykryto białko za pomocą testu paskowego. Dla łańcuchów lambda, próg wykrywalności testem paskowym był wyższy. Najniższe stężenie, dla którego zaobserwowano dodatni wynik testu paskowego wynosiło 1100 mg/l (wynik 471 mg/l został oznaczony jako ujemny).

W eksperymencie wykorzystano również liofilizowane łańcuchy lekkie o zdefiniowanych stężeniach (3.3.2 Wyznaczenie czułości analitycznej testów paskowych dla wolnych łańcuchów lekkich.). Wyniki przedstawiono w tabeli (Tab. 9).

Tab. 9 Rozcieńczania standardu zawierającego łańcuchy lekkie (LC) lambda i kappa -kolorem czerwonym zaznaczono rozcieńczenie z najniższym stężeniem LC, dla którego test paskowy pokazał obecność białka w moczu.

LC lambda, liofilizowane		Stężenie LC lambda mg/l (met. nefelom)	Stężenie białka – metoda kolorymetryczna g/l	Stężenie białka –test paskowy
c0	Kappa	4230	3,80	1+
	lambda	1520	3,41	1+
c1	Kappa	2080	1,58	1+
	lambda	992	1,64	1+
c2	Kappa	1410	1,01	1+
	lambda	485	0,81	1-
c3	Kappa	838	0,59	1+
	lambda	330,0	0,62	1-
c4	Kappa	671	0,42	1+
	lambda	270,0	0,44	1-
c5	Kappa	436	0,24	1+
	lambda	202,0	0,27	1-
c6	Kappa	267	0,11	1-
	lambda	77,3	0,12	1-
c7	Kappa	123	<0,03	1-
	lambda	48,5	0,04	1-
c8	Kappa	80,9	<0,02	1-
	lambda	33,8	<0,02	1-

Zarówno wyniki oznaczenia z użyciem preparatu liofilizowanego jak i moczy pacjentów wskazują, że czułość testów paskowych jest wyższa dla LC kappa niż lambda. Dla

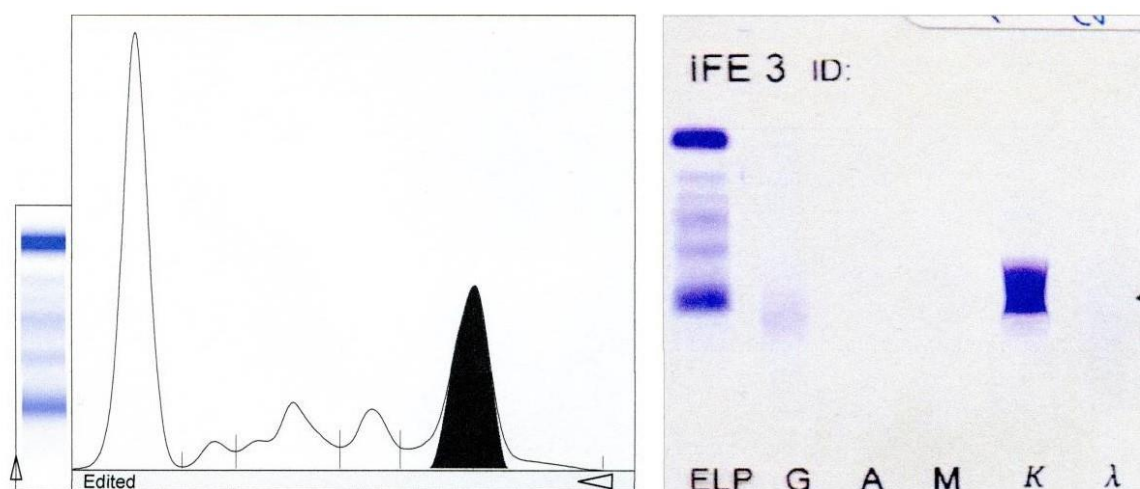
LC kappa próg wykrywalności białka można oszacować na wartość około 300 mg/l. Dla łańcuchów lekkich lambda – około 1000 mg/l.

4.4 Niespójności dotyczące oznaczania wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin w surowicy testem Freelite®

Poniżej przedstawiono wyniki pacjentów ze zdiagnozowanym szpiczakiem mnogim, w których wynikach wolnych łańcuchów lekkich (FLC) oraz całkowitych łańcuchów lekkich (TLC) zaobserwowano niespójności.

Przypadek 1 (*pacjentka 2*)

Rozdział elektroforetyczny oraz wynik immunofiksacji surowicy *pacjentki 2* (Ryc. 28) ujawniły obecność białka monoklonalnego: wolnych łańcuchów lekkich kappa w dwóch strefach: słaba, niepoliczalna ilość we frakcji alfa 2 oraz bardzo mocna strefa w paśmie gamma-globulin (14,1 g/l).



Ryc. 28 Elektroforegram oraz wynik immunofiksacji surowicy *pacjentki 2*: obecność białka monoklonalnego - wolnych łańcuchów lekkich kappa w dwóch strefach: słaba w alfa 2 oraz bardzo mocna w paśmie gamma-globulin

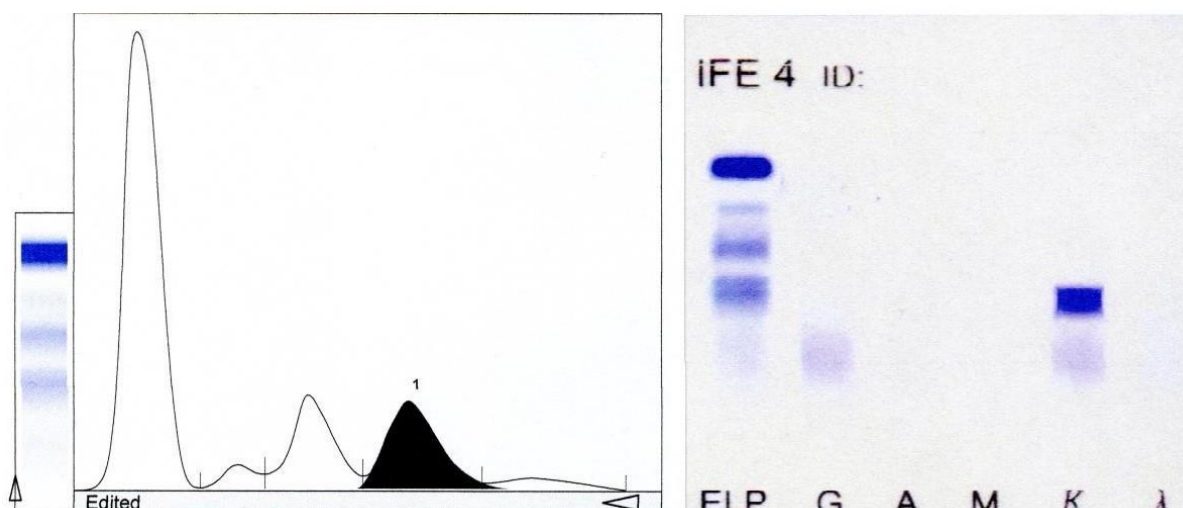
Oznaczone testem Freelite® stężenie FLC kappa: 79700 mg/l (79,7 g/l) nie tylko ponad pięciokrotnie przewyższało stężenie TLC, ale również było większe od stężenia białka całkowitego: 57400 mg/l (57.4g/l) co wskazuje na zawyżenie oznaczenia FLC (Tab. 10).

Tab. 10 Wynik stężenia FLC, TLC oraz białka całkowitego u *pacjentki 2*. Zawyżony wynik stężenia FLC kappa testem Freelite® zaznaczono czerwonym kolorem.

Parametr	Wynik [mg/l]	Zakres referencyjny [mg/l]
TLC kappa	15300	1700 - 3700
TLC lambda	190	900 - 2100
FLC kappa Freelite®	79700	3,30 - 19,40
FLC lambda Freelite®	11,7	5,71 - 26,30
Białko całkowite	57400	66000 - 87000

Przypadek 2 (*pacjentka 3*)

Podobna sytuacja miała miejsce w przypadku *pacjentki 3*, u której po wykonaniu badania elektroforezy i immunofiksacji w surowicy stwierdzono obecność białka monoklonalnego - wolnych łańcuchów lekkich kappa we frakcji beta-globulin (Ryc. 29). W tym przypadku test Freelite® również zawyżył stężenie FLC kappa: 14800 mg/l (14,8 g/l) versus TLC kappa 4920 mg/l (4,9 g/l) (Tab. 11).



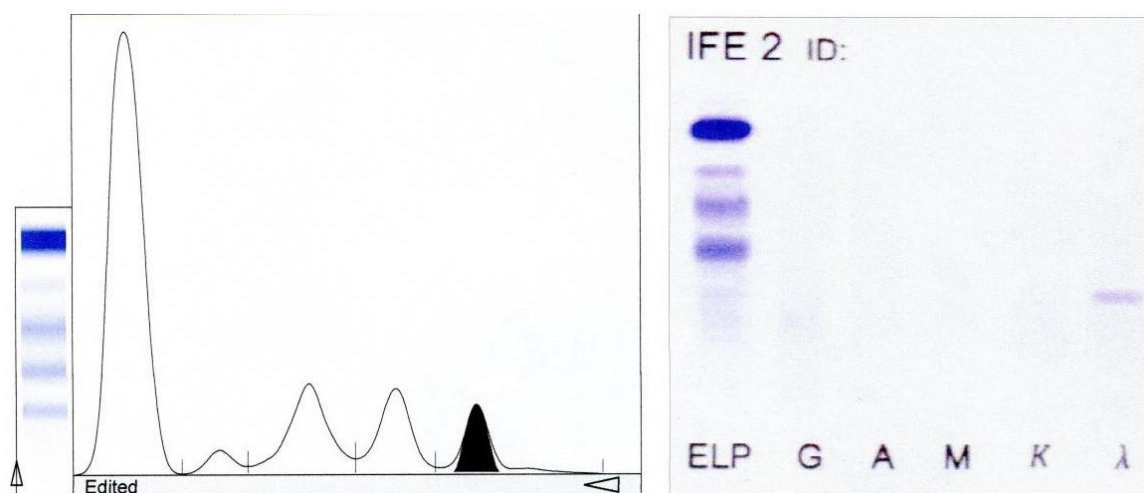
Ryc. 29 Rozdział elektroforetyczny oraz wynik immunofiksacji surowicy *pacjentki 3*: obecność białka monoklonalnego - wolnych łańcuchów lekkich kappa w paśmie beta-globulin. Białko monoklonalne zliczone razem z frakcją beta.

Tab. 11 Wynik stężenia FLC, TLC oraz białka całkowitego u *pacjentki 3*. Czerwonym kolorem zaznaczono zawyżony wynik stężenia FLC kappa oznaczony testem Freelite®.

Parametr	Wynik [mg/l]	Zakres referencyjny [mg/l]
TLC kappa	4920	1700 - 3700
TLC lambda	340	900 - 2100
FLC kappa Freelite®	14800	3,30 - 19,40
FLC lambda Freelite®	5,88	5,71 - 26,30
Białko całkowite	69500	66000 - 87000

Przypadek 3 (*pacjent 4*)

Elektroforegram oraz wynik immunofiksacji surowicy *pacjenta 4* (Ryc. 30) wskazują na obecność białka monoklonalnego – wolnych łańcuchów lekkich lambda. Ich stężenie oznaczone testem Freelite® ponad pięciokrotnie przewyższa stężenie całkowitych łańcuchów lekkich lambda (TLC), co przedstawiono w Tab. 12.



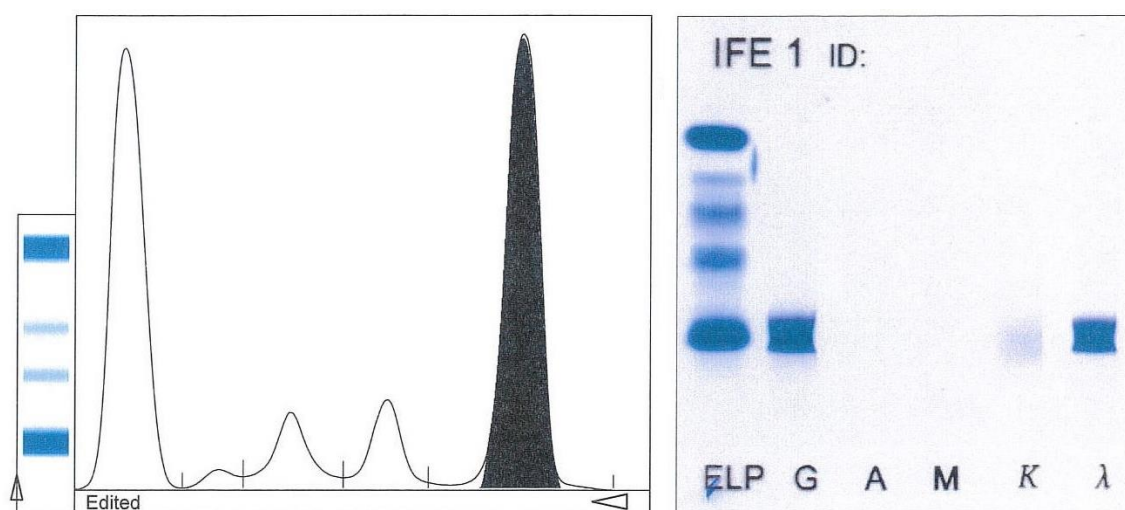
Ryc. 30 Elektroforegram oraz wynik immunofiksacji surowicy *pacjenta 4*: obecność białka monoklonalnego - wolnych łańcuchów lekkich lambda w paśmie gamma-globulin.

Tab. 12 Wynik stężenia FLC, TLC oraz białka całkowitego u *pacjenta 4*. Zawyżony wynik stężenia FLC lambda testem Freelite® zaznaczono czerwonym kolorem.

Parametr	Wynik [mg/l]	Zakres referencyjny [mg/l]
TLC kappa	310	1700 - 3700
TLC lambda	2390	900 - 2100
FLC kappa Freelite®	7,40	3,30 - 19,40
FLC lambda Freelite®	13700	5,71 - 26,30
Białko całkowite	62200	66000 - 87000

Przypadek 4 (*pacjentka 5*)

Z nieco inną sytuacją mamy do czynienia analizując wyniki *pacjentki 5*, u której wykryto białko monoklonalne IgG lambda (Ryc. 31).



Ryc. 31 Elektroforegram oraz wynik immunofiksacji surowicy *pacjentki 5*: obecność białka monoklonalnego IgG lambda .

Wyniki oznaczeń białka całkowitego, immunoglobuliny IgG oraz wolnych i całkowitych łańcuchów lekkim przedstawiono w Tab. 13. Uwagę zwraca wynik stężenia FLC kappa, który jest niespójny z innymi wynikami.

Tab. 13 Wynik stężenia FLC (oznaczenie testem Freelite®), TLC, białka całkowitego oraz IgG u *pacjentki 5*. Czerwonym kolorem zaznaczono wynik niespójny z pozostałymi wynikami.

Parametr	Wynik [mg/l]	Zakres referencyjny [mg/l]
TLC kappa	590	1700 - 3700
TLC lambda	17400	900 - 2100
FLC kappa Freelite®	348	3,30 - 19,40
FLC lambda Freelite	3,06	5,71 - 26,30
Białko całkowite	113000	66000 - 87000
IgG	71300	6380-17000

W rozważanym przypadku *pacjentki 5* w tej samej próbce oznaczono dodatkowo FLC testem N Latex z uwagi na problemy w teście Freelite® (Tab. 14).

Tab. 14 Wynik stężenia FLC (oznaczenie testem N Latex), TLC oraz białka całkowitego u *pacjentki 5*. Kolorem niebieskim zaznaczono wynik FLC kappa który jest spójny z pozostałymi wynikami.

Parametr	Wynik [mg/l]	Zakres referencyjny [mg/l]
TLC kappa	590	1700 - 3700
TLC lambda	17400	900 - 2100
FLC kappa Freelite®	8,13	3,30 - 19,40
FLC lambda Freelite	15,0	5,71 - 26,30
Białko całkowite	113000	66000 - 87000

Oznaczenia FLC testem N Latex oraz zmierzone kontrolnie wartości TLC wykazują wzajemną spójność oraz zgodność z testami elektroforetycznymi SPE i IFE.

4.5 Przemijające i wtórne gammopatie monoklonalne

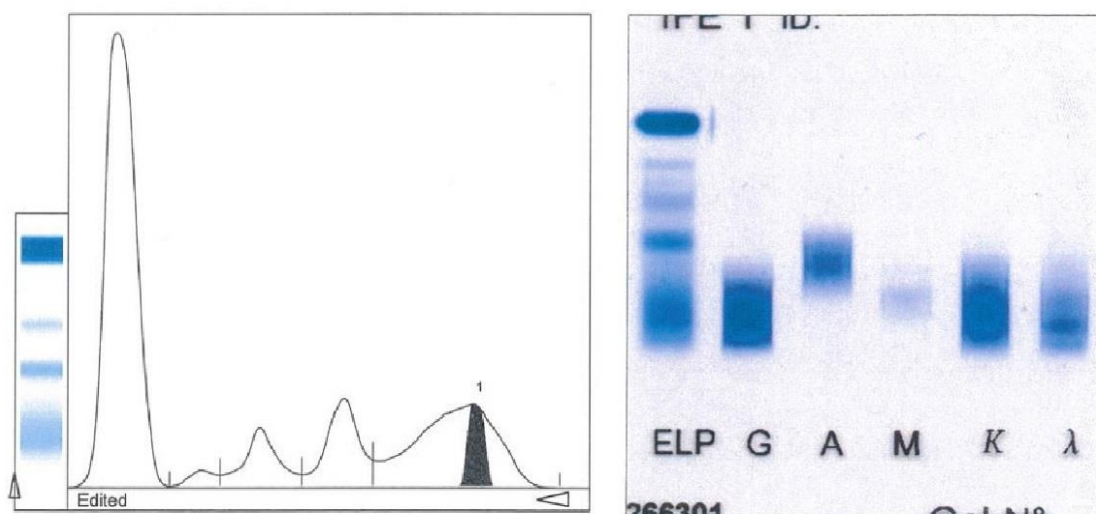
Przypadek 1 (pacjentka 6)

Aby zobrazować problem przejściowych gammopatii monoklonalnych przedstawiono przypadek 40 letniej pacjentki. Pacjentka została skierowana na badania do poradni hematologicznej w marcu 2019 r przez lekarza podstawowej opieki zdrowotnej z powodu ogólnego złego samopoczucia, stanów podgorączkowych, bóli kostnych i mięśniowych. Wyniki badań diagnostycznych oraz stan kliniczny pacjentki mogły sugerować nowotworowy rozrost plazmocytów. W tabeli przedstawiono wyniki badań laboratoryjnych (Tab. 15)

Tab. 15 Wybrane wyniki *pacjentki 6* z podejrzeniem dyskracji plazmocytovej. Kolorem czerwonym zaznaczono wyniki przekraczające wartości referencyjne.

Parametr laboratoryjny	Wynik	Zakres referencyjny
Leukocyty	7,54 x10 ³ /μl	4,0-10,0 x10 ³ /μl
Neutrofile	1,84 x10 ³ /μl	1,8-7,70 x10 ³ /μl
Limfocyty	4,77 x10 ³ /μl	1,0-4,5 x10 ³ /μl
Hemoglobina	12,9 g/dl	12-16 g/dl
Płytki krwi	174 x10 ³ /μl	140-440 x10 ³ /μl
Alat	73,2 U/l	5-33 U/l
Aspat	58,4 U/l	5-32 U/l
LDH	283 U/l	135-214 U/l
TLC kappa	3,68 g/l	1,70-3,70 g/l
TLC lambda	2,71 g/l	0,90-2,10 g/l
TLC kappa/lambda	1,36	1,35-2,65
FLC kappa	26,10 mg/l	3,30-19,40 mg/l
FLC lambda	114,0 mg/l	5,71-26,30 mg/l
FLC kappa/lambda	0,23	0,26-1,65
Beta-2-mikroglobulina	5,1 mg/l	1,09-2,53 mg/l
IgG	18,0 g/l	7,0-16,0 g/l
IgM	1,53 g/l	0,4-2,3 g/l
IgA	3,42 g/l	0,7-4,0 g/l

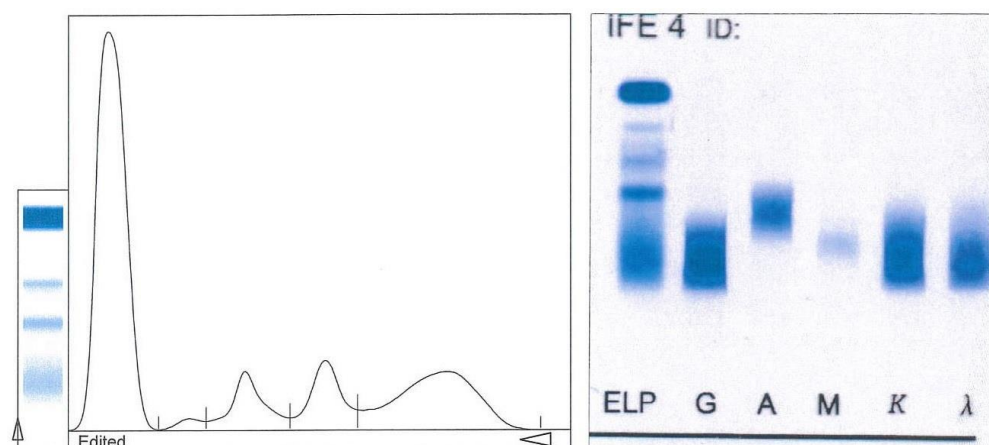
Elektroforeza białek surowicy krwi ujawniła strefę białka monoklonalnego. Metodą immunofiksacji potwierdzono obecność białka monoklonalnego klasy IgG lambda (Ryc. 32).



Ryc. 32 Proteinogram surowicy *pacjentki 6* ze strefą białka monoklonalnego słabo wyodrębnionego o stężeniu 3,7 g/l oraz wynik immunofiksacji surowicy- IgG lambda

Przed wdrożeniem inwazyjnej diagnostyki hematologicznej, np. biopsji szpiku, zlecono wykonanie testów mikrobiologicznych w kierunku wirusów mogących powodować dysfunkcję wątroby jak np. ludzki wirus cytomegalii (*Cytomegalovirus* - CMV) czy wirus Epsteina-Barra (*Epstein-Barr virus* - EBV). Otrzymano wyniki dodatnie przeciwciał anty-CMV zarówno w klasie IgG jak i IgM, co wskazywało na toczące się zakażenie wirusem cytomegalii.

Po okresie 2 miesięcy w rozdziale elektroforetycznym nie stwierdzono już obecności białka monoklonalnego zarówno w proteinogramie jak i w immunofiksacji (Ryc. 33). Ponadto wartości parametrów biochemicznych oraz morfologicznych mieściły się w zakresach wartości referencyjnych, wartości stężeń łańcuchów lekkich immunoglobulin jak również stężenie IgG były tylko nieznacznie podwyższone, natomiast wyliczone wartości FLCr i TLCr były w normie, co wykluczało monoklonalny charakter schorzenia (Tab. 16).



Ryc. 33 Elektroforegram i immunofiksacja surowicy u pacjentki po leczeniu i ustąpieniu objawów cytomegalii. Brak obecności strefy białka monoklonalnego.

Tab. 16 Wyniki *pacjentki 6* po leczeniu i ustąpieniu objawów cytomegalii. Kolorem czerwonym zaznaczono wyniki przekraczające wartości referencyjne.

Parametr laboratoryjny	Wynik	Zakres referencyjny
Leukocyty	$6,17 \times 10^3/\mu\text{l}$	$4,0-10,0 \times 10^3/\mu\text{l}$
Neutrofile	$2,69 \times 10^3/\mu\text{l}$	$1,8-7,70 \times 10^3/\mu\text{l}$
Limfocyty	$2,79 \times 10^3/\mu\text{l}$	$1,0-4,5 \times 10^3/\mu\text{l}$
Hemoglobina	14,0 g/dl	12-16 g/dl
Płytki krwi	$174 \times 10^3/\mu\text{l}$	$140-440 \times 10^3/\mu\text{l}$
Alat	15,3 U/l	5-33 U/l
Aspat	18,0 U/l	5-32 U/l
LDH	136 U/l	135-214 U/l
TLC kappa	3,99 g/l	1,70-3,70 g/l
TLC lambda	2,66 g/l	0,90-2,10 g/l
TLC kappa/lambda	1,50	1,35-2,65
FLC kappa	19,90 mg/l	3,30-19,40 mg/l
FLC lambda	28,3 mg/l	5,71-26,30 mg/l
FLC kappa/lambda	0,70	0,26-1,65
Beta-2-mikroglobulina	2,41 mg/l	1,09-2,53 mg/l
IgG	16,5 mg/l	7,0-16,0 g/l

Opisany przypadek to przykład reaktywnej przemijającej plazmocytozy, spotykanej podczas niektórych zakażeń wirusowych, bakteryjnych czy grzybiczych.

Przypadek 2 (pacjent 7)

W celu zobrazowania problemu wtórnych gammapatii monoklonalnych po transplantacji krwiotwórczych komórek macierzystych, przedstawiono przypadek 68 letniego chorego przyjętego do szpitala maju 2017 roku z powodu pneumokokowego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych.

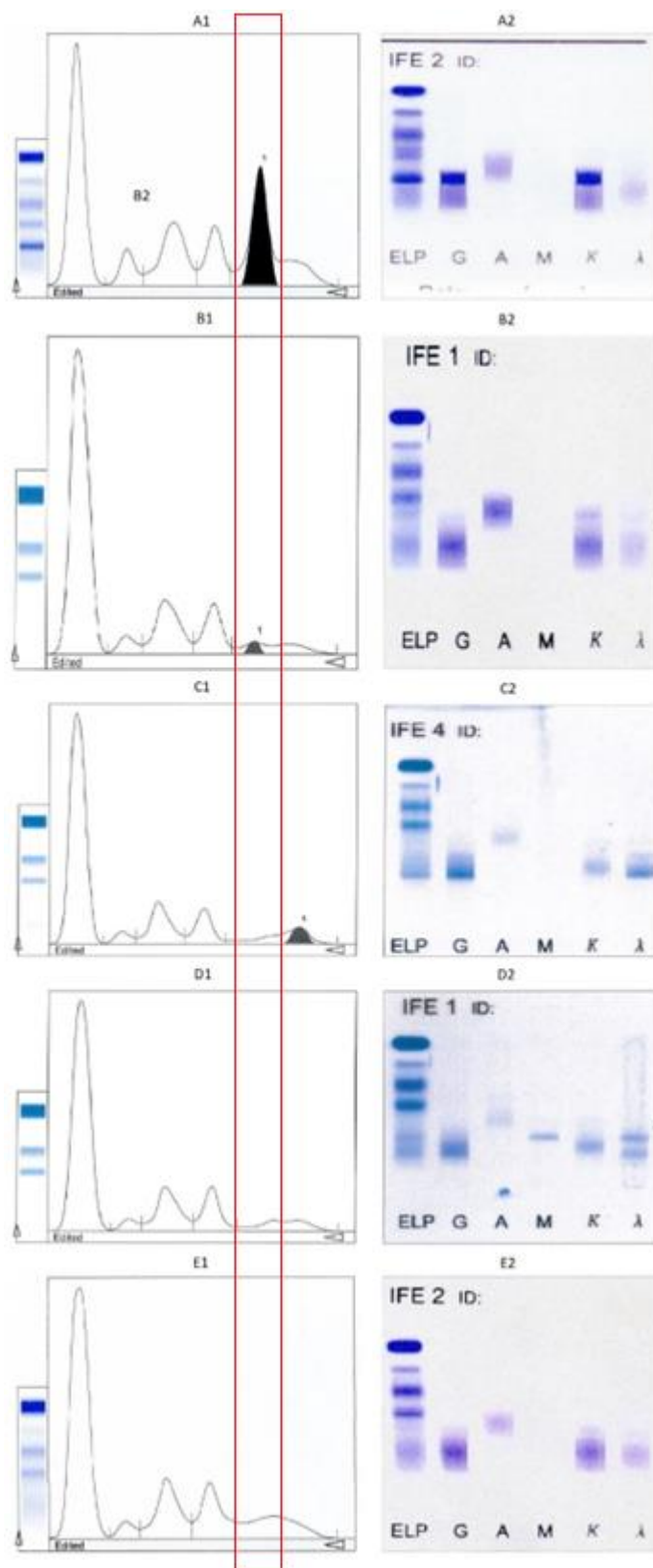
W trakcie hospitalizacji zwrócono uwagę na następujące patologiczne wyniki badań laboratoryjnych: niedokrwistość normocytarną: RBC 3,62 mln/ul [4,50 - 5,90] HGB 10,6 g/dl [14,0 - 17,5], MCV 85,3 fL [80,0 - 96,0]. Pacjent zgłaszał silne bóle kostne. Z uwagi na powyższe zlecono badanie elektroforetyczne i immunofiksację surowicy, która ujawniła gammapatię monoklonalną IgG kappa (Ryc. 34 A1, A2). Stężenie białka monoklonalnego wyliczone na podstawie proteinogramu wyniosło 9,0 g/l.

Chory nie spełniał histologicznego kryterium szpiczaka (w badaniu trepanobiopsji szpiku kostnego wykryto 7-8% plazmocytów). W badaniach obrazowych stwierdzono uogólnioną osteolizę kostną, a w badaniach laboratoryjnych podwyższone stężenie FLC kappa surowicy: 484.00 mg/l [3,30 - 19,40], łańcuchów lekkich kappa w moczu: 37.100 mg/l [$<7,300$]) oraz stężenie beta2-mikroglobuliny: 3.08 mg/l [1,09 - 2,53]. Rozpoznano szpiczaka plazmocytowego w stadium I wg ISS. Zdecydowano o podaniu leczenia TAL-DEX, czyli talidomid oraz deksametazon. W ciągu następnych 6 miesięcy chory przeszedł 4 cykle leczenia TAL-DEX i uzyskał bardzo dobrą remisję częściową (VGPR.). Stężenie białka monoklonalnego wyliczone na podstawie badania elektroforetycznego surowicy zostało zredukowane do 0,9 g/l (Ryc. 34 B1, B2). Pacjenta zaklasyfikowano do procedury transplantacji autologicznych komórek krwiotwórczych (autoHSCT). Przed wdrożeniem procedury podano cyklofosfamid z etopozydem (CTX+VEP), a następnie czynnik wzrostu granulocytów (*colony forming unit-granulocyte* - G-CSF) celem mobilizacji komórek macierzystych. Przeprowadzono skuteczną separację komórek macierzystych CD34+ uzyskując odpowiednią ilość komórek ($12,25 \times 10^6$ /kg masy ciała). Po trzech tygodniach przeprowadzono z powodzeniem procedurę transplantacji autologicznych komórek macierzystych poprzedzoną terapią mieloablacyjną - terapią wysokodawkowaną (HDT) melfalanem. Procedura przebiegła bez powikłań.

W badaniach kontrolnych po trzech miesiącach zauważono przesunięcie prążka białka monoklonalnego na koniec rozdziału w paśmie gamma-globulin, w porównaniu do pierwotnej lokalizacji w pobliżu strefy beta-globulin. Badanie immunofiksacji wykazało obecność nowego rodzaju białka monoklonalnego - IgG lambda (dotychczas było to IgG kappa) (Ryc. 34 C1,C2)

Pół roku od pierwszej auto-HSCT wykonano drugą infuzję autologicznego materiału przeszczepowego. Po kilku tygodniach wykonano badania kontrolne. W elektroforezie widoczne były dwie słabe strefy białka monoklonalnego (dwa niepoliczalne piki białka monoklonalnego). Wykonano również immunofiksację surowicy, która ujawniła obecność prążków w obszarach dla immunoglobulin IgG oraz IgM, a także obszarach dla łańcuchów lekkich kappa i lambda (dwa prążki). Całość obrazu wskazywała na obecność monoklonalnych prążków: IgG kappa - odpowiadający pierwotnemu białku M oraz dodatkowo: IgM lambda oraz wolne lambda (Ryc. 34 D1, D2). Otrzymany obraz był wynikiem przeszczepienia komórek krwiotwórczych.

Pół roku od ostatniego przeszczepienia chory uzyskał całkowitą remisję hematologiczną (*complete remission* – CR). Proteinogram i immunofiksacja nie wykazały obecności białka monoklonalnego (Ryc. 34 E1, E2).



Proteinogram surowicy z widoczną strefą białka monoklonalnego we frakcji gamma-globulin o stężeniu 9,0 g/l (**A1**). Metodą immunofiksacji stwierdzono obecność białka monoklonalnego IgG kappa (**A2**) (wynik przed leczeniem).

Wynik proteinogramu (**B1**) oraz immunofiksacji surowicy (**B2**) u pacjenta po leczeniu TAL-DEX. Stężenie białka monoklonalnego zredukowane do 0,9 g/l.

Proteinogram (**C1**) pacjenta po autoHSCT. Widoczne wyraźne przesunięcie piku białka monoklonalnego na koniec strefy gamma-globulin. Immunofiksacja ujawnia obecność nowego prążka białka monoklonalnego - IgG lambda (**C2**).

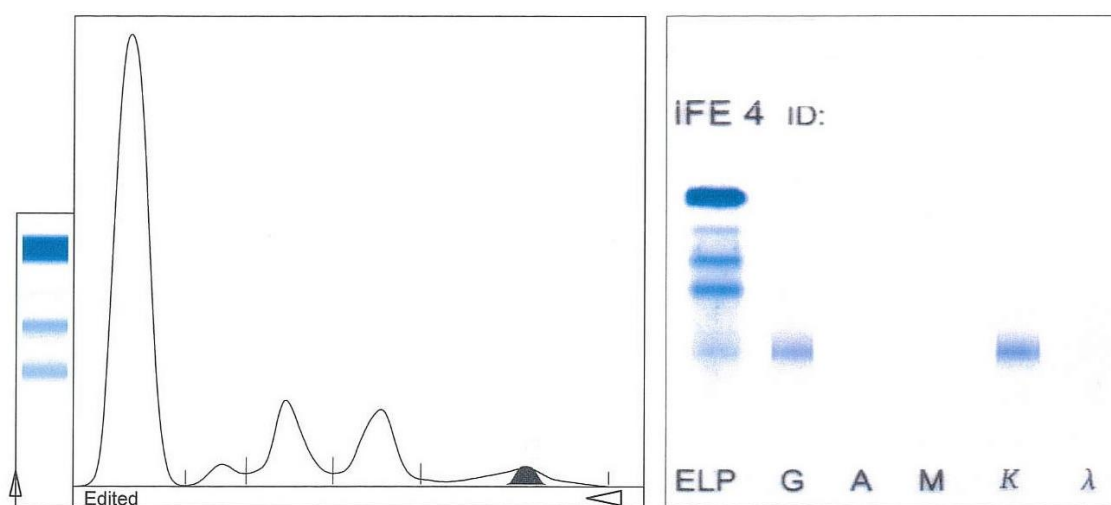
Elektroforeza surowicy pacjenta po tandemowym autoHSCT (**D1**). W immunofiksacji obecne dodatkowe prążki (**D2**).

Proteinogram (**E1**) i immunofiksacja (**E2**) surowicy pacjenta po uzyskaniu remisji – brak białka monoklonalnego.

Ryc. 34 Zestawienie wyników SPE oraz IFE *pacjenta 7* z wtórną gammopatią monoklonalną. Czerwona ramka umieszczona w pierwotnej (przed leczeniem) lokalizacji białka M uwidocznia zmiany w lokalizacji piku w trakcie leczenia.

Przypadek 3 (pacjentka 8)

Poniżej przedstawiono kolejny przykład wtórnej gammapatii monoklonalnej po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych, tym razem u 3-letniej dziewczynki chorej na mukopolisacharydozę typu I. Opisywane badania przeprowadzono kilka miesięcy po przeszczepieniu szpiku. Elektroforegram ujawnił prążek białka monoklonalnego o stężeniu 1g/l, natomiast metodą immunofiksacji stwierdzono obecność białka monoklonalnego klasy IgG kappa (Ryc. 35).



Ryc. 35 Elektroforegram u 3-letniej dziewczynki z mukopolisacharydozą typu I. Badanie wykonano po przeszczepieniu szpiku. Metodą immunofiksacji stwierdzono obecność białka monoklonalnego IgG kappa.

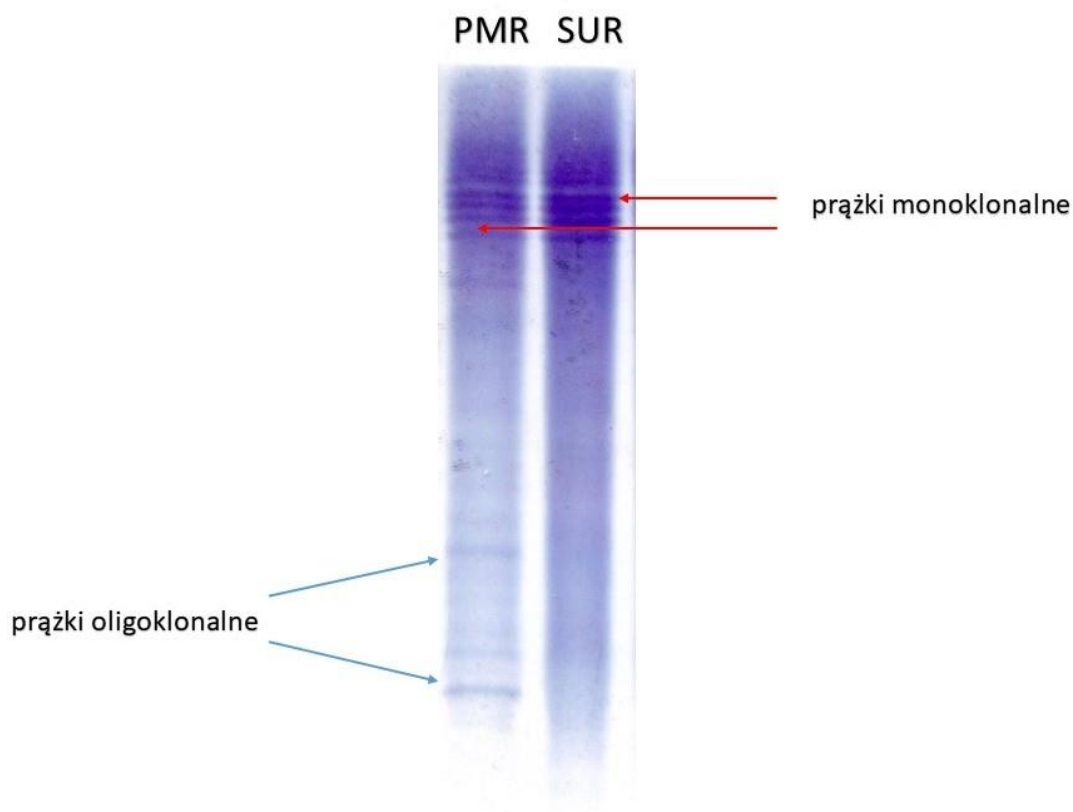
4.6 Gammapatie monoklonalne u pacjentów z zaburzeniami neurologicznymi.

W trakcie realizacji niniejszej pracy dokonano analizy 1142 wyników elektroforegramów wykonanych techniką ogniskowania izoelektrycznego. Pacjentami byli chorzy z oddziału neurologii, 1 osoba z oddziału reumatologii, 1 z SOR 1 z oddziału hematologii. Mężczyźni stanowili 438 osób z medianą wieku 44 lata, kobiety 704 osób z medianą wieku 39 lat. Prążki monoklonalne w PMR i surowicy wykazano u 11 osób (0,96 %) Poniżej przedstawiono dwa takie przypadki.

Przypadek 1 (pacjent 9)

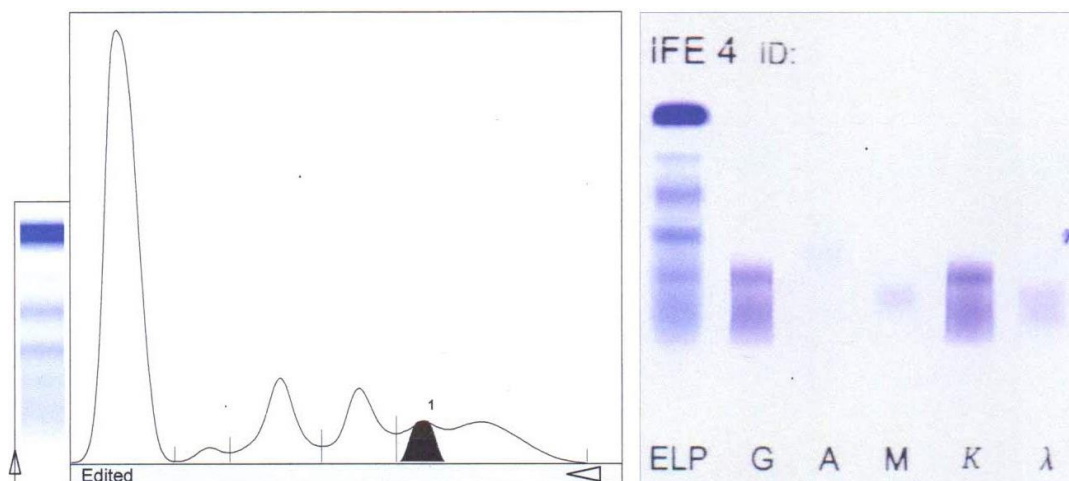
Mężczyzna w wieku 34 lat został przyjęty na oddział neurologiczny z podejrzeniem stwardnienia rozsianego.

W trakcie procesu diagnostycznego u pacjenta wykonano badanie płynu mózgowo-rdzeniowego (PMR) metodą ogniskowania izoelektrycznego na żelu agarozowym. W elektroforegramie zauważono obecność dwóch prążków oligoklonalnych w PMR oraz niespodziewanie kilka prążków monoklonalnych w PMR i surowicy (Ryc. 36).



Ryc. 36 Wynik badania elektroforetycznego u *pacjenta 9* metodą ogniskowania izoelektrycznego na żelu agarozowym: widoczne prążki oligoklonalne w PMR oraz prążki monoklonalne w PMR i surowicy. (PMR- płyn mózgowo-rdzeniowy, SUR- surowica).

U pacjenta wykonano dodatkowe badania elektroforetyczne surowicy, które ujawniły obecność białka monoklonalnego IgG kappa (Ryc. 37).



Ryc. 37 Wynik badań elektroforetycznych surowicy *pacjenta 9* ujawniający obecność białka monoklonalnego IgG kappa.

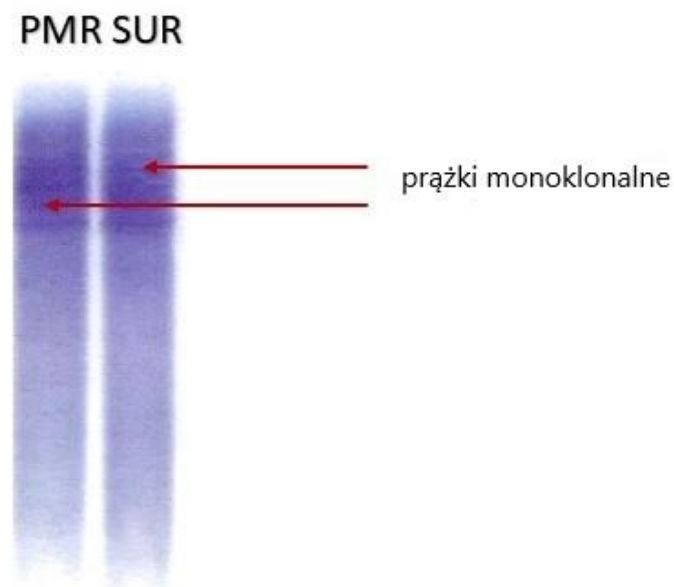
Chory nigdy nie miał żadnych objawów charakterystycznych dla dyskrazji plazmocytowych, nie był również leczony przeciwciałami monoklonalnymi. Hematolog zlecił u pacjenta wykonanie oznaczeń: wapnia całkowitego, wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin, beta2 mikroglobuliny w surowicy, badanie ogólne moczu oraz badanie w kierunku białka monoklonalnego w moczu. Nie stwierdzono odchyleń w wynikach ww. badań. U pacjenta nie wdrożono dalszej pogłębionej diagnostyki hematologicznej. Na podstawie dotychczas zleconych badań u chorego rozpoznano MGUS i zalecono kontrolne oznaczanie białka monoklonalnego w surowicy raz na pół roku.

Przypadek 2 (pacjentka 10)

58 –letnia kobieta została przyjęta na oddział neurologii w związku ze zmianami w rdzeniu kręgowym na poziomie Th9 i Th10 i dolegliwościami bólowymi kręgosłupa oraz nieokreślonym zapaleniem stawów.

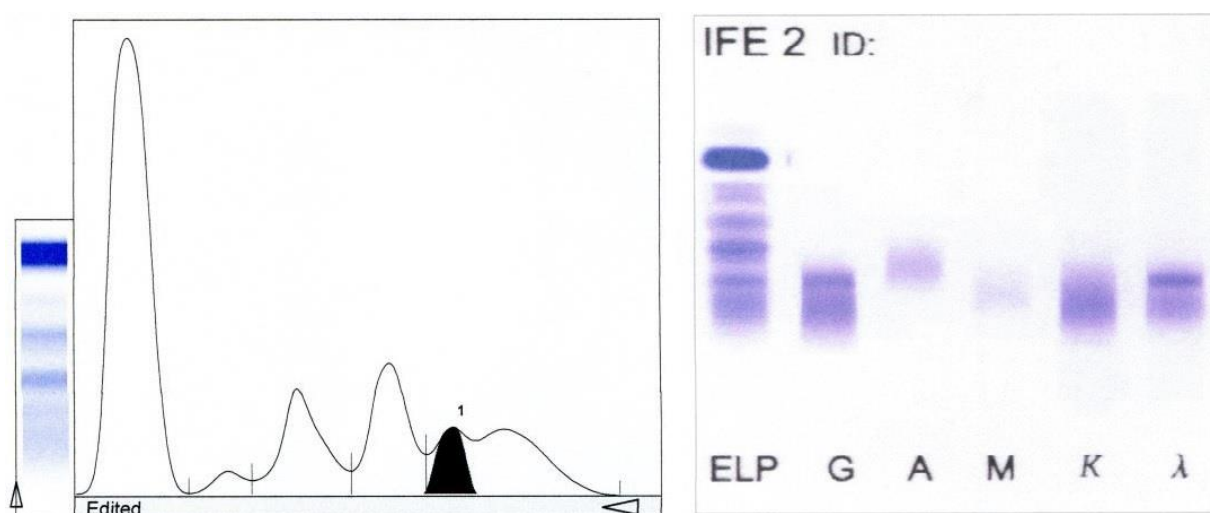
W trakcie diagnostyki związanej z podejrzeniem zmian demielinizacyjnych w OUN zlecono badanie płynu mózgowo-rdzeniowego w kierunku wewnątrzpłynowej syntezy globulin.

W rozdziale elektroforetycznym PMR otrzymano prążki charakterystyczne dla białka monoklonalnego. Wynik ogniskowania izoelektrycznego surowicy również ujawnił prążki monoklonalne (Ryc. 38).



Ryc. 38 Wynik badania elektroforetycznego u *pacjentki 10* metodą ogniskowania izoelektrycznego na żelu agarozowym: widoczne prążki monoklonalne w PMR i surowicy (PMR-płyn mózgowo-rdzeniowy, SUR-surowica).

W celu weryfikacji powyższych wyników wykonano elektroforezę i immunofiksację białek surowicy krwi. Uzyskano wynik dodatni - białko monoklonalne IgG lambda (Ryc. 39).



Ryc. 39 Wynik badań elektroforetycznych surowicy *pacjentki 10* ujawniający obecność białka monoklonalnego IgG lambda.

U chorej wdrożono pogłębioną diagnostykę hematologiczną w kierunku dyskracji plazmocytowych. Badanie biopsji szpiku wykazało, że plazmocyty CD138+/CD56-/kappa+/lambda+, stanowiły ok. 2% komórek szpiku. Wspomniane plazmocyty nie tworzyły

patologicznych skupień. Uznano, że w biopsji brak histologicznych dowodów na zajęcie szpiku przez nowotworowy rozrost plazmacytów i/lub limfocytów. Nie stwierdzono również złogów amyloidu. Wykonano tomografię według protokołu typu "whole body" z redukcją dawki (*Whole-Body Low-Dose Computed Tomography* - WBLDCT) dedykowanym do oceny układu kostnego u chorych z podejrzeniem dyskracji plazmacytowych (92), (93). Wykonano badanie czaszki, klatki piersiowej, miednicy, kręgosłupa szyjnego, piersiowego, lędźwiowo-krzyżowego, kości ramiennych i udowych. W obrębie części kostnych objętych badaniem wykryto łącznie kilka drobnych ognisk rozrzedzenia struktury kostnej. Jednak nie osiągały one średnicy 5 mm i nie spełniały kryteriów IMWG ognisk procesu zasadniczego. Uznano, że dolegliwości bólowe kręgosłupa związane są ze zmianami zwyrodnieniowymi.

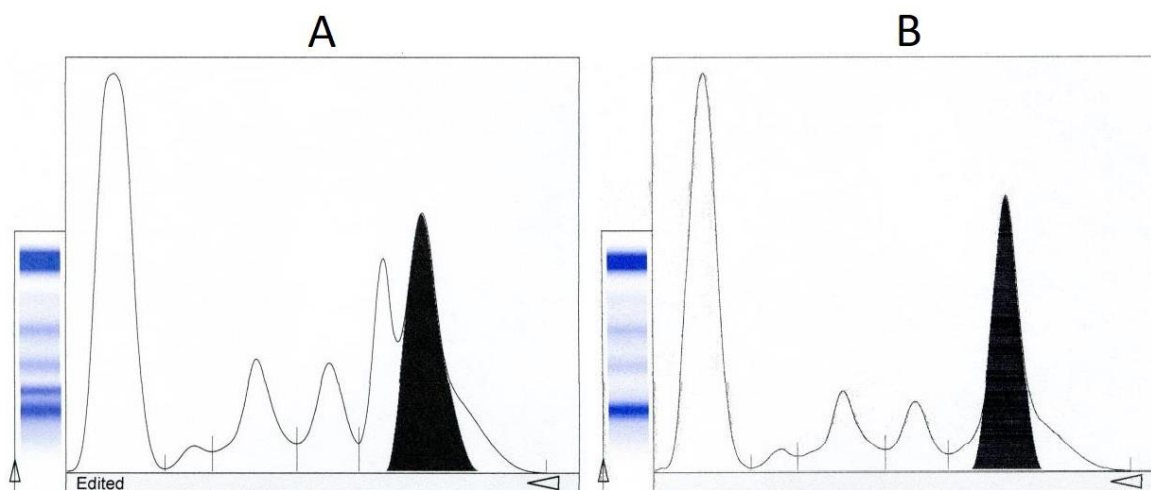
Ostatecznie nie udowodniono związku pomiędzy chorobą neurologiczną u pacjentki a obecnością białka monoklonalnego w surowicy. Stwierdzono MGUS i pouczono pacjentkę o konieczności dalszej obserwacji.

4.7 Wpływ krioglobulin i zespołu nadlepkości na wyniki laboratoryjne

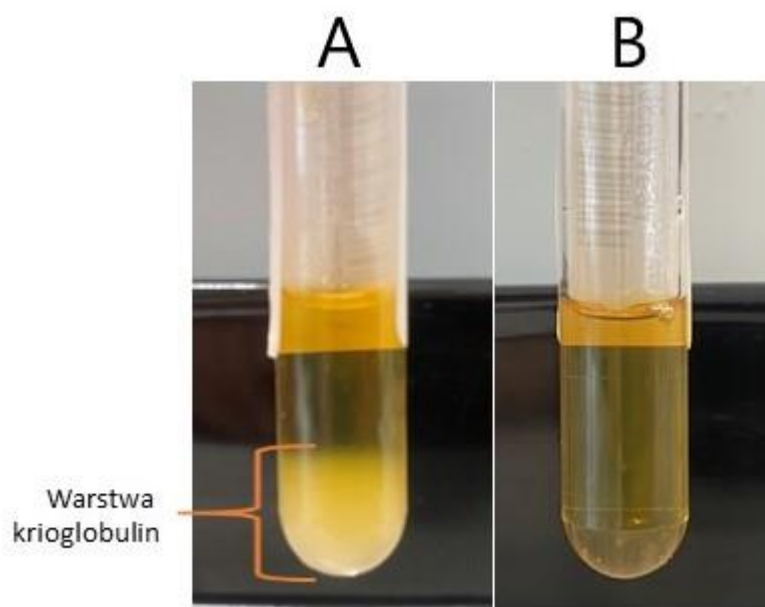
Przypadek 1 (pacjentka 11)

52-letnia pacjentka została przyjęta do Poradni Immunologii i Chorób Rzadkich z powodu bólu i uczucia sztywności w stawach dłoni oraz pojawiających się od wielu lat zmian skórnych o charakterze skazy naczyńniowej na skórze kończyn w przebiegu plamicy Schonleina – Henocha, a także zapalenia naczyń skóry w celu pogłębienia diagnostyki. W trakcie wykonywania badań laboratoryjnych uwagę zwrócił niski poziom immunoglobulin IgA: 0,29g/l [0,70-4,00] i IgG: 3,49g/l [6,38-17,00] oraz podwyższony poziom immunoglobuliny IgM: 11g/l [0,40-2,30]. Zlecono wykonanie badania elektroforezy białek surowicy. Otrzymano wynik (Ryc. 40A) na którym widoczne są dwa wyraźne dodatkowe prążki w rejonie gammaglobulin. W przypadku takich nietypowych obrazów należy wykonać badanie immunofiksacji surowicy w celu potwierdzenia obecności dwóch klonów monoklonalnych immunoglobulin. Do czasu oznaczenia immunofiksacji surowica pacjentki była przechowywana przez noc w lodówce w temperaturze 4°C. Po jej wyjęciu okazało się, że w próbce na dnie pojawił się biały osad (Ryc. 41A). Fakt ten nasunął przypuszczenie obecności w surowicy krioglobulin. Próbkę umieszczono na 1 godzinę w ciepłarni w temperaturze 37°C. Po tym czasie osad uległ rozpuszczeniu (Ryc. 41 B). W ogrzanej surowicy wykonano ponownie proteinogram i otrzymano wynik z jednym wyraźnym prążkiem w strefie gamma (Ryc. 40 B). Wykonano

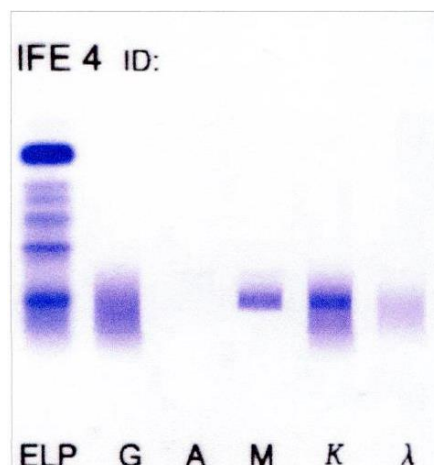
również immunofiksację otrzymując potwierdzenie obecności białka monoklonalnego klasy IgM typu kappa (Ryc. 42).



Ryc. 40 Proteinogram surowicy pacjentki 11 zawierającej krioglobuliny (A) oraz surowicy po ogrzaniu (B)



Ryc. 41 Surowica pacjentki 11 zawierająca krioglobuliny -biały osad (A) oraz po ogrzaniu -bez osadu (B).



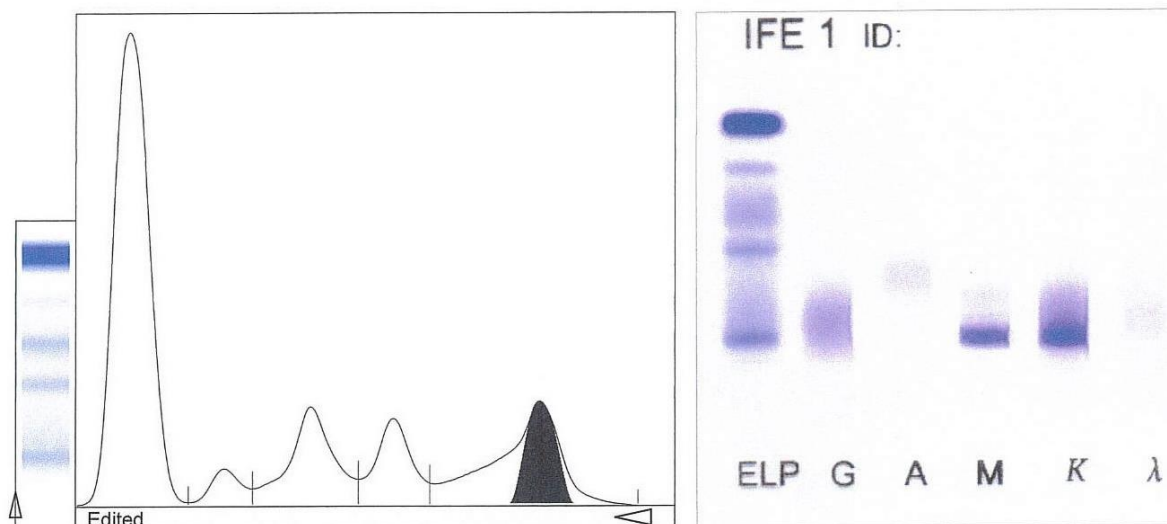
Ryc. 42 Immunofiksacja surowicy pacjentki 11 ujawniająca obecność białka monoklonalnego klasy IgM typu kappa.

Zlecono trepanobiopsję szpiku. Wynik ujawnił niewielki (15-17%) naciek chłoniaka limfoplazmocytozowego (*lymphoplasmacytic lymphoma* - LPL). Dodatkowo oznaczono stężenie łańcuchów lekkich kappa w surowicy krwi 33,80 mg/l [6,70 - 22,40] i moczu (brak obecności) oraz uzyskano prawidłowe stężenia b2-mikroglobuliny: 1,93 mg/l [1,09 - 2,53] i aktywność LDH 478.0 U/L [313,0 - 618,0]. Podano wlewy immunoglobulin z uwagi na wtórny niedobór odporności humoralnej IgG i IgA.

Całość obrazu wskazywała na rozpoznanie chłoniaka indolentnego o niskim stopniu złośliwości i powolnym przebiegu oraz towarzyszącej paraproteinemii IgM (makroglobulinemia Waldenstroma). Z uwagi na małą dynamikę choroby i braku narastania stężenia białka monoklonalnego IgM kappa w kolejnych wizytach kontrolnych oraz braku uszkodzeń narządowych zdecydowano o obserwacji pacjentki i dalszych kontrolnych badaniach laboratoryjnych co pół roku.

Przypadek 2 (pacjent 12)

U 42-letniego mężczyzny zdiagnozowano makroglobulinemię Waldenströma. W badaniach technikami elektroforetycznymi stwierdzono obecność monoklonalnej immunoglobuliny IgM kappa. (Ryc. 43).



Ryc. 43 Wynik rozdziału elektroforetycznego i immunofiksacji surowicy *pacjenta 12* stwierdzający obecność białka monoklonalnego IgM kappa.

Morfologia krwi wykonana na analizatorze hematologicznym Sysmex XN-1000 wykazała obecność wysokiej trombocytozy (Ryc. 44).

Item	Data	Unit	Item	Data	Unit
WBC	10.21	10 ³ /uL	NEUT#	7.08 +	10 ³ /uL
RBC	3.01	10 ⁶ /uL	LYMPH#	1.94	10 ³ /uL
HGB	8.8	g/dL	MONO#	0.97 +	10 ³ /uL
HCT	24.9	%	EO#	0.06	10 ³ /uL
MCV	82.7	fL	BASO#	0.03	10 ³ /uL
MCH	29.2	pg	NEUT%	69.3	%
MCHC	35.3	g/dL	LYMPH%	19.0 -	%
PLT	1205 *	10 ³ /uL	MONO%	9.5	%
RDW-SD	43.5	fL	EO%	0.6	%
RDW-CV	14.5	%	BASO%	0.3	%
PDW	11.5	fL	IG#	0.13	10 ³ /uL
MPV	10.0	fL	IG%	1.3	%
P-LCR	25.7	%			
PCT	1.20	%			
NRBC#	0.00	10 ³ /uL			
NRBC%	0.0	/100WBC			
RET					
Item	Data	Unit			
RET%		%%			
RET#		10 ⁶ /uL			
IRF		%			
LFR		%			
MFR		%			
HFR		%			
RET-He		pg			

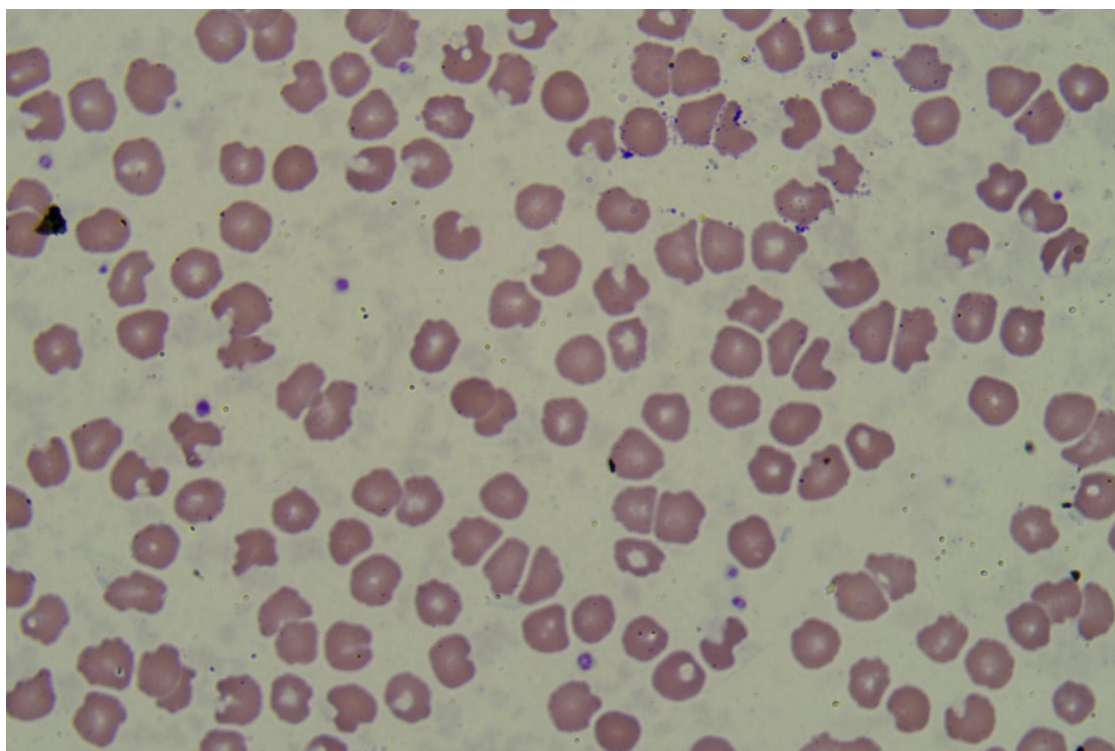
Ryc. 44 Wynik morfologii krwi *pacjenta 12* z makroglobulinemią Waldenströma. Płytki mierzone metodą impedancyjną. Oflagowanie przy wyniku PLT wskazuje na interferencje w oznaczeniu spowodowanym przez monoklonalne immunoglobuliny klasy IgM.

W kolejnych dniach hospitalizacji u chorego utrzymywała się zwiększona liczba płytek krwi, jednak zmienność wyników w różnych dniach była zaskakująco wysoka (CV = 26,7%) (Tab. 17).

Tab. 17 Wyniki płytek krwi u *pacjenta 12* z podejrzeniem pseudotrombocytozy.

Dzień hospitalizacji	Płytki krwi [$\times 10^3/\mu\text{l}$]
2	714
3	1085
4	806
5	790
6	1447
7	1175
8	880

Z uwagi na brak klinicznych objawów nadpłytkowości u pacjenta zdecydowano o weryfikacji wyników równoległe dwoma metodami: manualną – wykonano mikroskopową ocenę rozmazu krwi (Ryc. 45) oraz automatyczną metodą fluorescencyjnej cytometrii przepływowej na analizatorze Sysmex XN-1000 (Ryc. 46). Obie metody wykazały liczbę płytek mieszczącą się w zakresie referencyjnym. Obraz mikroskopowy rozmazu krwi ujawnił dużą liczbę fragmentocytów.



Ryc. 45 Obraz mikroskopowy rozmazu krwi obwodowej *pacjenta 12* chorującego na makroglobulinemię Waldenströma z rzekomą nadpłytkowością. Widoczne liczne fragmentocyty.

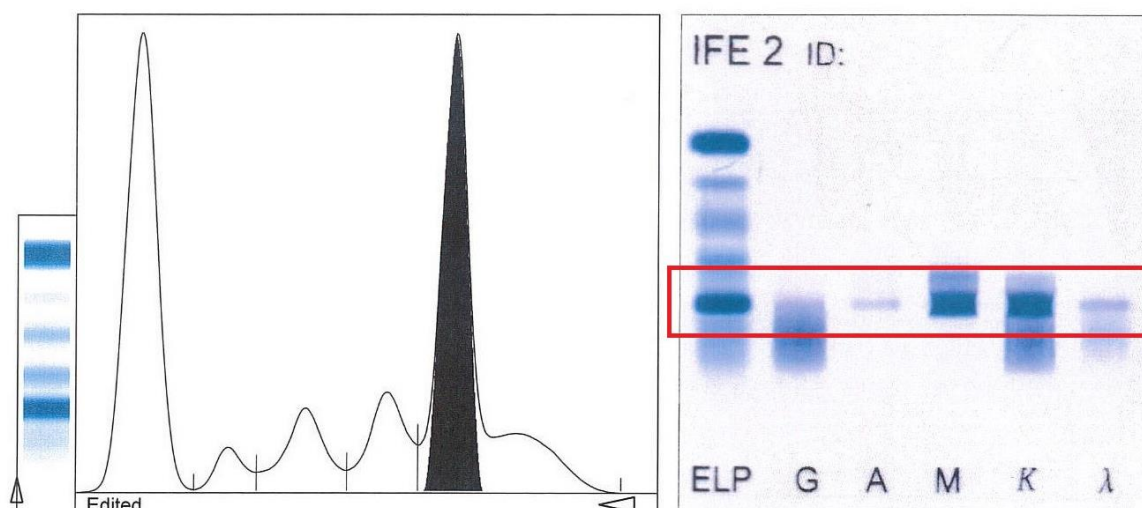
Item	Data	Unit	Item	Data	Unit
WBC	11.60	10 ³ /uL	NEUT#	9.85 +	10 ³ /uL
RBC	3.56	10 ⁶ /uL	LYMPH#	0.87 -	10 ³ /uL
HGB	9.9	g/dL	MONO#	0.84 +	10 ³ /uL
HCT	29.0	%	EO#	0.00	10 ³ /uL
MCV	81.5 -	fL	BASO#	0.00	10 ³ /uL
MCH	27.8	pg	NEUT%	85.0 +	%
MCHC	34.1	g/dL	LYMPH%	7.5 -	%
PLT &F	262 *	10 ³ /uL	MONO%	7.2	%
RDW-SD	42.1	fL	EO%	0.0	%
RDW-CV	14.5	%	BASO%	0.0	%
PDW	16.7 *	fL	IG#	0.04	10 ³ /uL
MPV	12.3 *	fL	IG%	0.3	%
P-LCR	42.4 *	%			
PCT	1.22 *	%			
NRBC#	0.00	10 ³ /uL			
NRBC%	0.0	/100WBC			
RET			PLT-F		
Item	Data	Unit	Item	Data	Unit
RET%	9.5	%%	IPF	7.0 *	%
RET#	0.0338	10 ⁶ /uL			
IRF	0.7	%			
LFR	99.3	%			
MFR	0.7	%			
HFR	0.0	%			
RET-He	34.0	pg			

Ryc. 46 Wynik morfologii krwi *pacjenta 12*. Płytki mierzone metodą fluorescencyjnej cytometrii przepływowej, która eliminuje interferencje spowodowane przez monoklonalne immunoglobuliny w oznaczaniu PLT.

Z uwagi na niespójności w wynikach morfologii oraz biorąc pod uwagę obecność w surowicy chorego monoklonalnych immunoglobulin IgM zdecydowano o wykonaniu testu na obecność krioglobulin. Otrzymano pozytywny wynik testu.

Przypadek 3 (*pacjent 13*)

Poniżej przedstawiono wyniki badań elektroforetycznych 87-letniego pacjenta chorego na makroglobulinemię Waldenströma (Ryc. 47). Wykonano rozdział elektroforetyczny białek surowicy, w której zauważono charakterystyczny pik monoklonalny w obszarze gamma-globulin. Immunofiksacja białek surowicy wykazała obecność monoklonalnej immunoglobuliny IgM kappa, chociaż na wysokości immunoglobuliny monoklonalnej zauważono obecność prążków we wszystkich ścieżkach rozdziału surowicy. Taki rozkład prążków nasunął podejrzenie krioglobulinemii, jednak test inkubacji nie potwierdził obecności krioglobulin. W oznaczeniu immunonefelometrycznym stężenie IgM było znacznie podwyższone i wynosiło 47,0 g/l [0,40-2,30].



Ryc. 47 Wynik proteinogramu oraz immunofisacji surowicy *pacjenta 13*. Stwierdzono obecność białka monoklonalnego IgM kappa oraz obecność prążków we wszystkich klasach immunoglobulin wynikającą z precipitacji IgM. Czerwoną ramką zaznaczono nietypową obecność prążków na wszystkich ścieżkach rozdzału surowicy.

W wykonanym badaniu trepanobiopsji szpiku wykryto 41% naciek limfoplazmocytny. U pacjenta zauważono zaburzenie funkcji kognitywnych, podejrzewano zespół otępienny.

Wykonano morfologię krwi. U pacjenta zaobserwowano anemię normocytarną. Liczba płytek krwi była w obszarze wartości referencyjnych, jednak charakteryzowała się pewną niepewnością pomiarową, co analizator zasygnalizował umieszczając przy parametrach układu płytkowego symbol gwiazdki. Liczba leukocytów charakteryzowała się tak dużą niepewnością pomiarową, że analizator nie podał tej wartości. (Ryc. 48).

Item	Data	Unit	Item	Data	Unit
WBC &D	----	10 ³ /uL	NEUT#	----	10 ³ /uL
RBC	3.60	10 ⁶ /uL	LYMPH#	----	10 ³ /uL
HGB	9.9	g/dL	MONO#	----	10 ³ /uL
HCT	31.0	%	EO#	----	10 ³ /uL
MCV	86.1	fL	BASO#	----	10 ³ /uL
MCH	27.5	pg	NEUT%	----	%
MCHC	31.9	g/dL	LYMPH%	----	%
PLT	331 *	10 ³ /uL	MONO%	----	%
RDW-SD	53.1	fL	EO%	----	%
RDW-CV	17.5 +	%	BASO%	----	%
PDW	11.0 *	fL	IG#	----	10 ³ /uL
MPV	10.0 *	fL	IG%	----	%
P-LCR	25.1 *	%			
PCT	0.33 *	%			
NRBC#	----	10 ³ /uL			
NRBC%	----	%			

RET			PLT-F		
Item	Data	Unit	Item	Data	Unit
RET%		%%	IPF		%
RET#		10 ⁶ /uL			
IRF		%			
LFR		%			
MFR		%			
HFR		%			
RET-He		pg			

Ryc. 48 Wynik morfologii krwi u *pacjenta 13* z makroglobulinemią Waldenströma wykonany na analizatorze Sysmex XN-1000. Brak oznaczenia liczby leukocytów z uwagi na dużą niepewność pomiaru spowodowaną interferencją monoklonalnych immunoglobulin.

Wykonano ponowne oznaczenie po wymianie osocza na dedykowany firmowy diluent (Cellpack, Sysmex). Po eliminacji białka monoklonalnego obecnego w osoczu uzyskano wynik liczby leukocytów ($2.37 \times 10^3/\mu\text{L}$) (Ryc.49).

U pacjenta zaobserwowano leukopenię. Liczba płytek krwi znacząco się zmniejszyła ($331 \times 10^3/\mu\text{L}$ vs $222 \times 10^3/\mu\text{L}$), wynik wciąż cechował się znaczną niepewnością pomiarową (gwizdka przy wartości).

CBC			DIFF		
Item	Data	Unit	Item	Data	Unit
WBC &D	2.37 -	10 ³ /uL	NEUT#	1.00 -	10 ³ /uL
RBC	3.43	10 ⁶ /uL	LYMPH#	0.57 -	10 ³ /uL
HGB	9.5	g/dL	MONO#	0.69	10 ³ /uL
HCT	29.6	%	EO#	0.00	10 ³ /uL
MCV	86.3	fL	BASO#	0.06	10 ³ /uL
MCH	27.7	pg	NEUT%	42.2	%
MCHC	32.1	g/dL	LYMPH%	24.1	%
PLT	222 *	10 ³ /uL	MONO%	29.1 +	%
RDW-SD	54.2 +	fL	EO%	0.0	%
RDW-CV	17.6 +	%	BASO%	2.5 +	%
PDW	10.9 *	fL	IG#	0.05	10 ³ /uL
MPV	10.0 *	fL	IG%	2.1	%
P-LCR	25.0 *	%			
PCT	0.22 *	%			
NRBC#	----	10 ³ /uL			
NRBC%	----	%			
RET			PLT-F		
Item	Data	Unit	Item	Data	Unit
RET%	15.9	%%	IPF		%
RET#	0.0545	10 ⁶ /uL			
IRF	10.6	%			
LFR	89.4	%			
MFR	9.4	%			
HFR	1.2	%			
RET-He	33.3	pg			

Ryc. 49 Wynik morfologii krwi u *pacjenta 13* z makroglobulinemią Waldenströma na analizatorze Sysmex XN-1000 po wymianie osocza. Po eliminacji białka monoklonalnego obecnego w osoczu (powodującego interferencję w oznaczeniu) uzyskano wynik liczby leukocytów.

4.8 Problemy w interpretacji wyników pacjentów poddawanych immunoterapii

Przypadek 1 (pacjent 14)

Poniżej przedstawiono wyniki badań 58-letniego pacjenta, u którego w 2016 roku zdiagnozowano szpiczaka plazmocytowego (Ryc. 50).

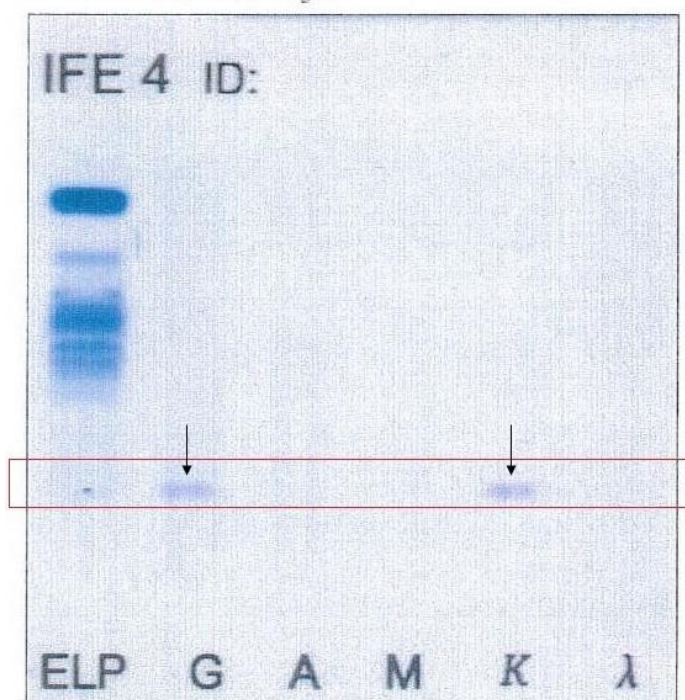


Ryc. 50 Immunofiksacja surowicy *pacjenta 14* ujawniająca obecność białka monoklonalnego – wolnych łańcuchów lekkich lambda.

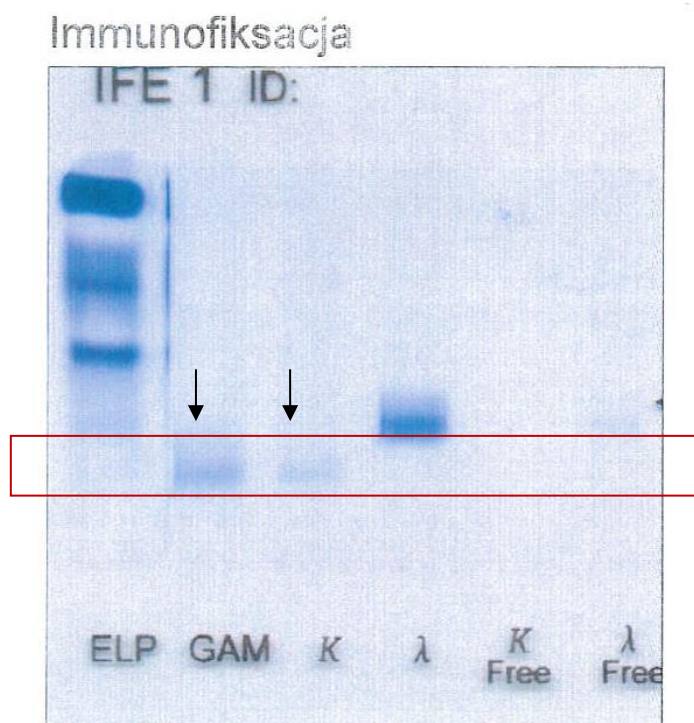
Po pierwszoliniowym leczeniu u pacjenta nastąpiła remisja, następnie w październiku 2019 roku wznowa. Pacjent został pomyślnie zakwalifikowany do programu leczenia daratumumabem (*Dara*), pierwszą dawkę leku otrzymał na początku grudnia 2019.

Badania testami IFE surowicy oraz moczu ujawniły obecność leku - immunoglobuliny IgG kappa (Ryc. 51, Ryc. 52). *Dara* nie wpłynął natomiast na stężenie FLC kappa w surowicy (Tab. 18).

Immunofiksacja



Ryc. 51 Metodą immunofiksacji w surowicy *pacjenta 14* stwierdzono obecność słabej strefy IgG kappa pochodzącej od podawanego leku *Dara* (zaznaczono czerwoną ramką).



Ryc. 52 Metodą immunofiksacji w moczu *pacjenta 14* stwierdzono obecność łańcuchów lekkich lambda. Dodatkowo widoczna jest całkowita cząsteczka IgG kappa, której obecność w moczu jest wynikiem eliminacji przez nerki podawanego leku *Dara* (zaznaczono czerwoną ramką).

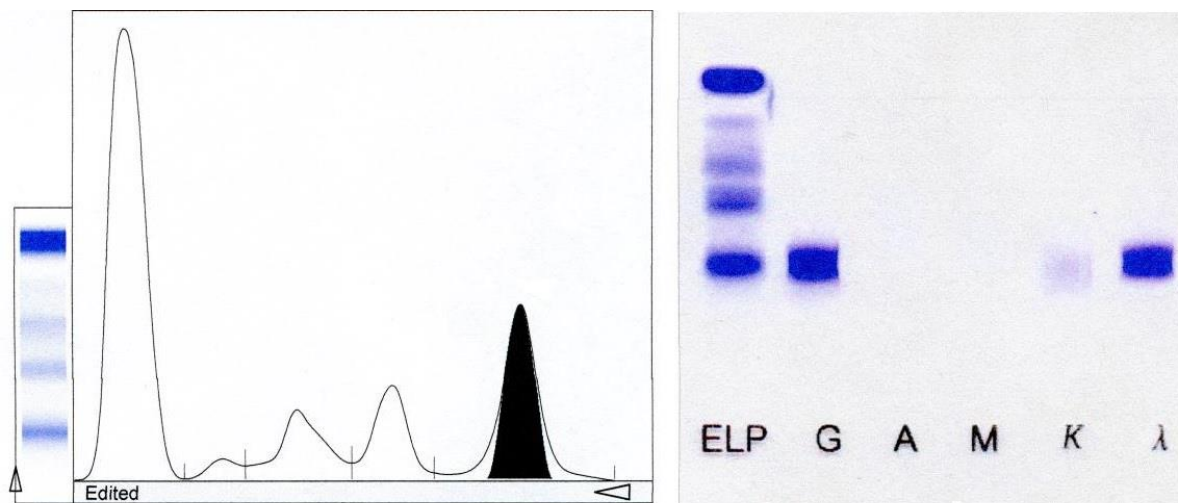
Tab. 18 Badania laboratoryjne u *pacjenta 14* przed i po otrzymaniu leczenia daratumumabem. Zwraca uwagę pojawienie się białka IgG kappa (czerwony kolor) w IFE oraz brak wzrostu stężenia FLC kappa w surowicy (zielony kolor), i wzrost stężenia łańcuchów lekkich kappa w moczu (żółty kolor) na skutek eliminacji leku przez nerki podczas terapii *Dara*.

Data badania/ etap choroby	IFE Białko monoklonalne	FLCs [κ: 3,30 - 19,40] [λ: 5,71 - 26,30]	FLCr [0,26-1,65]	Łańcuchy lekkie Mocz [κ < 7,300] [λ < 4,000]	κ/ λ Mocz [0,75-4,50]	UPE	IFE mocz
26.08.16 rozpoznanie	wolne łańcuchy lambda	κ: 33,50 λ :21,20	κ/ λ =1,58	κ: 9,76 λ: 4,29	κ/ λ= 2,28	uj	nw
04.04.18 Remisja	Ślad	κ: 21,60 λ :14,90	κ/ λ =1,44	κ < 6,84 λ <3,78	κ/ λ ---	uj	nw
17.10.19 progresja	wolne łańcuchy lambda słaba strefa	κ: 23,50 λ :503,00	κ/ λ =0,04	κ : 14,10 λ: 16,30	κ/ λ= 0,87	uj	nw
13.12.19 leczenie Dara	IgG kappa Słaba strefa	κ: 20,60 λ :196,00	κ/ λ =0,10	κ : 24,10 λ: 46,70	κ/ λ= 0,57	nw	wolne łańcuchy lambda oraz kompletna cząsteczka IgG kappa
16.01.20 po leczeniu	niewidoczne	κ: 23,80 λ :180,00	κ/ λ =0,13	κ : 17,30 λ: 42,50	κ/ λ= 0,41	nw	wolne łańcuchy lambda

nw – nie wykonano, uj – ujemny

Przypadek 2 (*pacjentka 15*)

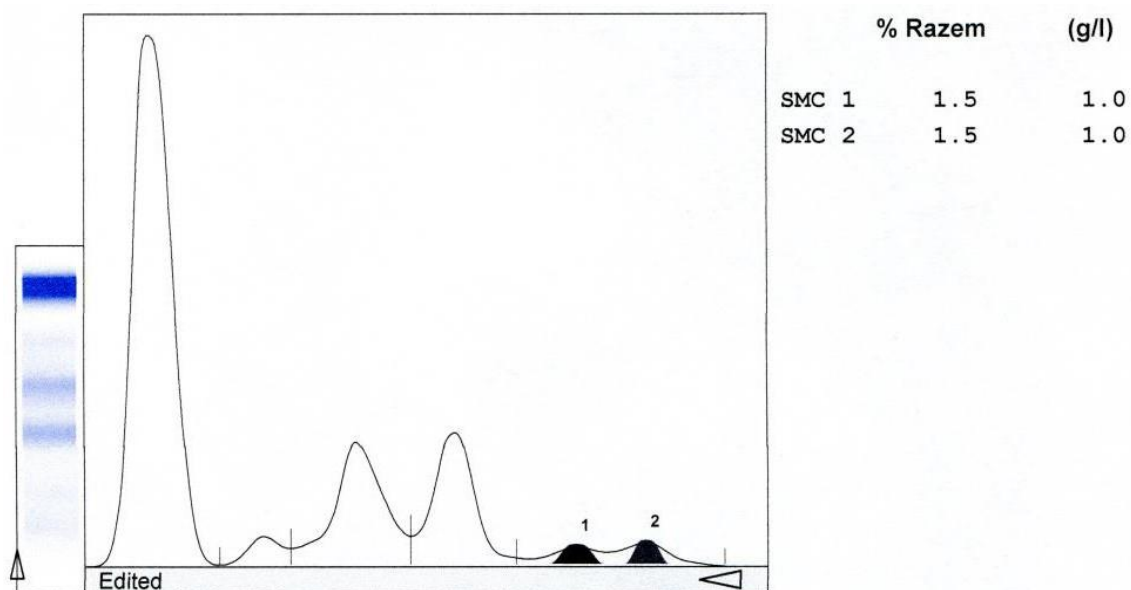
67 – letnia pacjentka została skierowana do poradni hematologicznej z powodu utrzymującej się leukopenii oraz anemii makrocytarnej. Poniżej przedstawiono jej wyniki morfologii krwi: WBC $3,47 \times 10^3/\mu\text{l}$ [4,0 - 10,0]; RBC $2,90 \times 10^6/\mu\text{l}$ [4,00 - 5,00], HGB 9,8g/dL [12,0 - 16,0], HCT 29,1 % [37,0 - 47,0], MCV 100,3 fL [80,0 - 96,0] MCH 33,8 pg [27,0 - 31,0]. Wykonano biopsję szpiku - w mielogramie wykazano obecność 30% plazmocytów. W ocenie radiologicznej kości opartej na rezonansie magnetycznym całego ciała stwierdzono obecność zmian osteolitycznych. Wykonano elektroforę i immunofiksację surowicy (Ryc. 53).



Ryc. 53 Elektroforeza i immunofiksacja surowicy pacjentki 15 potwierdziły obecność białka monoklonalnego IgG lambda.

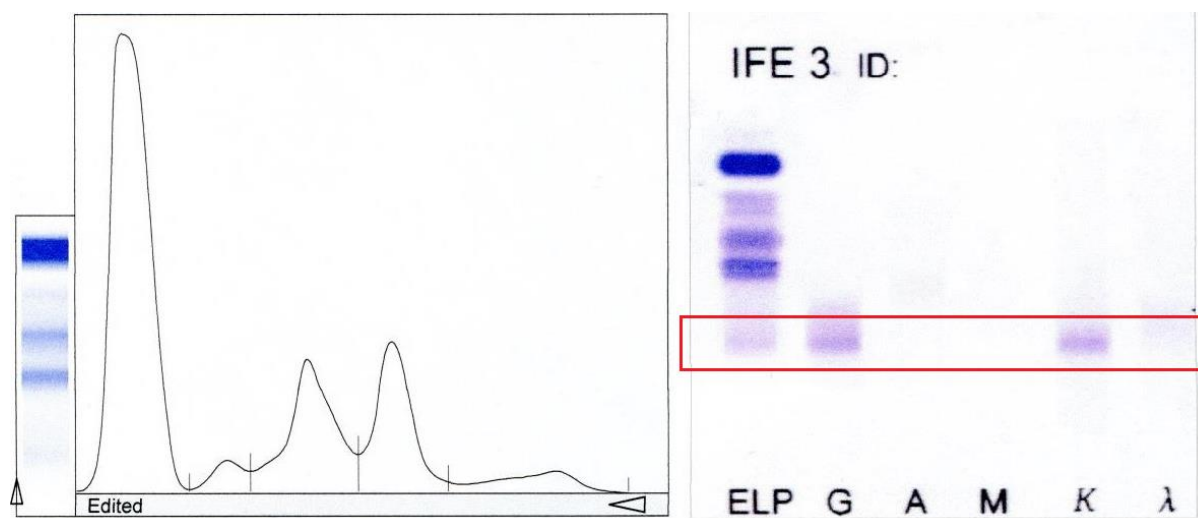
Rozpoznano szpiczaka plazmocytoowego IgG lambda, w stadium II wg ISS po oznaczeniu dodatkowo $\beta 2$ -mikroglobuliny: 3,94 mg/l [1,09 - 2,53] i albuminy: 34,40g/l [35,00 - 52,00]. Rozpoczęto leczenie wg schematu VTD (bortezomib, talidomid i deksametazon). Po przejściu leczenia indukującego uzyskano u chorej PR (*partial remission* – remisję częściową).

Po 3 miesiącach nastąpiła progresja choroby. Zdecydowano o włączeniu chemioterapii CyBorD (cyklofosfamid, bortezomib, deksametazon), a następnie chorą zakwalifikowano do badania klinicznego z leczeniem: karfilzomib + lenalidomid + deksametazon. Po uzyskaniu odpowiedzi u pacjentki dokonano przeszczepienie hematopoetycznych komórek krwiotwórczych (autotransplantację szpiku), a po 5 miesiącach tandemową autoHSCT. Pacjentka otrzymała leczenie podtrzymujące lenalidomidem. Po dwóch latach nastąpiła druga progresja choroby: białko M wzrosło do 7,6 g/l, w trepanobiopsji szpiku stwierdzono obecność nacieku szpiczaka plazmocytoowego (15% komórek szpiku stanowił śródmiażdżowy naciek z plazmocytoów CD138+/lambda+/kappa- z niewielką atypią). Chora odczuwała bóle kostne i osłabienie. Pacjentce podano lek Darzalex (daratumumab) w protokole DVD: daratumumab, bortezomib, deksametazon. Po miesiącu wykonano kontrole badanie elektroforetyczne surowicy pacjentki i otrzymano dwa prążki białka monoklonalnego w strefie gamma-globulin o stężeniu 1,5 g/l każdy (Ryc. 54).



Ryc. 54 Elektroforegram surowicy *pacjentki 15* ujawniający dwa niewielkie piki białka monoklonalnego w strefie gamma-globulin.

Przez następne miesiące pacjentka przyjmowała kolejne cykle leczenia DVd. Jej stan się poprawiał, a następne badanie kontrolne proteinogramu i immunofiksacji surowicy ujawniło obecność słabego prążka nowego białka M w surowicy - IgG kappa (Ryc. 55) Pierwotnym klonem nowotworowym była immunoglobulina IgG lambda.



Ryc. 55 Wyniki elektroforegramów surowicy *pacjentki 15* przedstawiające obecność w surowicy leku daratumumabu. W czerwonej ramce zaznaczono ujawniony prążek IgG kappaa.

4.9 Problem nieprawidłowych wyników badań przesiewowych testów krzepnięcia u pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym

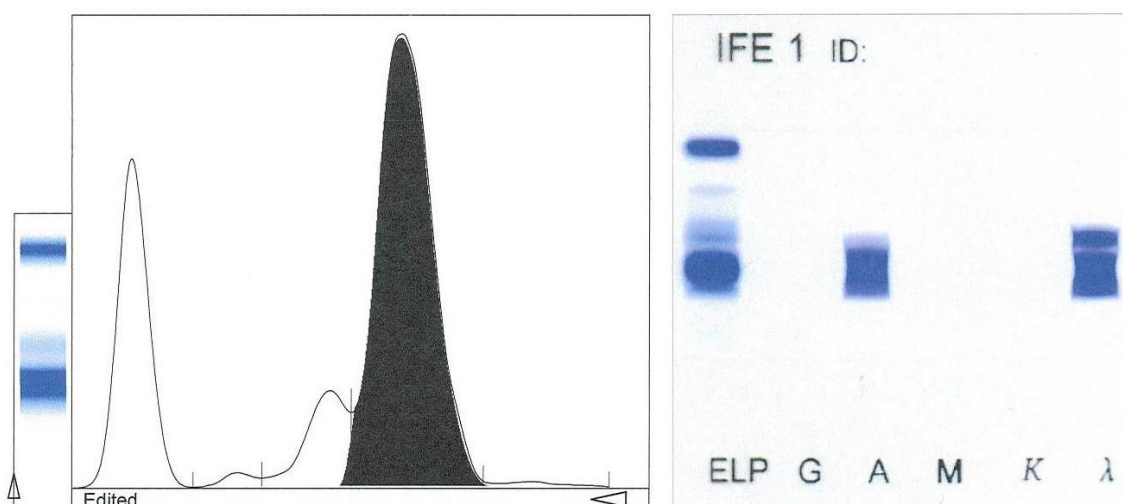
Przypadek 1 (pacjent 16)

88-letni pacjent został przyjęty do szpitala na oddział nefrologii z powodu ostrego uszkodzenia nerek. Dodatkowo pacjent skarżył się na pojawiające się okresowo od 3 miesięcy krwawienia z nosa. Nie zgłaszał przyjmowania leków przeciwkrzepliwych oraz nie miał innych objawów skazy krwotocznej. Wyniki wstępnie wykonanych badań laboratoryjnych przedstawia Tab. 19. Stwierdzono anemię, nieprawidłowe wyniki parametrów nerkowych oraz nieznacznie podwyższony stężenie potasu w surowicy.

Tab. 19 Wybrane wyniki badań laboratoryjnych *pacjenta 16* z podejrzeniem dyskrazji plazmocytovej i objawami uszkodzenia nerek. Czerwonym kolorem zaznaczono wyniki poza zakresami referencyjnymi.

Parametr laboratoryjny	Wynik	Zakres referencyjny
Leukocyty	7,04 x10 ³ /μl	4,0-10,0 x10 ³ /μl
Erytrocyty	2,36 x10 ⁶ /μl	4,50-5,90 x10 ⁶ /μl
Hemoglobina	6,8 g/dl	14-18 g/dl
Hematokryt	21 %	40-54 %
Płytki krwi	193 x10 ³ /μl	140-440 x10 ³ /μl
Kreatynina	295 μmol/l	62-106 μmol/l
GFR wg. MDRD	19 ml/min/1,73m ²	>60 ml/min/1,73m ²
Mocznik	18,60 mmol/l	2,76-8,07 mmol/l
Potas	5,5 mmol/l	3,50-5,10 mmol/l
Sód	143 mmol/l	135-145 mmol/l

Badanie obrazowe układu kostnego za pomocą tomografii komputerowej w protokole WBLDTK ujawniło u chorego liczne ogniska lityczne kośćca mogące odpowiadać zmianom w przebiegu szpiczaka mnogiego. Wykonano badania laboratoryjne w kierunku diagnostyki dyskrazji plazmocytovej oraz ustalono termin trepanobiosji wraz z wymaganymi badaniami układu krzepnięcia. Wyniki badań pokazano na rycinie (Ryc. 56) oraz zabrano w tabeli (Tab. 20).



Ryc. 56 Wynik proteinogramu i immunofiksacji surowicy *pacjenta 16* wskazujące na obecność białka monoklonalnego IgG lambda oraz monoklonalnych, wolnych łańcuchów lekkich lambda migrujących we frakcji beta-globulin. Stężenie białka monoklonalnego oszacowane za pomocą metody rzutu prostopadłego wynosiło 59,9 g/l.

Tab. 20 Wyniki stężenia białek surowicy i testów krzepnięcia osocza u *pacjenta 16* z podejrzeniem dyskracji plazmocytovej. Czerwonym kolorem zaznaczono wyniki powyżej zakresu referencyjnego, niebieskim poniżej zakresu referencyjnego. Zwracają uwagę przedłużone (a właściwie nieoznaczalne) czasy protrombinowy i APTT oraz niskie stężenie fibrynogenu (kolor fioletowy).

Parametr laboratoryjny	Wynik	Zakres referencyjny
Białko całkowite	96,1 g/l	66,0 — 87,0 g/l
IgA	65,40 g/l	0,70 — 4,00 g/l
IgG	< 1,53 g/l	6,38 — 17,00 g/l
IgM	< 0,19 g/l	0,40 — 2,30 g/l
FLC kappa	6,31 mg/l	3,30 — 19,40 mg/l
FLC lambda	9050,00 mg/l	5,71 — 26,30 mg/l
FLCr kappa / FLC lambda	0,0007	0,26 — 1,65
Czas protrombinowy	nie krzepnie	10,4 - 13,0 sek
INR	>12	0,90 — 1,20
APTT	>120 sek	26,0 — 36,0 sek
Fibrynogen	< 0,4 g/l	1,8-3,50 g/l

Immunofiksacja surowicy ujawniła obecność białka monoklonalnego IgA lambda oraz wolnych łańcuchów lambda w strefie beta-globulin. Wyniki te nasunęły przypuszczenie możliwych interferencji w testy koagulologiczne ze strony monoklonalnych immunoglobulin.

W celu weryfikacji nieoznaczalnych wyników parametrów krzepnięcia wykonano badania rozcieńczając próbkę osocza dwukrotnie 0,9 % solą fizjologiczną („rozcieńczając” w ten sposób również interferujące białko monoklonalne) oraz wykonano oznaczenie aktywności czynników VII i VIII. (Tab. 21).

Tab. 21 Powtórzone badania czasów krzepnięcia u *pacjenta 16* po dwukrotnym rozcieńczeniu próbki osocza 0,9 % solą fizjologiczną w celu eliminacji interferencji pochodzących od monoklonalnych immunoglobulin. Czerwonym kolorem zaznaczono wyniki powyżej zakresu referencyjnego. Uzyskano krótsze czasy krzepnięcia niż w poprzednim pomiarze. Zwraca uwagę podwyższona aktywność czynnika VIII –niespójna z pozostałymi wynikami (kolor fioletowy).

Parametr laboratoryjny	Wynik	Zakres referencyjny
Czas protrombinowy	53,8 sek	10,4 - 13,0 sek
INR	5,0	0,90 — 1,20
APTT	178 sek	26,0 — 36,0 sek
Czynnik VIII - aktywność	248 %	50-150 %
Czynnik VII - aktywność	77 %	70-130 %

Niespójne wyniki pacjenta wymagały dalszej weryfikacji, którą wykonano za pomocą innych metod niż używane dotychczas koagulometryczna i Clausa. Czasy APTT i protrombinowy oznaczono metodą optomechaniczną na aparacie BFT II (Siemens Healthcare Diagnostics, Germany), natomiast fibrynogen metodą turbidymetryczną na analizatorze Atellica Coag 360 Siemens (Germany) (Tab. 22).

Tab. 22 Wyniki weryfikacyjne parametrów krzepnięcia *pacjenta 16* uzyskane za pomocą metody optomechanicznej (czas protrombinowy i APTT) oraz metody turbidymetrycznej (fibrynogen).

Parametr laboratoryjny	Wynik	Zakres referencyjny
Czas protrombinowy	34,7 sek	10,4 - 13,0 sek
INR	3,6	0,90 — 1,20
APTT	50,4 sek	26,0 — 36,0 sek
Fibrynogen	4,4 g/l	1,8-3,50 g/l

Po uzyskaniu powyższych wyników *pacjent 16* mógł zostać zakwalifikowany do zabiegu trepanobiopsji szpiku, która potwierdziła rozpoznanie szpiczaka plazmocytoowego typu IgA lambda i chory został przekazany na oddział hematologii.

5. Dyskusja

5.1 Zależne od metody rozbieżności wyników oznaczania stężenia albuminy

Przyczyną rozbieżności dotyczących różnic w oznaczaniu stężenia albuminy są ograniczenia metodologiczne. W przypadku gammopatii monoklonalnych mamy przeważnie do czynienia z podwyższonym stężeniem białka całkowitego oraz obecnością białka monoklonalnego zlokalizowanego najczęściej w strefie gamma-globulin. Niejednokrotnie zdarza się, że stężenia białka M wielokrotnie przewyższa stężenie immunoglobulin poliklonalnych u osób zdrowych. Intensywna strefa białka powoduje silne związanie barwnika generując problemy z liniowością pomiaru densytometrycznego. Błędy związane z densytometrycznym pomiarem intensywnej strefy gamma-globulin mają wpływ na wyliczanie stężenia albuminy. Powyższe problemy były sygnalizowane w pracach z dziedziny diagnostyki laboratoryjnej (94). Padelli i wsp. (95) mierzyli stężenie albuminy w surowicy pacjentów z gammopatią monoklonalną stosując cztery różne metody: elektroforezy kapilarnej, kolorymetryczną z purpurą bromokrezolową, nefelometryczną oraz turbidymetryczną. Różnice w wartościach albuminy między różnymi metodami analizowano w odniesieniu do stężenia immunoglobulin monoklonalnych w surowicy. Metoda elektroforetyczna zawyżała poziom stężenia albuminy w surowicy, nawet o 67% (12 g/l), gdy poziom immunoglobuliny monoklonalnej wynosił 63 g/l. Zaproponowano hipotezę, że immunoglobuliny monoklonalne bezpośrednio zakłócają pomiar stężenia albuminy w surowicy metodą elektroforezy kapilarnej, prowadząc do systematycznego przeszacowywania stężeń albuminy proporcjonalnie do poziomu immunoglobulin monoklonalnych w surowicy.

Ząbek-Adamska i Drożdż (36) opisali przypadek pacjenta, u którego w badaniu elektroforetycznym surowicy ujawniono białko monoklonalne. Stężenie białka M wyliczone na podstawie elektroforezy wyniosło 99,3 g/l, natomiast stężenie albuminy otrzymane metodą elektroforetyczną 36,1 g/l. Wartość stężenia albuminy zmierzonego metodą kolorymetryczną (przy użyciu zieleni bromokrezolowej) wyniosło 28 g/l. Pierwsza wartość mieści się w zakresie referencyjnym [35-52 g/l.] Natomiast druga jest obniżona i może świadczyć o wyniszczeniu organizmu lub utracie albuminy przez nerki i potencjalnie zmienia klasyfikację stopnia zaawansowania choroby wg ISS. Obserwacje badaczy są zbieżne z wynikami niniejszej pracy, której wartość badawczą zwiększa duża grupa badana (50 chorych z dyskracjami plazmocytowymi). U wszystkich tych chorych stężenie albuminy mierzonej metodą

kolorymetryczną było znamienne niższe niż wykonane metodą elektroforetyczną (mediana odpowiednio: 32,0 vs 39,9 g/l). Natomiast w grupie kontrolnej (157 osób) sytuacja była odwrotna (mediana: 43,0 -metoda kolorymetryczną vs 38,2 g/l -metoda elektroforetyczną). U 13 pacjentów (26%) klasyfikacja stopnia zaawansowania choroby wg ISS jest różna w zależności od użytej metody oznaczania (ISS 1 lub ISS 2).

Niniejsza praca jednoznacznie wykazała rozbieżności oznaczeń stężeń albuminy w obu metodach i wskazuje na metodę kolorymetryczną oznaczania albuminy jako referencyjną, gdyż nieobarczoną błędem metodologicznym u pacjentów z dyskracjami plazmocytowymi.

5.2 Ilościowe oznaczanie białka monoklonalnego metodą elektroforetyczną

Pomiar stężenia białka monoklonalnego na podstawie rozdziału elektroforetycznego służy m.in. do monitorowania przebiegu choroby. U pacjentów z MGUS (stan przednowotworowy) oznaczenie ilościowe białka monoklonalnego przy użyciu SPE pomaga w określeniu ryzyka progresji do pełnoobjawowego szpiczaka plazmocytoowego. W sytuacji, gdy stężenie białka M jest > 15 g/l prawdopodobieństwo progresji do nowotworu jest większe. Pomiar białka M jest też częścią kryteriów odpowiedzi na leczenie szpiczaka plazmocytoowego zdefiniowanych przez IMWG. Podstawą do stwierdzenia reakcji na leczenie (jeśli białko M w surowicy jest >10 g/l) jest spadek stężenia o 50% (remisja częściowa -*partial remission* – PR), natomiast spadek o 90% lub więcej mówi o bardzo dobrej odpowiedzi częściowej na leczenie (*very good partial remission* – VGPR) (96). Oznaczenie ilościowe białka monoklonalnego przy użyciu SPE jest wykorzystywane zarówno u pacjentów ze szpiczakiem w trakcie terapii, jak i w okresie remisji po przeszczepieniu szpiku (16). Z tego powodu tak ważna jest dobra metodyka oszacowania stężenia białka monoklonalnego w proteinogramie oraz monitorowanie pacjenta w jednym ośrodku za pomocą tej samej metody elektroforetycznego oznaczania białka M. Zmiana metody opracowywania wyniku elektroforetycznego, podczas monitorowania pacjenta może spowodować niepoprawną ocenę stanu klinicznego pacjentów oraz błędną klasyfikację do konkretnego sposobu leczenia (97).

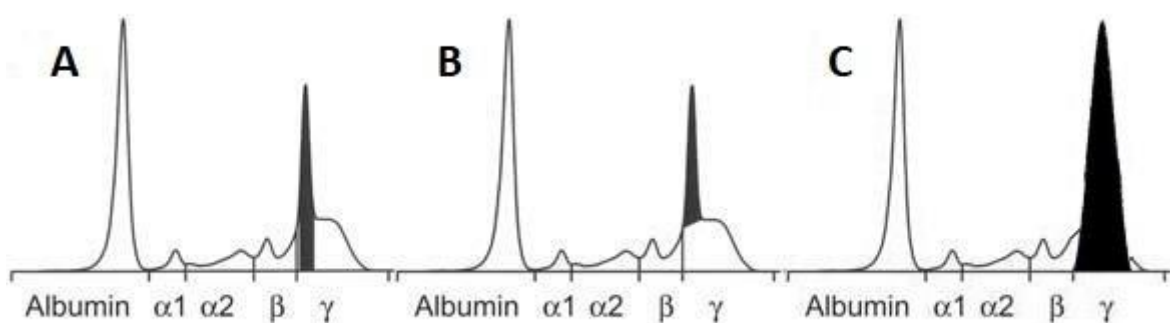
W przypadku opisywanej *pacjentki 1* białko M było usytuowane we frakcji beta, co związane było z niemożliwością oddzielenia białka monoklonalnego od innych prawidłowych białek komigrujących w tej samej frakcji takich jak transferryna czy składowa C3 dopełniacza. Stężenie białek w tej frakcji prawidłowo powinno mieścić się w przedziale: 5,2-11,5 g/l. Zatem szacowanie białka M we frakcji beta poniżej górnej granicy wartości referencyjnej tej frakcji

jest obarczone dużym błędem i nie powinno być używane do monitorowania odpowiedzi na leczenie. W przypadku opisywanej chorej szacowane stężenie białka M we frakcji beta utrzymywało się pod koniec leczenia na stałym poziomie 10 g/l co mogło odpowiadać stężeniu wszystkich również prawidłowych białek tej frakcji. Natomiast stężenie immunoglobuliny IgG intact systematycznie obniżało się do poziomu bardzo niskich stężeń (2,66 g/l). Zatem monitorowanie białka M na podstawie stężenia we frakcji beta mogło komplikować ocenę reakcji na leczenie. Postępy w leczeniu można było zauważyć obserwując stopniowe zanikanie białka M w wynikach immunofiksacji surowicy pacjentki w czasie oraz monitorując obniżanie się immunoglobuliny IgG intact mierzonej metodą immunochemiczną.

W niniejszej pracy dokonano porównania dwóch metod oznaczania stężenia białka M metodami elektroforezy na żelu agarozowym: 5 i 6- frakcyjnej. W metodzie 6-frakcyjnej zmniejszony jest wpływ białek komigrujących z białkiem M na oszacowanie jego stężenia, można uznać więc, że jest dokładniejsza i rekomendowana do monitorowaniu chorych z dyskracjami plazmocytowymi.

W klinicznym monitorowaniu pacjentów z gammopatiami monoklonalnymi, stężenie monoklonalnej immunoglobuliny (białka M) jest zwykle oznaczane densytometrycznie za pomocą elektroforezy białek surowicy. Otrzymane wyniki ilościowe są obarczone dużą (zależną od metody zmiennością). Na zmienność tą wpływa:

1. Zastosowana metoda elektroforezy - podłoża agarozowe, octan celulozy, elektroforeza kapilarna. Nawet w ramach jednego rodzaju podłoża spotykamy systemy elektroforetyczne dzielące białka na surowicy na 5 lub 6 frakcji. Różne są także procedury barwienia.
2. Sposób wyliczenia białka monoklonalnego - integrowanie wierzchołka białka M na elektroferogramie metodą opadania prostopadłego, odcięcia tła poliklonalnego metodą stycznej lub wyliczoną krzywą dzwonową. Kolejnym czynnikiem wpływającym na wynik jest sposób odejmowania tła. Na Ryc. 57 przedstawiono różne sposoby integracji krzywej densytometrycznej. Stosowane w rutynowych laboratoriach diagnostycznych systemy elektroforetyczne nie zawsze dają możliwość wyboru systemu integracji. Ze szczególnie dużym błędem spotykamy się w sytuacjach, kiedy strefa białka monoklonalnego znajduje się w obszarze beta-globulin. W takich przypadkach istnieje ryzyko znacznego zawyżenia (ok. 10g/l) stężenia białka M. Pewnym rozwiązaniem tego problemu jest zastosowanie (dostępnych w wariantach żelowych jak i elektroforezie kapilarnej) metod dzielących białka surowicy na 6 frakcji.



Ryc. 57 Systemy integracji krzywej densytometrycznej na elektroforegramie:

A -metoda rzutu prostopadłego

B – metoda stycznej z odcięciem tła poliklonalnego

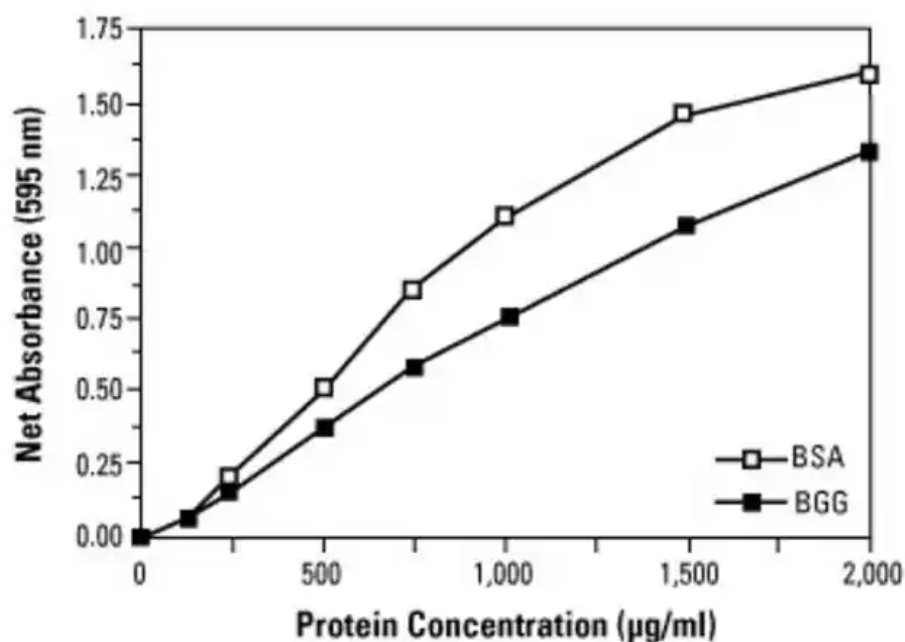
C -metoda krzywej dzwonowej

Opracowano na podstawie (27).

5.3 Czułość testów paskowych do analizy moczu dla łańcuchów lekkich immunoglobulin

Analiza moczu jest jednym z głównych przesiewowych badań diagnostycznych w laboratorium klinicznym, odgrywającym ważną rolę w diagnozowaniu i monitorowaniu wielu schorzeń. W ciągu ostatnich lat nowe zautomatyzowane technologie w analizatorach znacznie zmniejszyły pracochłonność analizy moczu i stworzyły nowe możliwości techniczne. Chociaż technologia chemii suchej dla pasków testowych do moczu poczyniła ograniczone postępy, to jednak znacznie poprawiono czułość analityczną czytników pasków testowych na przestrzeni ostatnich lat (98). Producenci testów w ulotkach odczynnikowych deklarują, że pole reakcyjne dla białka wykrywa zarówno albuminy oraz globuliny oraz mukoproteiny, przy czym reakcja barwna dla globulin oraz mukoprotein jest słabsza niż reakcja na albuminę. Przedstawione informacje są spójne z wynikami niniejszej pracy. Jednak w fachowej literaturze nie znaleziono informacji na temat minimalnych wartości stężeń białka Bence Jonesa, wykrywanego testem paskowym. Otrzymane wyniki badań pokazują, że testy paskowe różnią się czułością w zależności od typu łańcuchów lekkich. Czułość dla łańcuchów kappa jest niewiele niższa niż dla albuminy (odpowiednio 300 vs 150 mg/l). Jednak w przypadku łańcuchów lekkich lambda wyniki ujemne obserwowano jeszcze dla próbek o stężeniu FLC lambda rzędu 700 mg/l. Być może wynika to z odmiennej sekwencji aminokwasowej, a co za tym idzie innego powinowactwa łańcuchów kappa i lambda do odczynnika na polu reakcyjnym. Różne powinowactwo barwników do różnych białek jest dość szeroko opisane w piśmiennictwie naukowym. Powszechnie stosowane metody oparte o reakcje z Coomassie Brilliant Blue (metoda Bradforda) dają różną intensywność zabarwienia z różnymi białkami.

(Ryc. 58). Intensywność zabarwienia (przy tym samym stężeniu białka może się między białkami różnić nawet 10 razy (Tab. 23).



Typical standard curves for bovine serum albumin (BSA) and bovine gamma globulin (BGG) in the Pierce Coomassie Plus Protein Assay. The assay kit (Part No. 23236) includes ampules of Albumin Standard.

Ryc. 58 Różnice w intensywności barwy dla albuminy wołowej (BSA) i immunoglobuliny wołowej (BGG) - oznaczenie metodą Bradforda.

Źródło: Ulotka informacyjna Thermo Fisher Scientific ([Pierce™ Coomassie Plus \(Bradford\) Assay Kit](https://www.thermofisher.com) (thermofisher.com))

Tab. 23 Różnice w intensywności zabarwienia różnych białek przy tym samym stężeniu roztworu białka – oznaczenie absorbancji za pomocą ExPASy ProtParam .

Opracowano na podstawie: (99).

Białko	Masa [Da]	Absorbancja 1 g/l roztworu białka
BSA (albumina bydlęca)	66 435	0.65
β-laktoglobulina	18363	0,94
Lizozym	14 305	2.65
α-globina	15 054	0,79
β-globina	15 955	0,79
Rybonukleaza A	13 683	0.69
Trypsynogen	23 980	1.42
Insulina	5777	1.10
Cytochrom C	12 229	1.00
Mioglobina	16 952	0.83
Ubikwityna	8565	0,17

Według założeń producentów, oznaczenie białka w moczu za pomocą testu paskowego jest metodą przesiewową do wykrywania albuminy, a więc niższa czułość dla białek drobnocząsteczkowych nie ogranicza wartości diagnostycznej tego badania. Ponieważ metoda ma jedynie charakter półilościowy – a więc szacunkowy (42), pozytywny wynik jest wskazaniem do dalszej diagnostyki i wykonania dokładniejszych badań metodami ilościowymi. Natomiast wynik ujemny kończy diagnostykę w kierunku białkomoczu. Jednak z badań własnych dotyczących czułości testu dla FLC wynika, że takie postępowanie nie jest właściwe dla wszystkich pacjentów. W przypadku pacjentów, u których podejrzewa się gammapatię monoklonalną, klinicysta powinien być wyczulony na możliwość wyników fałszywie ujemnych. We wspomnianej grupie pacjentów ujemny wynik tego badania nie powinien kończyć diagnostyki. Wyniki niniejszej pracy wskazują na znaczne korzyści diagnostyczne, które można uzyskać kontynuując diagnostykę z użyciem testu ilościowego, a w kolejnym kroku immunofikacji białek moczu oraz/lub selektywności białkomoczu.

5.4 Rozbieżności związane z oznaczaniem wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin w surowicy

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy dotyczące problemów metodycznych związanych z oznaczaniem wolnych łańcuchów lekkich są zbieżne z wieloma doniesieniami na przestrzeni ostatnich lat (50), (100). Liczne doniesienia oraz doświadczenia własne pokazują, że techniki immunochemiczne stosowane do ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich posiadają swoje ograniczenia, jak chociażby problem nadmiaru antygeny (efekt Hooka), czy błąd efektu rozcieńczenia (101),(102),(54). W przypadku trzech opisywanych w niniejszej pracy pacjentów (*pacjenci 2,3,4*) stężenie FLC oznaczane testem Freelite® było kilkukrotnie wyższe niż stężenie całkowitych łańcuchów lekkich (TLC), a u *pacjentki 2* stężenie FLC przewyższało nawet stężenie białka całkowitego (Tab. 10). Wskazuje to na zawyżanie FLC, ponieważ wolne łańcuchy lekkie są częścią łańcuchów całkowitych (TLC). Producent testu Freelite® twierdzi, że udoskonalił metodę oznaczania i jedynym zjawiskiem interferującym obecnie w oznaczanie wolnych łańcuchów lekkich jest tendencja FLC do tworzenia polimerów. Producent uważa, iż tego typu sytuacji nie można w żaden sposób wyeliminować. Jednak jest to zjawisko występujące rzadko (103). Polimery mogą działać jako wieloantygenowe epitopy w oznaczeniach FLC skutkując fałszywie wysokimi wynikami stężeń. Nawet w takiej sytuacji, jak zostało to zademonstrowane w publikacji Draysona i wsp

(104), polimery FLC zachowują swoją przydatność kliniczną. We wspomnianej publikacji testy Freelite® wykryły spolimeryzowane łańcuchy lekkie u kilku pacjentów, u których nie wykryto białka M metodą elektroforetyczną. Na tej podstawie postawiono diagnozę szpiczaka niewydzielającego i zastosowano odpowiednie leczenie.

W opisywanym przypadku *pacjentki 5* również występują niespójności w wynikach związanych z testem Freelite®. Mamy tu najprawdopodobniej do czynienia z całkowitą cząsteczką monoklonalnej immunoglobuliny IgG lambda, bez obecności wolnych łańcuchów lekkich, co potwierdzałby wynik stężenia FLC lambda (3,06 mg/l). Natomiast zastrzeżenia musi budzić podwyższony wynik stężenia FLC kappa (348 mg/l) (Tab. 13), który jest zupełnie niespójny z wynikami uzyskanymi metodami elektroforetycznymi (Ryc. 31). W tym miejscu należy zaznaczyć, że dokonane później oznaczenia FLC testem N Latex Siemens oraz zmierzone kontrolnie wartości TLC wykazują wzajemną spójność oraz zgodność z testami elektroforetycznymi SPE i IFE (Tab. 14).

Istnieją również doniesienia dotyczące niezgodności w oznaczaniu stężeń wolnych łańcuchów lekkich FLC (oznaczanych techniką Freelite®) w moczu oraz całkowitych łańcuchów lekkich (TLC), w których zauważono, że niekiedy poziom tych pierwszych znacznie przewyższa poziom lekkich łańcuchów całkowitych (105). Stąd w wielu ośrodkach, w tym w Szpitalu Uniwersyteckim w Krakowie, wycofano się z wykorzystywania testu Freelite® do oznaczenia wolnych łańcuchów lekkich w moczu na rzecz testu TLC Siemens metodą immunonefelometryczną. Obecnie, zamiast badań moczu, Międzynarodowa Grupa Robocza ds. Szpiczaka sugeruje stosowanie FLC w surowicy obok SPE i IFE jeśli podejrzewa się szpiczaka (22). Włączenie diagnostycznego badania moczu pod kątem obecności łańcuchów lekkich immunoglobulin jest zalecane w przypadku podejrzenia AL i pacjentów ze szpiczakiem wydzielającym łańcuchy lekkie z uwagi na często niskie stężenie białka M w surowicy (106). Mimo powyższych rekomendacji, w wielu ośrodkach diagnozujących pacjentów z dyskracjami plazmocytowymi w dalszym ciągu w panelu badań rutynowo zlecanych znajduje się oznaczanie łańcuchów lekkich immunoglobulin w moczu.

Mimo dużego postępu technik diagnostycznych w ciągu ostatnich kilkunastu lat, wielu badaczy uważa, że obecne testy FLC nie są dokładne, a wyniki pomiarów nie są równoważne między różnymi metodami (107), (108). Po pierwsze dlatego, że FLC to heterogenna grupa cząsteczek białek, które mają duże zróżnicowanie ładunku i wielkości dzięki unikalnym aminokwasom, które tworzą podgrupy regionu zmiennego. Dlatego epitopy wykrywane na monoklonalnych FLC jednego pacjenta, mogą być niewykryte lub słabiej reagować z odczynnikami u innego. Wprawdzie nie można wpłynąć na zmianę tych właściwości, ale

można poprawić dostępne testy FLC dążąc przede wszystkim wyeliminowania efektu Hooka i nieliniowości metod. Ważne jest też, aby wyniki FLC w surowicy nie były interpretowane osobno, ale w kontekście klinicznym wraz z innymi istotnymi wynikami laboratoryjnymi.

Kolejnym problemem związanym z testem Freelite®, który należy wziąć pod uwagę monitorując chorych z dyskracjami plazmocytowymi jest duża zmienność „między - aparaturowa”. W początkowym okresie jedynym analizatorem używanym do oznaczania FLCs testem Freelite® był immunonefrolometr BN II (Siemens). Obecnie test Freelite® można wykonywać na ok. 10 platformach analitycznych m.in.: cobas 8000 i cobas 6000 (Roche), Image (Becman Coulter), SPA Plus i Optilite (Binding Site), Attelica Neph 630 (Siemens). Cotten i wsp. (109) badając zmienność oznaczeń FLCs na 4 różnych platformach wyznaczyli nowe zakresy referencyjne dla stosunku wolnych łańcuchów kappa do lambda (FLCr) dla poszczególnych analizatorów. Wartości te różniły się od obowiązującego obecnie, wyznaczonego w 2002 roku na platformie BN II Siemens, zakresu: 0.26–1.65 (18). Wyniki uzyskane dla cobas 6000 to 0.50–2.43, dla Image: 0.20–1.26, Optilite: 0.40–2.53 i SPA Plus 0.36–2.07. Warto przywołać tym miejscu badanie Morales-García i Pacheco-Delgado, którzy określili nowe zakresy referencyjne FLCr dla analizatora Optilite (Binding Site) na poziomie: 0.65–2.56 mg/l (110) (56). Niezwykle istotne jest więc monitorowanie pacjenta przy użyciu jednej platformy analitycznej. Oznaczanie FLCs na różnych analizatorach może generować błędne przypisanie pacjentów podczas monitorowania odpowiedzi na leczenie, w którym współczynnik FLCs jest jednym z kryteriów odpowiedzi na terapię. Prawidłowy współczynnik FLC świadczy o rygorystycznej remisji całkowitej (*stringen CR* – sCR), natomiast powyżej 25% wzrostu różnicy stężeń pomiędzy klonalnym łańcuchem w FLC a łańcuchem nieklonalnym (wartość absolutna wzrostu o minimum > 10 mg/dl) świadczy o progresji choroby (*progressive disease*-PD) (15).

Przedstawione powyżej przykłady podkreślają konieczność wykonywania całego pakietu uzupełniających się badań w przebiegu diagnozowania pacjentów z dyskracjami plazmocytowymi: (SPE, IFE, TLC, intact Ig), nie tylko oznaczenia FLC oraz konieczność monitorowania pacjenta przy pomocy jednej platformy analitycznej.

5.5 Przemijające i wtórne gammopatie monoklonalne

Przykłady przemijającej obecności białka monoklonalnego u pacjentów z różnego rodzaju zakażeniami można spotkać w literaturze. De Rooij i wsp. (111), opisują przypadek 62-letniej pacjentki z ostrą infekcją CMV, u której stwierdzono obecność białka monoklonalnego w

rozdziale elektroforetycznym. Potwierdzono zależność występowania ostrego zakażenia cytomegalowirusem i przejściowej gammapatii monoklonalnej. Po 2 miesiącach u pacjentki ustąpiły objawy infekcji, a białko monoklonalne nie było już oznaczalne. Powyższy opis jest zbieżny z przypadkiem *pacjentki 6* z niniejszej pracy. Po otrzymaniu wyniku elektroforegramu ujawniającego białko M nie wdrożono inwazyjnej diagnostyki hematologicznej takiej jak biopsja szpiku, ale wykonano najpierw testy w kierunku wirusów mogących powodować uszkodzenie wątroby i otrzymano wynik dodatni przeciwciał anti-CMV zarówno w klasie IgG jak i IgM, co wskazywało na toczące się zakażenie wirusem cytomegalii. Po okresie kilku tygodni w rozdziale elektroforetycznym nie stwierdzono już obecności białka monoklonalnego zarówno w proteinogramie jak i w immunofiksacji (Ryc. 33).

Przemijająca gammapatia monoklonalna może również wystąpić podczas zakażeń grzybiczych. W badaniu Conant i wsp. (112) w rozdziale elektroforetycznym w surowicy krwi 41-letniej pacjentki przyjętej do szpitala z powodu zakażenia krwi drożdżakami z rodzaju *Candida albicans* stwierdzono obecność białka monoklonalnego. Po przeprowadzonym leczeniu flukonazolem, po 6 miesiącach od postawienia diagnozy nie stwierdzono obecności białka monoklonalnego w proteinogramie.

Gammapatia monoklonalna może zostać również indukowana przez infekcje bakteryjne. Obserwacje przeprowadzone w 2006 roku przez Stoimenis i wsp. wykazały korelację pomiędzy wystąpieniem przejściowej obecności monoklonalnego białka typu IgG lambda w surowicy, a zakażeniem *Staphylococcus aureus* u 68-letniego chorego (62).

Znaczenie kliniczne i dokładna patogeneza przejściowej monoklonalności są słabo poznane i wciąż wymagają wyjaśnienia. Kilka prac wykazało, że osteoblasty zakażone *Staphylococcus aureus* w zapaleniu kości i szpiku indukują wydzielanie cytokin zapalnych IL-6 i IL-12, które mogą stymulować nadmierną proliferację immunoglobulin monoklonalnych powodując rozwój MGUS (113). Po uszkodzeniu wątroby (np. przez wirusy, alkohol, toksyny), niektóre białka uwolnione z hepatocytów bardzo silnie stymulują układ immunologiczny. W obszarze gamma w proteinogramie obserwujemy wtedy hipergammaglobulinemię poliklonalną a czasem, choć rzadziej, występowanie jednego lub kilku wyodrębnionych prążków białkowych. Prążki te - zwykle klasy IgM - są wynikiem klonalnej odpowiedzi układu odpornościowego na uwolnione z hepatocytów białka rozpoznawane jako obce antygeny (54).

Biorąc pod uwagę przedstawione wyżej przykłady klinicyści powinni rozważyć prawdopodobieństwo przemijającej paraproteinemii u chorych z przewlekłymi infekcjami przed wdrożeniem inwazyjnej, drogiej i często uciążliwej dla pacjenta diagnostyki hematologicznej.

Gammapatie monoklonalne zdarzają się niezwykle rzadko u dzieci. W opisywanym w niniejszej pracy przypadku 3-letniej dziewczynki, gammapatia monoklonalna wystąpiła w rezultacie allogenicznego przeszczepienia szpiku kostnego zastosowanym w leczeniu mukopolisachrydozy typu I. Jest to spichrzeniowa choroba genetyczna spowodowana brakiem aktywności enzymu lizosomalnego α -liduronidazy. Skutkiem tego deficytu jest postępująca akumulacja glikozoaminoglikanów: siarczanu heparanu i siarczanu dermatanu w lizosomach powodująca nieprawidłowe funkcjonowanie komórek, tkanek i narządów (114). Strategia terapeutyczna polega na dostarczeniu enzymu bezpośrednio w formie enzymatycznej terapii zastępczej lub w sposób pośredni poprzez przeszczepienie krwiotwórczych komórek macierzystych lub szpiku kostnego. Ta ostatnia metoda opiera się na zastąpieniu makrofagów chorego z deficytem aktywności α -liduronidazy przez pulę komórek pochodzących ze szpiku zdrowego dawcy z prawidłową aktywnością enzymu (115).

Klinicyści powinni mieć świadomość, że zdarzają się gammapatie związane z przeszczepieniem narządów lub komórek krwiotwórczych lub gammapatie w przebiegu wrodzonych i nabytych zespołów niedoboru odporności, w chorobach limfoproliferacyjnych, a także ataksji teleangiektazji (116). Dlatego w przypadku obecności białka M u pacjentów pediatrycznych, zawsze w pierwszej kolejności należy brać pod uwagę przytoczone wyżej przyczyny/schorzenia. Szpiczak mnogi występuje niezwykle rzadko u dzieci i stanowi mniej niż 1% wszystkich pacjentów ze szpiczakiem (117), (118).

Badania przeprowadzone w 2010 roku przez Sucak i wsp. (63) wykazały, pojawienie się dodatkowego prążka białka monoklonalnego u 26 % dorosłych pacjentów ze szpiczakiem plazmacytowym po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych. W badaniu tym stwierdzono, że występowanie postransplantacyjnych dodatkowych prążków białka monoklonalnego nie wiąże się z żadnymi niekorzystnymi długoterminowymi konsekwencjami i nie wymaga modyfikacji leczenia.

Istnieją także doniesienia, że wtórna MGUS jest często związana z wysokim wskaźnikiem odpowiedzi i lepszym przeżyciem u pacjentów z dyskracją komórek plazmatycznych (65). Opisywany *pacjent 7* po przeszczepie tandemowym oraz pojawieniu się wtórnej MGUS w rezultacie uzyskał remisję całkowitą. Badacze tłumaczą fenomen wtórnej MGUS przejściową utratą funkcji regulatorowych limfocytów T krótko po przeszczepie oraz nadmierną proliferacją limfocytów B, co skutkuje nadprodukcją najczęściej jednego klonu immunoglobulin. Maisnar i wsp uważają, że pojawienie się dodatkowych prążków paraprotein w rozdziale elektroforetycznym jest prawdopodobnie związane z odzyskiwaniem upośledzonej produkcji immunoglobulin po przeszczepie (119). W opisywanych przypadkach *pacjenta 7*

chorego na szpiczaka plazmocytozowego informacja o dodatkowym prążku białka monoklonalnego w proteinogramie surowicy była bardzo istotna, gdyż redukcja stężenia białka monoklonalnego jest jednym z głównych wytycznych oceny odpowiedzi na leczenie szpiczaka. Pojawienie się nowego białka monoklonalnego mogła powodować niepewność w ocenie odpowiedzi na zastosowaną terapię oraz prowadzić do niepotrzebnych modyfikacji leczenia. W celu uniknięcia takich sytuacji wskazana jest ścisła współpraca i przepływ informacji pomiędzy klinicystą i diagnostą laboratoryjnym mającym specjalistyczną wiedzę i doświadczenie z zakresu wykonywania i interpretacji elektroforegramów. Dobrą praktyką byłoby umieszczanie na skierowaniu informacji w formie komentarza do zlecenia o fakcie oraz dacie przeszczepienia komórek krwiotwórczych u chorego, wówczas diagnosta mógłby porównać poprzednie wyniki elektroforetyczne surowicy pacjenta i odpowiednio skomentować wynik. Ułatwiłoby to interpretację badań przez klinicystę i przyspieszyło ewentualne decyzje w postępowaniu terapeutycznym.

5.6 Gammopatie monoklonalne u pacjentów z zaburzeniami neurologicznymi

W diagnostyce różnicowej pacjenta z nietypowymi objawami neurologicznymi zawsze należy brać pod uwagę możliwość dyskrazji plazmocytozowych. Także w tych przypadkach wykonanie badania płynu mózgowo-rdzeniowego w kierunku wewnątrzpłynowej syntezy globulin może wnieść wiele cennych informacji o stanie chorego. Wprawdzie badanie to jest integralną częścią diagnostyki chorych na SM od czasu włączenia oceny PMR do kryteriów diagnostycznych McDonald (120) i przy takim podejrzeniu jest najczęściej zlecane, jednak w przypadku chorych z dyskrazjami plazmocytozowymi może pozwolić na wcześniejsze zdiagnozowanie MGUS lub szpiczaka tłącego i objęcie pacjenta opieką hematologiczną.

W niniejszej pracy przeanalizowano 1142 wyników elektroforegramów wykonanych techniką ogniskowania izoelektrycznego. Prążki monoklonalne w PMR i surowicy wykazano u 11 osób (0,96 %), które skierowano do poradni hematologicznej. U wszystkich stwierdzono MGUS i poddano dalszej obserwacji –zalecono, aby zgłaszać się regularnie do hematologa w celu monitorowania poziomu stężenia białka monoklonalnego w surowicy co 6 miesięcy. U wszystkich 11 pacjentów wykrycie prążków monoklonalnych w PMR i surowicy było przypadkowe, jednak przyniosło dużą korzyść chorym, którzy mają szansę na wcześniejsze uchwycenie ewentualnej progresji MGUS do szpiczaka plazmocytozowego, otrzymanie odpowiedniego leczenia, a co za tym idzie lepsze rokowanie i dłuższe przeżycie. Jinghong L i

wsp. opisali przypadek pacjenta u którego zdiagnozowano szpiczaka plazmocytoowego niejako „przy okazji” wykonania badania ogniskowania izoelektrycznego przy podejrzeniu stanu zapalnego w OUN (121). U chorego wykryto mózgową postać zakażenia tasiemcem bąblowcowym (*Echinococcus granulosus*), jednak prążki monoklonalne w PMR i surowicy poprowadziły do dalszej diagnostyki w kierunku szpiczaka i potwierdziły rozpoznanie, co pozwoliło na wdrożenie leczenia przeciwnowotworowego w niedługim czasie po wyleczeniu zakażenia pasożytem. Autorzy zaproponowali, aby w przyszłości ogniskowanie izoelektryczne było badaniem pomocniczym w diagnostyce dyskrazji plazmocytoowych.

W piśmiennictwie znaleźć można użycie terminu „prążki oligoklonalne” (*oligoklonal bands*) do opisu białka monoklonalnego pojawiającego się w elektroforegramie po przeszczepieniu komórek macierzystych i różniącego się od pierwotnie zidentyfikowanego przy rozpoznaniu szpiczaka plazmocytoowego (122), (123). W niniejszej pracy i w innych publikacjach (64), (65) takie białko monoklonalne zostało opisane jako wtórne białko M, a gammapatia monoklonalna (jako stan wynikający z pojawienia się owego białka) wtórną MGUS (*secondary MGUS*) (1.6 *Zjawisko przemijających i wtórnych gammapati monoklonalnych*). Natomiast termin „prążki oligoklonalne” użyte w pracy to prążki, które są wynikiem nadmiernego wytwarzania przez dojrzałe limfocyty B oraz plazmocyty przeciwciał w klasie G przeciwko białkom: mieliny oraz oligodendrocytów miejscowo w OUN.

Inną ważną kwestią, którą trzeba poruszyć jest skierowanie (zlecenie) na badanie płynu mózgowego w kierunku wewnątrzpłynowej syntezy globulin. Optymalnym postępowaniem lekarza jest przekazanie na skierowaniu możliwie jak najwięcej informacji dotyczących chorego ze względu na cenny i trudno dostępny materiał biologiczny jakim jest płyn mózgowo-rdzeniowy oraz z uwagi na pracochłonność i złożoność metody ogniskowania izoelektrycznego. Poniżej przedstawiono wzór skierowania zawierającego wszelkie potrzebne informacje (Ryc. 59).

Zlecenie wykonania badań laboratoryjnych
w Zakładzie Diagnostyki SU (ul. Jakubowskiego 2, budynek C, poziom 2)

GRAKOWSKI SZPITAL SPECJALISTYCZNY
ul. JANA PAWŁA II
81-200 KRAKÓW, ul. Prądnicka 80, tel. 12 614 20 00
ODDZIAŁ NEUROLOGICZNY Z PRACOWNIĄ UDAROWY
12 POKOJEM REHABILITACJI NEUROLOGICZNEJ
tel. 12 614 27 80, fax 12 614 27 29
000000005598/177
REGON 000299073, ident. 061100010

PA C J E N T X

Nazwisko: _____ Imię: _____ Płeć: ☒ M ☐ K

Pesel: _____ Data urodzenia: _____

Adres: _____

☒ Elektroforeza płynu mózgowo-rdzeniowego w kierunku prążków oligoklonalnych

Inne badania: **PMR i surowica**

Uwagi:

- pacjent z diagnozą RZS
- leczenie biologiczne
- odosłaniem
- porównanie z poprzednim
- demielinizacja OUN

MOD MATERIAŁU: _____

MOD ODZIAŁU: _____

Rodzaj materiału: D płu M-R D KREU

Leżący kierujący: dr n. med. specjalista neurolog

czytelny podpis osoby odpowiedzialnej: specjalista planowania i diagnostyki

Ryc. 59 Wzór skierowania na badanie PMR i surowicy w kierunku wewnątrzpłynowej syntezy globulin. Czerwoną i niebieską ramką zaznaczono ważne informacje, które powinny znaleźć się na skierowaniu.

Z doświadczenia praktycznego wynika, że tak szczegółowo wypełnione skierowanie na badania jest rzadkością. Obecnie nie ma w tej kwestii formalnych wymogów, jednak jest to rekomendowane, ułatwia pracę diagnostce wykonującemu oznaczenie, skraca czas badania i informację zwrotną dla klinicysty, a tym samym przyspiesza postawienie diagnozy i wdrożenie leczenia pacjenta. W niniejszej pracy niejednokrotnie już sygnalizowano potrzebę intensyfikacji komunikacji pomiędzy lekarzami i diagnostami w celu optymalizacji procesu diagnostyki chorych, a starannie wypełnione skierowanie zawierające istotne informacje jest zdecydowanie elementem tego procesu.

5.7 Krioglobuliny

W przypadku krioglobulinemii niezwykle istotna jest prawidłowa interpretacja wyników rozdzielów elektroforetycznych białek. Szczególnie w przypadku krioglobulinemii mieszanych, w których elektroforeza białek może mylnie sugerować monoklonalny charakter choroby. Klinicyści winni skorelować objawy kliniczne z wynikami elektroforegramów i wybranych badań immunochemicznych. Wymaga to jednak dobrych reguł współpracy między lekarzami a wyspecjalizowanym zespołem diagnostów laboratoryjnych, którzy potrafią

nie tylko postępować z trudnym materiałem diagnostycznym w przypadku krioglobulinemii, ale także odpowiednio opisać wynik badania sugerujący to zjawisko.

Dobłą praktyką byłoby zamieszczanie przez lekarza na zleceniu badań do laboratorium informacji o zdiagnozowanej wcześniej krioglobulinemii. W opisywanym przypadku *pacjentki 11* chora miała zdiagnozowaną wcześniej krioglobulinemię, ale ta informacja trafiła do diagnosty wykonującego badania dopiero po kilku dniach, podczas rozmowy telefonicznej z lekarzem prowadzącym. Wcześniejsza informacja (najdogodniej w momencie zlecenia badań i otrzymania surowicy) skróciłaby czas procesu diagnostycznego i otrzymania wyniku przez klinicystę. Brak tego typu informacji prowadzi do wydłużenia czasu oczekiwania na wynik z powodu dodatkowych badań (test inkubacji krioglobulin, powtarzanie oznaczeń), skutkuje opóźnioną diagnozą i wdrożeniem odpowiedniego postępowania terapeutycznego.

Krioglobuliny mogą nie zostać wykryte w badaniu elektroforetycznym, jeśli precypitują podczas wirowania. Ich obecność we krwi pełnej prowadzi może do zawyżenia liczby erytrocytów lub płytek krwi w oznaczeniu przez analizatory hematologiczne (72). Tego typu interferencje były opisywane np. przez Larsen i wsp (37).

Fałszywie podwyższona liczba płytek krwi – pseudotrombocytoza nie zdarza się często, ale jest dużym wyzwaniem diagnostycznym. Może wystąpić, gdy w próbce krwi obecne są fragmenty komórek jądrzastych, erytrocytów, mikroorganizmy, kropelki lipidów lub agregaty białek. Istnieją doniesienia o fałszywie wysokiej liczbie płytek krwi u pacjentów z krioglobulinemią. Zawyżona liczba płytek może stanowić problem diagnostyczny u pacjentów podejrzewanych o rozpoznanie makroglobulinemii Waldenströma i może być nawet podstawą błędnej stratyfikacji chorych wg Międzynarodowego Indeksu Prognostycznego – IPSSWM (15). U *pacjenta 12* metodą użytą pierwotnie na aparacie Sysmex XN-1000 była analiza impedancyjna, w której zliczanie trombocytów odbywa się ze względu na wielkość komórek. Metoda ta ma swoje ograniczenia związane z niezdolnością analizatora do odróżnienia płytek krwi od innych cząstek, które pokrywają się z zakresem wielkości trombocytów. Rozwiązaniem problemu jest oznaczenie płytek przy pomocy fluorescencyjnej cytometrii przepływowej, w której zawartość komórek jest dodatkowo barwiona. Zastosowanie specyficznego dla płytek barwnika, nie tylko zwiększa czułość metody, ale także niweluje niespecyficzne zliczanie innych cząstek o wielkości zbliżonej do trombocytów. Przypuszczalnie krioglobuliny w próbce krwi pacjenta *in vitro* mogły wpłynąć na fragmentację komórek (erytrocyty, leukocyty), co uwidoczniło w rozmazie krwi, a powstałe fragmentocyty były zaliczane w kanale impedancyjnym jako trombocyty. Innym wytłumaczeniem tego zjawiska proponowanym przez badaczy (37), (124) jest zliczanie przez analizator agregatów

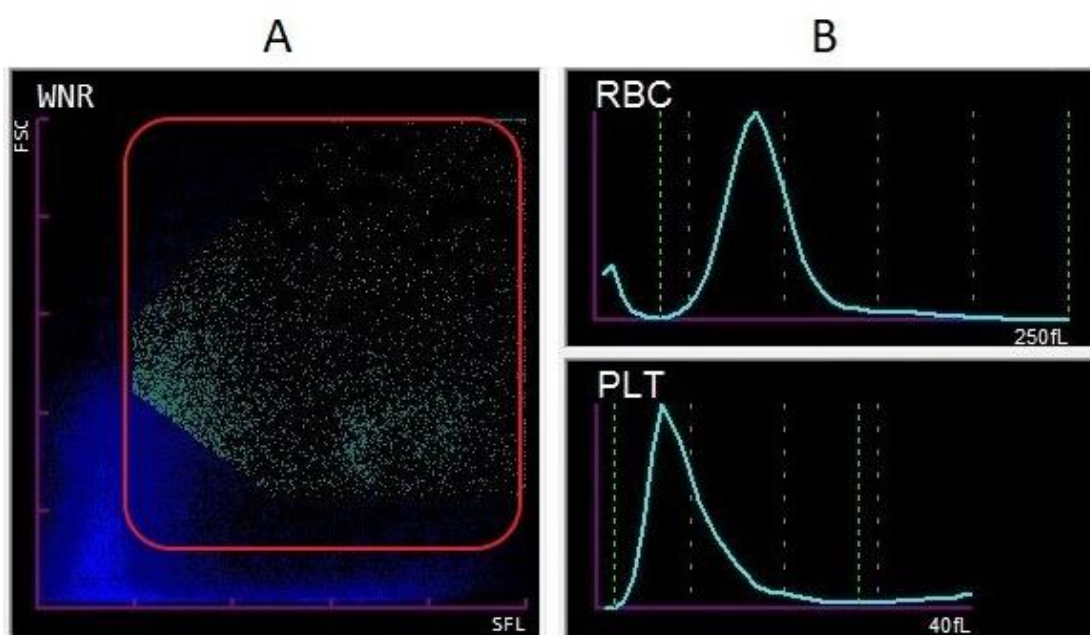
białkowych (złożonych z monoklonalnych immunoglobulin IgM), które mogły uzyskać wielkość mieszczącą się w zakresach rozmiarów płytek krwi.

Zjawisko pseudotrombocytozy towarzyszącej występowaniu immunoglobulin monoklonalnych o charakterze krioglobulin nie zostało dotychczas jednoznacznie wyjaśnione i z pewnością wymaga dalszych badań. Należy jednak pamiętać, aby w przypadku uzyskania wyniku wysokiej trombocytozy u pacjenta z makroglobulinemią Waldenstroma lub szpiczakiem plazmocytowym IgM zawsze weryfikować wynik inną metodą niż impedancyjna. Można wykonać rozmaz krwi lub dokonać pomiaru metodą fluorescencyjnej cytometrii przepływowej dostępną w wielu nowoczesnych analizatorach hematologicznych. Warto pamiętać również o ogrzaniu próbki krwi do 37 °C przed wykonaniem analizy.

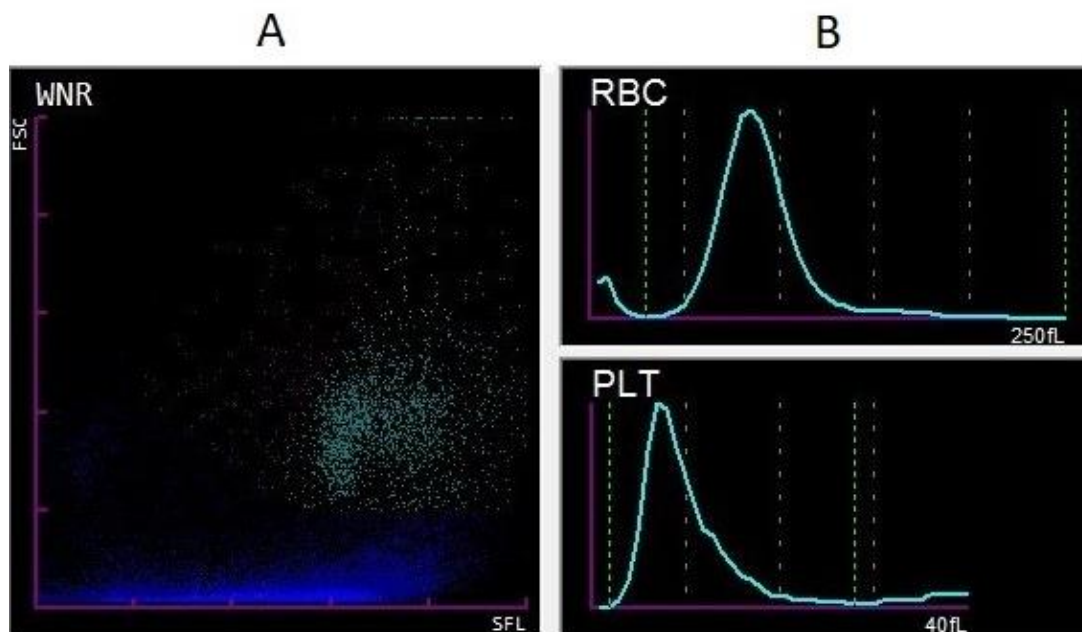
Wysokie stężenie monoklonalnych immunoglobulin IgM może być przyczyną występowania zespołu nadlepkości krwi (HVS). Immunoglobuliny mogą wówczas zaburzać pracę analizatorów hematologicznych prawdopodobnie na zasadzie interferencji w zliczaniu komórek w poszczególnych obszarach wykrywania. Taka sytuacja wystąpiła w przypadku *pacjenta 13*. HVS stwierdzono u niego na podstawie wysokiego stężenia IgM (47 g/l) w przebiegu MW, nietypowego wyniku immunofiksacji (na wysokości immunoglobuliny monoklonalnej zauważono obecność prążków we wszystkich ścieżkach rozdziału surowicy) oraz objawów neurologicznych (prawdopodobny wpływ wysokiego stężenia monoklonalnych immunoglobulin IgM na stopniowe pogarszanie funkcji poznawczych). W wyniku morfologii krwi uwagę zwracała znaczna niepewność pomiarowa, zasygnalizowana przez aparat hematologiczny, dotycząca oznaczeń leukocytów (WBC) oraz płytek krwi (PLT) (Ryc. 48). Zgodnie z rekomendacją producenta (Sysmex) wykonano ponowne oznaczenie po wymianie osocza na dedykowany firmowy diluent (Cellpack, Sysmex). Po eliminacji białka monoklonalnego obecnego w osoczu uzyskano wynik liczby leukocytów: 2,37 tys./ μ l. U pacjenta zaobserwowano leukopenię, a liczba płytek krwi znacząco się zmniejszyła (331 tys./ μ l vs 222 tys./ μ l) (Ryc. 49). Analizując skatergram dla pierwszego pomiaru można zauważyć znaczną ilość cząstek zakłócających pomiar leukocytów widocznych wyraźnie w polu zaznaczonym czerwoną ramką (Ryc. 60A). W drugim pomiarze po wymiennie osocza skatergram nadal ma pewne cechy wskazujące na nieprawidłowości – poszczególne punkty nie są na nim zgrupowane w „chmury” lecz są rozproszone (Ryc. 61A), jednak wartość zliczania leukocytów została raportowana z uwagi na widoczne wyraźne zmniejszenie ilości interferencji. Wynik PLT w drugim pomiarze wciąż cechował się znaczną niepewnością pomiarową (gwizdka przy wartości, Ryc. 49).

Trudno jest definitywnie rozstrzygnąć, dlaczego wynik zmniejszył się o jedną trzecią po wymianie osocza. Nie można jednoznacznie określić czy ta zmiana jest wynikiem interferencji, czy też manualnej ingerencji w próbkę. Jest możliwe, że część płytek nie opadła tak szybko jak pozostałe komórki i została usunięta. Analizując wyniki w obu pomiarach praktycznie nie ma różnic we wskaźnikach PLT, jedynie pojawia się oczekiwany spadek PCT w wyniku spadku PLT (Ryc. 49).

Ponadto histogram PLT w obu pomiarach wyglądał poprawnie (Ryc. 60B, Ryc. 61B). Jednak analizator podał komunikat „PLT Clumps?” (agregaty płytkowe), co wskazywało na obecność dużej liczby cząstek zakłócających w obszarach wykrywania agregatów PLT (prawdopodobnie agregatów białkowych złożonych z monoklonalnych immunoglobulin IgM). Cząstki te miały mały rozmiar, prawdopodobnie generowały sygnał klasyfikowany przez odpowiedni algorytm analizatora jako sygnał od trombocytów. To wskazuje, że prawdopodobnie liczba PLT mogła być przeszacowana w pierwszym pomiarze. W drugim pomiarze PLT zostały dodatkowo zmierzone w kanale *PLT-F*, w którym do pomiaru stosuje się marker fluorescencyjny znakujący jedynie trombocyty, co minimalizuje interferencje i zapewnia dokładne i precyzyjne oznaczenie płytek krwi.



Ryc. 60 Skatergram WBC (A) i histogram RBC i PLT (B) w wyniku morfologii krwi *pacjenta 13* z makroglobulinemią Waldenströma Na skatergramie widoczna jest znaczna ilość cząstek zakłócających pomiar leukocytów w polu zaznaczonym czerwoną ramką. Interferencje spowodowane są wysoką lepkością osocza pochodzącą od monoklonalnych immunoglobulin klasy IgM o dużym stężeniu. Histogramy RBC i PLT wyglądają prawidłowo.



Ryc. 61 Skatergram WBC (A) histogram RBC i PLT (B) w wyniku morfologii krwi *pacjenta 13* z makroglobulinemią Waldenströma po wymianie osocza w celu eliminacji interferencji w zliczaniu leukocytów. Skatergram nadal ma pewne cechy wskazujące na nieprawidłowości – poszczególne punkty nie są na nim zgrupowane w „chmury” lecz są rozproszone, jednak widać wyraźne zmniejszenie interferujących cząstek - monoklonalnych immunoglobulin. Histogramy RBC i PLT wyglądają prawidłowo.

Diagnostyka laboratoryjna chorych z zespołem HVS stanowi duże wyzwanie, tym bardziej, że w dostępnych piśmiennictwie nie ma wielu artykułów poświęconych temu zagadnieniu. Autorzy publikacji skupiają się raczej na klinicznych implikacjach zespołu nadlepkości (68), (74), (125) niż na technicznych aspektach opracowywania wyników laboratoryjnych. Z tego powodu diagnostyka chorych z HSV wymaga od diagnosty laboratoryjnego doświadczenia w postępowaniu z trudnym materiałem diagnostycznym oraz interpretacji wyników badań. W oznaczaniu morfologii krwi wymiana osocza wg. procedury opisanej w niniejszej pracy może być jedynym sposobem uzyskania niezbędnego wyniku badania u chorego z HVS. Niezwykle pomocne są też nowoczesne analizatory hematologiczne z zaawansowanymi technikami analitycznymi takich jak fluorescencyjna cytometria przepływowa, pozwalającymi na eliminację ewentualnych interferencji w badanym materiale.

5.8 Daratumumab – interferencje w badaniach elektroforetycznych

W ostatnich dwudziestu latach pojawiło się wiele nowych leków takich jak inhibitory proteasomu czy leki immunomodulujące, które przyczyniły się istotnie do pogłębienia i wydłużenia odpowiedzi na kolejne linie leczenia, rewolucjonizując paradygmat choroby. Jednak szpiczak plazmocytowy nadal uznawany jest za chorobę nieuleczalną, co wynika

z obecności opornych klonów nowotworowych komórek plazmatycznych wywołujących nawroty choroby. Prawdziwą rewolucją w terapii szpiczaka plazmocytoowego okazało się wprowadzenie leku o nazwie daratumumab (*Dara*), który biochemicznie jest przeciwciałem monoklonalnym anty-CD38. Badacze szczególnie podkreślają wysoką skuteczność *Dara* zarówno w monoterapii jak i w terapii skojarzonej. Na uwagę zasługują też dobra tolerancja i profil bezpieczeństwa leku (76).

Jednak w przypadku podawania *Dara* istnieje możliwość pojawienia się dodatkowego prążka w rozdziale elektroforetycznym pochodzącego od humanizowanych przeciwciał monoklonalnych IgG κ . *Dara* może migrować w żelu agarozowym jednocześnie z monoklonalnym endogennym białkiem chorego, utrudniając prawidłową ocenę ilościową białka M, a tym samym ocenę odpowiedzi klinicznej na leczenie. W tym kontekście niezmiernie ważne jest odróżnienie endogennego białka wytwarzanego przez klon nowotworowych plazmocytoów od immunoglobuliny *Dara* w elektorforegramie.

Można dokonać tego używając do diagnostyki metody spektrometrii masowej np. MALDI-TOF MS (*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*- laserowej jonizacji próbki wspomaganej matrycą z detektorem czasu przelotu) (126), (127), jednak jest to metoda wysoko specjalistyczna, droga i niedostępna dla większości ośrodków monitorujących pacjentów z dyskracją plazmocytoową.

Inna metoda polega na wykorzystaniu w badaniu immunofiksacji surowicy dodatkowego przeciwciała skierowanego przeciwko regionowi zmiennemu *Dara*. Wiązanie tego przeciwciała z daratumumabem zmienia mobilność *Dara* w rozdziale elektroforetycznym przesuwając go na obrzeże rozdziału umożliwiając odróżnienie go od endogennego białka monoklonalnego (79), (41). Opisana metoda nie rozwiązuje jednak kompleksowo problemu interferencji *Dara* ponieważ ma zastosowanie jedynie na niektórych analizatorach np. firmy Sebia Hydrasis 2 tzw. test DIRA (*daratumumab specific IFE reflex assay*) (128), natomiast inne popularne platformy jak Intrelab nie mają wdrożonych tego rodzaju testów.

Kolejnym problemem jest często brak dostępu diagnostów laboratoryjnych do historii choroby pacjenta. Bardzo ważna w przebiegu diagnostyki chorych jest informacja o stosowanych lekach chociażby w formie komentarza do zlecenia, a w przypadku *Dara* jest to informacja niezbędna dla specjalisty laboratoryjnego do wydania wiarygodnego wyniku badania stanowiącego dla klinicysty podstawę do dalszych decyzji terapeutycznych. W obu opisanych przypadkach chorych poddanych terapii daratumumabem diagnosta wykonujący badania elektroforetyczne surowicy nie otrzymał żadnej informacji (czy to pisemnej, na skierowaniu, czy też telefonicznej o podawanym leku od lekarza prowadzącego). Opracowując

wyniki diagnosta musiał kierować się intuicją i doświadczeniem, opatrując wynik komentarzem o prawdopodobnej interferencji leku. Optymalną sytuacją byłoby opracowanie procedur, według których lekarz zlecający badanie zamieszczałby odpowiedni komentarz o stosowanej terapii, tym bardziej, że w ostatnich latach obserwujemy istotny postęp w leczeniu szpiczaka plazmocytoowego, rejestrowane są kolejne cząsteczki - przeciwciała monoklonalne dostępne w terapii, które również mogą ingerować w badania laboratoryjne. Część badaczy uważa, że do czasu opracowania praktycznych i szeroko dostępnych testów laboratoryjnych omijających interferencje spowodowane terapeutycznymi przeciwciałami monoklonalnymi przydatnym badaniem może okazać się test oznaczania wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin (FLCs) jako odpowiedni do monitorowania choroby resztkowej u pacjentów poddawanych immunoterapii (41). Test ten mierzy tylko łańcuchy lekkie niezwiązane z cząsteczką immunoglobuliny, więc obecność podanej cząsteczki monoklonalnej IgG kappa nie powinna wpływać na oznaczenie wolnych łańcuchów lekkich. Rosenberg i wsp (129) wykazali brak interferencji ze strony *Dara* w oznaczanie stężenia wolnych łańcuchów lekkich. W opisywanym w niniejszej pracy przypadku *pacjenta 14* mimo pojawienia się w proteinogramie dodatkowego białka IgG kappa, stężenie FLC kappa pozostało na niskim poziomie: 20,60 mg/l [3,30-19,40]. U *pacjentki 15* lek również nie wpłynął na stężenia wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin: FLC kappa 2,07 mg/l [3,30 - 19,40], FLC lambda: 2.46 mg/l [5,71 - 26,30], FLCkappa / FLClambda 0.8415 [0,26 - 1,65].

Konieczne są jednak dalsze badania w celu potwierdzenia przydatności powyższego testu do monitorowania choroby resztkowej u pacjentów leczonych *Dara*.

Należy także zwrócić uwagę, że monoklonalne przeciwciała terapeutyczne są coraz częściej stosowane w całym spektrum chorób. W elektroforezie oraz immunofiksacji mogą być raportowane jako białko monoklonalne. Brak komunikacji między lekarzem a laboratorium przyczynia się w takich sytuacjach do zaburzenia procesu diagnostycznego i dodatkowych kosztów.

5.9 Nieprawidłowości w przesiewowych testach krzepnięcia u pacjentów ze szpiczakiem plazmocytoowym

Badanie układu krzepnięcia jest niezwykle istotną częścią diagnostyki chorych z dyskracjami plazmocytoowymi. Pacjenci z przedłużonymi czasami PT i APTT mają znacząco skróconą medianę całkowitego czasu przeżycia (*overall survival* - OS) oraz czasu wolnego od

progresji (*progression – free survival* - PFS) (130). Oznaczanie parametrów hemostazy jest też niezbędne do przeprowadzenia badań inwazyjnych.

W przypadku pacjenta 16 na uwagę zasługiwały przedłużone, a właściwie nieoznaczalne czasy: protrombinowy (PT), częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT) oraz stężenie fibrynogenu poniżej 0,4 g/l. Uzyskanie prawidłowych wyników jest niezbędne do przeprowadzenia zabiegu trepanobiopsji szpiku. Należy dodać, iż pacjent nie przyjmował leków antykoagulacyjnych oraz nie prezentował objawów skazy krwotocznej oprócz wspomnianych okresowych krwawień z nosa ustępujących samoistnie. Wyniki były niespójne z obrazem klinicznym chorego, zlecono zatem kontrolę badań układu krzepnięcia. Wyniki powtórzyły się. W związku z podejrzeniem interferencji monoklonalnych immunoglobulin w przebieg testów krzepnięcia, wdrożono postępowanie mające na celu eliminację interferencji. Przeprowadzono pomiary rozcieńczając osocze 0,9 % solą fizjologiczną („rozcieńczając” w ten sposób również interferujące paraproteiny, ograniczając ich wpływ). Zastosowano metodę optomechaniczną dedykowaną dla próbek osocza o zwiększonej lepkości oraz zawierających duże stężenia paraprotein. Fibrynogen oznaczono metodą turbidymetryczną, w której używane są przeciwciała monoklonalne przeciwko cząsteczce fibrynogenu. Analizator mierzy rozproszenie światła na kompleksach immunologicznych. Jest to metoda bardziej „odporna” na zakłócenia pomiarów fibrynogenu niż rutynowo używana metoda Claussa.

Wyniki zmienione przez niewykryte zakłócenia w testach laboratoryjnych stanowią potencjalne zagrożenie. Wprowadzają w błąd klinicystę, a pacjent jest narażony na ryzyko niekorzystnej diagnozy i leczenia. Taka sytuacja miała miejsce w przypadku opisywanym przez Margetić i wsp. (90). U starszego pacjenta przyjętego na szpitalny oddział ratunkowy otrzymano wyniki nieoznaczalnego czasu PT, przedłużonego czasu trombinowego - TT i stężenia fibrynogenu poniżej zakresu liniowości, oraz wynik czasu APTT mieszczący się w zakresie referencyjnym. Mimo braku krwawień w wywiadzie i obrazie klinicznym pacjent otrzymał wlew z witaminy K, co później okazało się zupełnie niepotrzebnym, a nawet potencjalnie szkodliwym działaniem. Po podaniu dawki witaminy K czas PT nie uległ korekcji, nadal był nieoznaczalny. W trakcie dalszej diagnostyki u chorego wykryto we krwi obecność monoklonalnych immunoglobulin IgG lambda. Oznaczono aktywności czynników krzepnięcia, które mieściły się w zakresach referencyjnych. Wprowadzono również działania prowadzące do eliminacji z osocza paraprotein i w rezultacie uzyskano skrócenie czasów krzepnięcia oraz uzyskanie prawidłowego stężenia fibrynogenu. Uznano, że czynnikiem interferującym w testy

koagulologiczne były monoklonalne immunoglobuliny mogące zaburzać polimeryzację fibryny.

Do podobnych wniosków doszła Iwaniec i wsp. (38) po przeanalizowaniu przypadku 71-letniego chorego przyjętego do szpitala z powodu guza nerki oraz nieprawidłowych wyników badań układu hemostazy. Wywiad krwotoczny był ujemny. Czasy PT, APTT, TT były przedłużone natomiast aktywności czynników krzepnięcia wykonane w trakcie dalszej diagnostyki były prawidłowe. Wykluczono obecność antykoagulantu toczniowego i przeciwciał antykardiolipinowych. Z uwagi na wysoki poziom białka całkowitego (91.6 g/l,) wykonano immunofiksację surowicy, która wykazała obecność monoklonalnych immunoglobulin IgG kappa. Podejrzewano, że interferują one w przebieg testów koagulologicznych. Badacze zauważyli, że z najbardziej przedłużony był czas TT natomiast stężenie fibrynogenu mieściło się w zakresach referencyjnych, uznali więc, że łańcuchy lekkie monoklonalnych immunoglobulin mogły niespecyficycznie wiązać cząsteczki fibrynogenu. Mechanizm ten mógł przedłużać czas TT oraz zaburzać polimeryzację fibryny. Potwierdzenie hipotezy wymaga jednak dalszych badań.

Przytoczone przykłady wskazują jak niezwykle istotą jest ścisła współpraca klinicystów i diagnostów laboratoryjnych, tak jak to miało miejsce w przypadku opisywanego w pracy *pacjenta 16*. Ciągły przepływ informacji zaowocował szybką diagnozą chorego i wdrożeniem odpowiedniego leczenia.

6. Wnioski

U pacjentów z dyskracjami plazmocytowymi ilościowe oznaczenia parametrów istotnych dla diagnostyki i monitorowania tej grupy chorych mogą być obarczone znacznym błędem. Wybór odpowiedniej metody i interpretacja otrzymanych wyników wymagają doświadczenia pracowników laboratorium i ścisłej współpracy z zespołem lekarzy.

1. Wyniki oznaczania stężenia albuminy różnymi metodami mogą się znacząco różnić. Niniejsza praca jednoznacznie wykazała niespójności oznaczeń stężeń albuminy w metodzie kolorymetrycznej i elektroforetycznej i wskazuje na metodę kolorymetryczną jako referencyjną u pacjentów z dyskracjami plazmocytowymi
2. Ilościowe wyniki oznaczania białka monoklonalnego zależą od zastosowanej metody elektroforetycznej i wybranej metody integracji. Dla niskich stężeń białka M wartość wyliczona z elektroforezy może być obciążona kilkusetprocentowym błędem (zwłaszcza kiedy strefa białka monoklonalnego wędruje w strefie beta-globulin). W trudnych przypadkach raport powinien zawierać ilościowy wynik immunochemicznego oznaczenia immunoglobuliny (klasy związanej ze strefą monoklonalną) i być spójny z półilościową interpretacją wyniku immunofiksacji. Jako dokładniejsza do monitorowania chorych z dyskracjami plazmocytowymi powinna być rekomendowana elektroforetyczna metoda dzieląca białka surowicy na sześć frakcji.
3. Czułość testów paskowych do oznaczania białka w moczu jest dla wolnych łańcuchów lekkich wielokrotnie wyższa od zakresu referencyjnego. Dla łańcuchów kappa czułość analityczna wynosi 300 mg/l natomiast w przypadku łańcuchów lekkich lambda czułość można oszacować na ok. 1000 mg/l. Ujemny wynik testu paskowego nie oznacza braku obecności wolnych łańcuchów lekkich w moczu. Rekomenduje się ilościowe oznaczenie białka w moczu u wszystkich pacjentów z podejrzeniem gammapatii monoklonalnej. W przypadku wyniku powyżej zakresu referencyjnego oznaczenie albuminy oraz łańcuchów lekkich (całkowitych) metodą immunochemiczną,
4. Z powodu problemów metodycznych związanych z oznaczaniem wolnych łańcuchów lekkich, w przebiegu diagnozowania pacjentów z dyskracjami plazmocytowymi istnieje konieczność wykonywania całego pakietu uzupełniających się badań (oprócz oznaczenia FLC także: SPE, IFE, TLC, intact Ig), oraz konieczność monitorowania pacjenta przy pomocy jednej platformy analitycznej (wyniki pomiarów nie są

równoważne między różnymi metodami). Ilościowe wyniki stężenia FLC na różnych platformach / różnymi metodami mogą się różnić wielokrotnie.

5. Pojawienie się nowego białka monoklonalnego na skutek przeszczepienia komórek krwiotwórczych może niekiedy powodować niepewność w ocenie odpowiedzi na zastosowaną terapię. Interpretacja wyników wymaga dużego doświadczenia personelu laboratorium.
6. Pojawienie się prążków monoklonalnych w PMR może być pierwszą nieprawidłowością w wynikach laboratoryjnych u pacjenta z dyskracją plazmocytową z objawami neurologicznymi. Personel laboratorium powinien być odpowiednio przeszkolony i umieć rozpoznać gammapatię monoklonalną w obrazie izoogniskowania płynu mózgowo rdzeniowego. Neurologzy powinni być wyczuleni na możliwość wystąpienia takiego wyniku i niezwłoczne kierowanie pacjenta do hematologa.
7. W pracy opisano procedury postępowania z materiałem badanym u chorych z dyskracjami plazmocytowymi, u których wystąpił zespół nadlepkości lub krioglobulinemia. Są to: wstępne ogrzewanie surowicy przed wykonaniem rozdzielów elektroforetycznych, wymiana osocza w próbkach pobranych na EDTA dedykowanym diluentem przy podejrzeniu interferencji powodowanych przez immunoglobuliny monoklonalne oraz używanie metody fluorescencyjnej cytometrii przepływowej do oznaczania płytek krwi.
8. Daratumumab (*Dara*) przeciwciało monoklonale IgG-kappa stosowane w immunoterapii szpiczaka plazmocytoowego interferuje w badanie elektroforezy białek surowicy (SPE) i (IFE). Zastosowanie testu polegającego na dołączeniu dodatkowego przeciwciała skierowanego przeciwko regionowi zmiennemu *Dara* i przesunięcie go na obrzeże pola rozdzielu elektroforetycznego umożliwia odróżnienie *Dara* od endogennego białka monoklonalnego. Drugim sposobem postępowania jest oznaczanie wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin (FLCs), testu odpowiedniego do monitorowania choroby resztkowej u pacjentów poddawanych immunoterapii. Test ten mierzy tylko łańcuchy lekkie niezwiązane z cząsteczką immunoglobuliny, a więc obecność podanej cząsteczki monoklonalnej IgG kappa nie wpływa na oznaczenie wolnych łańcuchów lekkich, co pokazano w niniejszej pracy w opisie przypadków pacjentów leczonych daratumumabem.
9. U pacjentów z dyskracją komórek plazmatycznych, u których istnieje podejrzenie interferencji w badania laboratoryjne układu krzepnięcia i fibrynolizy, z uwagi na niespójne wyniki czasów krzepnięcia w odniesieniu do stanu klinicznego pacjenta

należy zastosować szereg działań mających na celu eliminację interferencji. Są to: wprowadzanie serii rozcieńczeń próbki osocza, zastosowanie metody optomechanicznej i turbidymetrycznej.

W procesie diagnostyki i monitorowania chorych z dyskracjami plazmocytowymi oraz z uwagi na charakter tych chorób niezwykle istotna jest współpraca pomiędzy poszczególnymi grupami pracowników ochrony zdrowia, a w szczególności lekarzami oraz diagnostami laboratoryjnymi. Optymalnym rozwiązaniem byłoby stworzenie interdyscyplinarnych zespołów w ośrodkach zajmujących się tymi chorymi. W skład takich zespołów oprócz lekarza hematologa, nefrologa, ortopedy wchodziłby również doświadczony w dziedzinie diagnostyki gammapatii monoklonalnych diagnosta laboratoryjny. Ścisła współpraca i wymiana informacji pomiędzy diagnostą wykonującym badanie a klinicystą prowadzącym pacjenta umożliwi skrócenie procesu diagnostycznego tak pożądanego u chorych z nowotworami oraz skuteczne monitorowanie leczenia. Poprawa jakości opieki medycznej i wybór optymalnych metod diagnostycznych powinien przynieść ostatecznie obniżenie całkowitych kosztów leczenia.

7. Streszczenie

Niecharakterystyczna symptomatologia związana z dyskracjami plazmocytowymi sprawia, że pacjenci późno, niejednokrotnie w zaawansowanym stadium choroby, trafiają do poradni hematologicznej. Dlatego tak ważne jest wykonanie badań, które umożliwią szybkie postawienie trafnej diagnozy, dobór farmakoterapii i monitorowanie leczenia. Diagnostyka laboratoryjna ma kluczowe znaczenie w szybkim rozpoznawaniu, a następnie monitorowaniu stanu pacjentów z gammadopatiami monoklonalnymi, jednak w tej grupie pacjentów często występują problemy diagnostyczne i niespójności mierzonych parametrów laboratoryjnych. Niespójności te utrudniają właściwą interpretację wyników laboratoryjnych i podejmowanie trafnych decyzji terapeutycznych.

W pracy analizowano przyczyny rozbieżności wyników badań laboratoryjnych u pacjentów z dyskracją plazmocytów. Podano gotowe rozwiązania, które można zastosować w praktyce laboratoryjnej.

Porównano dwa systemy elektroforezy żelowej: 5 i 6 - frakcyjną. Ilościowe oznaczanie białka M za pomocą elektroforezy 6 - frakcyjnej jest bardziej dokładne z uwagi na zmniejszony wpływ prawidłowych białek komigrujących z białkiem M we frakcjach beta 1 i beta 2.

Dokonano analizy czułości testów paskowych oznaczania białka Bence – Jonesa, czyli stężenia łańcuchów lekkich immunoglobulin (LC) w moczu. Uzyskane wyniki wskazują na ograniczone możliwości detekcji tych białek przez przesiewowe testy paskowe. Wykazano różnice czułości pasków w zależności od typu łańcuchów lekkich. Dla LC kappa próg wykrywalności białka wynosi około 300 mg/l. Dla łańcuchów lekkich lambda – około 1000 mg/l.

Przedstawiono problemy metodyczne związane z oznaczaniem wolnych łańcuchów lekkich (FLC) testem Freelite®. Opisano przypadki 4 pacjentów, których stężenie FLC oznaczane testem Freelite® było drastycznie zawyżone i niespójne z innymi wynikami badań surowicy (elektroforeza, immunofiksacja, stężenia całkowite łańcuchów lekkich i białka całkowitego). Z uwagi na ograniczenia testu przy monitorowaniu leczenia pacjentów z dyskracją plazmocytową istnieje konieczność wykonywania całego pakietu uzupełniających się badań.

Rozbieżności w oznaczaniu stężenia albuminy badano w oparciu o zastosowaną metodę: test kolorymetryczny z zielenią bromokrezolową i metodę elektroforetyczną. Pomiar stężenia albuminy za pomocą testu kolorymetrycznego były znacznie niższe niż te uzyskane metodą elektroforetyczną w próbkach surowicy od 50 pacjentów z dyskracjami komórek

plazmatycznych. Natomiast w grupie kontrolnej sytuacja była odwrotna. W przypadku 26% pacjentów (n=13) metoda oznaczania albuminy mogła wpływać na zmianę stadium klinicznego pacjenta zgodnie z międzynarodową klasyfikacją prognostyczną szpiczaka mnogiego.

W pracy poruszono kwestię przemijających i wtórnych gammapatii monoklonalnych. Opisano przypadki pacjentów po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych, u których pojawiło się nowe białko monoklonalne (tzw. wtórna MGUS) oraz pacjentkę z przemijającą (reaktywną) plazmocytozą na skutek zarażenia wirusem cytomegalii. Zwrócono uwagę na interpretację wyników w takich przypadkach w celu uniknięcia inwazyjnej, drogiej i często uciążliwej dla pacjenta diagnostyki hematologicznej w sytuacji plazmocytozy reaktywnej lub niepewności w ocenie odpowiedzi na zastosowaną terapię w przypadku wtórnej gammapatii monoklonalnej.

W niniejszej pracy badano częstość występowania prążków monoklonalnych w PMR wśród pacjentów neurologicznych badanych w kierunku obecności prążków oligoklonalnych. Przeanalizowano 1142 wyników elektorforegramów wykonanych techniką ogniskowania izoelektrycznego. Prążki monoklonalne w PMR i surowicy wykazano u 11 osób (0,96 %). U wszystkich stwierdzono MGUS. Pojawienie się prążków monoklonalnych w PMR może być pierwszą nieprawidłowością w wynikach laboratoryjnych u niezdiagnozowanego pacjenta z dyskracją plazmocytową i objawami neurologicznymi.

Opisano przykłady interpretacji wyników badań w przypadku pacjentów z dyskracjami plazmocytowymi, u których dodatkowo wystąpił zespół nadlepkości surowicy lub kioglobulinemia. Omówiono procedury postępowania z trudnym materiałem diagnostycznym w przypadku tej grupy chorych.

W pracy przedstawiono możliwości eliminacji interferencji w badania laboratoryjne pochodzące z obecności w surowicy i moczu chorych leku przeciwciała monoklonalnego – daratumumabu stosowanego w immunoterapii szpiczaka plazmocytozowego.

Zwrócono uwagę na możliwe występowanie interferencji w badaniach laboratoryjnych układu krzepnięcia i fibrynolizy związanych z wysokim stężeniem monoklonalnych immunoglobulin.

8. Abstract

Non-characteristic symptomatology associated with plasma cell dyscrasias often leads patients to seek hematological consultation at a late stage, frequently in an advanced disease state. Therefore, it is crucial to conduct tests that enable prompt and accurate diagnosis, selection of pharmacotherapy, and treatment monitoring. Laboratory diagnostics play a pivotal role in the rapid recognition and subsequent monitoring of patients with monoclonal gammopathies. However, this patient group often presents diagnostic challenges and inconsistencies in measured laboratory parameters. These inconsistencies hinder the proper interpretation of laboratory results and the implementation of appropriate therapeutic decisions.

This study analyzed the causes of discrepancies in laboratory test results among patients with plasma cell dyscrasias. Ready-made solutions that can be applied in laboratory practice were provided, addressing difficulties related to the processing of challenging specimens or result interpretation.

Two gel electrophoresis systems, the 5-fraction and 6-fraction methods, were compared. The quantitative determination of M protein using the 6-fraction electrophoresis method is more accurate due to the reduced interference of normal proteins co-migrating with M protein in the beta 1 and beta 2 fractions.

The sensitivity of strip tests for Bence-Jones protein detection, i.e., the concentration of light chain immunoglobulins (LC) in urine, was analyzed. The obtained results indicate limited capabilities of screening strip tests in detecting these proteins. Sensitivity differences among strips were demonstrated depending on the type of light chains. The detectability threshold for LC kappa protein is approximately 300 mg/L, while for lambda light chains, it is around 1000 mg/L.

Methodological issues associated with the measurement of free light chains (FLC) using the Freelite® test were presented. Four cases were described in which the FLC concentration determined by the Freelite® test was drastically elevated and inconsistent with other serum test results (electrophoresis, immunofixation, total light chain concentrations, and total protein). Due to the limitations of the test in monitoring the treatment of patients with plasma cell dyscrasias, there is a need for a comprehensive package of complementary tests.

Discrepancies in albumin concentration determination were examined based on the method used: colorimetric assay with bromocresol green and electrophoretic method. The albumin concentration measurements using the colorimetric assay were significantly lower than those obtained using the electrophoretic method in serum samples from 50 patients with plasma

cell dyscrasias. Conversely, in the control group, the situation was reversed. For 26% of patients (n=13), the method of albumin determination could affect the change in the patient's clinical stage according to the international prognostic classification for multiple myeloma.

The study addressed the issue of transient and secondary monoclonal gammopathies. Cases of patients who developed new monoclonal proteins (secondary MGUS) after hematopoietic stem cell transplantation and a patient with transient (reactive) plasmacytosis due to cytomegalovirus infection were described. Attention was drawn to result interpretation in such cases to avoid invasive, expensive, and often burdensome hematological diagnostic procedures in situations of reactive plasmacytosis or uncertainty in assessing the response to therapy in cases of secondary monoclonal gammopathy.

The frequency of monoclonal bands in cerebrospinal fluid (CSF) among neurologically examined patients with suspected oligoclonal bands was investigated. A total of 1142 electrophoretogram results obtained using isoelectric focusing were analyzed. Monoclonal bands in CSF and serum were detected in 11 individuals (0.96%). All of them were diagnosed with MGUS. The appearance of monoclonal bands in CSF may be the first laboratory abnormality in an undiagnosed patient with plasma cell dyscrasia and neurological symptoms.

Examples of result interpretation were provided for patients with plasma cell dyscrasias who additionally presented with hypergammaglobulinemia or cryoglobulinemia. Procedures for handling challenging diagnostic specimens in this patient group were discussed.

The possibilities of eliminating interference in laboratory tests resulting from the presence of the monoclonal antibody drug daratumumab in the serum and urine of patients undergoing immunotherapy for multiple myeloma were presented.

A series of measures aimed at eliminating interference in laboratory tests were proposed for patients with plasma cell dyscrasias suspected of having interference in the coagulation and fibrinolysis system, considering inconsistent results of clotting times in relation to the patient's clinical condition.

9. Spis Tabel

Tab. 1 Międzynarodowa klasyfikacja prognostyczna szpiczaka plazmocytozy.....	26
Tab. 2 Zmodyfikowane kryteria narządowego uszkodzenia związanego ze szpiczakiem plazmocytozy (SliM CRAB).	31
Tab. 3 Wybrane parametry statystyczne dotyczące stężenia albuminy oznaczanego metodami: kolorymetryczną (ALB_met. kolorym.) oraz elektroforetyczną (ALB_met. elektrof.) u pacjentów z dyskracjami plazmocytozy oraz w grupie kontrolnej.	50
Tab. 4 Wybrane parametry statystyczne różnic stężenia albuminy dla obu badanych grup (pacjentów i grupy kontrolnej).	53
Tab. 5 Porównanie oznaczenia stężenia albuminy dwoma metodami, które kwalifikują pacjenta do odmiennych kategorii klasyfikacji szpiczaka ISS.	53
Tab. 6 Stężenia białka M we frakcji beta-globulin wykonanych w surowicy pacjentów równoległe w rozdziałach elektroforetycznych 5 i 6 frakcyjnych.	58
Tab. 7 Stężenia białek w moczu pacjentów zawierających łańcuchy lekkie kappa. LC – łańcuchy lekkie kappa (metoda nefelometryczna); ALB – albumina (metoda nefelometryczna); PROT – białko całkowite (test paskowy); TP_U – białko całkowite (metoda turbidymetryczna); uj –wynik ujemny; NA – nie analizowano. Kolorem czerwonym zaznaczono stężenie LC w moczu, dla którego test paskowy pokazał obecność białka.	59
Tab. 8 Stężenia białek w moczu pacjentów zawierających łańcuchy lekkie lambda: LC – łańcuchy lekkie lambda (metoda nefelometryczna); ALB – albumina (metoda nefelometryczna); PROT – białko całkowite (test paskowy); TP_U – białko całkowite (metoda turbidymetryczna); uj –wynik ujemny; NA – nie analizowano. Kolorem czerwonym zaznaczono stężenie LC w moczu, dla którego test paskowy pokazał obecność białka.	60
Tab. 9 Rozcieńczania standardu zawierającego łańcuchy lekkie (LC) lambda i kappa -kolorem czerwonym zaznaczono rozcieńczenie z najniższym stężeniem LC, dla którego test paskowy pokazał obecność białka w moczu.	61
Tab. 10 Wynik stężenia FLC, TLC oraz białka całkowitego u <i>pacjentki 2</i> . Zawyżony wynik stężenia FLC kappa testem Freelite® zaznaczono czerwonym kolorem.	63
Tab. 11 Wynik stężenia FLC, TLC oraz białka całkowitego u <i>pacjentki 3</i> . Czerwonym kolorem zaznaczono zawyżony wynik stężenia FLC kappa oznaczony testem Freelite®.	64
Tab. 12 Wynik stężenia FLC, TLC oraz białka całkowitego u <i>pacjenta 4</i> . Zawyżony wynik stężenia FLC lambda testem Freelite® zaznaczono czerwonym kolorem.	65
Tab. 13 Wynik stężenia FLC (oznaczenie testem Freelite®), TLC, białka całkowitego oraz IgG u <i>pacjentki 5</i> . Czerwonym kolorem zaznaczono wynik niespójny z pozostałymi wynikami.	66

Tab. 14 Wynik stężenia FLC (oznaczenie testem N Latex), TLC oraz białka całkowitego u <i>pacjentki 5</i> . Kolorem niebieskim zaznaczono wynik FLC kappa który jest spójny z pozostałymi wynikami.	66
Tab. 15 Wybrane wyniki <i>pacjentki 6</i> z podejrzeniem dyskrazji plazmocytovej. Kolorem czerwonym zaznaczono wyniki przekraczające wartości referencyjne.	67
Tab. 16 Wyniki <i>pacjentki 6</i> po leczeniu i ustąpieniu objawów cytomegalii. Kolorem czerwonym zaznaczono wyniki przekraczające wartości referencyjne.	69
Tab. 17 Wyniki płytek krwi u <i>pacjenta 12</i> z podejrzeniem pseudotrombocytozy.	82
Tab. 18 Badania laboratoryjne u <i>pacjenta 14</i> przed i po otrzymaniu leczenia daratumumabem. Zwraca uwagę pojawienie się białka IgG kappa (czerwony kolor) w IFE oraz brak wzrostu stężenia FLC kappa w surowicy (zielony kolor), i wzrost stężenia łańcuchów lekkich kappa w moczu (żółty kolor) na skutek eliminacji leku przez nerki podczas terapii <i>Dara</i>	89
Tab. 19 Wybrane wyniki badań laboratoryjnych <i>pacjenta 16</i> z podejrzeniem dyskrazji plazmocytovej i objawami uszkodzenia nerek. Czerwonym kolorem zaznaczono wyniki poza zakresami referencyjnymi.	92
Tab. 20 Wyniki stężenia białek surowicy i testów krzepnięcia osocza u <i>pacjenta 16</i> z podejrzeniem dyskrazji plazmocytovej. Czerwonym kolorem zaznaczono wyniki powyżej zakresu referencyjnego, niebieskim poniżej zakresu referencyjnego. Zwracają uwagę przedłużone (a właściwie nieoznaczalne) czasy protrombinowy i APTT oraz niskie stężenie fibrynogenu (kolor fioletowy).	93
Tab. 21 Powtórzone badania czasów krzepnięcia u <i>pacjenta 16</i> po dwukrotnym rozcieńczeniu próbki osocza 0,9 % solą fizjologiczną w celu eliminacji interferencji pochodzących od monoklonalnych immunoglobulin. Czerwonym kolorem zaznaczono wyniki powyżej zakresu referencyjnego. Uzyskano krótsze czasy krzepnięcia niż w poprzednim pomiarze. Zwraca uwagę podwyższona aktywność czynnika VIII –niespójna z pozostałymi wynikami (kolor fioletowy).	94
Tab. 22 Wyniki weryfikacyjne parametrów krzepnięcia <i>pacjenta 16</i> uzyskane za pomocą metody optomechanicznej (czas protrombinowy i APTT) oraz metody turbidymetrycznej (fibrynogen).	94
Tab. 23 Różnice w intensywności zabarwienia różnych białek przy tym samym stężeniu roztworu białka – oznaczenie absorbancji za pomocą ExPASy ProtParam	99

10. Spis Rycin

Ryc. 1 Rozmaz aspiratu szpiku kostnego u pacjenta ze szpiczakiem plazmocytowym. Widoczne skupiska plazmocytów i rulonizacja erytrocytów. Fot. dr Marta Szostek, Katedra i Klinika Hematologii Collegium Medicum Uniwersytet Jagielloński.	8
Ryc. 2 Wynik rozdziału elektroforetycznego białek surowicy: prawidłowy (A) oraz z widoczną strefą białka monoklonalnego we frakcji gamma-globulin (B). Na rycinie podkreślono różnicę w sposobie migracji frakcji gamma. W prawidłowej surowicy różnorodność ładunku immunoglobulin powoduje powstanie „rozciągniętej” frakcji białkowej. Immunoglobulina monoklonalna jest produktem jednego klonu plazmocytów, a więc białkiem o jednorodnym ładunku – stąd charakterystyczny wzór migracji w postaci ostrego, odgraniczzonego piku. Czerwoną ramką zaznaczono parametr SMC (<i>Serum Monoclonal Concentration</i>) –wyliczone na podstawie intensywności piku elektroforetycznego stężenie białka monoklonalnego.....	12
Ryc. 3 Elektroforegram ze strefą białka monoklonalnego we frakcji beta (A) i w paśmie alfa-2 (B). Zawartość białka monoklonalnego wyliczone łącznie z frakcją odpowiednio: beta i alfa-2.	13
Ryc. 4 Wynik elektroforezy białek surowicy przedstawiający białko biklonalne. Obie frakcje monoklonalne migrują jako dwa dobrze odgraniczone piki, co umożliwia niezależne oznaczenie każdego z nich w sposób ilościowy.....	14
Ryc. 5 Immunofiksacja białek surowicy: ujemna tzn. bez obecności monoklonalnej immunoglobuliny (A) i z obecnością białka monoklonalnego: klasy IgG typu kappa (B). Na ścieżce G oraz κ widoczny charakterystyczny wzór migracji białka monoklonalnego – jako ostry odgraniczony pik. Dodatkowo o nieprawidłowej klonalności świadczą zaburzone proporcje intensywności prążków kappa oraz lambda (ścieżka κ i λ).....	14
Ryc. 6 Proteinogram z niewielkim pikiem białka monoklonalnego w strefie gamma.	15
Ryc. 7 Imunofiksacja surowicy z widocznym prążkiem odpowiadającym wolnym łańcuchom lekkim kappa.	16
Ryc. 8 Proteinogram przedstawiający wzrost stężenia immunoglobulin poliklonalnych (hypergammaglobulinemia poliklonalna), brak białka monoklonalnego. Pomimo, że frakcja gamma jest podwyższona, rozlany sposób migracji wskazuje na	

immunoglobuliny poliklonalne, których obecność towarzyszy przewlekłym stanom zapalnym.	16
Ryc. 9 Elektroforeza białek wykonana w osoczu. Widoczny pik pochodzący od fibrynogenu w paśmie gamma-globulin – komponenta pseudomonoklonalna.	17
Ryc. 10 Elektroforeza białek w surowicy ze znaczną hemolizą. Na rycinie widoczna jest podwójna frakcja beta. W tym przypadku wolna hemoglobina migruje we frakcji beta dając dodatkowy prążek, który może być mylnie uznany za białko M. U pacjenta nie stwierdzono obecności białka monoklonalnego.....	17
Ryc. 11 Badanie elektroforetyczne białkomoczu pacjenta z gammapatią monoklonalną. Widoczna intensywna, podwójna strefa monomeru i dimeru wolnych łańcuchów lekkich (FLC mon. /dim.) oraz obecność prążków białkowych w strefach migracji: albuminy (Alb.), transferyny (TRF.) oraz immunoglobulin (Imm). Obraz jest charakterystyczny dla białkomoczu nieselektywnego. W moczu widoczne są również prążki w strefie białek drobnocząsteczkowych. Dwa z nich mają charakterystyczną dla wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin lokalizację.	18
Ryc. 12 Imunofiksacja białek moczu - widoczne wolne łańcuchy lekkie lambda (ścieżka λ oraz free λ).	19
Ryc. 13 Elektroforeza białek surowicy na żelu agarozowym – rozdział na 6 frakcji.	21
Ryc. 14 Oznaczenie białka M techniką elektroforezy kapilarnej – u pacjenta wykryto immunoglobulinę monoklonalną IgA kappa.	22
Ryc. 15 Porównanie metod ilościowego oznaczania białka monoklonalnego metodą elektroforetyczną.	24
Ryc. 16 Częsteczka przeciwciała z widoczną strukturą łańcucha ciężkiego i lekkiego immunoglobuliny wraz z epitopami, FLC kappa i lambda.	29
Ryc. 17 Diagram przedstawiający plazmocyty produkujące cząsteczki immunoglobulin, monomery łańcuchów lekkich kappa oraz dimery lambda.....	30
Ryc. 18 Badanie PMR i surowicy metodą ogniskowania izoelektrycznego: wynik typowy dla SM (A), wynik prawidłowy (B) oraz charakterystyczny dla dysproteinemii (C).....	35
Ryc. 19 Imunofiksacja surowicy z silnie zaznaczoną strefą gamma-globulin poliklonalnych. Obecność prążków we wszystkich klasach immunoglobulin sugeruje obecność krioglobulin.	37
Ryc. 20 Imunofiksacja surowicy z klasycznym obrazem krioglobulinowym: wytrącanie białka w miejscu nałożenia, rozmazane rozdziały.....	38

Ryc. 21 Lek daratumumab (Darzalex).	40
Ryc. 22 Rozdział elektroforetyczny białek moczu na żelu poliakrylamidowym z dodatkiem SDS. Widoczna strefa monomeru oraz dimeru wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin. U pacjenta nie zaobserwowano prążka pochodzącego od albuminy...	47
Ryc. 23 Testy paskowe firmy Roche do oznaczeń parametrów fizyko-chemicznych w moczu.....	48
Ryc. 24 Stężenie albuminy zmierzonej obiema metodami w grupie pacjentów oraz w grupie kontrolnej.....	51
Ryc. 25 Różnice stężeń albuminy zmierzonych dwiema metodami dla pacjentów badanych i grupy kontrolnej.....	52
Ryc. 26 Zestawienie wyników SPE oraz IFE <i>pacjentki 1</i> ze szpiczakiem plazmocytowym z białkiem M we frakcji beta-globulin, podczas monitorowania terapii.....	56
Ryc. 27 Wynik elektroforezy białek u pacjenta X: A - rozdział 5 - frakcyjny, B - rozdział 6 - frakcyjny. Białko monoklonalne znajduje się we frakcji β 1.....	57
Ryc. 28 Elektroforegram oraz wynik immunofiksacji surowicy <i>pacjentki 2</i> : obecność białka monoklonalnego - wolnych łańcuchów lekkich kappa w dwóch strefach: słaba w alfa 2 oraz bardzo mocna w paśmie gamma-globulin	62
Ryc. 29 Rozdział elektroforetyczny oraz wynik immunofiksacji surowicy <i>pacjentki 3</i> : obecność białka monoklonalnego - wolnych łańcuchów lekkich kappa w paśmie beta-globulin. Białko monoklonalne zliczone razem z frakcją beta.....	63
Ryc. 30 Elektroforegram oraz wynik immunofiksacji surowicy <i>pacjenta 4</i> : obecność białka monoklonalnego - wolnych łańcuchów lekkich lambda w paśmie gamma-globulin.	64
Ryc. 31 Elektroforegram oraz wynik immunofiksacji surowicy <i>pacjentki 5</i> : obecność białka monoklonalnego IgG lambda	65
Ryc. 32 Proteinogram surowicy <i>pacjentki 6</i> ze strefą białka monoklonalnego słabo wyodrębnionego o stężeniu 3,7 g/l oraz wynik immunofiksacji surowicy- IgG lambda ..	68
Ryc. 33 Elektroforegram i immunofiksacja surowicy u pacjentki po leczeniu i ustąpieniu objawów cytomegalii. Brak obecności strefy białka monoklonalnego.	69
Ryc. 34 Zestawienie wyników SPE oraz IFE <i>pacjenta 7</i> z wtórną gammopatią monoklonalną. Czerwona ramka umieszczona w pierwotnej (przed leczeniem) lokalizacji białka M uwidocznia zmiany w lokalizacji pików w trakcie leczenia.....	72

Ryc. 35 Elektroforegram u 3-letniej dziewczynki z mukopolisacharydozą typu I . Badanie wykonano po przeszczepieniu szpiku. Metodą immunofiksacji stwierdzono obecność białka monoklonalnego IgG kappa	73
Ryc. 36 Wynik badania elektroforetycznego u <i>pacjenta 9</i> metodą ogniskowania izoelektrycznego na żelu agarozowym: widoczne prążki oligoklonale w PMR oraz prążki monoklonalne w PMR i surowicy. (PMR-płyn mózgowo-rdzeniowy, SUR- surowica).....	74
Ryc. 37 Wynik badań elektroforetycznych surowicy <i>pacjenta 9</i> ujawniający obecność białka monoklonalnego IgG kappa.	75
Ryc. 38 Wynik badania elektroforetycznego u <i>pacjentki 10</i> metodą ogniskowania izoelektrycznego na żelu agarozowym: widoczne prążki monoklonalne w PMR i surowicy (PMR-płyn mózgowo-rdzeniowy, SUR- surowica).....	76
Ryc. 39 Wynik badań elektroforetycznych surowicy <i>pacjentki 10</i> ujawniający obecność białka monoklonalnego IgG lambda.	76
Ryc. 40 Proteinogram surowicy <i>pacjentki 11</i> zawierającej krioglobuliny (A) oraz surowicy po ogrzaniu (B).....	78
Ryc. 41 Surowica <i>pacjentki 11</i> zawierająca krioglobuliny -biały osad (A) oraz po ogrzaniu -bez osadu (B).....	78
Ryc. 42 Immunofiksacja surowicy <i>pacjentki 11</i> ujawniająca obecność białka monoklonalnego klasy IgM typu kappa.	79
Ryc. 43 Wynik rozdziału elektroforetycznego i immunofiksacji surowicy <i>pacjenta 12</i> stwierdzający obecność białka monoklonalnego IgM kappa.	80
Ryc. 44 Wynik morfologii krwi <i>pacjenta 12</i> z makroglobulinemią Waldenströma. Płytki mierzone metodą impedancyjną. Oflagowanie przy wyniku PLT wskazuje na interferencje w oznaczeniu spowodowanym przez monoklonalne immunoglobuliny klasy IgM.....	81
Ryc. 45 Obraz mikroskopowy rozmazu krwi obwodowej <i>pacjenta 12</i> chorującego na makroglobulinemię Waldenströma z rzekomą nadpłytkowością. Widoczne liczne fragmentocyty.	82
Ryc. 46 Wynik morfologii krwi <i>pacjenta 12</i> . Płytki mierzone metodą fluorescencyjnej cytometrii przepływowej, która eliminuje interferencje spowodowane przez monoklonalne immunoglobuliny w oznaczaniu PLT.....	83
Ryc. 47 Wynik proteinogramu oraz immunofiksacji surowicy <i>pacjenta 13</i> . Stwierdzono obecność białka monoklonalnego IgM kappa oraz obecność prążków we wszystkich	

klasach immunoglobulin wynikającą z precypitacji IgM. Czerwoną ramką zaznaczono nietypową obecność prążków na wszystkich ścieżkach rozdziału surowicy.....	84
Ryc. 48 Wynik morfologii krwi u <i>pacjenta 13</i> z makroglobulinemią Waldenströma wykonany na analizatorze Sysmex XN-1000. Brak oznaczenia liczby leukocytów z uwagi na dużą niepewność pomiaru spowodowaną interferencją monoklonalnych immunoglobulin.	85
Ryc. 49 Wynik morfologii krwi u <i>pacjenta 13</i> z makroglobulinemią Waldenströma na analizatorze Sysmex XN-1000 po wymianie osocza. Po eliminacji białka monoklonalnego obecnego w osoczu (powodującego interferencję w oznaczenia) uzyskano wynik liczby leukocytów.....	86
Ryc. 50 Immunofiksacja surowicy <i>pacjenta 14</i> ujawniająca obecność białka monoklonalnego –wolnych łańcuchów lekkich lambda.	87
Ryc. 51 Metodą immunofiksacji w surowicy <i>pacjenta 14</i> stwierdzono obecność słabej strefy IgG kappa pochodzącej od podawanego leku <i>Dara</i> (zaznaczono czerwoną ramką).	88
Ryc. 52 Metodą immunofiksacji w moczu <i>pacjenta 14</i> stwierdzono obecność łańcuchów lekkich lambda. Dodatkowo widoczna jest całkowita cząsteczka IgG kappa, której obecność w moczu jest wynikiem eliminacji przez nerki podawanego leku <i>Dara</i> (zaznaczono czerwoną ramką).....	88
Ryc. 53 Elektroforeza i immunofiksacja surowicy <i>pacjentki 15</i> potwierdziły obecność białka monoklonalnego IgG lambda.	90
Ryc. 54 Elektroforegram surowicy <i>pacjentki 15</i> ujawniający dwa niewielkie piki białka monoklonalnego w strefie gamma-globulin.	91
Ryc. 55 Wyniki elektroforegramów surowicy <i>pacjentki 15</i> przedstawiające obecność w surowicy leku daratumumabu. W czerwonej ramce zaznaczono ujawniony prążek IgG kappa.....	91
Ryc. 56 Wynik proteinogramu i immunofiksacji surowicy <i>pacjenta 16</i> wskazujące na obecność białka monoklonalnego IgG lambda oraz monoklonalnych, wolnych łańcuchów lekkich lambda migrujących we frakcji beta-globulin. Stężenie białka monoklonalnego oszacowane za pomocą metody rzutu prostopadłego wynosiło 59,9 g/l.	93
Ryc. 57 Systemy integracji krzywej densytometrycznej na elektroforegramie:	98
Ryc. 58 Różnice w intensywności barwy dla albuminy wołowej (BSA) i immunoglobuliny wołowej (BGG) - oznaczenie metodą Bradforda.....	99

Ryc. 59 Wzór skierowania na badanie PMR i surowicy w kierunku wewnątrzprzynowej syntezy globulin. Czerwoną i niebieską ramką zaznaczono ważne informacje, które powinny znaleźć się na skierowaniu.	107
Ryc. 60 Skatergram WBC (A) i histogram RBC i PLT (B) w wyniku morfologii krwi <i>pacjenta 13</i> z makroglobulinemią Waldenströma Na skatergramie widoczna jest znaczna ilość cząstek zakłócających pomiar leukocytów w polu zaznaczonym czerwoną ramką. Interferencje spowodowane są wysoką lepkością osocza pochodzącą od monoklonalnych immunoglobulin klasy IgM o dużym stężeniu. Histogramy RBC i PLT wyglądają prawidłowo.	110
Ryc. 61 Skatergram WBC (A) histogram RBC i PLT (B) w wyniku morfologii krwi <i>pacjenta 13</i> z makroglobulinemią Waldenströma po wymianie osocza w celu eliminacji interferencji w zliczaniu leukocytów. Skatergram nadal ma pewne cechy wskazujące na nieprawidłowości – poszczególne punkty nie są na nim zgrupowane w „chmury” lecz są rozproszone, jednak widać wyraźne zmniejszenie interferujących cząstek - monoklonalnych immunoglobulin. Histogramy RBC i PLT wyglądają prawidłowo.	111

11. Piśmiennictwo

1. Dmoszyńska A, Usnarska-Zubkiewicz L, Walewski J, Lech-Marańda E, Walter-Croneck A, Pieńkowska-Grela B, et al. Zalecenia Polskiej Grupy Szpiczakowej dotyczące rozpoznawania i leczenia szpiczaka plazmocytoowego oraz innych dyskracji plazmocytoowych na rok 2017. *Acta Haematol Pol.* 2017;48(2):55–103.
2. Masood A, Ehsan H, Iqbal Q, Salman A, Hashmi H. Treatment of Light Chain Deposition Disease: A Systematic Review. *J Hematol.* 2022;11(4):123–30. <https://www.doi.org/10.14740/jh1038>.
3. Szudy-Szczyrek A, Szczyrek M, Soroka-Wojtaszko M, Hus M. Nowe biomarkery w prognozowaniu przebiegu szpiczaka plazmocytoowego. *Postepy Hig Med Dosw.* 2016;70(0):811–9.
4. Charliński G, Wiater E. Szpiczak plazmocytoowy - praktyczne aspekty dotyczące diagnostyki i leczenia. *Hematologia.* 2014;5(4):317–31.
5. Fernández de Larrea C, Kyle R, Rosiñol L, Paiva B, Engelhardt M, Usmani S, et al. Primary plasma cell leukemia: consensus definition by the International Myeloma Working Group according to peripheral blood plasma cell percentage. *Blood Cancer J.* 2021;11(12):1–5.
6. Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2022 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol.* 2022;97(8):1086–107.
7. Leung N, Bridoux F, Hutchison CA, Nasr SH, Cockwell P, Ferman J, et al. Monoclonal gammopathy of renal significance: When MGUS is no longer undetermined or insignificant. *Blood.* 2012;120(22):4292–5. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2012-07-445304>.
8. Leung N, Bridoux F, Batuman V, Chaidos A, Cockwell P, D'Agati VD, et al. The evaluation of monoclonal gammopathy of renal significance: a consensus report of the International Kidney and Monoclonal Gammopathy Research Group. *Nat Rev Nephrol.* 2019;15(1):45–59.
9. Skwierawska K, Waszczuk-Gajda A, Perkowska-Ptasińska A, Basak G, Jędrzejczak WW. Monoclonal gammopathy of renal significance. *Acta Haematol Pol.* 2018;49(2):50–8.
10. Ferman J, Bridoux F, Dispenzieri A, Jaccard A, Kyle RA, Leung N, et al. Monoclonal gammopathy of clinical significance: A novel concept with therapeutic implications.

- Blood. 2018;132(14):1478–85.
11. Dispenzieri A. Monoclonal gammopathies of clinical significance. *Hematol (United States)*. 2020;20(1):380–8.
 12. Usnarska-Zubkiewicz L. Monoclonal gammopathy of clinical significance (MGCS): when monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) is no longer undetermined. *Acta Haematol Pol*. 2021;52(4):382–9.
 13. Bradwell AR. Serum free light chain analysis plus Hevylite. THE BINDING SITE Group LT; 2015. 416 p.
 14. Hejl C, Mestiri R, Carmoi T, Bugier S, Chianea D, Renard C, et al. IgE monoclonal gammopathy: A case report and literature review. *Clin Biochem*. 2018;51(September 2017):103–9.
 15. Giannopoulos K, Jamroziak K, Usnarska-Zubkiewicz L, Dytfeld D, Jurczyszyn A, Walewski J, et al. Zalecenia Polskiej Grupy Szpiczakowej dotyczące rozpoznawania i leczenia szpiczaka plazmocytoowego oraz innych dyskrazji plazmocytoowych na rok 2018/2019. *Acta Haematol Pol*. 2018;49(4):157–206.
 16. Rodziewicz-Lurzyńska A, Bobilewicz D. Rola badań laboratoryjnych w diagnostyce szpiczaka mnogiego i innych dyskrazji plazmocytoów. *Diagn Lab*. 2015;51(1):43–52.
 17. Dmoszyńska A, Giannopoulos K, Wydawnictwo Czelej. Szpiczak plazmocytoowy i inne dyskrazje plazmocytoowe. Wydawnictwo Czelej; 2015.
 18. Katzmann JA, Clark RJ, Abraham RS, Bryant S, Lymp JF, Bradwell AR, et al. Serum reference intervals and diagnostic ranges for free κ and free λ immunoglobulin light chains: Relative sensitivity for detection of monoclonal light chains. *Clin Chem*. 2002;48(9):1437–44.
 19. Ludwig H, Milosavljevic D, Zojer N, Faint JM, Bradwell AR, Hübl W, et al. Immunoglobulin heavy/light chain ratios improve paraprotein detection and monitoring, identify residual disease and correlate with survival in multiple myeloma patients. *Leukemia*. 2013;27(1):213–9.
 20. Kudyba E, Wróbel T. Oznaczenia wolnych łańcuchów lekkich i par łańcuchów ciężki / lekki w diagnostyce szpiczaka plazmocytoowego oraz w innych chorobach związanych z dyskrazją komórek plazmatycznych. *Diagn Lab*. 2017;53(1):41–6.
 21. Katzmann JA, Willrich MA V, Kohlhagen MC, Kyle RA, Murray DL, Snyder MR, et al. Monitoring IgA multiple myeloma: Immunoglobulin heavy/light chain assays. *Clin Chem*. 2015;61(2):360–7.
 22. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, et al.

- International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 2014;15(12):e538–48.
23. D’Anastasi M, Notohamiprodjo M, Schmidt GP, et al. Tumor Load in Patients With Multiple Myeloma: β 2 -Microglobulin Levels Versus Whole-Body MRI. *Am J Roentgenol.* 2014;203(4):854–62.
 24. Kazmann JA, Kyle RA, Benson K J, Larson DR, Melissa R, Lust JA, et al. Screening panels for monoclonal gammopathy. *Clin Chem.* 2013;55(8):1517–22.
 25. Regeniter A, Siede WH. Peaks and tails: Evaluation of irregularities in capillary serum protein electrophoresis. *Clin Biochem.* 2018;51:48–55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2017.09.017>
 26. Keren DF, Schroeder L. Challenges of measuring monoclonal proteins in serum. Vol. 54, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.* 2016. p. 947–61.
 27. Schild C, Wermuth B, Trapp-Chiappini D, Egger F, Nuoffer JM. Reliability of M protein quantification: Comparison of two peak integration methods on Capillarys 2. *Clin Chem Lab Med.* 2008;46(6):876–7.
 28. Sun W, Sun J, Zou L, Shen K, Zhong D, Zhou D, et al. The successful diagnosis and typing of systemic amyloidosis using a microwave-assisted filter-aided fast sample preparation method and LC/MS/MS analysis. *PLoS One.* 2015;10(5):1–16.
 29. Howell D, Smith A, Appleton S, Bagguley T, Macleod U, Cook G, et al. Multiple myeloma: routes to diagnosis, clinical characteristics and survival – findings from a UK population-based study. *Br J Haematol.* 2017;177(1):67–71.
 30. Giannopoulos K, Dwilewicz-Trojaczek J, Stompór T, Ligocki P, Stopiński M, Sutkowski M, et al. Challenges in early diagnosis of multiple myeloma - Diagnostic algorithm. *Acta Haematol Pol.* 2019;50(3):121–9.
 31. Jurczyszyn A, Skotnicki AB. Szpiczak mnogi wybrane zagadnienia Tom II. 2011. 294 p.
 32. Banaszkiewicz M, Małyszko J, Batko K, Koc-Żórawska E, Żórawski M, Dumnicka P, et al. The Key Role of Hepcidin-25 in Anemia in Multiple Myeloma Patients with Renal Impairment. *Med.* 2022;58(3).
 33. Hussain A, Almenfi HF, Almeshdewi AM, Hamza MS, Bhat MS, Vijayashankar NP. Laboratory Features of Newly Diagnosed Multiple Myeloma Patients. *Cureus.* 2019;11(5).
 34. Koshiairis C, Van Den Bruel A, Oke JL, Nicholson BD, Shephard E, Braddick M, et al. Early detection of multiple myeloma in primary care using blood tests: A case-control

- study in primary care. *Br J Gen Pract.* 2018;68(674):e586–93.
35. Budziszewska BK. Zaburzenia metaboliczne i wodno-elektrolitowe u pacjentów z hematologicznymi chorobami nowotworowymi. *Hematologia.* 2018;9(1):22–37.
 36. Jurczyszyn A, Skotnicki AB. Szpiczak mnogi przypadki kliniczne Tom III. 2012. 161 p. www.fn.viamedica.pl.
 37. Larsen PB, Vikeså J, Friis-Hansen L. EDTA-induced pseudothrombocytosis and citrate-induced platelet agglutination in a patient with Waldenstrom macroglobulinemia. *Clin Case Reports.* 2017;5(8):1243–7.
 38. Iwaniec T, Zdziarska J, Jurczyszyn A. Abnormal hemostasis screening tests leading to diagnosis of multiple myeloma. *Acta Haematol Pol.* 2019;50(1):32–5.
 39. Koumpis E, Florentin M, Hatzimichael E, Liamis G. Hyponatremia in patients with hematologic diseases. *J Clin Med.* 2020;9(11):1–24.
 40. Warren JS. Clinically unsuspected cryoglobulinemia: Cases that present as laboratory artifact. *Am J Clin Pathol.* 2013;139(3):352–9.
 41. Tang F, Malek E, Math S, Schmotzer CL, Beck RC. Interference of therapeutic monoclonal antibodies with routine serum protein electrophoresis and immunofixation in patients with myeloma: frequency and duration of detection of daratumumab and elotuzumab. *Am J Clin Pathol.* 2018;150(2):121–9.
 42. Wlazeł RN, Janeczko A, Rośniak-Bąk K. Analiza porównawcza dostępnych na rynku metod oznaczania stężenia białka w moczu w aspekcie decyzji klinicznych – o czym ciągle zapominamy. *Diagn Lab.* 2016;52(2):115–22.
 43. Oyaert M, Delanghe JR. Semiquantitative, fully automated urine test strip analysis. *J Clin Lab Anal.* 2019;33(5):1–7.
 44. Usnarska-Zubkiewicz L, Kulickowski K. Wolne łańcuchy lekkie w surowicy – znaczenie diagnostyczne i prognostyczne w dyskracjach plazmocytowych. *Acta Haematol Pol.* 2009;40(2):349–61.
 45. Gumółka I, Lichoń ED, Basa J. Ocena przydatności oznaczania w surowicy krwi stężenia wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin w diagnostyce chorych z dyskracjami plazmocytowymi. *Ann Acad Medicae Silesiensis.* 2013;67(4):249–55.
 46. Jenner E. Serum free light chains in clinical laboratory diagnostics. *Clin Chim Acta.* 2014;427:15–20.
 47. Bradwell AR. Highly Sensitive, Automated Immunoassay for Immunoglobulin Free Light Chains in Serum and Urine. *Clin Chem.* 2001;47(4):673–680.
 48. Kumar SK, Dispenzieri A, Lacy MQ, Hayman SR, Buadi FK, Zeldenrust SR, et al.

- Changes in serum-free light chain rather than intact monoclonal immunoglobulin levels predicts outcome following therapy in primary amyloidosis. *Am J Hematol.* 2011;86(3):251–5.
49. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, Durie B, Landgren O, Moreau P, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 2016;17(8):e328–46.
 50. Vercammen M, Meirlaen P, Broodtaerts L, Broek I Vande, Bossuyt X. Effect of sample dilution on serum free light chain concentration by immunonephelometric assay. *Clin Chim Acta.* 2011;412(19–20):1798–804.
 51. Levinson SS. Hook effect with lambda free light chain in serum free light chain assay. *Clin Chim Acta.* 2010;411(21–22):1834–6.
 52. Vercammen MJ, Broodtaerts L, Meirlaen P, Bossuyt X. Overestimation of free light chain antigen excess rate. *Clin Chim Acta.* 2015;444:297–302.
 53. Bosmann M, Kößler J, Stolz H, Walter U, Knop S, Steigerwald U. Detection of serum free light chains: The problem with antigen excess. *Clin Chem Lab Med.* 2010;48(10):1419–22.
 54. Dyrka A. Ocena testu Freelite® - ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin do wykrywania i monitorowania gammapatii monoklonalnych w porównaniu z metodami elektroforetycznymi u pacjentów ze szpiczakiem mnogim. Pr Doktorska Uniw Jagielloński Coll Medicum Wydz Lek , Promot Dr hab Ryszard Drożdż. 2012.
 55. Campbell JP, Cobbold M, Wang Y, Goodall M, Bonney SL, Chamba A, et al. Development of a highly-sensitive multi-plex assay using monoclonal antibodies for the simultaneous measurement of kappa and lambda immunoglobulin free light chains in serum and urine. *J Immunol Methods.* 2013;391(1–2):1–13.
 56. Messiaen AS, De Sloovere MMW, Claus PE, Vercammen M, Van Hoovels L, Heylen O, et al. Performance Evaluation of Serum Free Light Chain Analysis: Nephelometry vs Turbidimetry, Monoclonal vs Polyclonal Reagents. *Am J Clin Pathol.* 2017;147(6):611–22.
 57. Te Velthuis H, Drayson M, Campbell JP. Measurement of free light chains with assays based on monoclonal antibodies. *Clin Chem Lab Med.* 2016;54(6):1005–14.
 58. Hoedemakers RMJ, Pruijt JFM, Hol S, Teunissen E, Martens H, Stam P, et al. Clinical comparison of new monoclonal antibody-based nephelometric assays for free light chain kappa and lambda to polyclonal antibody-based assays and immunofixation

- electrophoresis. *Clin Chem Lab Med*. 2012;50(3):489–95.
59. Nicole M.A, White-Al Habeeb, Earle T, Spencer M, Blasutig IM. Evaluation of the N-latex serum free light chain assay on the Siemens BNII analyzer and agreement with The Binding Site FreeLite assay on the SPAPLus. *Clin Biochem*. 2018;51.
 60. Henriot B, Rouger E, Rousseau C, Escoffre M, Sébillot M, Bendavid C, et al. Prognostic value of involved/uninvolved free light chain ratio determined by Freelite and N Latex FLC assays for identification of high-risk smoldering myeloma patients. *Clin Chem Lab Med*. 2019;57(9):1397–405.
 61. Te Velthuis H, Knop I, Stam P, Van Den Broek M, Bos HK, Hol S, et al. N Latex FLC - New monoclonal high-performance assays for the determination of free light chain kappa and lambda. *Clin Chem Lab Med*. 2011;49(8):1323–32.
 62. Stoimenis D, Spyridonidou C, Papaioannou N. Transient Monoclonal Gammopathy Induced by Disseminated Staphylococcus aureus Infection . *Case Rep Med*. 2012;2012(Table 1):1–5.
 63. Sucak G, Suyanı E, Ozkurt ZN, Yegin ZA. Abnormal protein bands in patients with multiple myeloma after haematopoietic stem cell transplantation: does it have a prognostic significance? *Hematol Oncol*. 2010;28(February):180–184.
 64. Schmitz MF, Otten HG, Franssen LE, van Dorp S, Strooisma T, Lokhorst HM, et al. Secondary monoclonal gammopathy of undetermined significance after allogeneic stem cell transplantation in multiple myeloma. *Haematologica*. 2014;99(12):1846–53.
 65. Zou D, An G, Zhu G, Wang J, Shi L, Meng H, et al. Secondary monoclonal gammopathy of undetermined significance is frequently associated with high response rate and superior survival in patients with plasma cell dyscrasias. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;20(3):319–25.
 66. Kamińska J., Koper O. M., Piechal K., Kemona H. Stwardnienie rozsziane-etiotogeneza i możliwości diagnostyczne. *Postep Hig Med Dosw*. 2017;71:551–63.
 67. Napodano C , Gulli F, Marino M, et al. Cryoglobulins: Identification, classification, and novel biomarkers of mysterious proteins. *Ann Oncol*. 2020;(January):19–21.
 68. Mewawalla P, Geller AB, Silver JS. Hyperviscosity syndrome in a patient with kappa light chain myeloma with cryoglobulin properties and alpha thalassemia. *Leuk Res*. 2010;34(12):e315–6.
 69. Hsu JH, Fang YW, Yang AH, Tsai MH. Mixed cryoglobulinemic membranoproliferative glomerulonephritis due to monoclonal gammopathy of undetermined significance: A case report. *Med (United States)*. 2018;97(37):0–3.

70. Riaz N, Wolden SL, Gelblum DY, Eric J. Clinical presentation and outcomes of patients with type 1 monoclonal cryoglobulinemia. 2016;118(24):6072–8.
71. Tisończyk J, Drozd R. Krioglobuliny. Around the sample Biuletyn Laboratoryjnej Diagnostyki Medycznej. 2015;1(2):5–14.
72. Sargur R, White P, Egner W. Review Article Cryoglobulin evaluation : best practice ? Ann Clin Biochem. 2010;47:8–16.
73. Damoiseaux J. The diagnosis and classification of the cryoglobulinemic syndrome. Autoimmun Rev. 2014;13(4–5):359–62.
74. Debski J, Usnarska-Zubkiewicz L, Kuliczkowski K. Szpiczak plazmocytowy powikłany zespołem nadlepkości u chorego z otepieniem niewiadomego pochodzenia. Hematologia. 2015;6:16–9.
75. Kwaan HC. Hyperviscosity in plasma cell dyscrasias. Clin Hemorheol Microcirc. 2013;55(1):75–83.
76. Jurczyszyn A, Kosmaczewska A, Skotnicki AB. Daratumumab – przełomowy lek w terapii szpiczaka plazmocytoowego Daratumumab – breakthrough drug in multiple myeloma therapy. Postep Hig Med Dosw. 2014;68:1352–60.
77. Jelinek T, Hajek R. Monoclonal antibodies - A new era in the treatment of multiple myeloma. Blood Rev. 2016;30(2):101–10.
78. Jung SH, Lee HJ, Vo MC, Kim HJ, Lee JJ. Immunotherapy for the treatment of multiple myeloma. Crit Rev Oncol Hematol. 2017;111:87–93.
79. McCudden C, Axel AE, Slaets D, Dejoie T, Clemens PL, Frans S, et al. Monitoring multiple myeloma patients treated with daratumumab: Teasing out monoclonal antibody interference. Clin Chem Lab Med. 2016;54(6):1095–104.
80. Sherbenou DW, Mark TM, Forsberg P. Monoclonal Antibodies in Multiple Myeloma: A New Wave of the Future. Clin Lymphoma, Myeloma Leuk. 2017;17(9):545–54.
81. Murata K, McCash SI, Carroll B, Lesokhin AM, Hassoun H, Lendvai N, et al. Treatment of multiple myeloma with monoclonal antibodies and the dilemma of false positive M-spikes in peripheral blood. Clin Biochem. 2018;51:66–71.
82. Song J, Fu R. Review: Effects of anti-CD38 monoclonal antibodies on red blood cell transfusion and interventions. J Clin Lab Anal. 2021;35(12):1–3.
83. Quach H, Benson S, Haysom H, Wilkes AM, Zacher N, Cole-Sinclair M, et al. Considerations for pre-transfusion immunohaematology testing in patients receiving the anti-CD38 monoclonal antibody daratumumab for the treatment of multiple myeloma. Intern Med J. 2018;48(2):210–20.

84. Bub CB, Reis IN, Aravechia MG, Santos LD, Bastos EP, Kutner JM, et al. Transfusion management for patients taking an anti-CD38 monoclonal antibody. *Hematol Transfus Cell Ther.* 2018;40(1):25–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjhh.2017.09.003>.
85. Hosokawa M, Kashiwagi H, Nakayama K, Sakuragi M, Nakao M, Morikawa T, et al. Distinct effects of daratumumab on indirect and direct antiglobulin tests: a new method employing 0.01 mol/L dithiothreitol for negating the daratumumab interference with preserving K antigenicity (Osaka method). *Transfusion.* 2018;58(12):3003–13.
86. Habicht CP, Ridders M, Grueger D, Adolph S, Immenschuh S, Schneeweiss C. Mitigation of therapeutic anti-CD38 antibody interference with fab fragments: How well does it perform? *Transfusion.* 2023;(December 2022):808–16.
87. Fotiou D, Sergentanis TN, Papageorgiou L, Stamatelopoulos K, Gavriatopoulou M, Kastritis E, et al. Longer procoagulant phospholipid-dependent clotting time, lower endogenous thrombin potential and higher tissue factor pathway inhibitor concentrations are associated with increased VTE occurrence in patients with newly diagnosed multiple myeloma: results. *Blood Cancer J.* 2018;8(11). <http://dx.doi.org/10.1038/s41408-018-0135-y>.
88. Wu X yao, Yin Y feng, Teng J lin, Zhang L wei, Yang C de. IgMk paraprotein from gammopathy patient can bind to cardiolipin and interfere with coagulation assay: A case report. *BMC Immunol.* 2017;18(1):1–4.
89. Post GR, Guillory E, Wade CL, LeSourd SE, Post SR. Effect of serum immunoglobulins on routine coagulation tests: A comparison of coagulation analyzers using mechanical and optical clot detection. *Ann Clin Lab Sci.* 2017;47(6):744–6.
90. Margetić S, Čelap I, Dukić L, Vukasović I, Virović-Jukić L. Interference of M-protein on prothrombin time test – case report. *Biochem Medica.* 2016;26(2):248–54.
91. Lesokhin AM, Arnulf B, Niesvizky R, Mohty M, Bahlis NJ, Tomasson MH, et al. Initial safety results for MagnetisMM-3: A phase 2 trial of elranatamab, a B-cell maturation antigen (BCMA)-CD3 bispecific antibody, in patients (pts) with relapsed/refractory (R/R) multiple myeloma (MM). *J Clin Oncol.* 2022;40(16_suppl):8006–8006.
92. Pop VS, Tomoaia G, Parvu A. Modern imaging techniques in the monitoring of patients with multiple myeloma. *Med Pharm Reports.* 2022;95(4):377–84.
93. Chrzan R, Jurczyszyn A, Urbanik A. Whole-body low-dose computed tomography (WBLDCT) in assessment of patients with multiple myeloma – Pilot study and standard imaging protocol suggestion. *Polish J Radiol.* 2017;82:356–63.
94. Murray DL, Ryu E, Snyder MR, Katzmman JA. Quantitation of serum monoclonal

- proteins: Relationship between agarose gel electrophoresis and immunonephelometry. *Clin Chem*. 2009;55(8):1523–9.
95. Padelli M, Labouret T, Labarre M, Reun E Le, Rouillé A, Kerspern H, et al. Systematic overestimation of human serum albumin by capillary zone electrophoresis method due to monoclonal immunoglobulin interferences. *Clin Chim Acta*. 2019;491(December 2018):74–80.
 96. Willrich MA V., Long TA, Bashleben C, Fink SL, Rudolf JW, Peterson D, et al. Performance of perpendicular drop versus tangent skimming gating of M-protein in proficiency testing challenges. *Clin Chem Lab Med*. 2020;59(1):E19–22.
 97. Miller JJ, Taher J, Kulasingam V, Chan PC. To skim or splice? Comparing the quantification of M-proteins using two peak-integration protocols across multiple electrophoresis platforms. *Clin Biochem*. 2022;102(January):44–9.
 98. Oyaert M, Delanghe J. Progress in automated urinalysis. *Ann Lab Med*. 2018;39(1):15–22.
 99. Arrell MS, Kálmán F. Estimation of protein concentration at high sensitivity using SDS-capillary gel electrophoresis-laser induced fluorescence detection with 3-(2-furoyl)quinoline-2-carboxaldehyde protein labeling. *Electrophoresis*. 2016;37(22):2913–21.
 100. Tate JR, Gill D, Cobcroft R, Hickman PE. Practical considerations for the measurement of free light chains in serum. *Clinical Chemistry*. 2003.
 101. Daval S, Tridon A, Mazon N, Ristori JM, Evrard B. Risk of antigen excess in serum free light chain measurements. *Clin Chem*. 2007;53:1985–6.
 102. Palladini G, Russo P, Bosoni T, Verga L, Sarais G, Lavatelli F, et al. Identification of amyloidogenic light chains requires the combination of serum-free light chain assay with immunofixation of serum and urine. *Clin Chem*. 2009;55:499–504.
 103. Walker S, Payne D. Serum free light chain analysis using the Optilite® analyser: a clinical laboratory perspective S. 70th AACC Annu Sci Meet. 2018;(A-035):45.
 104. Drayson M, Tang LX, Drew R, Mead GP, Carr-Smith H, Bradwell AR. Serum free light-chain measurements for identifying and monitoring patients with nonsecretory multiple myeloma. *Blood*. 2001;97(9):2900–2.
 105. Le Bricon T, Bengoufa D, Benlakehal M, Bousquet B, Erlich D. Urinary free light chain analysis by the Freelite® immunoassay: A preliminary study in multiple myeloma. *Clin Biochem*. 2002;35(7):565–7.
 106. Willrich MAV, Katzmán JA. Laboratory testing requirements for diagnosis and follow-

- up of multiple myeloma and related plasma cell dyscrasias. Vol. 54, Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2016. p. 907–19.
107. Jacobs JFM, Tate JR, Merlini G. Is accuracy of serum free light chain measurement achievable? Clin Chem Lab Med. 2016;54(6):1021–30.
 108. Di Noto G, Cimpoiu E, Dossi A, Paolini L, Radeghieri A, Caimi L, et al. Polyclonal versus monoclonal immunoglobulin-free light chains quantification. Ann Clin Biochem. 2015;52(3).
 109. Cotten SW, Shajani-Yi Z, Cervinski MA, Voorhees T, Tuchman SA, Korpi-Steiner N. Reference intervals and diagnostic ranges for serum free κ and free λ immunoglobulin light chains vary by instrument platform: Implications for classification of patient results in a multi-center study. Clin Biochem. 2018;58(May):100–7.
 110. Morales-García LJ, Pacheco-Delgado MS. Serum free light chain reference intervals in an Optilite and their influence on clinical guidelines. Clin Biochem. 2021;92(February):54–60.
 111. de Rooij E, Verheul R, de Vreede M, de Jong Y. Cytomegalovirus infection with pulmonary embolism, splenic vein thrombosis and monoclonal gammopathy of undetermined significance: a case and systematic review. BMJ Case Rep. 2019;12(3):e226448.
 112. Conant JL, Rabinowitz I, Zhang QY. Transient monoclonal gammopathy induced by Candida fungemia. Hum Pathol. 2018;75:154–8.
 113. Ning R, Zhang X, Guo X, Li Q. Staphylococcus aureus regulates secretion of interleukin-6 and monocyte chemoattractant protein-1 through activation of nuclear factor kappaB signaling pathway in human osteoblasts. Brazilian J Infect Dis. 2011;15(3):189–94.
 114. Jameson E, Jones S, Je W. Cochrane Database of Systematic Reviews for treating mucopolysaccharidosis type I. Cochrane Database Syst Rev. 2013;(11):1–20.
 115. Kloska A, Tylki-szymańska A, Węgrzyn G. Mukopolisacharydozy — biochemiczne mechanizmy chorób oraz możliwości terapeutyczne. Postepy Biochem. 2011;2:133–47.
 116. Rikhi R, Bhattad S, Jindal A, Saikia B, Garg R, Rawat A, et al. Monoclonal Gammopathy of Unclear Significance in a Child with Wiskott-Aldrich Syndrome: a Rare Occurrence. J Clin Immunol. 2019;39(1):7–10.
 117. García-Álvarez KG, Garibaldi-Covarrubias R, Flores-Márquez MR, Ortiz-Hidalgo C. Plasma cell myeloma associated with Epstein-Barr virus infection in an 11-year-old girl. Pediatr Dev Pathol. 2012;15(4):339–42.
 118. Miranda AD, Rivero-Garvía M, Mayorga-Buiza MJ, Pancucci G, Valencia-Anguita J,

- Márquez-Rivas J. Plasmocytoma of C1 in a child. Case report. *Child's Nerv Syst.* 2015;31(2):325–8.
119. Maisnar V, Tichý M, Smolej L, Žák P, Radocha J, Palička V, et al. Isotype class switching after transplantation in multiple myeloma. *Neoplasma.* 2007;54(3):225–8.
 120. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis. *Ann Neurol.* 2001;50(1):121–7.
 121. Li J, Zhang X, Hao H, Fan S, Xu Y. Multiple myeloma with *Echinococcus granulosus* infection diagnosed by detection of oligoclonal bands: A case report. *Medicine (Baltimore).* 2021;100(9):e24709.
 122. Soares Vieira da Silva L, de Queiroz Crusoe E, de Souza Sampaio Almeida M, de Sousa LRG, Perez AL, Cury P, et al. Prevalence of oligoclonal bands in multiple myeloma patients who achieved at least very good partial response after treatment with standard or high dose chemotherapy- final analysis. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2015;15:e104. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clml.2015.07.275>.
 123. Fujisawa M, Seike K, Fukumoto K, Suehara Y, Fukaya M, Sugihara H, et al. Oligoclonal bands in patients with multiple myeloma: Its emergence per se could not be translated to improved survival. *Cancer Sci.* 2014;105(11):1442–6.
 124. Keuren JFW, Raijmakers MTM, Oosterhuis WP, Leers MPG. Drastic effects of cryoglobulin on blood cell counts, erythrocyte morphology and M-protein analysis. *Scand J Clin Lab Invest.* 2010;70(6):462–4.
 125. Edwards GM, Alejmi A. Cryoglobulinaemic vasculitis in light chain myeloma. *Clin Med J R Coll Physicians London.* 2021;21(1):E106–7.
 126. Moore LM, Cho S, Thoren KL. MALDI-TOF mass spectrometry distinguishes daratumumab from M-proteins. *Clin Chim Acta.* 2019;492(October 2018):91–4.
 127. Murray DL, Puig N, Kristinsson S, Usmani SZ, Dispenzieri A, Bianchi G, et al. Mass spectrometry for the evaluation of monoclonal proteins in multiple myeloma and related disorders: an International Myeloma Working Group Mass Spectrometry Committee Report. *Blood Cancer J.* 2021;11(2):4–9. <http://dx.doi.org/10.1038/s41408-021-00408-4>.
 128. Van De Donk NWCJ, Otten HG, El Haddad O, Axel A, Sasser AK, Croockewit S, et al. Interference of daratumumab in monitoring multiple myeloma patients using serum immunofixation electrophoresis can be abrogated using the daratumumab IFE reflex

- assay (DIRA). Clin Chem Lab Med. 2016;54(6):1105–9.
129. Rosenberg AS, Bainbridge S, Pahwa R, Jialal I. Investigation into the interference of the monoclonal antibody daratumumab on the free light chain assay. Clin Biochem. 2016;49(15):1202–4.
 130. Geng C, Yang G, Wang H, Zhang Z, Zhou H, Chen W. The Prognostic Role of Prothrombin Time and Activated Partial Thromboplastin Time in Patients with Newly Diagnosed Multiple Myeloma. Biomed Res Int. 2021;2021.