

Zalecenia Grupy Roboczej ds. Raportowania Wyników Elektroforezy Białek (RaWEB) surowicy Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej. 2023

The Society of Laboratory Diagnostics Working Group
recommendations for serum protein electrophoresis. 2023

Olga Ciepela (Przewodnicząca)^{1,2}, Justyna Cofta³, Ryszard Drożdż⁴, Maciej Korpysz^{5,6}, Barbara Kruk⁷, Aleksandra Ludziejewska^{3,8}, Jarosław Materski⁹, Anna Rodziewicz-Lurzyńska², Iwona Słowikowska¹⁰, Barbara Tarasiewicz¹¹, Anna Ząbek-Adamska¹²

¹Zakład Medycyny Laboratoryjnej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa, Polska

²Laboratorium Centralnego Szpitala Klinicznego Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w Warszawie, Polska

³Dział Diagnostyki Laboratoryjnej, Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Poznaniu, Polska

⁴Zakład Diagnostyki Medycznej, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków, Polska

⁵Zakład Diagnostyki Biochemicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Polska

⁶Dział Diagnostyki Laboratoryjnej Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego nr 1 w Lublinie, Polska

⁷Zakład Diagnostyki Hematologicznej, Instytut Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie, Polska

⁸Katedra i Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Polska

⁹Product Manager ds. elektroforezy P.P.H.U BOR-POL Mariusz Borkowski, Gliwice, Polska

¹⁰Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, 4. Wojskowy Szpital Kliniczny z Polikliniką SP ZOZ we Wrocławiu, Polska

¹¹Uniwersyteckie Centrum Kliniczne w Gdańsku, Polska

¹²Zakład Diagnostyki Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie, Polska

Słowa kluczowe: elektroforeza białek surowicy, zalecenia

Keywords: serum protein electrophoresis, recommendations

Received: 06.09.2023

Accepted: 13.09.2023

Published: 00.00.2023

DOI: ????????

Corresponding author:

prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Olga Ciepela, Zakład Medycyny Laboratoryjnej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa, Polska, 02-097 Warszawa, ul. Banacha 1A, tel.: +48 22 599 24 05, e-mail: olga.ciepela@wum.edu.pl

Cite the article as:

Ciepela O, Cofta J, Drożdż R, Korpysz M, Kruk B, Ludziejewska A, Materski J, Rodziewicz-Lurzyńska A, Słowikowska I, Tarasiewicz B, Ząbek-Adamska A. The Polish Society of Laboratory Diagnostics Working Group recommendations for serum protein electrophoresis. 2023 *Diagn Lab.* 2023; 59(3): ??-??



Open access

The content of the journal is available in Open Access formula which means free access to scientific data for researchers and readers.



Copyright

This material is available under the Creative Commons – Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0). The full terms of this license are available on: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>

Licence

Some right reserved: Polish Society of Laboratory Diagnostics. Published by Index Copernicus Sp. z o.o.

Conflict of interests

The authors declare that they have no competing interests.

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	4
1. CEL REKOMENDACJI	5
2. NOMENKLATURA	5
3. MATERIAŁ DO BADAŃ	6
4. TECHNIKI ELEKTROFORETYCZNE	6
4.1 Proteinogram (elektroforeza żelowa (AGE), elektroforeza kapilarna (CE))	6
4.2 Wykrywanie białka monoklonalnego (immunofiksacja, immunosubtrakcja / immunotypowanie)	7
5. BUDOWA SPRAWOZDANIA Z WYNIKÓW ELEKTROFOREZY BIAŁEK SUROWICY	8
5.1 Proteinogram	10
5.2 Badanie w kierunku obecności białka monoklonalnego	10
6. POMIAR ILOŚCIOWY FRAKCJI / BIAŁKA MONOKLONALNEGO	10
6.1 Jednostki i miejsca dziesiętne	13
6.2 Zakresy referencyjne dla frakcji białkowych	13
6.3 Sposób pomiaru stężenia białka monoklonalnego	13
6.4 Pomiar ilościowy białka monoklonalnego we frakcji alfa 2 lub beta globulin	14
6.5 Pomiar ilościowy białka monoklonalnego we frakcji gamma globulin	16
6.6 Pomiar ilościowy białka monoklonalnego – gammapatia biklonalna	17
6.7 Pomiar niskich stężeń białka monoklonalnego i dolna granica pomiaru białka monoklonalnego	18
7. KOMENTARZE DO WYNIKU ELEKTROFOREZY BIAŁEK SUROWICY	20
7.1 Wynik z obecnym białkiem monoklonalnym	20
7.2 Wynik bez dostrzegalnego białka monoklonalnego	21
7.3 Wynik profilu/obrazu oligoklonalnego	22
8. SPRAWOZDANIE Z WYNIKÓW BADANIA W KIERUNKU OBECNOŚCI BIAŁKA MONOKLONALNEGO	23
8.1 Wynik z obecnym białkiem monoklonalnym	23
8.2 Wynik bez białka monoklonalnego	24
8.3 Wynik profilu/obrazu oligoklonalnego	24
9. KONTROLA JAKOŚCI	24
10. INTERFERENCJE	24
10.1 Endogenne czynniki interferujące	25
10.1.1 Fibrynogen	25
10.1.2 Hemoliza	26
10.1.3 Ikteria	26
10.1.4 Lipemia	27



10.1.5 Ludzkie przeciwwierzące przeciwciała (HAAAs).....	27
10.1.6 Poliklonalne IgG4	27
10.2 Egzogenne czynniki interferujące	28
10.2.1 Środki kontrastowe	28
10.2.2 Leki	28
10.2.3 Terapie monoklonalne	28
10.2.4 Substytuty osocza	29
11. MINIMALNE DOŚWIADCZENIE I SPOSÓB PRACY	29
12. OZNACZENIA WOLNYCH LEKKICH ŁAŃCUCHÓW (FLC)	29
12.1 Informacje ogólne	29
12.2 Zastosowanie oznaczeń FLC	30
12.3 Zakres referencyjny i interpretacja wyników FLC	31
13. PIŚMIENNICTWO	33

PREPRINT



WYKAZ SKRÓTÓW

- AGE** – Elektroforeza na żelu agarozowym (ang. *agarose gel electrophoresis*)
- BME** – Beta-merkaptotoetanol
- CE** – Elektroforeza kapilarna (ang. *capillary electrophoresis*)
- CR** – Całkowita remisja (ang. *complete remission*)
- CV** – Współczynnik zmienności (ang. *coefficient of variation*)
- DZM** – Dobowa zbiórka moczu
- EQA** – Zewnętrzna ocena jakości (ang. *external quality assessment*)
- FLC** – Wolne lekkie łańcuchy (immunoglobulin) (ang. *free light chains*)
- HLC** – Pary łańcuchów ciężki/lekki immunoglobulin (ang. *heavy/light chains*)
- HAAAs** – Ludzkie przeciwwierzące przeciwciała (ang. *human anti-animal antibodies*)
- IFCC** – Międzynarodowa Federacja Chemii Klinicznej i Medycyny Laboratoryjnej (ang. *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*)
- IFE** – Immunofiksacja (ang. *immunofixation electrophoresis*)
- IMWG** – Międzynarodowa Grupa Robocza ds. Szpiczaka (ang. *International Myeloma Working Group*)
- INA** – Immunonefelometria (ang. *immunonephelometric assay*)
- ISUB** – Immunosubtrakcja (ang. *immunosubtraction*)
- IT** – Immunotypowanie (ang. *immunotyping*)
- ITA** – Immunoturbidymetria (ang. *immunosubtraction*)
- κf** – Wolne lekkie łańcuchy kappa (immunoglobulin) (ang. *kappa free*)
- LC MM** – Choroba łańcucha lekkiego (ang. *light chain multiple myeloma*)
- λf** – Wolne lekkie łańcuchy lambda (immunoglobulin) (ang. *lambda free*)
- LOQ** – Granica oznaczalności (ang. *limit of quantitation*)
- MGUS** – Gammopatia monoklonalna o nieokreślonym znaczeniu (ang. *monoclonal gammopathy of undetermined significance*)
- MM** – Szpiczak plazmocytowy (ang. *multiple myeloma*)
- MS** – Spektrometria mas (ang. *mass spectrometry*)
- PCR** – Wskaźnik białko/kreatynina (ang. *protein/creatinine ratio*)
- PD** – Pomiar strefy białka monoklonalnego bez odcięcia tła poliklonalnego (rzut prostopadły, ang. *perpendicular drop*)
- PR** – Częściowa remisja (ang. *partial remission*)
- QC** – Kontrola jakości (ang. *quality control*)
- sCR** – Rygorystyczna remisja całkowita (ang. *stringent complete remission*)
- sFLC** – Wolne lekkie łańcuchy (immunoglobulin) w surowicy (ang. *serum free light chains*)
- SPEP** – Elektroforeza białek surowicy (ang. *serum protein electrophoresis*)
- tmAb** – Terapeutyczne przeciwciało monoklonalne (ang. *therapeutic monoclonal antibody*)
- TS** – Pomiar strefy białka monoklonalnego z odcięciem tła poliklonalnego (metoda stycznej, ang. *tangent skimming*)
- uFLC** – Wolne lekkie łańcuchy (immunoglobulin) w moczu (ang. *urine free light chains*)
- UIFE** – Immunofiksacja białek moczu (ang. *urine immunofixation electrophoresis*)
- UPEP** – Elektroforeza białek moczu (ang. *urine protein electrophoresis*)
- VGPR** – Bardzo dobra remisja częściowa (ang. *very good partial remission*)

1. CEL REKOMENDACJI

Proteinogram jest powszechnie wykonywanym badaniem w medycznym laboratorium diagnostycznym. Na przestrzeni lat jego zastosowanie zostało ograniczone do funkcji badania przesiewowego w kierunku gammapatii monoklonalnych i ich monitorowania. Sposób raportowania wyników jest bardzo różny i najczęściej zależy od potrzeb danego ośrodka, w którym wykonywane są badania. Do tej pory opracowano pojedyncze rekomendacje, głównie w językach narodowych, co skutkuje ograniczoną wiedzą na temat standaryzacji raportowania wyników elektroforezy. Zalecenia te często oparte są tylko na opiniach i nie wprowadzają potrzebnej struktury do opracowania jednolitej formy raportowania wyników. Ogromnym zaskoczeniem jest fakt, że IMWG (ang. *International Working Group of Myeloma*), która jest liderem w wydawaniu zaleceń dotyczących diagnozowania, prognozowania i leczenia szpiczaka plazmocytozy, nie podjęła do tej pory prób opracowania rekomendacji odnośnie do raportowania wyników elektroforezy. Zarówno w 2014, jak i 2016 roku zalecali pomiar białka monoklonalnego, nie rekomendując metodologii, której laboratorium powinno używać. W 2017 roku Międzynarodowa Federacja Chemii Klinicznej i Medycyny Laboratoryjnej (IFCC; ang. *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*) postanowiła przyrzeć się raportowaniu wyników elektroforezy białek, powołując roboczą grupę do spraw ujednoczenia komentarzy do wyników. Efektem tej pracy była ankieta oceniająca raportowanie wyników elektroforezy białek surowicy, wolnych łańcuchów lekkich oraz pomiaru niskich

stężeń białka monoklonalnego (30 pytań). Została ona rozesłana do 350 laboratoriów na całym świecie. Wyniki ankiety potwierdziły potrzebę harmonizacji i standaryzacji, jednakże z powodu stosowania różnej metodologii, aparatów i testów IFCC zachęca się towarzystwa kliniczne do opracowania standardów w obrębie własnego kraju [1-3]. Duże kontrowersje dodatkowo budzi sposób pomiaru białka monoklonalnego, a także komentowanie rozdzielców elektroforetycznych, niezwiązanych z gammapatią monoklonalną. Pomimo częściowej automatyzacji badań techniką elektroforezy nadal wymaga się, aby interpretacja wyników była przeprowadzana przez wysoko przeszkolony zespół, który stale powinien pogłębiać swoją wiedzę. Natomiast sprawozdanie z wyników elektroforezy białek surowicy powinno być dla lekarza jasne i czytelne, a pacjentowi umożliwić konsultacje i leczenie w różnych ośrodkach medycznych.

2. NOMENKLATURA

Obecnie zarówno w literaturze naukowej, jak i na wynikach badań laboratoryjnych używanych jest wiele nazw określających białko monoklonalne. Najczęściej stosowane to m.in.: paraproteina, prążek monoklonalny, M-spike, prążek-M, białko monoklonalne Bence'a-Jonesa, białko M, gammaglobulina szpiczakowa. Jest to nieformalny żargon. Nazwy często pochodzą od techniki elektroforetycznej, stosowanej do wykrycia białka monoklonalnego. Nomenklatura, którą się posługujemy, powinna ograniczać możliwość niezrozumienia i/lub pomyłki oraz być jednolita zarówno dla badań wykonywanych w surowicy, jak i moczu (tab. I) [4, 5].

Tabela I. Nomenklatura.

Białko monoklonalne	Opisywanie obecności dodatkowej strefy na wyniku immunofiksacji / immunotypowania białek.
Monoklonalna immunoglobulina	Opisywanie obecności dodatkowej strefy na wyniku immunofiksacji / immunotypowania białek.
Monoklonalny wolny lekki łańcuch immunoglobuliny	Opisywanie obecności monoklonalnego wolnego lekkiego łańcucha (kappa lub lambda) immunoglobuliny na wyniku immunofiksacji/ immunotypowania.
Monoklonalny ciężki łańcuch immunoglobuliny	Opisywanie obecności monoklonalnego ciężkiego łańcucha (gamma, alfa, mi, delta lub epsilon) immunoglobulin (nie połączonego z lekkim łańcuchem) na wyniku immunofiksacji/ immunotypowania.
Profil immunoglobulin oligoklonalnych	Opisywanie obecności dwóch lub więcej stref oligoklonalnych we frakcji gamma globulin na wyniku elektroforezy lub immunofiksacji / immunotypowania białek.

ZALECENIA

Terminy powinny być stosowane zarówno do opisu wyniku surowicy i moczu, bez skrótów.

Nie zaleca się używania nazw: paraproteina, białko M, białko monoklonalne Bence'a-Jonesa.

3. MATERIAŁ DO BADAŃ

Materiałem diagnostycznym do przeprowadzenia rozdziału elektroforetycznego białek, immunofiksacji/immunotypowania oraz pomiaru stężenia wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin (FLC; ang. *free light chains*) jest surowica krwi oraz mocz. Zaleca się pobranie krwi na czczo. W celu monitorowania pacjentów z gammopatią monoklonalną rekomenduje się stosowanie próbki moczu z dobowej zbiórki. Dla badania przesiewowego dopuszcza się ocenę immunofiksacji oraz stężenia FLC w moczu z pierwszej porannej próbki (tab. II) [6, 7].

4. TECHNIKI ELEKTROFORETYCZNE

Dokonując wyboru techniki elektroforetycznej, należy brać pod uwagę jej czułość i swoistość analityczną oraz cel wykonania rozdziału białek surowicy. Ponadto wybór techniki powinien uwzględniać jej koszty, wydajność, rodzaj oprogramowania informatycznego przydatny do interpretacji wyniku oraz inne, osobiste preferencje użytkownika [4]. Obecnie w Polsce w dużych ośrodkach medycznych coraz częściej wykorzystywana jest technika elektroforezy kapilarnej (CE; ang. *capillary electrophoresis*) obok elektroforezy żelowej (AGE; ang. *agarose gel electrophoresis*). Wybierając technikę, należy pamiętać

o różnicach związanych z przydatnością analityczną, a także różną mobilnością wybranych białek, w zależności od zastosowanej techniki (AGE vs CE). Do poprawnej oceny proteinogramu konieczna jest więc znajomość podstawowych białek surowicy krwi, ich funkcji i lokalizacji w rozdziale elektroforetycznym oraz czynników interferujących, które mogą utrudniać właściwą interpretację.

4.1. Proteinogram (elektroforeza żelowa (AGE), elektroforeza kapilarna (CE))

Obecnie technika wykorzystująca żele agarozowe (AGE) jest powszechnie stosowana w laboratoriach medycznych. Służy do rozdziału białek surowicy w polu elektrycznym. Inną techniką jest elektroforeza kapilarna (CE), która w Polsce jest wykorzystywana od ponad dekady. Jest to tzw. elektroforeza w roztworze, w której wykorzystuje się przepływ buforu przez krzemionkową kapilarę po przyłożeniu bardzo wysokiego napięcia, a pomiar rozdzielonych białek przy końcu katodowym dokonywany jest spektrofotometrycznie przy długości fali 200 nm [8].

Zarówno elektroforeza żelowa (AGE), jak i kapilarna (CE) są technikami odpowiednimi do wykonania proteinogramu [4, 5, 9-12]. Rozdział białek surowicy na poszczególne frakcje jest równoważny, choć nie identyczny. Obie techniki mają porównywalną czułość (0,5-1,0 g/l) i swoistość analityczną, przy czym AGE ma nieco lepszą czułość względem wykrywania białka monoklonalnego, a CE wydajność [5, 13]. Ich rozdzielczość umożliwia rozdział frakcji beta globulin na beta 1 i beta 2, dzięki czemu możliwe jest wykrywanie niskich stężeń białka monoklonalnego, migrujących razem z prawidłowymi białkami CE zapewnia lepszą rozdzielczość niż AGE, jednakże

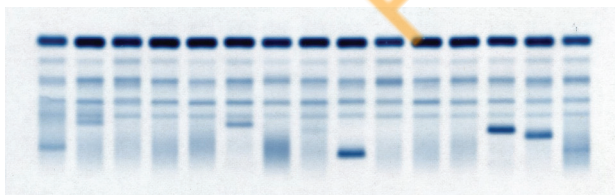
Tabela II. Rodzaj, transport i przechowywanie materiału do rozdziału elektroforetycznego białek oraz oznaczeń sFLC.

RODZAJ MATERIAŁU	TRANSPORT	PRZECHOWYWANIE	
Surowica (po odseparowaniu od elementów morfotycznych)	< 5 h, temperatura pokojowa > 5 h, 2 – 8°C	≤7 dni	2 – 8°C
		8 – 30 dni	–20°C
		>30 dni	–70°C
Mocz	< 1 h, temperatura pokojowa > 1 h, 2 – 8°C	≤3 dni	2 – 8°C
		4 – 30 dni	–20°C
		>30 dni	–70°C



niektóre substancje endogenne i egzogenne mogą pojawiać się jako dodatkowa strefa w elektroforegramie [9, 13, 14]. Wszystkie substancje, które wykazują absorpcję światła przy długości fali 200 nm, mogą zostać wykryte, powodując obniżenie swoistości i utrudniając interpretację wyniku. Dlatego też stosowanie CE nieco zwiększa liczbę wykonywanych badań, służących potwierdzeniu obecności białka monoklonalnego, takich jak immunofiksacja (IFE; ang. *immunofixation electrophoresis*) lub immunosubtrakcja / immunotypowanie (IUSB; ang. *immunosubtraction / IT*; ang. *immunotyping*).

Z kolei w AGE na skanowanie densytometryczne ma wpływ stężenie białka oraz rodzaj używanego barwnika [9]. Dokładność pomiaru frakcji gamma globulin jest dużo niższa niż w CE [9]. Przy wysokich stężeniach białka w surowicy, wiązanie barwnika używanego w AGE nie jest liniowe dla frakcji charakteryzujących się wyższym stężeniem, takich jak albumina lub białko monoklonalne [15]. W badanych próbkach mogą powstawać kompleksy immunologiczne na żelu agarozowym, co utrudnia interpretację i wymaga stosowania BME (beta-merkaptioetanolu) dla uzyskania pełnej rozdzielczości. W płynnym medium CE problem ten większości przypadków nie występuje. W przypadku zmiany techniki elektroforetycznej z AGE na CE wskazane jest porównanie obu metod. Poniżej przedstawiono zdjęcie żelu agarozowego rozdziału białek surowicy (ryc. 1)

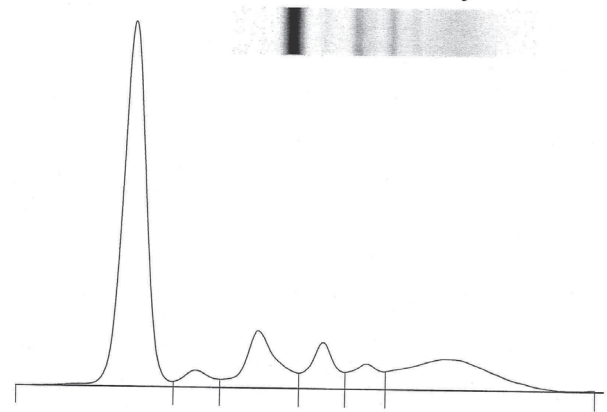


Rycina 1. Elektroforeza żelowa (AGE) – przykładowe rozdziały białek surowicy na żelu agarozowym.

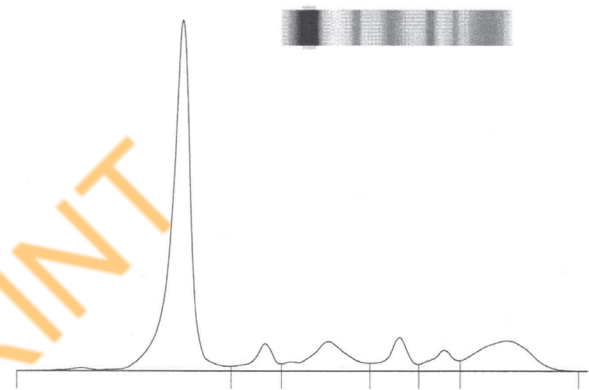
i przykładowy skan densytometryczny jednego z rozdziałów (ryc. 2) oraz rozdział białek surowicy uzyskany metodą elektroforezy kapilarnej (ryc. 3).

4.2. Wykrywanie białka monoklonalnego (immunofiksacja, immunosubtrakcja / immunotypowanie)

Stwierdzenie nieprawidłowości w postaci patologicznej strefy/prążka w proteinogramie wykonanym



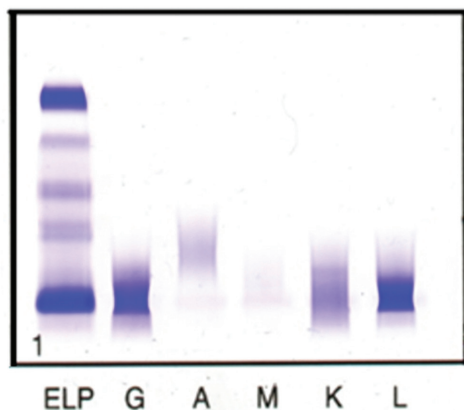
Rycina 2. Skan densytometryczny prawidłowego rozdziału białek surowicy uzyskany techniką elektroforezy żelowej.



Rycina 3. Prawidłowy rozdział białek surowicy uzyskany techniką elektroforezy kapilarnej. Na podstawie uzyskanej krzywej program komputerowy opracowuje obraz rozdziału białek surowicy, który przypomina rozdział na żelu agarozowym.

odpowiednio techniką CE lub AGE może sugerować obecność białka monoklonalnego. W celu weryfikacji należy wykonać badanie uzupełniające, które potwierdzi lub wykluczy jego obecność.

Technika immunofiksacji białek surowicy jest „złotym standardem” w wykrywaniu i identyfikacji białka monoklonalnego. Jest ona 10-krotnie czulsza niż zwykła elektroforeza białek surowicy. Związane jest to z zastosowaniem odpowiednich przeciwciał dla poszczególnych łańcuchów ciężkich i lekkich immunoglobulin. Po wykonaniu sześciu jednoczesnych rozdziałów elektroforetycznych białek surowicy przeprowadzany jest kolejny etap, związany z nałożeniem swoistych przeciwciał na poszczególne ścieżki rozdziału. Po immunoprecypitacji białek z antysurowicami (przeciwciałami) i wybarwieniu żelu możliwe jest wykrycie i identyfikacja izotypu monoklonalnej immunoglobuliny (ryc. 4).



Rycina 4. Immunofiksacja – przykładowy obraz immunofiksacji na żelu agarozowym. Interpretacja: obecne białko monoklonalne IgG lambda.

Rozwój technik elektroforetycznych doprowadził do wprowadzenia elektroforezy kapilarnej, a co za tym idzie opracowania techniki immunotypowania, będącej odpowiednikiem IFE [15, 16]. W technice tej próbka badana mieszana jest z pięcioma różnymi specyficznymi przeciwciałami (anty-G, -A, -M, -K, -L), uzyskując pięć badanych analitów, które analizator rozdziela w kapilarach, natomiast rozdział szóstej próbki (bez przeciwciała) stanowi zwykły proteinogram wykorzystywany jako rozdział wzorcowy. Następnie rozdział wzorcowy automatycznie zostaje nałożony przez system na otrzymane rozdziały z antysurowicami, co pozwala na ocenę zanikania frakcji monoklonalnej i określenie izotypu białka monoklonalnego. Obrazy te są wynikiem reakcji immunosubtrakcji, która polega na utworzeniu się kompleksu antygen–przeciwciało (Ag / Ab), a następnie jego usunięciu z analizowanej mieszaniny. Poniżej przedstawiono przykładowy wynik IT (ryc. 5).

Wykrywanie białka monoklonalnego techniką CE ma porównywalną swoistość w stosunku do IFE, ale obniżoną czułość [4, 11], co sprawia, że stanowi bardziej subiektywną technikę w porównaniu do IFE. Wynika to nie tylko z trudności w interpretacji wyniku, lecz także doświadczenia osoby wykonującej badanie [4]. Zaleca się, w razie zmiany metody z AGE na CE, stosowanie na początku obu technik elektroforetycznych w celach porównawczych. W przypadku niskiego stężenia białka monoklonalnego oraz monoklonalnej IgD i IgE zaleca się wykorzystanie żeli agarozowych w celu weryfikacji [4].

ZALECENIA

Zarówno elektroforeza żelowa (AGE), jak i elektroforeza kapilarna (CE) są technikami odpowiednimi do wykonania proteinogramu.

Zaleca się stosowanie technik, w których frakcja beta globulin jest rozdzielana na frakcję beta 1 i beta 2.

Proteinogramy powinny być wykonywane z zastosowaniem tej samej techniki elektroforetycznej podczas monitorowania prowadzonego leczenia.

Program informatyczny do raportowania wyników powinien zawierać (minimum) opcje, takie jak: pomiaru stężenia białka monoklonalnego, umożliwiającego ocenę wykresu aktualnego i porównanie z wykresem archiwalnym, bazę archiwum, możliwość dodawania komentarzy i moduł kontroli jakości.

Immunofiksacja białek (IFE) jest zalecaną techniką wykrywania i identyfikacji białka monoklonalnego.

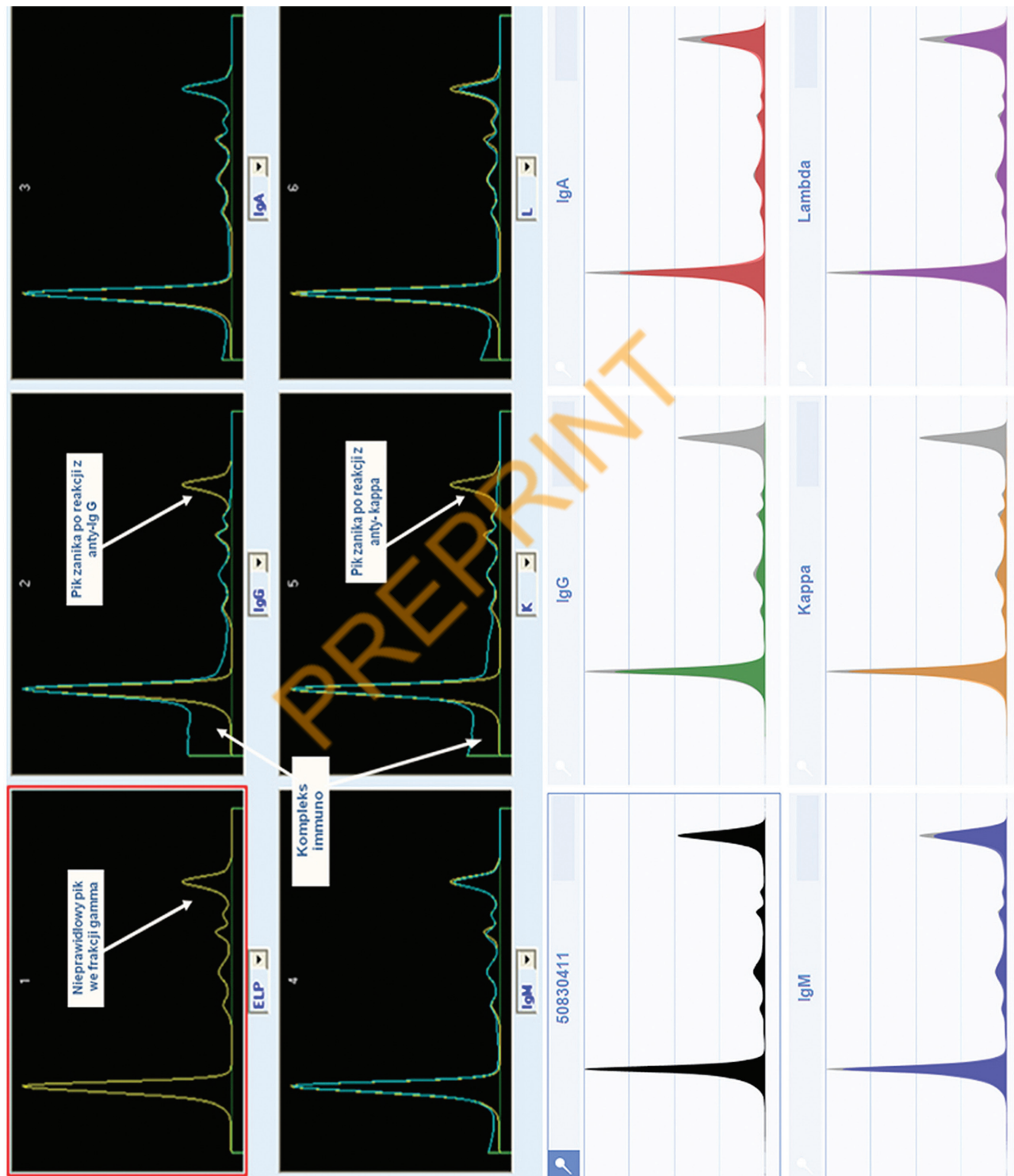
W laboratorium, w którym wykorzystywana jest technika immunosubtrakcji / immunotypowania (ISUB / IT), zaleca się dodatkowo stosowanie immunofiksacji białek (IFE) w celu weryfikacji niskich stężeń białka monoklonalnego (FLC, monoklonalna immunoglobulina) oraz monoklonalnej IgD i IgE.

5. BUDOWA SPRAWOZDANIA Z WYNIKÓW ELEKTROFOREZY BIAŁEK SUROWICY

Głównym celem raportowania wyniku elektroforezy białek surowicy jest zapewnienie kompletnego sprawozdania, w którym będą zawarte spójne informacje w tym samym ustrukturyzowanym formacie, tak aby klinicyści mogli odczytać bez dodatkowego wysiłku ważne informacje z różnych laboratoriów [17]. Dotyczy to nie tylko struktury, treści, sposobu pomiaru stężenia białka monoklonalnego, lecz także komentarzy interpretacyjnych do sprawozdań. Podstawową rolę wykonywania badania elektroforezy białek surowicy jest screening i monitorowanie pacjentów z gammapatią monoklonalną. Dlatego też sprawozdanie z wyników powinno jasno odpowiadać na

pytania: czy jest obecne białko monoklonalne, jaki jest izotyp immunoglobuliny monoklonalnej oraz jakie jest jej stężenie [5, 7]. Odpowiednie opisywanie wyników może znacząco skrócić diagnostykę

gammopatii monoklonalnych, a także zmniejszyć ryzyko błędnej interpretacji, a co za tym idzie ograniczyć wdrażanie niepotrzebnej, kosztownej i inwazyjnej diagnostyki.



Rycina 5. Immunotypowanie – przykładowe wyniki (różne systemy analityczne). Interpretacja: obecne białko monoklonalne IgG kappa.

5.1. Proteinogram

ZALECENIA

Raportowanie frakcji: albumina, alfa 1 globuliny, alfa 2 globuliny, beta 1 globuliny, beta 2 globuliny i gamma globuliny.

Wyniki dla poszczególnych frakcji białek wyrażone w procentach i wartościach bezwzględnych g/l wraz z zakresami referencyjnymi.

Wyniki odpowiednio oflagowywane (\downarrow \uparrow lub L (ang. *low*), H (ang. *high*)).

Na wyniku dodatkowo podane stężenie białka całkowitego i wartość współczynnika A/G (albumina/globuliny) wraz z zakresem referencyjnym.

Sprawozdanie zawiera obowiązkowo wykres rozdziału białek surowicy oraz obraz żelu agarozowego. W przypadku elektroforezy kapilarnej – tylko wykres.

Strefa/prążek białka monoklonalnego powinna być zmierzona i raportowana jako oddzielny parametr w celu ułatwienia długoterminowej oceny postępu choroby.

Stężenie białka monoklonalnego wyrażone w g/l.

W rzadko występujących dyskrazjach z wieloma klonami monoklonalnymi raport powinien przewidywać do 3 pól na pomiar stref monoklonalnych.

W polu komentarza pod wynikiem elektroforezy białek surowicy informacja tam, gdzie to jest wskazane: o prawdopodobnej obecności białka monoklonalnego wraz z zaleceniami w kierunku dodatkowych badań, interpretacja w odniesieniu do zakresu referencyjnego, informacja o immunoparezie i interferencji.

Pod wynikiem informacja o metodzie wykonania badania.

Na rycinie 6 przedstawiono przykładowe sprawozdanie z wyniku elektroforezy białek surowicy.

5.2. Badanie w kierunku obecności białka monoklonalnego

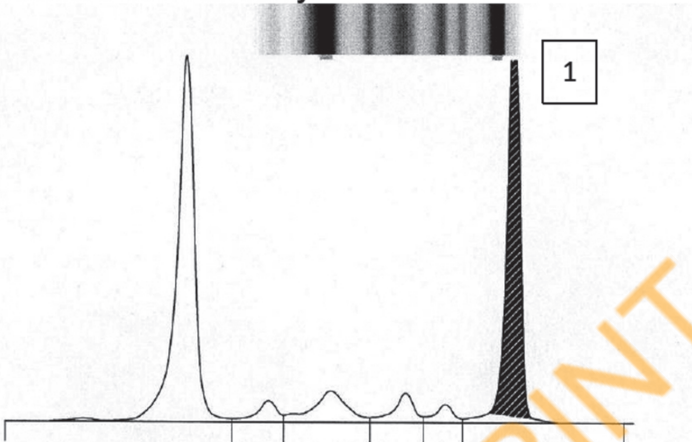
ZALECENIA

Wynik opisowy (obecne / nieobecne białko monoklonalne, wynik niejednoznaczny) z informacją o izotypie białka monoklonalnego.

Opcjonalnie wynik opisowy wraz ze zdjęciem wykonanej IFE / IUSB / IT.

Jeśli białko monoklonalne jest niewidoczne w elektroforezie białek, należy dodatkowo opisać, w której frakcji białek jest obecne.

Pod wynikiem informacja o metodzie wykonania badania.

SPRAWOZDANIE Z WYNIKÓW BADAŃ LABORATORYJNYCH		
Laboratorium:		
Nazwisko:	Imię:	
PESEL:		
Data urodzenia:	Wiek (lata)	Płeć: (K/M)
Lekarz zlecający:		
Oddział:		
Data i godz. pobrania materiału:		Data i godz. przyjęcia materiału:
Nazwa badania	Wynik badania	Zakres referencyjny
<i>Materiał: surowica</i>		
Elektroforeza białek surowicy		
		
Białko całkowite	↑ 102 g/l	62 – 82
A/G	↓ 0,84	0,95 – 1,65
Albumina %	↓ 45,6 %	55,8 – 66,1
Alfa 1 globuliny %	3,0 %	2,9 – 4,9
Alfa 2 globuliny %	7,5 %	7,1 – 11,8
Beta 1 globuliny %	↓ 4,1 %	4,7 – 7,2
Beta 2 globuliny %	↓ 2,3 %	3,2 – 6,5
Gamma globuliny %	↑ 37,5 %	11,1 – 18,8
Pik 1 %	34,3 %	
Albumina g/l	46,5 g/l	40,2 – 47,6
Alfa 1 globuliny g/l	3,1 g/l	2,1 – 3,5
Alfa 2 globuliny g/l	7,7 g/l	5,1 – 8,5
Beta 1 globuliny g/l	4,2 g/l	3,4 – 5,2
Beta 2 globuliny g/l	2,3 g/l	2,3 – 4,7
Gamma globuliny g/l	↑ 38,3 g/l	8,0 – 13,5
Pik 1 g/l	35,0 g/l	
Komentarz: Widoczna dodatkowa strefa we frakcji gamma globulin. Wskazane badanie w kierunku białka monoklonalnego w surowicy i DZM.		
<i>Badanie wykonano techniką elektroforezy kapilarnej</i>		
Badanie wykonał:		Badanie autoryzował:

Rycina 6. Przykładowe sprawozdanie z wyników badań laboratoryjnych – elektroforeza białek surowicy.

Na rycinie 7 przedstawiono przykładowe sprawozdanie z badania w kierunku obecności białka monoklonalnego.

SPRAWOZDANIE Z WYNIKÓW BADAŃ LABORATORYJNYCH		
Laboratorium:		
Nazwisko:	Imię:	
PESEL:	Wiek (lata)	Płeć: (K/M)
Data urodzenia:		
Lekarz zlecający:		
Oddział:		
Data i godz. pobrania materiału:	Data i godz. przyjęcia materiału:	
Nazwa badania	Wynik badania	Zakres referencyjny
Materiał: surowica		
Wykrywanie białka monoklonalnego W badanej surowicy stwierdzono obecność białka monoklonalnego IgG kappa		
Badanie wykonano techniką immunofiksacji		
Badanie wykonał:	Badanie autoryzował:	

Rycina 7. Przykładowe sprawozdanie z wyników badań laboratoryjnych – wykrywanie białka monoklonalnego w surowicy metodą immunofiksacji.

6. POMIAR ILOŚCIOWY FRAKCJI / BIAŁKA MONOKLONALNEGO

Pomiar stężenia białka monoklonalnego ma kluczowe znaczenie dla stratyfikacji ryzyka i monitorowania osób z gammopatiami monoklonalnymi [18]. Białko monoklonalne można określić ilościowo z elektroforezy białek (wykorzystując densytometryczny pomiar na żelu agarozowym lub odczyt spektrofotometryczny w CE wyrażony jako procent całkowitego białka) lub metodami immunochemicznymi (INA; ang. *immunonefelometric assay* i ITA; ang. *immunospectrometric assay*, immunonefelometria i immunoturbidymetria) [5].

Metodami immunochemicznymi oznaczane są zarówno całkowite immunoglobuliny, jak i wolne łańcuchy lekkie FLC. Pomiar ilościowy poszczególnych izotypów immunoglobulin metodą immunonefelometryczną / turbidymetryczną może dawać odmiennie wyniki od elektroforezy białek, związane jest to nie tylko z odmiennymi właściwościami białek monoklonalnych, lecz także obecnością innych poliklonalnych immunoglobulin tego samego izotypu co białko monoklonalne [5]. Nowe możliwości

daje niedawno opracowany test par ciężki/lekki łańcuch immunoglobulin (HLC; ang. *heavy / light chains*). Test HLC umożliwia ocenę ilościową poszczególnych klas immunoglobulin G, A, M, różnicując jednocześnie typ łańcuchów lekkich wchodzących w ich skład, odpowiednio: IgGκ i IgGλ, IgAκ i IgAλ oraz IgMκ i IgMλ. Ponadto dostarcza informacji o immunosupresji nienowotworowej immunoglobuliny tego samego izotypu co immunoglobulina nowotworowa [19, 20].

Nieliniowość metod immunochemicznych w ocenie całkowitych immunoglobulin (IgA, IgM, IgG) jest najbardziej widoczna przy bardzo wysokich stężeniach białka monoklonalnego podczas wykonywania seryjnych rozcieńczeń, gdzie końcowy wynik może być większy niż stężenie globulin wyliczone na podstawie proteinogramu [5, 19]. Na wynik mają również wpływ właściwości przeciwciał, stosowanych do pomiaru immunoglobulin [15]. Wskazane jest, aby medyczne laboratorium diagnostyczne przeprowadziło porównanie metod pomiaru białka monoklonalnego techniką elektroforetyczną i immunochemiczną (IgA, IgM, IgG) w celu określenia górnej granicy zgodności wyników dla monoklonalnych immunoglobulin oznaczanych metodami immunochemicznymi [5]. Densytometria zaniża wysokie stężenia IgG w porównaniu z immunonefelometrią, prawdopodobnie ze względu na efekt nasycenia barwnika w żelu agarozowym lub z powodu nieliniowości skanowania densytometrycznego żelu. Dlatego w przypadku białka monoklonalnego powyżej 30,0 g/l zaleca się jednocześnie pomiar stężenia immunoglobuliny całkowitej metodą immunonefelometryczną lub immunoturbidymetryczną. Tym niemniej pomiar białka monoklonalnego technikami elektroforetycznymi jest bardziej swoisty niż oznaczanie ilościowe całkowitych immunoglobulin. W obecności rzadko występujących krieglobulin pomiar białka monoklonalnego jest niedokładny zarówno techniką elektroforezy, jak i metodami immunochemicznymi [5].

Spektrometria mas (MS; ang. *mass spectrometry*) jest niezwykle czułą i specyficzną techniką, która w przyszłości może służyć do identyfikacji i pomiaru białka monoklonalnego. Niestety dostępne obecnie aparaty są bardzo kosztowne i nieprzystosowane do wykonywania dużej liczby badań [19].

Wyznaczenie po raz kolejny strefy białka monoklonalnego w elektroforezie białek należy wykonać w odniesieniu do tego jak została ona wytyczona pierwotnie. Nie należy używać określeń jakościowych, takich jak: śladowe, małe lub duże białko monoklonalne.

6.1. Jednostki i miejsca dziesiętne

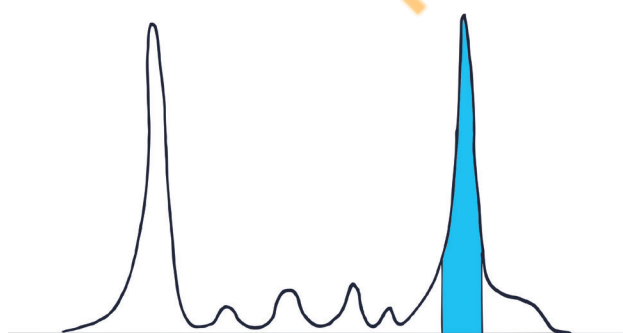
Poszczególne frakcje białek surowicy i strefa białka monoklonalnego powinny być wyrażone w jednostkach układu SI, tj. w g/l, z dokładnością do jednego miejsca po przecinku [5].

6.2. Zakresy referencyjne dla frakcji białkowych

Każde laboratorium powinno określić swoje zakresy referencyjne dla poszczególnych frakcji białek surowicy w badanej populacji lub zweryfikować opublikowane.

6.3. Sposób pomiaru stężenia białka monoklonalnego

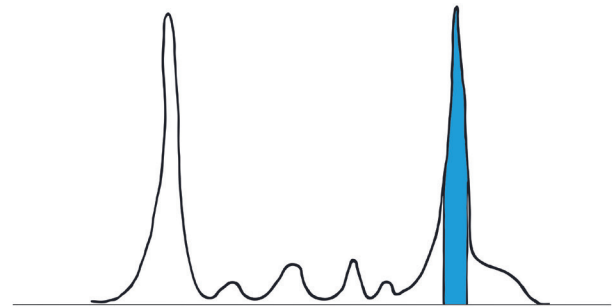
Z powodu braku metody referencyjnej pomiaru stężenia białka monoklonalnego w elektroforezie białek obecnie w Polsce wykorzystuje się różne sposoby: bez odcięcia i z odcięciem tła poliklonalnego. Pierwszy tzw. rzut prostopadły – „od góry do dołu” (PD; ang. *perpendicular drop*) polega na umieszczeniu pionowych znaczników w miejscu od strony anodowej i katodowej strefy białka monoklonalnego i zaznaczeniu pola piku od góry do podstawy wykresu [19, 21, 22] (ryc. 8).



Rycina 8. Pomiar strefy białka monoklonalnego techniką PD – rzut prostopadły.

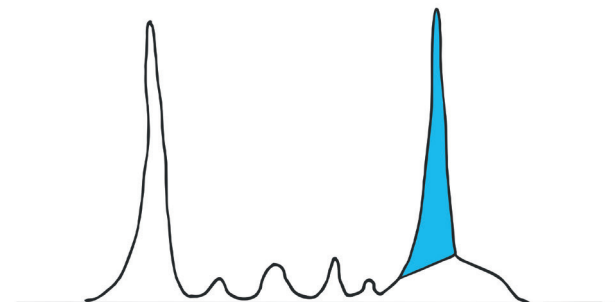
Pewną modyfikacją tego sposobu jest „rzut prostopadły z korektą” (cPD; ang. *corrected perpendicular drop*), w którym zawęża się obszar mierzony za pomocą oceny wizualnej poliklonalnych immunoglobulin

lub wzoruje się na krzywej elektroforegramu tej samej próbki po wykonaniu immunosubtrakcji lub immunotypowania [19] (ryc. 9).



Rycina 9. Pomiar strefy białka monoklonalnego techniką cPD – rzut prostopadły z korektą.

Drugim sposobem jest pomiar białka monoklonalnego z odcięciem tła poliklonalnego TS (ang. *tangent skimming*, metoda stycznej). W technice pomiaru z TS zostaje narysowana linia łącząca punkty ugięcia od strony anodowej i katodowej białka monoklonalnego, w których występuje szczyt białka monoklonalnego. Połączenie tych punktów tworzy trójkątny obszar powyżej linii, z wyłączeniem poniżej poliklonalnych immunoglobulin („od doliny do doliny”) [19, 21, 22] (ryc. 10).



Rycina 10. Pomiar strefy białka monoklonalnego techniką TS – odcięcie tła poliklonalnego, metoda stycznej.

W momencie rozpoznania szpiczaka plazmocytozy białka monoklonalnemu często towarzyszy supresja prawidłowych poliklonalnych immunoglobulin, dzięki czemu pomiar przy użyciu rzutu prostopadłego PD jest wystarczająco dokładny i powtarzalny [19]. Jednak, w przypadku niewielkich i niskich stężeń białka monoklonalnego, tak jak u większości pacjentów z MGUS (ang. *monoclonal gammopathy of undetermined significance*, gammapatia monoklonalna o nieokreślonym znaczeniu) lub podczas monitorowania odpowiedzi

na terapię u chorych na szpiczaka plazmocytoowego, obecność komigrujących immunoglobulin poliklonalnych zmierzonych techniką PD znacznie przeszacowuje ilość białka monoklonalnego [19]. Biorąc pod uwagę stałą ilość immunoglobulin poliklonalnych, im mniejsza ilość białka monoklonalnego, tym większe przeszacowanie jego stężenia metodą PD. Pomiar PD zawiera poliklonalne tło, dlatego powinien być wykonywany tylko wtedy, gdy strefa białka monoklonalnego stanowi co najmniej jedną czwartą całkowitego tła frakcji gamma [19]. TS jest lepszą techniką niż PD w próbkach z hipergammaglobulinemią. Jednakże jednoczesne wykrycie hipergammaglobulinemii i białka monoklonalnego nie jest często spotykane. Hipergammaglobulinemia występuje w chorobach autoimmunizacyjnych, stanach zapalnych lub przewlekłych chorobach wątroby, podczas gdy białko monoklonalne jest obecne w stanach przednowotworowych i chorobach nowotworowych. Tym niemniej technika TS wykazuje lepszą liniowość niż PD. Z badań przeprowadzonych przez Schilda wynika, że pomiar techniką PD przeszacowuje ilość białka monoklonalnego o stężeniach poniżej 15,0 g/l w porównaniu do techniki TS, w której nie zaobserwowano istotnych odchyień do stężenia 1,5 g/l [23]. TS nie jest najlepszym sposobem pomiaru małych ilości białka monoklonalnego we frakcji beta i beta – gamma globulin [19]. Dotyczy to zwłaszcza białka monoklonalnego IgA. IMWG od 2016 roku zaleca oznaczanie stężenia całkowitej IgA i IgD metodami immunochemicznymi, zamiast pomiaru białka monoklonalnego w elektroforezie białek [18].

W celu ujednoczenia sposobu pomiaru białka monoklonalnego w elektroforezie białek surowicy Grupa Robocza ds. RaWEB proponuje metodę z odcięciem tła poliklonalnego TS.

6.4. Pomiar ilościowy białka monoklonalnego we frakcji alfa 2 lub beta globulin

W prawidłowym rozdziale elektroforetycznym białek surowicy immunoglobuliny tworzą szeroką frakcję gamma globulin. Związane jest to z syntezą immunoglobulin przez wiele różnych linii komórkowych plazmacytów. W gammapatiach monoklonalnych białko monoklonalne w elektroforezie białek jest zazwyczaj

widoczne jako dodatkowa strefa/prążek. Migracja białka monoklonalnego jest różna. W analizie Kyle i wsp. dotyczącej 1027 pacjentów ze szpiczakiem plazmocytoowym migracja białka monoklonalnego była rozmieszczona w następującej kolejności: 54% białek monoklonalnych było we frakcji gamma, 12% w mostku beta-gamma, 13% w beta i 1% we frakcji alfa 2 globulin, dając razem 80%. Pozostałe przypadki dotyczyły gammapatii biklonalnych i rozdziałów z hipogammaglobulinemią [24].

Wykrycie i pomiar białka monoklonalnego migrującego do frakcji alfa 2 lub beta globulin nie są szczególnie łatwe, gdy jego stężenie jest niskie. Z reguły pomiar ilościowy takiego białka monoklonalnego jest obarczony dużym błędem [25]. Związane jest to ze znacznym udziałem współmigrujących prawidłowych globulin, powodujących przeszacowanie stężenia białka monoklonalnego [25]. Dlatego też pomiar ilościowy powinien być opatrzone komentarzem, że jest to pomiar zarówno białka monoklonalnego, jak i frakcji alfa 2 / beta globulin [5]. Próby oszacowania dokładnego stężenia białka monoklonalnego poprzez odjęcie innych alfa 2 / beta globulin są z natury niewiarygodne ze względu na zmienność stężenia ko-migrujących białek, np. w stanach ostrej fazy [4, 5]. W elektroforezie kapilarnej, która ma nieco większą rozdzielczość niż elektroforeza żelowa, uzyskujemy wyraźne odseparowanie transferyny i C3, w związku z tym łatwiej jest wykryć białko monoklonalne i dokonać jego pomiaru z wykorzystaniem cPD poprzez porównanie elektroforegramów przed i po immunosubtrakcji [19]. ISUB / IT pokazuje dokładny obszar, który został usunięty i jasno określa ilość podstawowych białek, takich jak transferyna i C3 czy poliklonalna immunoglobulina we frakcji beta globulin [19, 26]. Niestety wykorzystanie tej techniki wiąże się z wysokimi kosztami. Dlatego też w takich przypadkach oznaczenie ilościowe całkowitej IgG, IgA i IgM metodami immunochemicznymi INA lub ITA są bardziej przydatne do monitorowania białka monoklonalnego. Należy przy tym pamiętać, że stężenie białka monoklonalnego może być przeszacowane z powodu nieliniowości metod immunochemicznych przy wyższych rozcieńczeniach próbki. Nie zaleca się stosowania INA lub ITA zamiennie z elektroforezą. W wielu publikacjach naukowych wykazano, że

testy ciężki / lekki łańcuch (HLC) są bardziej swoiste niż całkowite oznaczanie immunoglobulin. Ocena stosunku HLC może być wykorzystana do diagnostyki i monitorowania pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym i w monitorowaniu szeroko migrującej monoklonalnej immunoglobuliny (m.in. IgA), którą trudno zmierzyć w elektroforezie. Test IgA HLC może być wykorzystywany szczególnie do oceny ilości monoklonalnej IgA wykazującej mobilność do frakcji beta [27]. Bardzo przydatnym badaniem jest także oznaczanie FLC w chorobie lekkiego łańcucha oraz kiedy białko monoklonalne migruje razem z prawidłowymi białkami frakcji alfa 2 i beta globulin

lub jest obecne w bardzo niskim stężeniu. Wysokie stężenie białka monoklonalnego, gdzie prawidłowe globuliny stanowią bardzo małą część frakcji, powinno być mierzone jak białko monoklonalne we frakcji gamma globulin w obecności poliklonalnego tła immunoglobulin. Z drugiej strony niskie stężenie białka monoklonalnego we frakcji alfa 2 / beta globulin powinno być mierzone bardzo ostrożnie, aby uniknąć podwyższenia stężenia przez komigrujące globuliny. Na rycinie 11 przedstawiono przykładowe rozdziały elektroforetyczne z obecnością niskiego lub wysokiego stężenia białka monoklonalnego w strefie alfa 2 / beta globulin.

ZALECENIA

Białko monoklonalne o wysokim stężeniu, obecne we frakcji alfa 2 lub beta globulin, powinno być mierzone tak jak białko monoklonalne migrujące we frakcji gamma globulin.

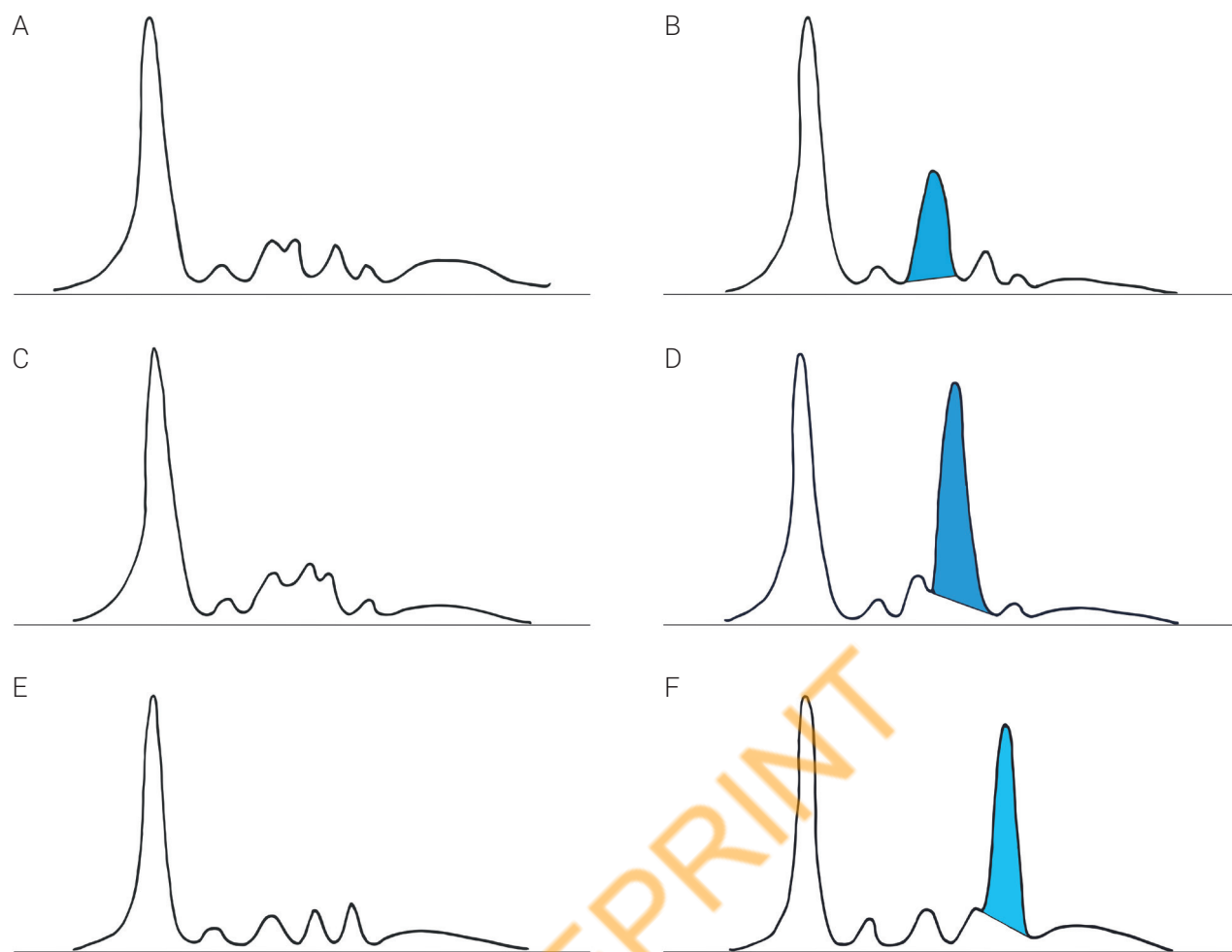
Pomiar białka monoklonalnego o niskim stężeniu obarczony jest znacznym błędem przez komigrujące globuliny.

Sprawozdanie powinno zawierać komentarz sugerujący obecność białka monoklonalnego migrującego do frakcji alfa 2 / beta globulin i stwierdzający, że pomiar stężenia zawiera również prawidłowe białka frakcji alfa 2 / beta globulin.

W sytuacji, w której strefa białka monoklonalnego nie może być zmierzona, sprawozdanie powinno zawierać komentarz sugerujący obecność białka monoklonalnego migrującego do frakcji alfa 2 / beta globulin i stwierdzający, że pomiar stężenia jest niemiarodajny.

Pomiar ilościowy całkowitych IgG, IgA, IgM, IgD, IgE metodami immunochemicznymi zapewnia przybliżone stężenie białka monoklonalnego, dlatego też może być wykorzystywany w sytuacjach, w których pomiar metodami elektroforetycznymi jest niemiarodajny, np.: niskie stężenie białka monoklonalnego we frakcji alfa 2 / beta globulin.

Laboratorium powinno mieć możliwość wykonania zarówno elektroforetycznego, jak i całkowitego pomiaru immunoglobulin metodami immunochemicznymi, aby ułatwić monitorowanie choroby u pacjentów z gammopatiami monoklonalnymi.

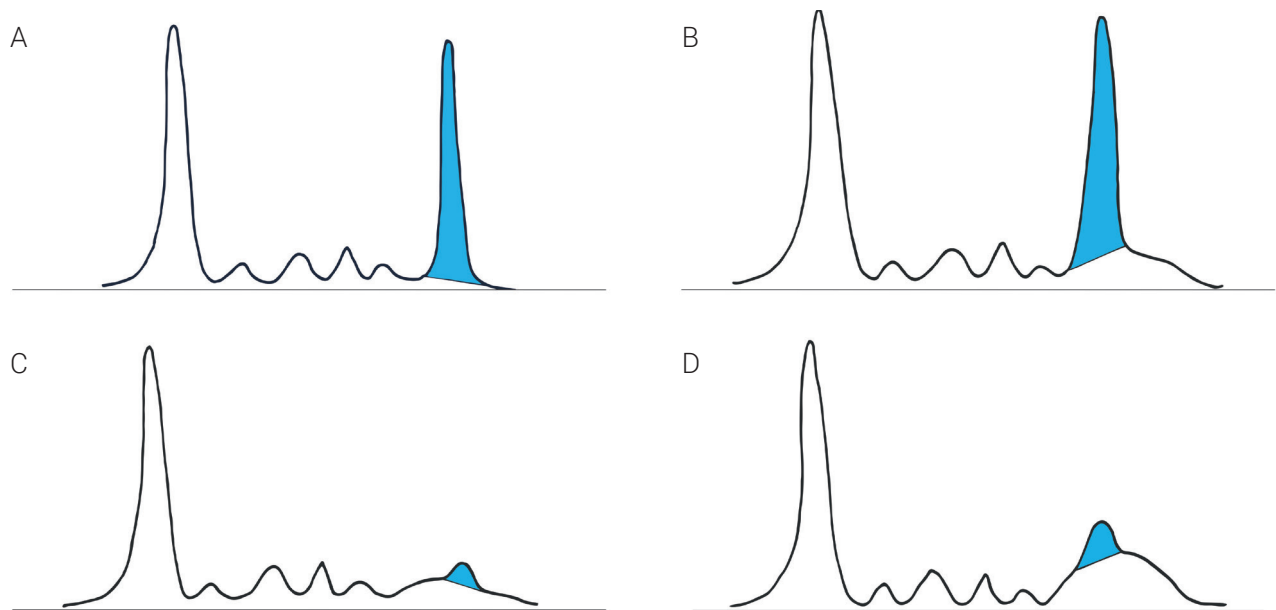


Rycina 11. Przykładowe wykresy prezentujące różną migrację białka monoklonalnego w strefie alfa 2 i beta globulin (A, B, C, D, E, F). A – Niskie stężenie białka monoklonalnego we frakcji alfa 2 globulin; B – Wysokie stężenie białka monoklonalnego we frakcji alfa 2 globulin; C – Niskie stężenie białka monoklonalnego we frakcji beta 1 globulin; D – Wysokie stężenie białka monoklonalnego we frakcji beta 1 globulin; E – Niskie stężenie białka monoklonalnego we frakcji beta 2 globulin, frakcja beta 2 > beta 1; F – Wysokie stężenie białka monoklonalnego we frakcji beta 2 globulin.

6.5. Pomiar ilościowy białka monoklonalnego we frakcji gamma globulin

Większość białek monoklonalnych migruje do frakcji gamma globulin, w której obecne są prawidłowe immunoglobuliny. Dlatego też pomiar stężenia białka monoklonalnego może być utrudniony przez obecność znacznych ilości poliklonalnych immuno-

globulin. W tym celu pomiar białka monoklonalnego może być dokonany przez odcięcie tła poliklonalnego od monoklonalnej frakcji z wykorzystaniem metody TS. Na rycinie 12 przedstawiono przykładowe rozdziały elektroforetyczne z obecnością niskiego lub wysokiego stężenia białka monoklonalnego w strefie gamma globulin.



Rycina 12. Przykłady pomiaru białka monoklonalnego metodą TS (A, B, C, D). A – Wysokie stężenie białka monoklonalnego we frakcji gamma globulin z immunoparazą; B – Wysokie stężenie białka monoklonalnego we frakcji gamma globulin na tle poliklonalnym; C – Niskie stężenie białka monoklonalnego we frakcji gamma globulin; D – Niskie stężenie białka monoklonalnego we frakcji gamma globulin na tle poliklonalnych immunoglobulin.

ZALECENIA

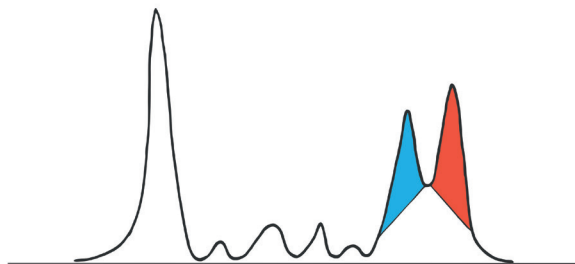
Białko monoklonalne we frakcji gamma globulin powinno być oceniane ilościowo densytometrycznie lub spektrofotometrycznie w jednostkach g/l, z podaniem jednego miejsca po przecinku.

Białka monoklonalnego o stężeniu $< 1,0$ g/l widocznego w AGE lub CE nie można wiarygodnie określić ilościowo, zwłaszcza jeśli towarzyszy mu tło poliklonalne immunoglobulin. Powinno być określone jako $< 1,0$ g/l z komentarzem: „Widoczna słaba dodatkowa strefa ($< 1,0$ g/l) nie może zostać wiarygodnie zmierzona”.

Pomiar z odcięciem tła poliklonalnego (TS) jest proponowaną metodą pomiaru białka monoklonalnego we frakcji gamma globulin.

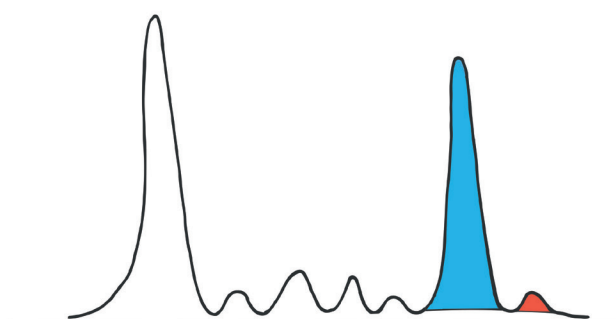
6.6. Pomiar ilościowy białka monoklonalnego – gammapatia biklonalna

W przypadku rzadko występujących gammapatii biklonalnych (ryc. 13) czy triklonalnych każda strefa monoklonalna



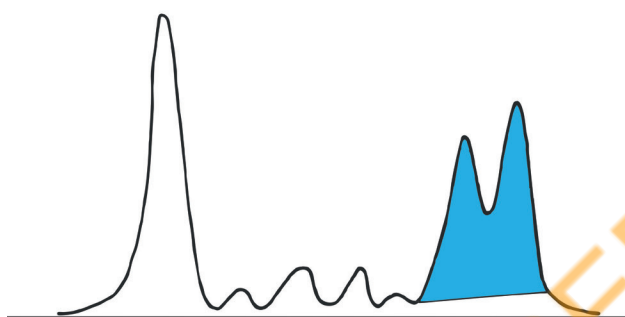
Rycina 13. Gammapatia biklonalna, pomiar białka monoklonalnego.

powinna być zmierzona osobno (jeśli jest to możliwe) [1]. Należy zachować szczególną ostrożność przy przypisywaniu zmierzonej wartości do danej strefy białka monoklonalnego w kolejnych badaniach, aby można było prawidłowo ocenić zmiany w czasie [4]. Raport z elektroforezy białek powinien przewidywać do 3 pól na pomiar stref białek monoklonalnych. W przypadku gammapatii monoklonalnej z jednym klonem nowotworowym dodatkowa mniejsza strefa w elektroforezie białek może wskazywać na obecność FLC zaangażowanych w proces chorobowy (ryc. 14). W badaniu, po weryfikacji immunofiksacji białek, w komentarzu do elektroforezy należy opisać, że jest to strefa FLC. Białka monoklonalne



Rycina 14. Gammapatia monoklonalna z widoczną strefą wolnych łańcuchów lekkich (na czerwono).

mogą także ulegać polimeryzacji, prowadząc do pojawienia się kilku stref w elektroforezie. Taki obraz może sugerować gammapatie biklonalną, jednak po uprzedniej inkubacji z roztworem redukującym mostki disiarczkowe i wykonaniu immunofiksacji okazuje się jednym klonem białka monoklonalnego (ryc. 15).



Rycina 15. Pomiar białka monoklonalnego po identyfikacji tylko jednego izotypu immunoglobuliny.

W takiej sytuacji poszczególne strefy białka monoklonalnego powinny być, jeśli jest to możliwe, zmierzone razem.

6.7. Pomiar niskich stężeń białka monoklonalnego i dolna granica pomiaru białka monoklonalnego

We wstępnej diagnostyce gammapatii monoklonalnych stężenie białka monoklonalnego jest jednym z czynników determinujących rozpoznanie. Wartością graniczną jest stężenie białka monoklonalnego 30,0 g/l, na podstawie której wraz z innymi badaniami laboratoryjnymi i obrazowymi stawiana jest diagnoza MGUS, szpiczak tłący bądź szpiczak plazmocytowy objawowy. Na ogół pomiar takich stężeń białka monoklonalnego nie stwarza większych problemów. Po postawieniu diagnozy gammapatii

monoklonalnej pacjenci są monitorowani do końca życia. Wykonywane są badania obrazowe, biopsje szpiku kostnego i najczęściej powtarzane badania laboratoryjne surowicy oraz moczu. Odpowiedź na leczenie związana jest z obniżeniem stężenia białka monoklonalnego. Niska dokładność analityczna elektroforezy białek surowicy jest dobrze znana dla niskich stężeń białka monoklonalnego (< 10,0 g/l) [28]. Dlatego też każde laboratorium powinno ustalić dolną granicę pomiaru białka monoklonalnego LOQ (ang. *limit of quantitation*) wraz z współczynnikami zmienności CV (ang. *coefficient of variation*) dla stosowanej metody elektroforetycznej [5]. Zarówno dla elektroforezy żelowej, jak i kapilarnej współczynniki zmienności dla frakcji gamma i beta globulin zawierających poliklonalne i monoklonalne białka wahają się od 3-11% dla stężeń $\leq 10,0$ g/l [5]. Brak uniwersalnego LOQ jest związane z niejednorodnością białka monoklonalnego i ilością tła poliklonalnego [28]. Z mniejszym tłem poliklonalnym, jak w hipogammaglobulinemii, białko monoklonalne łatwiej jest zidentyfikować, w przypadku zaś wysokiego tła, jak hipergammaglobulinemii, białko monoklonalne może być mało widoczne, a nawet niemierzalne, nawet jeśli występuje względnie duże jego stężenie. Raportowanie niskich stężeń białka monoklonalnego jest kłopotliwe, zwłaszcza jeśli wyniki zaokrąglane są do liczb całkowitych, np.: 1,5 g/l w zaokrągleniu wynosi 2,0 g/l [4]. Pomiar niezmiernie niskich stężeń, mimo że jest możliwy, może nie zapewniać odpowiedniej dokładności i precyzji. Dlatego nie zaleca się pomiaru ilościowego bardzo niskich stężeń białka monoklonalnego. Rozwiązaniem jest podanie LOQ i umieszczenie informacji w komentarzu wyniku, np.: „widoczna słaba strefa < LOQ (np.: < 1,0 g/l), pomiar ilościowy niemiarodajny / niewiarygodny”. Gdy białko monoklonalne widoczne jest wyłącznie w immunofiksacji, sprawozdanie powinno być opatrzone komentarzem, takim jak np.: „Białko monoklonalne IgG kappa widoczne tylko w immunofiksacji”. Takie raportowanie wyników pomaga ocenić odpowiedź na leczenie: „remisja częściowa PR (ang. *partial remission*) – redukcja białka monoklonalnego $\geq 50\%$ ”, „bardzo dobra remisja częściowa VGPR (ang. *very good partial response*) – białko monoklonalne obecne w IFE”, „brak w SPEP (elektroforeza białek surowicy, ang. *serum protein elec-*

trophoresis) lub obniżenie białka monoklonalnego o $\geq 90\%$, „remisja całkowita CR (ang. *complete remission*) – białko monoklonalne nieobecne w IFE” oraz „rygorystyczna remisja całkowita sCR (ang. *stringent complete remission*) – dodatkowo stosunek FLC prawidłowy” [4, 18, 43]. Progresję choroby natomiast definiujemy jako 25% wzrost stężenia białka monoklonalnego (absolutny wzrost co najmniej o 5,0 g/l). Jednakże te rekomendacje oparte są głównie na opinii ekspertów [29]. W przeprowadzonym międzynarodowym, wieloośrodkowym badaniu dokładności pomiaru elektroforezy białek wykazano, że niezależnie od stosowanej metody, wewnątrzlaboratoryjna niedokładność pomiaru ilościowego białka monoklonalnego o stężeniu od 1,0 do 10,0 g/l była mała (średnio CV = 5%) w tym samym laboratorium, stosując tę samą metodologię [30]. Obecnie, do monitorowania pacjentów z gammapatiami monoklonalnymi, zaleca się stosowanie tej samej metody w tym samym laboratorium, aby poprawić odtwarzalność i porównywalność pomiarów seryjnych.

ZALECENIA

Zaleca się dolną granicę pomiaru białka monoklonalnego 1,0 g/l z akceptacją, że pomiar jest niedokładny i nieprecyzyjny przy wykorzystaniu techniki TS.

Białko monoklonalne < 1,0 g/l widoczne w SPEP nie powinno być określane ilościowo. Należy raportować jako < 1,0 g/l z komentarzem „mała strefa białka monoklonalnego nie może być dokładnie zmierzona”.

Pomiar ilościowy niskich stężeń białka monoklonalnego do monitorowania pacjentów w czasie jest odpowiedni, kiedy jest wykonywany w jednym laboratorium.

Zaleca się, aby każde laboratorium ustaliło własną dolną granicę pomiaru (LOQ) białka monoklonalnego na podstawie stosowanych metod analitycznych.

7. KOMENTARZE DO WYNIKU ELEKTROFOREZY BIAŁEK SUROWICY

Dla elektroforegramów bez białka monoklonalnego wystarczające są minimalne komentarze opisowe lub ich brak [5]. W przypadku próbek z białkiem monoklonalnym, oligoklonalnym czy niskimi stężeniami białka monoklonalnego komentarz do wyniku jest niezbędny. Powinien on określać znaczenie strefy monoklonalnej, jej izotyp (jeśli jest znany) oraz zawierać informacje o dalszym postępowaniu. Zalecane jest, aby każde laboratorium medyczne, wykonujące elektroforezę białek, miało opracowaną strategię edukacyjną postępowania dla lekarzy zlecających badanie. Komentarze powinny być zharmonizowane w obiegu międzylaboratoryjnym, tak aby informacja zawarta na wyniku była zrozumiała dla wszystkich odbiorców.

7.1. Wynik z obecnym białkiem monoklonalnym

Raportowanie obecności dodatkowych stref w elektroforezie białek surowicy jest obowiązkiem każdego laboratorium. Komentarz powinien zawierać informację o miejscu migracji dodatkowej strefy i zalecenie wykonania badania w kierunku białka monoklonalnego.

Raportowanie niskich stężeń białka monoklonalnego może być problematyczne bez znajomości wcześniejszej historii pacjenta. Mogą sugerować nawrót szpiczaka u pacjentów po przeszczepie komórek macierzystych lub po zastosowaniu nowej terapii [25].

Obecność bardzo niskiego stężenia białka monoklonalnego (0,5-1,0 g/l) może wskazywać na chłoniaki, AL amyloidozę, szpiczaka skąpowydzielającego czy gammapatię monoklonalną o nerkowym znaczeniu (MGRS; ang. *monoclonal gammopathy of renal significance*) [25]. Jednakże częściej towarzyszą chorobom zapalnym, zakaźnym, autoimmunizacyjnym czy nowotworowym, w których to przypadkach białko monoklonalne może zanikać [25].

U pacjentów z historią gammapatii monoklonalnej po transplantacji typowo może występować izotyp IgG kappa < 1,0 g/l, ale czasami stwierdza się wyższe

stężenie, które może utrzymywać się od 1-18 miesięcy [25]. Obecność tego białka może być także myląco nazywane wtórną gammopatią monoklonalną o nieokreślonym znaczeniu (ang. *secondary MGUS*), która występuje u 10-73% pacjentów ze szpiczakiem po przeszczepie autologicznym [25]. Inne małe strefy IgG kappa, które mogą zakłócać ocenę CR u pacjenta

ze szpiczakiem IgG kappa, to terapeutyczne przeciwciała monoklonalne (tmAb; ang. *therapeutic monoclonal antibody*), takie jak daratumumab [7, 25, 31-34]. Sprawozdanie powinno zawierać informację o niskim stężeniu, ale nie należy raportować go jako nowe białko monoklonalne, aby zredukować niepokój pacjenta i lekarza oraz niepotrzebną diagnostykę [25] (tab. III).

Tabela III. Przykładowe komentarze do wyników elektroforezy białek surowicy z obecnym białkiem monoklonalnym.

ZMIANY W PROTEINOGRAMIE	KOMENTARZ
Intensywna strefa białka monoklonalnego	Widoczna dodatkowa strefa we frakcji alfa 2 / beta 1 / beta 2 / gamma globulin. Wskazane badanie w kierunku białka monoklonalnego w surowicy i DZM.
Intensywna strefa białka monoklonalnego u pacjenta z rozpoznaną gammopatią monoklonalną	Widoczna dodatkowa strefa we frakcji alfa 2 / beta 1 / beta 2 / gamma globulin.
Słaba strefa białka monoklonalnego < 1,0 g/l	Widoczna dodatkowa, słaba strefa (< 1,0 g/l) we frakcji alfa 2 / beta 1 / beta 2 / gamma globulin. Wskazane badanie w kierunku białka monoklonalnego w surowicy i DZM oraz ozn. sFLC.
Słaba strefa białka monoklonalnego < 1,0 g/l u pacjenta z gammopatią monoklonalną	Widoczna dodatkowa słaba strefa (< 1,0 g/l) we frakcji alfa 2 / beta 1 / beta 2 / gamma globulin nie może być dokładnie zmierzona.
Słaba strefa białka monoklonalnego na tle poliklonalnym frakcji gamma globulin	Widoczna dodatkowa słaba strefa na tle poliklonalnym immunoglobulin. Wskazane badanie w kierunku białka monoklonalnego w surowicy i DZM oraz ozn. sFLC. Badanie elektroforezy białek należy powtórzyć za 3-6 miesięcy.
Słaba strefa białka monoklonalnego we frakcji alfa 2 / beta globulin	Widoczna dodatkowa, słaba strefa we frakcji alfa 2 / beta globulin zawierająca także prawidłowe globuliny. Wskazane badanie w kierunku białka monoklonalnego wraz z ilościowym oznaczeniem immunoglobulin całkowitych lub HLC.
Dwie lub więcej stref białka monoklonalnego	Widoczne dodatkowe strefy we frakcji np. gamma globulin. Wskazane badanie w kierunku obecności białka monoklonalnego w surowicy i DZM.
Nowa, dodatkowa słaba strefa z inną elektroforetyczną mobilnością niż pierwotne białko monoklonalne u pacjenta z gammopatią	Widoczna dodatkowa słaba strefa we frakcji alfa 2 / beta 1 / beta 2 / gamma globulin. Położenie tego białka jest inne od pierwotnego białka monoklonalnego. Wskazane badanie w kierunku białka monoklonalnego surowicy i DZM oraz sFLC. Badanie elektroforezy białek należy powtórzyć za ok. 3-6 miesięcy.

sFLC (ang. *serum free light chain*); HLC (ang. *heavy/light chain*); DZM (dobowa zbiórka moczu)

7.2. Wynik bez dostrzegalnego białka monoklonalnego

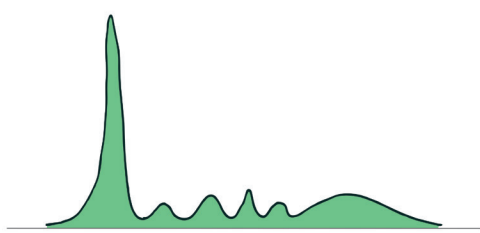
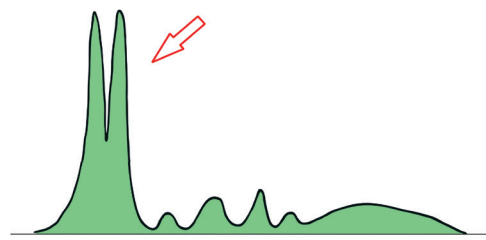
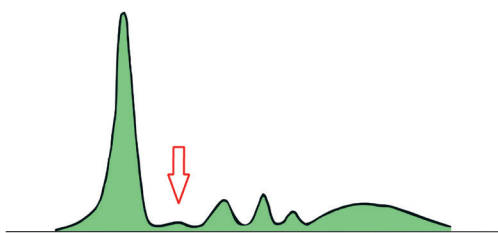
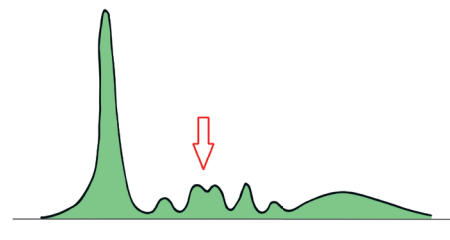
Brak komentarza pod mieszczącym się w zakresach referencyjnych wynikiem elektroforezy białek surowicy nie stanowi problemu dla lekarzy zlecających badanie. Więcej kontrowersji sprawia wynik, w którym nie stwierdza się dodatkowej strefy, a jedynie wzrost lub obniżenie poszczególnych frakcji. Taka sytuacja może być kłopotliwa dla osoby zlecającej badanie. Często w takich przypadkach tak na „wszelki wypadek” rozszerzana jest dość kosztowna diagnostyka laboratoryjna w celu wyklucze-

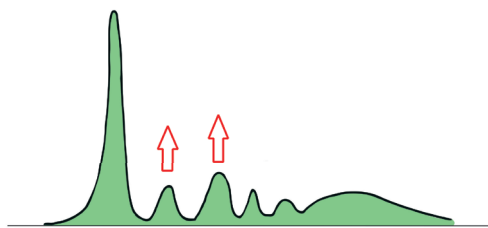
nia gammapatii monoklonalnej. Jest to oczywiście uzasadnione w przypadkach, w których jest wysokie ryzyko gammapatii monoklonalnej, które zostało oszacowane na podstawie wywiadu lekarskiego, badań laboratoryjnych i obrazowych. Elektroforeza białek surowicy cechuje się bardzo dobrą czułością (85%) i swoistością diagnostyczną (95%) w diagnozowaniu dyskrazji plazmocytowych [35]. Dlatego też Polska Grupa Robocza ds. RaWEB zachęca diagnostów laboratoryjnych do komentowania wyników bez dostrzegalnej strefy tam, gdzie to jest właściwe (tab. IV, ryc. 16-26).



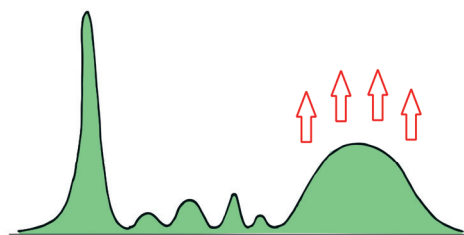
Tabela IV. Przykładowe komentarze do wyników elektroforezy białek surowicy bez dostrzegalnego białka monoklonalnego.

ZMIANY W PROTEINOGRAMIE	KOMENTARZ
Prawidłowy proteinogram (ryc. 16)	Brak
Podwójna strefa albuminy (ryc. 17)	Bisalbuminemia
Obniżona frakcja alfa 1 globulin (ryc. 18)	Obniżona frakcja alfa 1 globulin. Wskazane ilościowe ozn. alfa 1 antytrypsyny w celu wykluczenia wrodzonego niedoboru.
Dodatkowa strefa we frakcji alfa 2 globulin (Fenotypy haptoglobiny) (ryc. 19)	Dodatkowa strefa we frakcji alfa 2 globulin. Dodatkowe badania wskazane, jeśli występuje wysokie prawdopodobieństwo kliniczne gammadopatii monoklonalnej.
Wzrost frakcji alfa 1 i alfa 2 globulin (ryc. 20)	Powyższy rozdział białek może towarzyszyć stanom zapalnym.
Wzrost frakcji alfa 1 i alfa 2 globulin oraz wzrost poliklonalnej frakcji gamma globulin (ryc. 21)	Powyższy rozdział białek może towarzyszyć przewlekłym stanom zapalnym.
Obniżona frakcja albuminy, wzrost alfa 2 globulin, obniżona frakcja gamma globulin oraz niskie stężenie białka całkowitego (ryc. 22)	Powyższy rozdział białek może wskazywać na zespół nerczycowy. Wskazane oznaczenie ilościowe utraty białka w DZM.
Wyraźnie podwyższona frakcja beta 1 lub beta 2 globulin	Wskazane badanie w kierunku białka monoklonalnego w surowicy i DZM oraz sFLC.
Frakcja beta 2 globulin przewyższa frakcję beta 1 globulin (ryc. 23)	Podwyższona frakcja beta 2 może być związana z obecnością białka monoklonalnego. Wskazane wykonanie badania w kierunku obecności białka monoklonalnego.
Połączenie frakcji beta i gamma globulin (ryc. 24)	Powyższy rozdział białek związany jest z poliklonalnym wzrostem immunoglobulin (mostek beta-gamma).
Hipogammaglobulinemia (pierwszy wynik pacjenta)	Obniżona frakcja gamma globulin. Dodatkowe badania (sFLC) wskazane, jeśli występuje wysokie prawdopodobieństwo kliniczne gammadopatii monoklonalnej.
Hipogammaglobulinemia (kolejny wynik) (ryc. 25)	Obniżona frakcja gamma globulin.
Hipergammaglobulinemia poliklonalna (ryc. 26)	Powyższy rozdział białek związany jest z poliklonalnym wzrostem immunoglobulin.

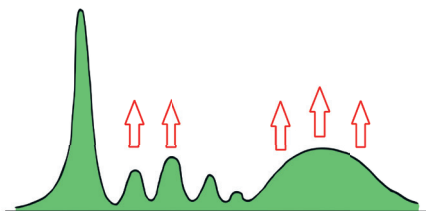

Rycina 16. Prawidłowy rozdział elektroforetyczny białek surowicy.

Rycina 17. Bisalbuminemia.

Rycina 18. Obniżona frakcja alfa 1 globulin.

Rycina 19. Dodatkowa strefa we frakcji alfa 2 globulin (fenotypy haptoglobiny).



Rycina 20. Stan zapalny (wzrost frakcji alfa 1 i alfa 2 globulin).



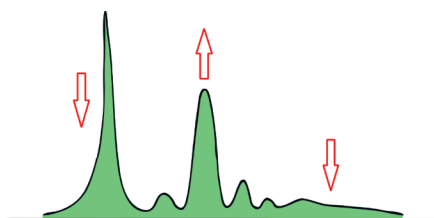
Rycina 26. Hipergammaglobulinemia poliklonalna.



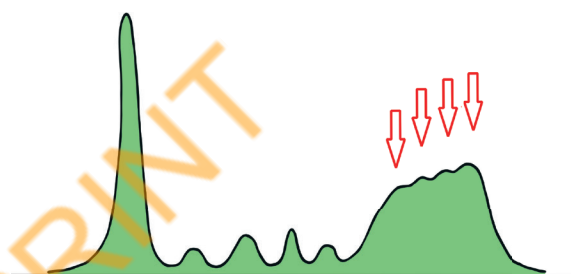
Rycina 21. Przewlekły stan zapalny (wzrost frakcji alfa 1 i alfa 2 globulin oraz wzrost poliklonalny frakcji gamma globulin).

7.3. Wynik profilu/obrazu oligoklonalnego

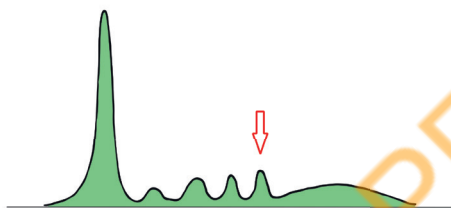
Obraz oligoklonalny frakcji gamma globulin może towarzyszyć chorobom zapalnym i autoimmunizacyjnym. Wskazane powtórzenie badania za ok. 3-6 miesięcy (ryc. 27).



Rycina 22. Zespół nerczycowy (obniżona frakcja albuminy, wzrost frakcji alfa 2 globulin, obniżone stężenie białka całkowitego).



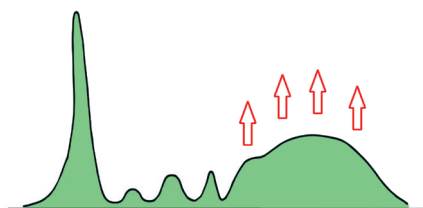
Rycina 27. Obraz oligoklonalny w przebiegu chorób zapalnych i autoimmunizacyjnych.



Rycina 23. Podejrzanie obecności białka monoklonalnego (frakcja beta 2 globulin przewyższa frakcję beta 1 globulin).

8. SPRAWOZDANIE Z WYNIKÓW BADAŃ W KIERUNKU OBECNOŚCI BIAŁKA MONOKLONALNEGO

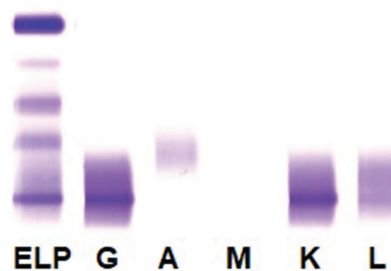
8.1. Wynik z obecnym białkiem monoklonalnym (ryc. 28-33)



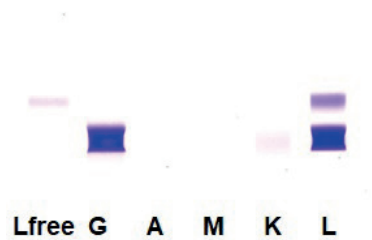
Rycina 24. Mostek beta-gamma (połączenie frakcji beta 2 i gamma globulin).



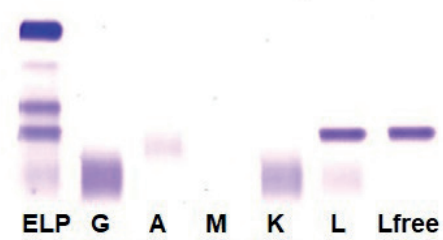
Rycina 25. Hipogammaglobulinemia.



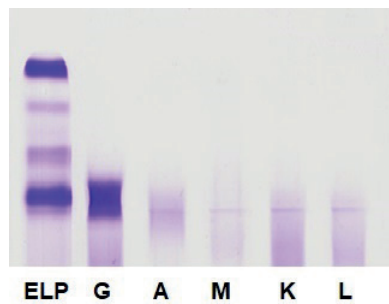
Rycina 28. W surowicy stwierdzono obecność białka monoklonalnego IgG kappa.



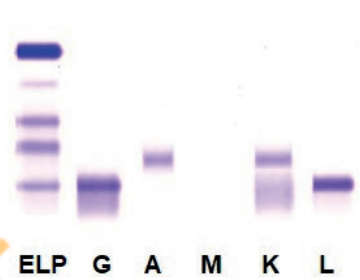
Rycina 29. W surowicy stwierdzono obecność białka monoklonalnego IgG lambda i strefy monoklonalnych wolnych łańcuchów lekkich typu lambda.



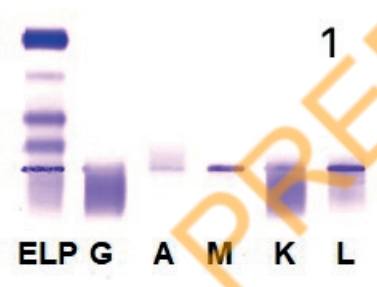
Rycina 30. W surowicy stwierdzono obecność strefy monoklonalnych wolnych łańcuchów lekkich typu lambda (choroba łańcuchów lekkich). Wskazane ilościowe oznaczenie sFLC.



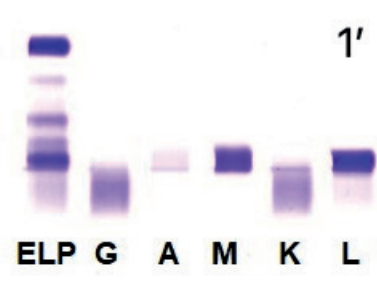
Rycina 31. W surowicy stwierdzono obecność monoklonalnego ciężkiego łańcucha gamma (choroba łańcuchów ciężkich).



Rycina 32. W surowicy stwierdzono obecność podwójnej strefy białka monoklonalnego IgG lambda i IgA kappa (gammapatia biklonalna).

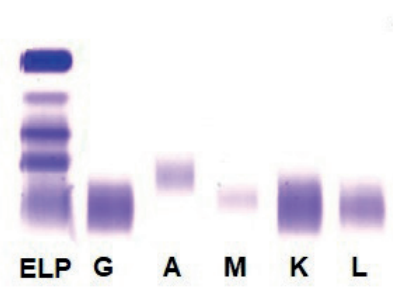


Rycina 33. W surowicy stwierdzono obecność białka monoklonalnego IgM lambda. 1 – przed inkubacją z BME, 1' – po inkubacji z BME.

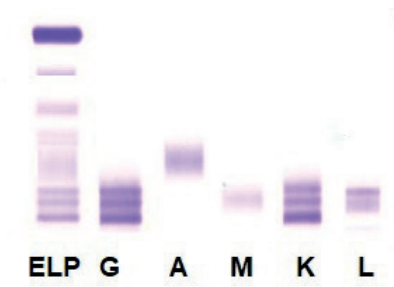


8.2. Wynik bez białka monoklonalnego (ryc. 34)

8.3. Wynik profilu/obrazu oligoklonalnego (ryc. 35)



Rycina 34. W surowicy nie stwierdzono obecności białka monoklonalnego.



Rycina 35. W surowicy nie stwierdzono obecności białka monoklonalnego. Obraz oligoklonalny IgG (kappa + lambda). Wskazane powtórzenie badania za ok. 3-6 miesięcy.



9. KONTROLA JAKOŚCI

Prowadzenie programu wewnętrznej kontroli jakości (QC) w laboratorium medycznym ma na celu utrzymanie metod pomiarowych na akceptowalnym poziomie, aby popełniane błędy analityczne, przypadkowe i systematyczne nie przekraczały dopuszczalnych granic. W przypadku badań wykorzystujących techniki elektroforetyczne przy planowaniu kontroli jakości należy wziąć pod uwagę parametry raportowane oraz sposób ich monitorowania. W elektroforezie białek materiał kontrolny powinien zapewniać 6 dobrze zdefiniowanych frakcji wraz z odpowiednimi wartościami, które można następnie monitorować za pomocą metod statystycznych oraz umożliwić monitorowanie małych i wysokich stężeń białka monoklonalnego w sposób powtarzalny [4]. Dostępne komercyjne materiały kontrolne surowicy nie zachowują dopełniacza białka, co prowadzi do obniżonej lub brakującej frakcji beta-2 globulin [4]. Dlatego też próbki pacjentów wydają się lepszym materiałem do celów kontroli jakości. Zachęca się laboratoria do wykonywania kontroli z próbką osocza w celu określenia położenia fibrynogenu.

W przypadku IFE dołączanie materiału kontrolnego dla każdego żelu lub materiału analitycznego jest wysoce nieoptymalne z powodu małej liczby próbek badanych jednocześnie [4]. Dlatego w przypadku IFE osoba wykonująca badanie powinna dokładnie sprawdzić jakość żelu i zachować szczególną ostrożność, aby uniknąć potencjalnych błędów analitycznych. Każda nowa seria żeli i antysurowic powinna zostać sprawdzona przy zastosowaniu materiału kontrolnego przeznaczonego do tego badania [4]. Komercyjne kontrole nie obejmują izotypu immunoglobuliny D i E. Dlatego też w tych rzadkich przypadkach, o ile jest to możliwe, zaleca się wykonanie IFE próbki badanej z próbką pacjenta z monoklonalną IgD lub IgE. Obecnie programy zewnętrznej oceny jakości (EQA; ang. *External Quality Assessment*) dostatecznie monitorują wyniki ilościowej i jakościowej elektroforezy białek, ale nie oceniają komentarza interpretacyjnego, który jest z nim powiązany. Jednym z głównych powodów jest brak standaryzacji nomenklatury i formy raportu z elektroforezy białek surowicy [4].

ZALECENIA

Dla elektroforezy żelowej i kapilarnej co najmniej jedna próbka kontrolna w serii badanej.

Materiał kontrolny powinien pozwalać na ocenę każdej frakcji w elektroforezie białek.

Oprócz komercyjnych materiałów kontrolnych dopuszcza się stosowanie surowicy pacjentów jako materiał kontrolny.

W IFE / IUSB / IT wskazane jest wykonanie kontroli jakości przy zmianie serii zestawu i/lub serii antysurowic.

Uczestnictwo w zewnętrznej ocenie jakości EQA (ang. *External Quality Assessment*) co najmniej 2 razy w roku.

10. INTERFERENCJE

W metodach elektroforezy (AGE, CE) oraz immunofiksacji (IFE) i immunotypowania (IT) może interferować wiele czynników. Udział interferujących substancji egzogennych oraz endogennych zmienia wielkość i cechy jakościowe frakcji białek surowicy. Ponadto może również sugerować obecność dodatkowej strefy białek. Wpływ niektórych substancji, sugerujący obecność białka monoklonalnego w wyniku elektroforezy, może zostać zweryfikowany po wykonaniu immunofiksacji. Większym wyzwaniem są interferencje mające wpływ na IFE. W przypadku, kiedy nie ma możliwości wyeliminowania czynnika interferującego, sprawozdanie z wyników elektroforezy białek surowicy powinno być opatrzone odpowiednim komentarzem informującym o interferencjach.

Osoby wykonujące badania powinny podlegać stałym szkoleniom w zakresie interferencji i możliwości ich rozwiązania.

Poniżej przedstawiono czynniki interferujące najczęściej spotykane w praktyce laboratoryjnej [11, 14, 32-34, 36-42].



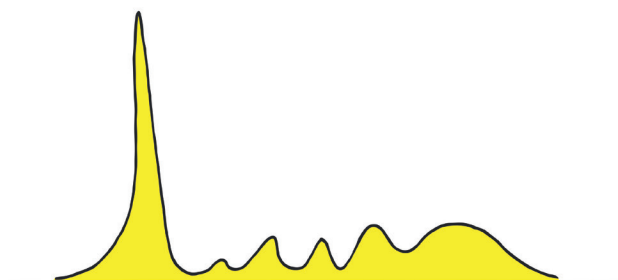
10.1. Endogenne czynniki interferujące

10.1.1. Fibrynogen

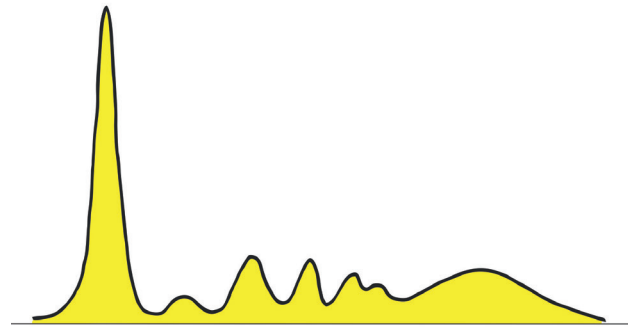
- Interferencja występująca w próbkach pacjentów z zaburzeniami krzepnięcia lub przy wykonaniu badań z osocza.
- Wpływ na metodę AGE, CE – dodatkowa strefa białka we frakcji beta/gamma globulin sugerująca obecność białka monoklonalnego (ryc. 36, 38). Wynik nie może być wydany bez weryfikacji immunofiksacją/immunotypowaniem.
- Wpływ na metodę IFE – reakcja krzyżowa z antysurowicą IgA, utrudniona ocena obecności białka monoklonalnego. Możliwa weryfikacja z zastosowaniem antysurowicy dla fibrynogenu lub selektywne usunięcie fibrynogenu. Wynik może być wydany po identyfikacji interferencji.
- Należy zwrócić uwagę na czas wykrzepiania próbki krwi pobranej na „skrzep”. Nie wykonywać badań z próbki osocza (ryc. 36, 37).



Rycina 36. CE białek osocza (obecna słaba strefa fibrynogenu we frakcji gamma globulin).



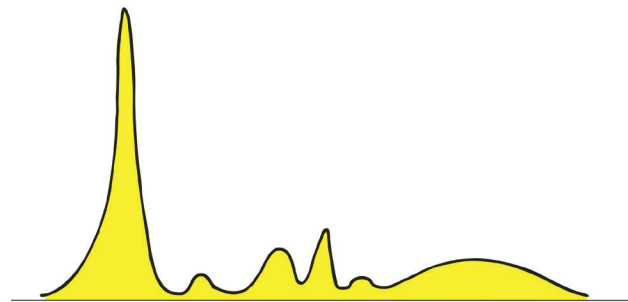
Rycina 37. CE białek surowicy pacjenta dializowanego (podwyższona frakcja beta 2 globulin, szeroka o zaokrąglonym wierzchołku).



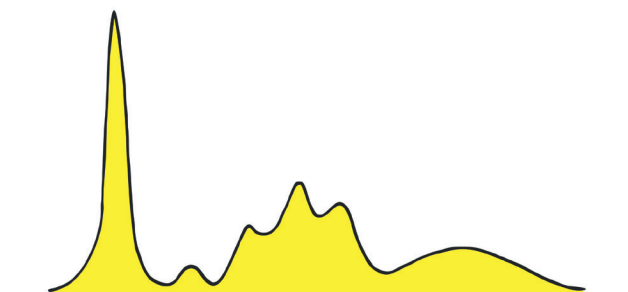
Rycina 38. AGE białek osocza (obecna dodatkowa słaba strefa fibrynogenu we frakcji beta 2 – gamma globulin).

10.1.2. Hemoliza

- Interferencja wynikająca z błędów pobrania, niewłaściwego przygotowania lub przechowywania próbek krwi.
- Wpływ na metodę AGE, CE – dodatkowa strefa białka we frakcji alfa 2 i beta globulin (ryc. 39, 40). Ilościowa ocena białka monoklonalnego występującego we frakcji beta globulin może być zawyżona.



Rycina 39. CE białek surowicy próbki z hemolizą (wzrost i przesunięcie frakcji alfa 2 globulin – kompleks hemoglobina + haptoglobina, oraz wzrost frakcji beta 1 globulin – wolna hemoglobina).

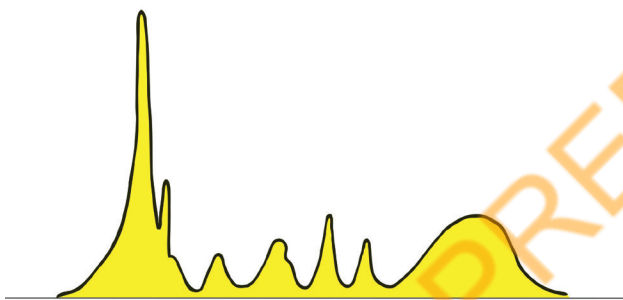


Rycina 40. AGE białek surowicy próbki z hemolizą (dodatkowa strefa we frakcji alfa 2 globulin).

- Obecność białka monoklonalnego w obrębie strefy alfa 2 lub beta globulin należy zweryfikować w IFE.
- Należy powtórzyć badanie z próbki z nowego pobrania, bez hemolizy. Jeśli nie ma możliwości powtórzenia badania z nowego pobrania, należy wydać wynik z komentarzem o obecności interferencji.

10.1.3. Ikteria

- Interferencja związana jest z obecnością wysokiego stężenia bilirubiny oraz pigmentów żółciowych, zwykle u pacjentów z chorobami wątroby, niewydolnością wielonarządową lub niedokrwistością hemolityczną.
- Wpływ na metodę AGE, CE – dodatkowa strefa białek we frakcji albuminy oraz zmiany w obrębie frakcji beta globulin (ryc. 41).

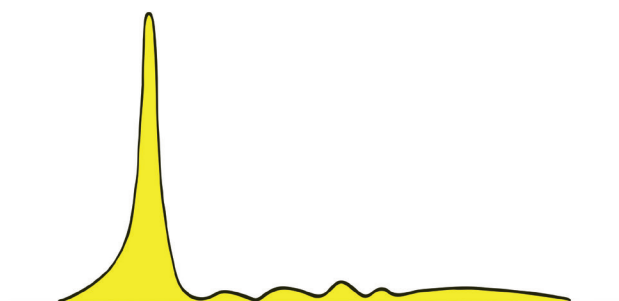


Rycina 41. CE białek surowicy próbki z hiperbilirubinemią (dodatkowa strefa we frakcji albuminy).

- Jeśli nie ma możliwości uzyskania próbki surowicy bez ikterii, należy wydać wynik z komentarzem o obecności interferencji.

10.1.4. Lipemia

- Interferencję stanowi zwykle silna lipemia w próbkach surowicy pacjentów z chorobami metabolicznymi, leczonych sterydami lub stosujących żywienie pozajelitowe.
- Wpływ na metodę AGE, CE – dodatkowa strefa we frakcji alfa 2 i/lub beta globulin. W CE możliwe obniżenie wszystkich frakcji w wybitnej lipemii (ryc. 42).



Rycina 42. CE białek surowicy próbki z lipemią (obniżenie wszystkich frakcji).

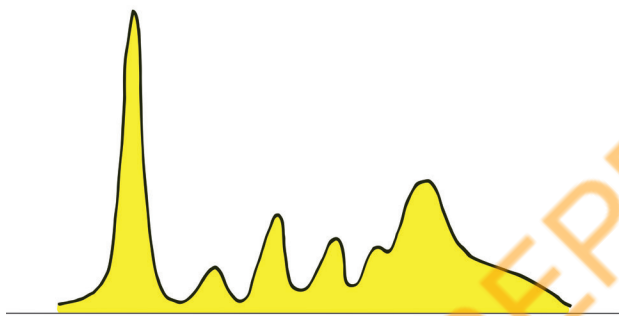
- Obecność białka monoklonalnego w obrębie strefy alfa 2 lub beta globulin należy zweryfikować w IFE. Jeśli nie ma możliwości uzyskania próbki surowicy bez lipemii, należy wydać wynik z komentarzem o obecności interferencji.
- Należy powtórzyć badanie z próbki pobranej od pacjenta na czczo, przed podaniem żywienia pozajelitowego.

10.1.5. Ludzkie przeciwzwierzęce przeciwciała (HAAAs)

- Interferencja związana z obecnością przeciwciał heterofilnych lub HAMA (ang. *human anti-mouse antibody*, ludzkie przeciwciała przeciw białkom mysim) wykrywanymi u pacjentów po niektórych szczepieniach, terapiach zwierzęcymi immunoglobulinami lub po ekspozycji zawodowej związanej z pracą ze zwierzętami.
- Wpływ na metodę AGE, IFE – obraz elektroforezy sugerujący obecność niskiego stężenia białka monoklonalnego oraz identyfikacja białka monoklonalnego w IFE, nie związana z dyskrazją plazmacytów. Niespójność wyników z innymi badaniami weryfikującymi gammopatię monoklonalną.
- Interferencja niemożliwa do zweryfikowania i wyeliminowania w laboratorium. W interpretacji wyniku lekarz musi mieć świadomość klinicznego znaczenia zjawiska HAAAs (ang. *human anti-animal antibodies*).

10.1.6. Poliklonalne IgG4

- Interferencja związana z wysokim stężeniem poliklonalnych immunoglobulin IgG4, zwykle u pacjentów ze stanem zapalnym lub chorobami autoimmunizacyjnymi.
- Wpływ na AGE, CE, IFE – w elektroforezie odchylenie od symetrii frakcji gamma globulin, sugerujące obecność białka monoklonalnego (ryc. 43). Utrudniona ocena białka monoklonalnego w IFE ze względu na intensywne, niejednorodne wysycenie barwnika i obecność szerokiego prążka w ścieżkach dla łańcucha ciężkiego gamma oraz obu lekkich łańcuchów kappa i lambda.



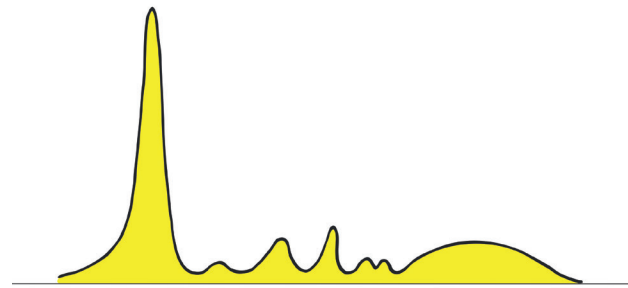
Rycina 43. AGE białek surowicy z wysokim stężeniem poliklonalnej IgG4.

- Należy powtórzyć IFE z próbki rozcieńczonej. Często nie można wykluczyć obecności białka monoklonalnego w obrębie frakcji gamma globulin.

10.2. Egzogenne czynniki interferujące

10.2.1. Środki kontrastowe

- Wpływ na CE – dodatkowa strefa białek we frakcji alfa 2 lub beta 2 globulin (ryc. 44).
- Wynik można zweryfikować, wykonując IFE lub AGE.
- Próbkę krwi należy pobierać przed podaniem środków kontrastowych.



Rycina 44. CE białek surowicy pacjenta po podaniu środka kontrastowego (obecna dodatkowa słaba strefa we frakcji beta 2 globulin).

10.2.2. Leki

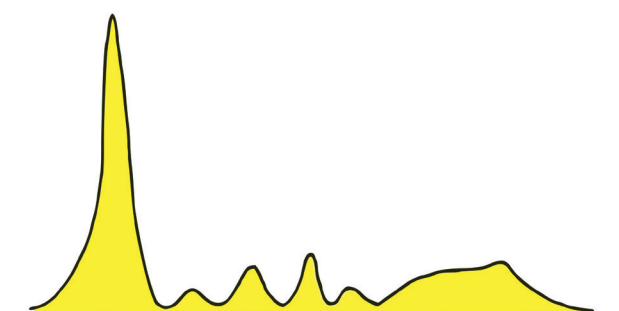
(m.in.: ceftriakson, sulfametoksazol, piperacylia, tazobaktam, 5-fluorocytozyna)

- Wpływ na CE – dodatkowe strefy białka we frakcjach albuminy, alfa globulin lub beta globulin. Toksyczne kumulowanie leku w wyniku niewydolności nerek.
- Wynik można zweryfikować, wykonując IFE lub AGE.
- Próbkę krwi należy pobierać przed podaniem leku lub po zakończeniu leczenia.

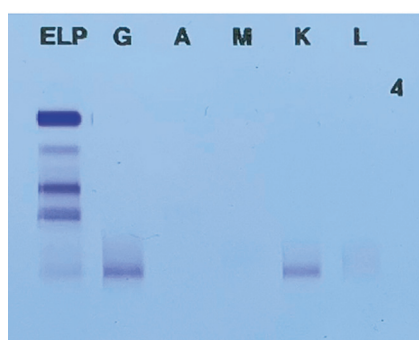
10.2.3. Terapie monoklonalne

(m.in.: daratumumab, izatukymab, elotuzumab, rituximab i bewacyzumab, tocilizumab)

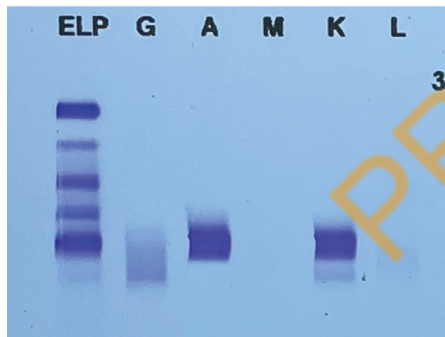
- Interferencja związana z zastosowaniem leczenia terapeutycznymi przeciwciałami monoklonalnymi (zwykle klasy IgG kappa), identyfikowanymi w wynikach elektroforezy i immunofiksacji.
- Wpływ na AGE, CE, IFE – obraz elektroforezy sugeruje obecność niskiego stężenia (< 1,0 g/l) białka monoklonalnego w obrębie strefy gamma globulin. W immunofiksacji stwierdza się obecność białka monoklonalnego klasy IgG kappa (ryc. 45-49).



Rycina 45. CE białek surowicy pacjenta przyjmującego daratumumab w dawkach terapeutycznych (obecna słaba strefa we frakcji gamma globulin).



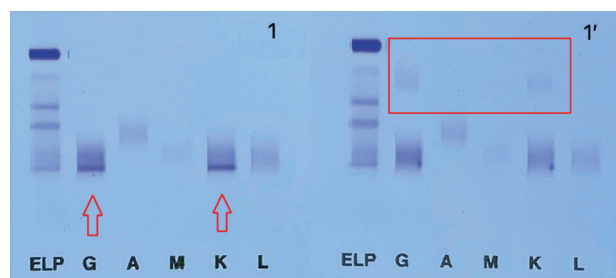
Rycina 46. Wynik immunofiksacji surowicy pacjenta przyjmującego daratumumab, obecne białko monoklonalne IgG kappa.



Rycina 47. Wynik immunofiksacji surowicy pacjenta z białkiem monoklonalnym (endogennym) IgA kappa podczas terapii daratumumabem.

- Konieczne jest poinformowanie laboratorium o stosowanym leczeniu.
- Możliwość zweryfikowania endogennego białka monoklonalnego jedynie u pacjentów leczonych daratumumabem i izatuksymabem za pomocą komercyjnie dostępnych testów (ryc. 48). W przypadku braku możliwości zastosowania ww. testów wskazane jest obok wyniku dodać komentarz: „Możliwa interferencja,

pacjent leczony terapeutycznymi przeciwciałami monoklonalnymi”. Dotyczy to sytuacji, kiedy laboratorium posiada wiedzę na temat stosowanej terapii. W innym przypadku wynik immunofiksacji białek wydawany jest bez dodatkowego komentarza.



Rycina 48. Wyniki immunofiksacji białek pacjenta leczonego daratumumabem. 1 – Badanie wykonane standardową procedurą. Obecne białko monoklonalne IgG kappa (zaznaczono strzałkami). 1' – Badanie wykonane z zastosowaniem techniki Hydrashift 2/4 firmy Sebia. Po dodaniu p/c anty daratumumab na ścieżkę rozdziálu ciężkiego łańcucha gamma oraz lekkiego kappa lek migruje do strefy alfa 1 globulin (zaznaczono ramką). Nieobecne białko monoklonalne.

10.2.4. Substytuty osocza

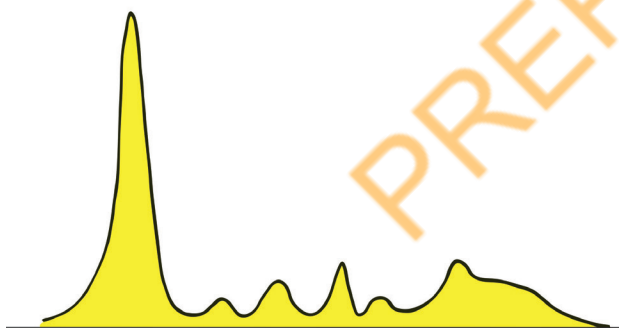
- Interferencja związana z zastosowaniem substytutów osocza na bazie żelatyny ($t_{1/2} = 2,5$ h).
- Wpływ na CE – poliklonalny wzrost frakcji gamma globulin z przesunięciem do frakcji beta 2 globulin, naśladujący mostek beta-gamma globulin. Obecne rozbieżności w wynikach ilościowych całkowitych immunoglobulin i frakcji gamma globulin.
- Wynik można zweryfikować, wykonując IFE lub AGE.

11. MINIMALNE DOŚWIADCZENIE I SPOSÓB PRACY

Pomimo ogromnego postępu w automatyzacji laboratoriów medycznych, który dokonał się na przestrzeni lat, w pracowni białek nadal wyniki autoryzowane są na podstawie subiektywnej oceny. Dlatego też osoby pracujące w obszarze metod elektroforezy powinny stanowić stały, niewielki zespół diagnostów laboratoryjnych i techników analityki koordy-

Tabela V. Wpływ interferencji na elektroforezę białek surowicy wg A. Ciapini, B. Milanese, et al. Electrophoresis atlas of serum proteins, serum immunofixation, urine proteins and crioglobulins.

BIAŁKA	BRAK INTERFERENCJI DO PODANEGO STĘŻENIA [mg/dl]		
	Hemoliza	Triglicerydy	Bilirubina
Prealbumina	400	400	500
Alfa 1 antytrypsyna	500	1500	250
Alfa 1 kwaśna glikoproteina	600	1500	650
Haptoglobina	150	700	600
Transferyna	1600	1800	850
C3	300	300	400
C4	100	150	300
IgG	1100	2000	350
IgA	1100	1500	300
IgM	1100	1500	400
Łańcuchy lekkie	400	800	450



Rycina 49. CE białek surowicy pacjenta przyjmującego elotuzumab lub izatuksimab w dawkach terapeutycznych (obecna słaba strefa we frakcji gamma globulin, migruje bardziej anodowo niż daratumumab).

12. OZNACZENIA WOLNYCH LEKKICH ŁAŃCUCHÓW (FLC)

12.1. Informacje ogólne

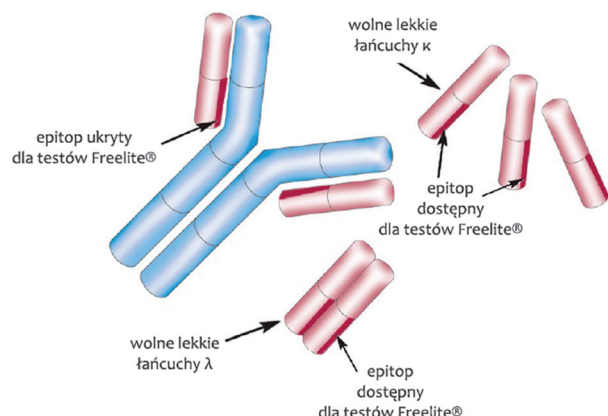
U chorych na MM, obok kompletnej immunoglobuliny, może pojawić się nadprodukcja jednego z dwóch typów łańcuchów lekkich przez rozrastający się klon nowotworowych plazmacytów. Możliwość wykrycia wolnych łańcuchów lekkich w badaniach tradycyjnych: AGE / CE oraz IFE są ograniczone ze względu na stężenie (rzędu kilkudziesięciu, kilkuset mg/l), które często znajduje się poniżej progu wykrywalności we wspomnianych metodach.

nowanych przez kierownika pracowni. Wskazane jest, aby laboratorium opracowało swoje wewnętrzne procedury wykonywania badań, komentowania i autoryzacji wyników.

Zachęcamy do organizowania „wewnętrznych sprawdzianów” oceny proteinogramów i immunofiksacji przez różne osoby i porównania uzyskanych wyników.

Wprowadzone do diagnostyki w ostatnich latach bardzo czułe testy ilościowe istotnie poprawiły możliwości wykrywania oraz monitorowania wolnych łańcuchów lekkich. Zastosowanie testów immunodiagnostycznych pozwala na dokładną ocenę poziomu łańcuchów kappa (κ) oraz lambda (λ), wykorzystując poliklonalne przeciwciała, które rozpoznają determinanty antygenowe wyłącznie wolnych łańcuchów lekkich. Test nie wykrywa łańcuchów lekkich

w kompletnej cząsteczce immunoglobuliny, ponieważ determinanty antygenowe są zasłonięte przez łańcuch ciężki (ryc. 50).



Rycina 50. Epitopy wykrywane w teście oznaczeń wolnych łańcuchów lekkich (FLC – Freelite, zaznaczono strzałką) (Obraz udostępniony dzięki uprzejmości Binding Site, www.binding-site.com).

Wolne lekkie łańcuchy są cząsteczkami o małej masie odpowiednio: 25 kDa i 50 kDa dla κ i λ oraz krótkim okresie półtrwania (2-6 h). Wolne lekkie łańcuchy w kłębuszkach nerkowych są łatwo filtrowane i metabolizowane w kanalikule proksymalnym nefronu. Uszkodzenie nerek oraz polimeryzacja zwiększają ich czas półtrwania do 2-3 dni.

Wprowadzona przez IMWG w roku 2014 roku aktualizacja dotycząca kryteriów narządowego uszkodzenia związana z objawowym szpiczakiem (ryc. 51) uwzględnia stosunek klonalnych do nieklonalnych wolnych łańcuchów lekkich oznaczonych testem Freelite w surowicy jako nowe kryterium (Li) dla wartości co najmniej 100, przy czym stężenie łańcucha klonalnego w surowicy wynosi co najmniej 100 mg/l.

12.2. Zastosowanie oznaczeń FLC

W grupie chorych na MM z produkcją kompletnej cząsteczki immunoglobuliny nieprawidłową wartość współczynnika FLC κ/λ stwierdza się nawet u 90-96% chorych [44, 45]. Szczególnie dużą przydatność diagnostyczną badanie to wykazuje w grupie chorych z niewydzielającą postacią szpiczaka [46] oraz LC MM [47], u których nie wykrywa się kompletnej

cząsteczki immunoglobuliny, a stężenie FLC może stanowić ekwiwalent obecności białka monoklonalnego.

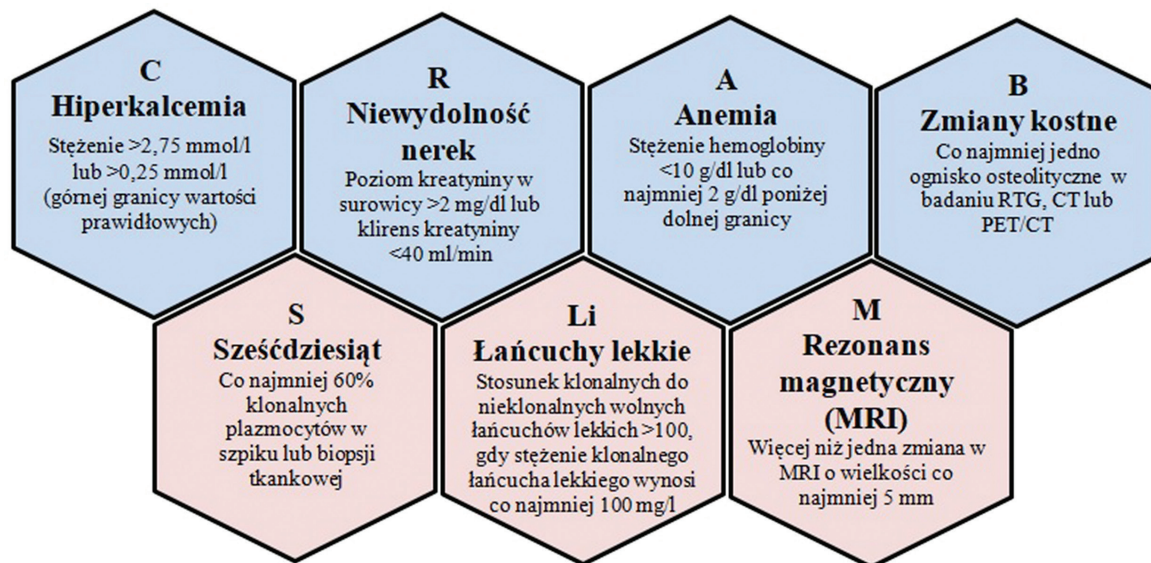
Opublikowane prace wskazują, że oznaczenia FLC łącznie z badaniem AGE / CE oraz IFE pozwalają na wykrycie białka monoklonalnego u wszystkich chorych z gammopatią w chwili rozpoznania oraz podczas monitorowania leczenia [43], co znajduje odzwierciedlenie w obowiązujących zaleceniach krajowych oraz międzynarodowych dotyczących oznaczeń FLC [48-50].

Szerokie zastosowanie oznaczeń FLC w monitorowaniu leczenia wynika z krótszego okresu półtrwania FLC, w porównaniu z immunoglobulinami (np. IgG – 20-25 dni). Szczególnie ważną rolę oznaczenia FLC odgrywają we wczesnej ocenie skuteczności terapii, a brak redukcji ich stężenia może przyczyniać się do podjęcia decyzji o zmianie schematu leczenia [51-53]. Dane literaturowe donoszą także o wartości prognostycznej stosunku FLC κ/λ w grupie chorych z dyskracjami plazmocytowymi [44].

Badanie białek surowicy metodami AGE / CE oraz IFE łącznie z oznaczeniami FLC przyczyniło się do ograniczenia wykonywania rozdziału białek moczu ze zbiórki dobowej. Wynikało to z faktu uzyskiwania niejednorodnych wyników, które często spowodowane były błędami popełnianymi podczas wykonywania dobowej zbiórki moczu przez pacjenta. Ponadto wykazano, że ilość wykrywanych FLC w moczu uzależniona jest od funkcji nerek, co wskazuje, że oznaczenia ilościowe FLC w surowicy są lepszym wskaźnikiem aktywności choroby. Opublikowane badania potwierdziły przewagę oznaczeń FLC w surowicy nad badaniami UPEP (ang. *urine protein electrophoresis*, elektroforeza białek moczu) i UIF (ang. *urine immunofixation electrophoresis*, immunofiksacja moczu). Zmiany stężenia FLC obserwowane w trakcie leczenia lepiej odzwierciedlały skuteczność prowadzonej terapii oraz miały związek z rokowaniem chorych w porównaniu z wynikami otrzymanymi w moczu [54, 55].

12.3. Zakres referencyjny i interpretacja wyników FLC

Zakresy wartości prawidłowych dla FLC wynoszą: 3,3-19,4 mg/l dla FLC κ i 5,7-26,3 mg/l dla FLC λ . Stosowane zestawy odczynnikowe umożliwiają wykrycie



Rycina 51. Zmodyfikowane kryteria uszkodzenia narządów w szpiczaku plazmocytołowym (SLiM CRAB). Zalecenia Polskiej Grupy Szpiczakowej dotyczące rozpoznawania i leczenia szpiczaka plazmocytołowego oraz innych dyskracji plazmocytołowych na rok 2022/2023.

najniższych stężeń FLC κ i λ na poziomie odpowiednio: 0,6 mg/l i 1,3 mg/l. Oznaczenia wolnych lekkich łańcuchów pozwalają wyliczać różne współczynniki.

Jednym z nich jest współczynnik κ/λ , który stanowi uznany wskaźnik klonalnej proliferacji plazmocytołów w przebiegu gammapatii monoklonalnej. Prawidłowa wartość FLC κ/λ , mieści się w zakresie od 0,26 do 1,65.

- Wysoka wartość współczynnika ($> 1,65$) może wskazywać na produkcję klonalnych łańcuchów typu κ , natomiast niska ($< 0,26$) wskazuje na nadprodukcję klonalnych łańcuchów typu λ przez klon nowotworowych plazmocytołów.
- Wyniki oznaczeń FLC i współczynnika κ/λ należy ostrożnie interpretować w sytuacjach, gdy stwierdza się niedobory odporności lub aplazję szpiku. Nieprawidłowa wartość współczynnika κ/λ w takich przypadkach może nie stanowić o klonalności.

Nieprawidłowe wyniki oznaczenia FLC nie muszą jednak wskazywać na gammapatię monoklonalną i mogą być stwierdzane także w przebiegu różnych chorób nienowotworowych.

- W niewydolności nerek można zaobserwować zawyżoną wartość stężenia FLC oraz prawidłowy lub podwyższony stosunek κ/λ , co wynika

ze zredukowanego wydalania FLC. Producenci testów do oznaczeń FLC rekomendują zastosować w tej grupie chorych zmodyfikowany zakres referencyjny współczynnika κ/λ : 0,37-3,1.

- Hipergammaglobulinemie poliklonalne (stany zapalne w przebiegu chorób autoimmunologicznych, neurologicznych lub przewlekłych chorób wątroby) istotnie wpływają na wartość FLC, co ma związek ze zwiększoną syntezą immunoglobulin przez limfocyty B. Często obserwuje się zachowaną dominację łańcucha typu κ i nieprawidłową wartość współczynnika κ/λ .

Do pozostałych współczynników, obliczanych na podstawie wyników FLC, których popularność w praktyce klinicznej jest mniejsza, należą:

- współczynnik i/uFLC (ang. *involved / uninvolved light chain*, zaangażowane / niezaangażowane łańcuchy lekkie) w liczniku znajduje się wartość stężenia monoklonalnego FLC (iFLC), natomiast w mianowniku poliklonalnego FLC (uFLC).
- dFLC (ang. *difference between involved and uninvolved light chain*) – różnica między monoklonalnym i poliklonalnym wolnym łańcuchem lekkim,

ZALECENIA

Na wyniku badania FLC powinny znajdować się: stężenie wolnych łańcuchów lekkich κ oraz λ podane w mg/l i wyliczona wartość współczynnika κ/λ .

Zaleca się wykonywanie oznaczeń FLC łącznie z badaniem AGE / CE i IFE u wszystkich chorych z gammopatią monoklonalną w chwili rozpoznania oraz podczas monitorowania leczenia.

Wykonywanie oznaczeń FLC jest bezwzględnie konieczne w grupie chorych, u której stężenie białka monoklonalnego jest często poniżej progu wykrywalności tradycyjnymi metodami (AGE / CE, IFE), m.in. w grupie pacjentów z niewydzielającą postacią szpiczaka oraz chorobą lekkich łańcuchów (LCMM; ang. *light chain multiple myeloma*).

Oznaczenia FLC w surowicy można traktować jako badanie alternatywne w stosunku do badania moczu technikami elektroforetycznymi w kierunku białka monoklonalnego (za wyjątkiem amyloidozy oraz LCMM).

PREPRINT

13. PIŚMIENICTWO

- Tate JR, Keren DF, Mollee P, et al. A global call to arms for clinical laboratories – Harmonised quantification and reporting of monoclonal proteins. *Clin Biochem*. 2018; 51: 4–9.
- Report of Survey conducted by IFCC WG Harmonisation of Interpretive Commenting EQA (WG-ICQA) subgroup: Results of an international survey of the reporting of protein electrophoresis and serum free light chains, and quantification of small monoclonal proteins. 2017, www.ifcc.org.
- Wijeratne N, Tate JR, Wienholt L, et al. Report of the Survey Conducted by RCPAQAP on Current Practice for Paraprotein and Serum Free Light Chain Measurement and Reporting: a Need for Harmonisation. *Clin Biochem Rev*. 2019; 40: 31–42.
- Booth RA, McCudden CR, Balion CM, et al. Candidate recommendations for protein electrophoresis reporting from the Canadian Society of Clinical Chemists Monoclonal Gammopathy Working Group. *Clin Biochem*. 2018; 51: 10–20.
- Tate J, Caldwell G, Daly J, et al. Recommendations for standardized reporting of protein electrophoresis in Australia and New Zealand. *Ann Clin Biochem*. 2012; 49: 242–256.
- Brigden ML, Neal ED, McNeely D, et al. The Optimum Urine Collections for the Detection and Monitoring of Bence Jones Proteinuria. *Am. J. Clin. Pathol.* 1990; 93: 689–693.
- Tate JR. The Paraprotein – an Enduring Biomarker. *Clin Biochem Rev*. 2019; 40: 5–22.
- Keren DF. Capillary Zone Electrophoresis in the Evaluation of Serum Protein Abnormalities. *Am J Clin Pathol*. 1998; 110: 248–252.
- McCudden CR, Mathews SP, Hainsworth SA, et al. Performance Comparison of Capillary and Agarose Gel Electrophoresis for the Identification and Characterization of Monoclonal Immunoglobulins. *Am J Clin Pathol*. 2008; 129: 451–458.
- Bergon E, Miranda I, Miravalles E. Linearity and detection limit in the measurement of serum M-Protein with the capillary zone electrophoresis system Capillarys®. *Clin Chem Lab Med*. 2005; 43: 721–723.
- Bossuyt X, Lissioir B, Marien G, et al. Automated Serum Protein Electrophoresis by Capillarys®. *Clin Chem Lab Med*. 2003; 41: 704–710.
- Litwin CM, Anderson AK, Philipps G, et al. Comparison of Capillary Zone and Immunofixation With Agarose Gel and Immunofixation Electrophoresis for Detecting and Identifying Monoclonal Gammopathies. *Am J Clin Pathol*. 1999; 112: 411–417.
- Mussap M, Pietrogrande F, Ponchia S, et al. Measurement of serum monoclonal components: comparison between densitometry and capillary zone electrophoresis. *Clin Chem Lab Med*. 2006; 44: 609–611.
- Regeniter A, Siede WH. Peaks and tails: Evaluation of irregularities in capillary serum protein electrophoresis. 2018; 51: 48–55.
- Keren DF. Protein Electrophoresis in Clinical Diagnosis. CRC Press, Londyn 2003.
- Dembińska-Kieć A, Naskalski JW, Solnica B. Zmiany składu białek osocza i moczu. In: Drożdż R, Naskalski J, Pater P. Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej. Wyd Edra Urban&Partner, Wrocław, 2017: 101–129.
- McCudden CR, Booth RA, Lin DCC, et al. Synoptic reporting for protein electrophoresis and immunofixation. *Clin Biochem*. 2018; 51: 21–28.
- Kumar S, Pavia B, Anderson KC, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2016; 17: e328–e346.
- Keren DF, Schroeder L. Challenges of measuring monoclonal proteins in serum. *Clin Chem Lab Med*. 2016; 54: 947–961.
- Visram A, Vaxman I, Al Saleh AS, et al. Disease monitoring with quantitative serum IgA levels provide a more reliable response assessment in multiple myeloma patients. *Leukemia*. 2021; 35(5): 1428–1437.
- Fernandez CMC, Surribas PD, Garay RP, et al. Vertical cutoff methods in serum protein electrophoresis for the measurement of monoclonal protein concentrations: Which is best? *Clinica Chimica Acta* 2020; 510: 573–580.
- Miller JJ, Taher J, Kulasingam V, et al. To skim or splice? Comparing the quantification of M-proteins using two peak-integration protocols across multiple electrophoresis platforms. *Clin Biochem* 2022; 102: 44–49.
- Schild C, Wermuth B, Trapp-Chiappini D, et al. Reliability of M quantification: comparison of two peak integration methods on Capillarys 2. *Clin Chem Lab Med*. 2008; 46: 876–877.
- Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, et al. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc* 2003; 78: 21–33.
- Tate JR, Smith JD, Wijeratne N, et al. Proposed Addendum to 2012 Recommendations for Standardised Reporting of Protein Electrophoresis in Australia and New Zealand. *Clin Biochem*. 2019; 40: 23–30.
- Schroeder LF, Huls F, Williams CL, et al. A Novel Approach to Estimating M-Protein Concentration: Capillary Electrophoresis Quantitative Immunofixation. *JALM*. 2018; 6: 914–919.
- Katzmann JA, Willrich AV, Kohlhagen MC, et al. Monitoring IgA Multiple Myeloma: Immunoglobulin Heavy/Light Chain Assays. *Clin Chem*. 2015; 61: 360–367.
- Turner AK, Frinack JL, Ettire MW, et al. An international multi-center serum protein electrophoresis accuracy and M-protein isotyping study. Part I: factors impacting limit of quantitation of serum protein electrophoresis. *Clin Chem Lab Med*. 2020; 58: 1–14.
- Salamatmanesh M, McCudden CR, McCurdy A, et al. Monoclonal protein reference change value as determined by gel – based serum protein electrophoresis. *Clin Biochem*. 2018; 51: 61–65.
- Jacobs JFM, Turner KA, Graziani MS, et al. An international multi-center serum protein electrophoresis accuracy and M-protein isotyping study. Part II: limit of detection and follow up of patients with small M-proteins. *Clin Chem Lab Med*. 2020; 58: 547–559.
- Rajkumar SV, Harousseau Jean-Luc, Durie B, et al. Consensus recommendations for the uniform reporting of clinical trials: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 1. *Blood*. 2011; 117: 4691–4695.
- Mills JR, Kohlhagen MC, Willrich, et al. A universal solution for eliminating false positives in myeloma due to therapeutic monoclonal antibody interference. *Blood*. 2018; 132: 670–672.
- McCudden CR, Axel AE, Slaets D, et al. Monitoring multiple myeloma patients treated with daratumumab: teasing out monoclonal antibody interference. *Clin Chem Lab Med*. 2016; 54: 1095–1104.
- Murata K, McCash SI, Carroll B, 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.



35. Chan PC, Chen Y, Randell EW, et al. On the path to evidence-based reporting of serum protein electrophoresis patterns in the absence of a discernible monoclonal protein – A critical review of literature and practice suggestions. *Clin Biochem*. 2018; 51: 29–37.
36. McCudden CR, Jacobs JFM, Keren D, et al. Recognition and management of common, rare, and novel serum protein electrophoresis and immunofixation interferences. *Clin Biochem*. 2018; 51: 72–79.
37. Finn WG, Gulbranson R, Fisher S, et al. Detection of Polyclonal Increases in Immunoglobulin G4 Subclass by Distinct Patterns on Capillary Serum Protein Electrophoresis. *Am J Clin Pathol*. 2016; 146: 303–311.
38. Shih AWY, McFarlane A, Verhovsek M. Haptoglobin testing in hemolysis: Measurement and interpretation. *Am J Hematol*. 2014; 89: 443–446.
39. Tang F, Malek E, Math S, et al. Interference of Therapeutic Monoclonal Antibodies With Routine Serum Protein Electrophoresis and Immunofixation in Patients With Myeloma. *Am J Clin Pathol*. 2018; 150: 121–129.
40. Keren DF. Therapeutic Complications: A Caveat for M-Protein Detection. *J Appl Lab Med*. 2017; 1(4): 342–345.
41. Murray DL, Seningen JL, Dispenzieri A, et al. Laboratory Persistence and Clinical Progression of Small Monoclonal Abnormalities. *Am J Clin Pathol*. 2012; 138: 609–613.
42. Durie BGM, Miguel JFS, Blade J, et al. Clarification of definition of complete response in multiple myeloma. *Leukemia*. 2015; 29: 2416–2417. DOI: 10.1038/leu.2015.290.
43. Giannopoulos K, Jamroziak K, Usnarska-Zubkiewicz L, et al. Zalecenia Polskiej Grupy Szpiczakowej dotyczące rozpoznawania i leczenia szpiczaka plazmocytoowego oraz innych dyskrazji plazmocytoowych na rok 2022/23. www.hematoonkologia.pl.
44. Katzmann JA., Kyle RA., Benson J, et al. Screening panels for detection of monoclonal gammopathies. *Clin Chem*. 2009; 55(8): 1517–1522.
45. Snozek CLH, Katzmann JA, Kyle RA, et al. Prognostic value of the serum free light chain ratio in newly diagnosed myeloma: proposed incorporation into the international staging system. *Leukemia*. 2008; 22(10): 1933–1937.
46. Drayson M, Tang LX, Drew R, et al. Serum free light-chain measurements for identifying and monitoring patients with non-secretory multiple myeloma. *Blood*. 2001; 97(9): 2900–2902.
47. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, et al. Serum test for assessment of patients with Bence Jones myeloma. *Lancet*. 2003; 361(9356): 489–491.
48. Dmoszyńska A, Usnarska-Zubkiewicz L, Walewski J, et al. Zalecenia Polskiej Grupy Szpiczakowej dotyczące rozpoznawania i leczenia szpiczaka plazmocytoowego oraz innych dyskrazji plazmocytoowych na rok 2017. *Acta Haematol Pol*. 2017; 48(2): 55–103.
49. Kumar SK, Callander NS, Alsina M, et al. Multiple Myeloma, Version 3.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2017; 15(2): 230–269.
50. Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G, et al. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia*. 2009; 23(2): 215–224.
51. Iwama KI, Chihara D, Tsuda K, et al. Normalization of free light chain kappa/lambda ratio is a robust prognostic indicator of favorable outcome in patients with multiple myeloma. *Eur J Haematol*. 2013; 90(2): 134–141.
52. Yagci F, Karakaya F, Suyani E, et al. Serum free light chain response after 2 courses of induction chemotherapy predicts prognosis in myeloma patients. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2015; 15(2): 98–102.
53. Hansen CT, Pedersen PT, Nielsen LC, et al. Evaluation of the serum free light chain (sFLC) analysis in prediction of response in symptomatic multiple myeloma patients: Rapid profound reduction in involved FLC predicts achievement of VGPR. *Eur J Haematol*. 2014; 93(5): 407–413.
54. Dejoie T, Corre J, Caillon H., et al. Serum free light chains, not urine specimens, should be used to evaluate response in light-chain multiple myeloma. *Blood*. 2016; 128(25): 2941–2949.
55. Dejoie T., Attal M., Moreau P., et al. Comparison of serum free light chain and urine electrophoresis for the detection of the light chain component of monoclonal immunoglobulins in light chain and intact immunoglobulin multiple myeloma. *Haematologica*. 2016; 101(3): 356–362.