Il dosaggio della componente monoclonale in chimica liquida: fonti di ambiguità

M. Ruggeri[a] , M. Gallina[b] , B. Biasioli[c], I. Brusca[d] , G. Galli[e], S. Mangraviti[f], B. Milanesi[g] , C. Ottomano[h], A. Paternoster[i], M. D. Sofia[l], M. Tani[m]

[a]Azienda Ospedaliera S.Giovanni-Addolorata,Roma,
[b]Azienda Ospedaliera della Valtellina e della Valchiavenna- Presidio di Sondalo (SO),
[c]Azienda Ospedaliera Ospedali Riuniti, Trieste,
[d]Ospedale Buccheri-La Ferla, Palermo,
[e]Ospedale S.Maria Annunziata Bagni a Ripoli (FI),
[f]IRCCS G.Gaslini di Genova,
[gb]Azienda Ospedaliera di Desenzano del Garda (BS),
[h]O*spedali Riuniti, Bergamo*,
[i]*Ospedale S.Bortol, Vicenza,*
[l]*Ospedale S.Giovanni di Dio, Cagliari,*
[m] *Azienda Ospedaliera di Desenzano del Garda (BS)*

Gruppo di Studio-Proteine

La componente monoclonale (CM), secondo le linee guida suggerite dal College of American Pathologists (CAP), deve essere quantificata mediante scansione densitometrica del tracciato elettroforetico, preferibilmente ad alta risoluzione o in capillare[1,2].

La quantificazione della CM con tecniche di chimica liquida, nefelometria e turbidimetria, appare problematica, poichè non corrisponde sempre, per la natura anomala della immunoglobulina monoclonale e per le problematiche intrinseche alle due metodiche, alla misura della concentrazione della CM in densitometria (gold standard)[3,4,5].

La nefelometria, che misura l'intensità della luce rifratta, presenta meno errori legati all'assorbimento della luce emergente, rispetto alla turbidimetria, che misura l'attenuazione della luce trasmessa.

Lo scopo del lavoro è stato quello di verificare queste premesse, analizzando in un solo laboratorio numerosi campioni provenienti da diversi centri, in modo da limitare l'eterogeneità dei risultati.

Per ogni campione abbiamo eseguito il tracciato elettroforetico in elettroforesi capillare (Sebia), quantizzato le IgG, IgA, IgM, le catene kappa e lambda, in nefelometria (BNII Dade Berhing) e turbidimetria (Lx2200 Alfa Wasserman) e tipizzata la CM in immunofissazione (Hydrasis Sebia)[6,7,8].

Sono stati selezionati 160 campioni che presentavano una CM determinabile densitometricamente e valori delle altre immunoglobuline (Ig) soppressi o drasticamente diminuiti allo scopo di poter correlare l'analisi densitometrica con quella basata sulla Ig monoclonale in chimica liquida.

Dei 160 campioni, 138 (86,3%) presentavano una IgG (86 di tipo kappa e 52 di tipo lambda), 15 (9,4%) una IgA (7 di tipo kappa e 8 di tipo lambda), 6 (3,7%) una IgM (1 di tipo kappa e 5 di tipo lambda) ed una (0,6%) lambda libera.

La concentrazione densitometrica della CM andava da 10 ad 80 g/L con un valore medio di 32,33 g/L

È stato eseguito il rapporto tra catene pesanti e leggere (HLR), che in una situazione ideale deve essere uguale a 1. La media per la turbidimetria era uguale a 1,71 e per la nefelometria era 1,30; il valore ottenuto dai dati turbidimetrici si allontana di più dal valore ideale. L'analisi statistica dei dati è stata eseguita con due metodi: la regressione lineare (Fig. 1) ed il plot di Bland Altman (Fig. 2).

Con entrambi i metodi abbiamo confrontato sia le misure nefelometriche che quelle turbibimetriche delle catene pesanti e leggere vs la concentrazione densitometrica della CM in elettroforesi capillare.

Sia la nefelometria che la turbidimetria sovrastimano il dato rispetto alla misura in elettroforesi capillare e sono sostanzialmente metodi sovrapponibili, anche se la turbidimetria sembra dare un errore, sia costante che proporzionale, maggiore rispetto a quello della nefelometria[9]. Per le catene pesanti il coefficiente di correlazione è r = 0.822 (turbidimetria vs densitometria) ed r =

Corrispondenza a: Dott.ssa Maria Ruggeri,Via Felice Govean, 9 - 00159 - Roma. Tel. 06-77054301 - Fax: 06-77054252. E-mail: emme.ruggeri@tiscali.it

Figura 1. Regressione lineare.

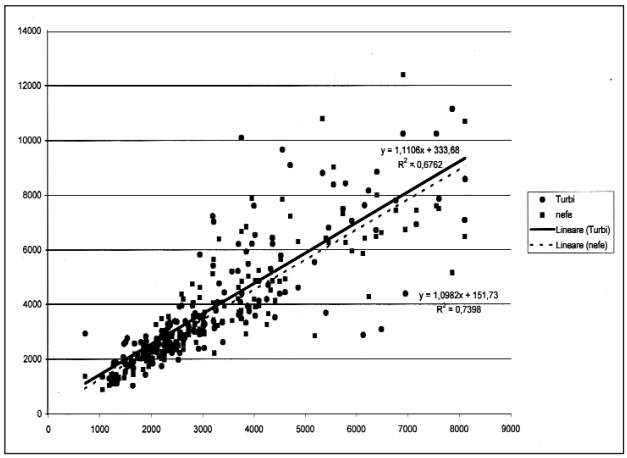
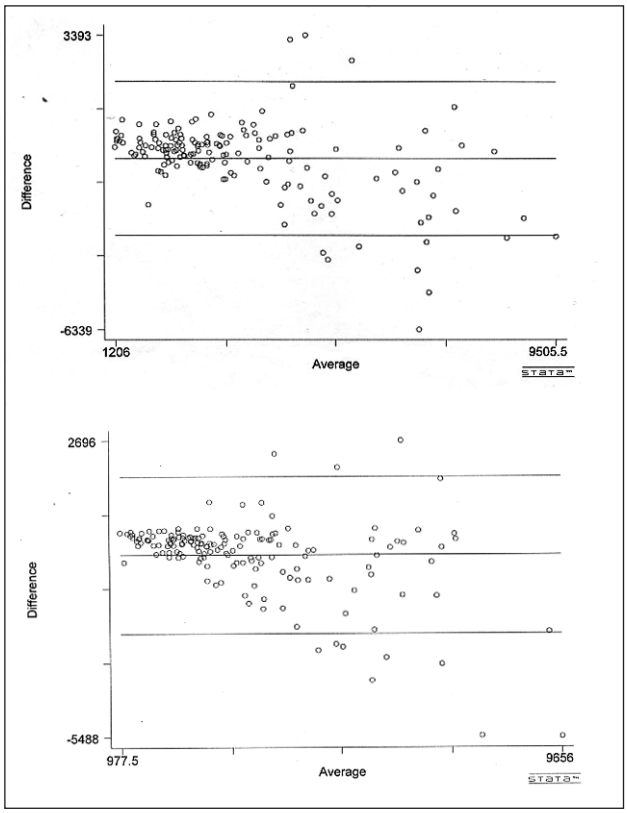


Figura 2. Plot di Bland Altman: EF-Capillare vs Turbidimetria; EF-Capillare vs Nefelometria.



0.860 (nefelometria vs densitometria).
I risultati sono simili a quelli ottenuti applicando il medesimo test alle catene leggere della CM: si è ottenuta una r uguale a 0.715 (turbidimetria vs densitometria) ed r uguale a 0.824 (nefelometria vs densitometria).
L'analisi secondo Bland Altman dimostra che vi è una differenza significativa tra elettroforesi capillare e turbidimetria e tra elettroforesi capillare e nefelometria.
Da tutto ciò si evince che è difficile avere una buona correlazione tra CM densitometricamente determinata e chimica liquida; che grosse CM risentono dei limiti di linearità con entrambi i metodi immunochimici e più a carico della turbidimetria. La dispersione dei dati nella retta di regressione lineare (Fig. 1) è maggiore per valori più elevati di CM. Si hanno errori di quantificazione difficilmente riconducibili al valore atteso in densitometria: il dosaggio non può ritenersi l'esatta misura della concentrazione poiché le immunoglobuline dello standard usato sono policlonali, mentre i determinanti antigenici delle proteine monoclonali non sono ben rappresentati negli antisieri diretti contro le Ig policlonali[10].
Inoltre, osservando i singoli dati, si evidenziano casi in cui la differenza è sostanziale e non è riconducibile ad un problema puramente quantitativo e metodologico. Ciò è presumibilmente dovuto alla natura anomala dell'Ig, ai diversi gradi di polimerizzazione, soprattutto a carico delle IgA ed IgM, ed alla eventuale presenza di catene leggere libere.
In conclusione, la problematica di un campione con CM va risolta valutando il singolo caso ed il valore ottenuto in chimica liquida va esaminato, sia per le catene pesanti che per le catene leggere, tenendo presente che la densitometria resta il valore di riferimento.
Questo confronto permette comunque di distinguere i casi problematici da quelli in cui i dati quantitativi sono coerenti.

Bibliografia

1. Tomar RH. College of American Pathologists Conference XXXII on Guidelines for laboratory evaluation and use of antinuclear antibodies and laboratory diagnosis and monitoring of monoclonal gammopathies. Arch Pathol Lab Med 1999; 123:103.
2. Keren DF, Alexanian R, Goeken JA, Gorevic PD, Kyle RA, Tonmar RH. Guidelines for clinical and laboratory evaluation of patients with monoclonal gammopathies. Arch Pathol Lab Med 1999; 123:106-7.
3. Blirup-Jensen S. Protein standardization III: method optimization basic principles for quantitative of human serum proteins on automated instruments based on turbidimetry or nephelometry. Clin Chem Lab Med 2001; 39: 1098-109.
4. Wuyts B, Bossuyt X, Verhoef G, Blackaert N, Delanghe JR. Conflicting results between electrophoresis methods of serum M-proteins. Electrophoresis 2004; 25: 1548-50.
5. Aguzzi F, Kohn J, Petrini C, Whicher JT.Densitometry of serum protein electrophoretograms. Clin Chem 1986; 32: 2004-5.
6. Mariën G, Vranken G, Demuylder M, Blanckaert N, Bossuyt X. Clinical Capillary Zone Electrophoresis of Serum Proteins: Balancing High Sensitivity and High Specificity. Clin Chem 2003; 49: 1419-21.
7. Gay-Bellile C, Bengoufa D, Houze P, Le Carrer D, Benlakehal M, Bousquet B, Gourmel B, Le Bricon T. Automated multicapillary electrophoresis for analysis of human serum proteins. Clin Chem, 2003; 49: 1909-15.
8. Whicher JT, Warren C, Chambers RE. Immunochemical assays for immunoglobulins. Ann Clin Biochem 1984; 21: 78-91.
9. Riches PG, Sheldon J, Smith AM, Hobbs JR. Overestimation of monoclonal immunoglobulin by immunochemical methods.Ann Clin Biochem 1991; 28: 253-9.
10. Keren DF. Procedures for the evaluation of monoclonal immunoglobulines. Arch Pathol Lab Med 1999; 123:126-32.