

## Linee guida per la diagnostica ed il monitoraggio delle gammopatie monoclonali

M. Ruggeri<sup>a</sup>, F. Bottan<sup>b</sup>, P. Chiarugi<sup>c</sup>, G. Lenci<sup>d</sup>, A. Lucchetti<sup>c</sup>, C. Maida<sup>a</sup>, L. Olivieri<sup>c</sup>, M. Panichi<sup>e</sup>

<sup>a</sup> UOD di Medicina di laboratorio I, Azienda Ospedaliera "S. Giovanni-Addolorata", Roma

<sup>b</sup> Laboratorio Analisi, Presidio Ospedaliero Tivoli ASL RM G, Tivoli (RM)

<sup>c</sup> Laboratorio Analisi, Azienda Ospedaliera Pisana, Pisa

<sup>d</sup> Laboratorio Analisi, Azienda Ospedaliera "S. Camillo-Forlanini", Roma

<sup>e</sup> Laboratorio Analisi, USL Massa-Carrara, Massa Carrara (MS)

### Introduzione

Le linee guida sono un tentativo di rendere omogenee le procedure diagnostiche e rappresentano uno strumento utile per comportamenti uniformi e rapidi nella scelta ottimale di test, assicurando così migliori prestazioni a costi più contenuti.

Il Diagnostic Immunology Resource Committee del College of American Pathologists (CAP) ha sviluppato le linee guida per la diagnosi ed il monitoraggio delle gammopatie (1).

La Commissione 05 Proteine della SIBioC sull'argomento ha dato delle raccomandazioni provvisorie (2). Noi cercheremo di suggerire un comportamento pratico atto a migliorare la qualità diagnostica nelle problematiche delle gammopatie e che non può prescindere dalla collaborazione costante con i clinici.

### Definizione

Le gammopatie monoclonali sono condizioni caratterizzate dalla presenza nel siero e/o nelle urine di una immunoglobulina omogenea detta anche componente monoclonale (CM), prodotta da un clone benigno o maligno di cellule B.

### Studio della CM nel siero

Il riscontro occasionale, a seguito di esami di routine, o mirato per un sospetto clinico (Tab. I) di una CM all'elettroforesi sierica ci impone di seguire la procedura indicata nella Tabella II.

L'elettroforesi proteica è l'indagine principale che ci permette di individuare una CM; pertanto deve essere di buona qualità e soddisfare i criteri già proposti dal CAP (3) e dalla Commissione Proteine della SIBioC (2).

Dal momento in cui viene individuata una CM all'ispezione visiva dell'elettroforesi, deve seguire una quantizzazione densitometrica nel caso di banda ben isolata. In alcuni casi in cui sia impossibile applicare

tale procedura o per la esigua quantità della CM (CM dovuta a catene leggere libere che migrano tra alfa2 e beta) oppure per la co-migrazione della CM con la trasferrina o con il C3, ecc., l'unica possibilità di quantizzazione è la nefelometria.

### Tabella I. Quadri clinici delle gammopatie monoclonali.

#### Forme clinicamente occulte (asintomatiche o pre-sintomatiche)

*Gammopatie monoclonali di incerto significato (MGUS)*

*Gammopatie monoclonali "benigne":*

associate a infiammazioni croniche e processi infettivi (ad es. osteomieliti, tubercolosi, infezioni biliari croniche, pielonefriti, artrite reumatoide etc);

associate a dismielopoiesi e leucemie;

associate a Sarcoma di Kaposi e AIDS;

associate a neoplasie epiteliali, particolarmente tumori intestinali, del tratto biliare e della mammella;

associate a polineuropatie idiomatiche;

associate a lipodistrofie, particolarmente alla malattia di Gaucher, alla ipercolesterolemia familiare e xantomatosi.

*Gammopatie monoclonali transitorie:*

associate con trattamento con farmaci, idantoina e sulfonamidi, immunosoppressori;

associate ad infezioni virali;

associate a cardiocirurgia (protesi valvolari);

alcuni casi di malattia da catene pesanti  $\alpha$ ;

da trasferimento placentare in neonati.

#### Forme clinicamente manifeste dovute alla proliferazione del clone neoplastico

Mieloma multiplo, mieloma solitario, plasmocitoma extramidollare, leucemia plasmacellulare

Macroglobulina di Waldstrom

Malattia da catene pesanti  $\gamma$ ,  $\alpha$  e  $\mu$

Malattia da catene H e L delete

#### Forme clinicamente manifeste dovute agli effetti patologici delle CM

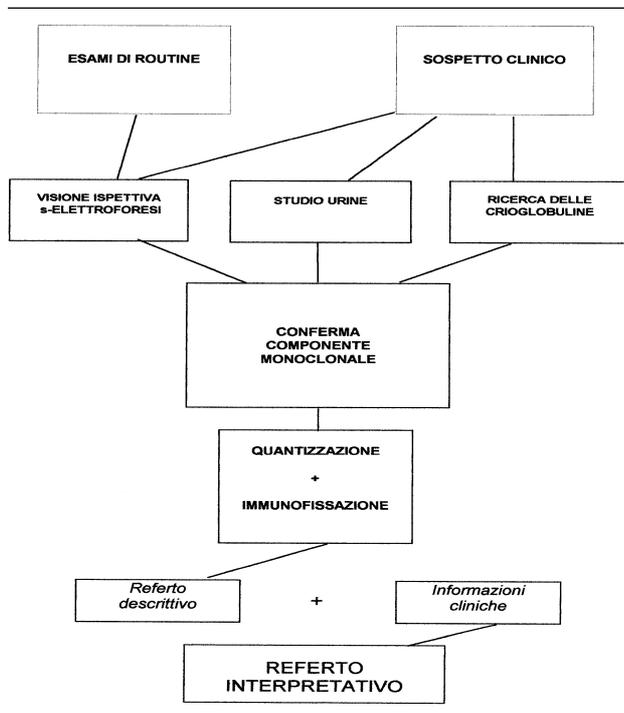
Malattia cronica da crioagglutinine

Amiloidosi AL

Malattia da deposizione di immunoglobuline o catene leggere

Polineuropatie

Sindrome di Poems

**Tabella II. Procedura consigliata per la ricerca della componente monoclonale.**

Si quantizzano le catene pesanti  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\mu$  e le catene leggere  $\kappa$  e  $\lambda$  e si fa il rapporto  $\kappa / \lambda$  (4).

Il passo immediatamente successivo è l'esecuzione dell'IFE (o dell'ISE o immunosottrazione) per mettere in evidenza la qualità della CM e quindi la monoclonalità dell'immunoglobulina coinvolta. Gli antisieri normalmente usati sono: antisieri anti catena pesante  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\mu$  e anti catene leggere  $\kappa$  e  $\lambda$ . Se si ritrovano nel tracciato CM di tipo  $\kappa$  o  $\lambda$  senza la corrispettiva catena pesante, per essere certi che si tratti di una catena leggera libera monoclonale è necessario testare il campione con antisieri anti  $\delta$  o anti  $\epsilon$  per escludere un mieloma IgD o IgE.

In presenza di un forte sospetto clinico, anche ad elettroforesi negativa, l'IFE deve essere obbligatoriamente eseguita (5).

Essa ci permette inoltre di escludere proteine che mimano una CM come ad esempio il fibrinogeno nei pazienti in trattamento anticoagulante, proteina C reattiva e lisozima ad alte concentrazioni, eterozigosi della transferrina, varianti del C3 e  $\beta$ 1 lipoproteina e di identificare una eventuale seconda CM, come catene leggere libere monoclonali.

### Studio della CM nelle urine

In presenza di una CM nel siero rilevata occasionalmente o ad un sospetto clinico associabile a gammopatia monoclonale, è necessario eseguire anche lo studio proteinologico delle urine.

Nelle urine non è tanto importante seguire le sorti della immunoglobulina monoclonale intera sierica, la cui presenza è segno di alterazione glomerulare, ma si

deve ricercare la cosiddetta proteina di Bence Jones (BJP), proteina costituita da catene leggere libere monoclonali (CLLM) di immunoglobuline.

La ricerca della BJP è principalmente indicata per la diagnosi e la prognosi di malattie immunoproliferative, discrasie plasmacellulari, in particolare per la diagnosi differenziale fra gammopatie d'incerto significato (MGUS), mieloma multiplo e malattia di Waldenstrom, per il controllo nel tempo della stabilità di una MGUS e per la stadiazione, il monitoraggio e la risposta alla terapia nel mieloma.

Indicazioni più rare sono il sospetto clinico di amiloidosi AL o di malattia da deposito di catene leggere (6). La BJP si trova propriamente nelle urine; in circolo le CLLM, liberamente filtrate dal glomerulo, hanno emivita breve e si possono riscontrare solo in caso di abbondante produzione, polimerizzazione o alterazione della funzionalità renale.

La ricerca delle CLLM nelle urine è campione e metodica dipendente; di conseguenza è anzitutto rilevante la scelta del campione: urine estemporanee (7) o urine delle 24 ore (1).

Per evitare i falsi negativi legati alla potenziale intermittenza della produzione monoclonale da una parte e all'emivita brevissima dall'altra, si suggerisce la raccolta delle urine prodotte nelle 24h. Infatti le BJP nelle urine rappresentano la produzione plasmacellulare tra il momento dell'ultima minzione e quello della raccolta, durante la quale il campione non necessita di conservante e può essere tenuto a temperatura ambiente (6).

Il campione di urina può essere concentrato se non si dispone di metodi sufficientemente sensibili o se il sospetto clinico richiede sensibilità elevata, come nel caso dell'amiloidosi AL o della malattia da deposito di catene leggere.

Per la ricerca qualitativa delle CLLM nelle urine suggeriamo:

Preliminarmente, il *dosaggio della proteinuria* al fine di verificare se e quanto concentrare il campione per eseguire con sufficiente sensibilità le metodiche successive. Nel dosaggio della proteinuria va assolutamente bandito l'uso delle strisce reattive poiché non dosano le globuline (6).

*Elettroforesi.* Si dovrebbe utilizzare una metodica elettroforetica (EF) con buona risoluzione e alta sensibilità per l'uso di coloranti ad alta affinità per le proteine come il bleu di Coomassie, il violetto acido o l'oro colloidale che potrebbe essere sufficiente come metodo di primo livello.

L'assenza di bande omogenee in un siffatto tracciato elettroforetico esclude ragionevolmente la presenza di CLLM; si dovrà però porre attenzione in particolare alla Transferrina con cui la CLLM potrebbe co-migrare e ad altre proteine presenti nel tracciato in forma di banda omogenea poiché in questo caso la CLLM potrebbe non essere identificabile. In realtà la CLLM può assumere nel tracciato elettroforetico qualsiasi posizione fino anche a simulare l'albumina.

*Immunofissazione (IFE).* L'immunofissazione è ritenuto il metodo di elezione, perché permette di supporre, dalla forma a banda stretta, la monoclonalità della proteina nella fase elettroforetica, e di individuare, nella fase di reazione immunologica, la sua caratteristica molecolare di catena leggera libera, nonché di stabilirne il tipo kappa o lambda.

Gli antisieri che si usano per l'IFE urinaria sono: un antisiero trivalente anti catene pesanti:  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\mu$ , oppure  $\delta$  ed  $\epsilon$  nei rari casi di CM IgD o IgE; ed antisieri anti catene leggere kappa e lambda totali, rivolte cioè sia verso le catene leggere libere sia verso quelle legate delle immunoglobuline intatte.

Per non perdere quei casi di CLLM che migrano insieme alle Ig-monoclonali intatte, suggeriamo, l'utilizzo anche degli antisieri anti catene leggere libere, purchè di buona e comprovata qualità, sia per titolo e avidità, sia per specificità.

La positività per la CLLM si verifica in caso di reazione a banda omogenea con un antisiero anti catena leggera senza corrispondente banda con l'antisiero anti catene pesanti, comprese la  $\epsilon$  e la  $\delta$ .

La frequente presenza nelle urine di catene leggere libere policlonali può creare problemi di diagnosi differenziale con le CLLM soprattutto nel caso di migrazione a bande multiple e regolari delle policlonali, i cosiddetti "ladders". L'IFE nelle urine dovrebbe essere eseguita in tutti i pazienti che hanno una quantità di CM nel siero maggiore di 15 g/L o in cui ci sia il sospetto clinico di una patologia correlata ad una CM: infatti essa, in alcuni pazienti, può essere presente soltanto o nel siero o nelle urine, in altri pazienti può essere presente in piccole quantità nel siero e grande quantità nelle urine (CLLM). Pertanto in questi casi l'IFE dovrebbe essere eseguita anche quando le proteine urinarie sono assenti all'analisi delle urine di routine o quando la proteinuria sulle urine delle 24 ore è entro i valori fisiologici (6).

Se l'elettroforesi delle urine rivela una CM e l'IFE evidenzia una reazione con l'antisiero anti catene pesanti ma non con l'antisiero anti catene leggere totali si deve avere il sospetto di malattia delle catene pesanti (6).

*Determinazione nefelometrica delle catene leggere.* Esistono in commercio antisieri anti catene leggere totali e antisieri anti catene leggere libere adattabili a strumenti automatizzati per nefelometria. Per la ricerca delle CLLM il dosaggio nefelometrico delle catene leggere è metodo generalmente sensibile ma non è ovviamente in grado di distinguere fra le monoclonali e le policlonali che possono essere presenti nelle urine nel caso di alterazione del riassorbimento tubulare anche transitorio. L'assenza di catene leggere dosabili esclude di fatto la presenza di CLLM. Poiché però sono segnalati rari casi di falsi negativi dovuti al fenomeno dell'eccesso di antigene od all'inevitabile discrepanza molecolare fra calibratore e campione, si consiglia di associare al dosaggio delle catene leggere l'elettroforesi.

Il dosaggio delle CLLM può essere utile per la diagnosi, la stadiazione, il monitoraggio e la risposta alla terapia del mieloma.

Per la determinazione quantitativa delle BJP tutti i metodi analitici percorribili presentano numerosi limiti soprattutto sul piano dell'accuratezza.

*Elettroforesi.* Per la valutazione quantitativa della CLLM si può eseguire la densitometria del tracciato elettroforetico (6), sempre che la banda sia ben isolata e non co-migrante con altre proteine. L'espressione percentuale dovrebbe poi essere integrata con la quantità in mg/L desunta in base alle proteine totali.

Purtroppo però spesso la CLLM non si presenta come picco unico di facile identificazione per la scansione densitometrica ed inoltre la misura della proteinuria ha notevoli problemi di accuratezza per proteine che non siano l'albumina.

*Determinazione nefelometrica delle catene leggere.* La determinazione quantitativa delle CLLM con questi metodi teoricamente sarebbe praticabile solo se si esclude con l'elettroforesi o l'IFE la presenza di catene leggere policlonali.

In realtà la presenza di catene leggere (CL) legate policlonali è espressione di danno glomerulare mentre la presenza di CL libere è espressione di danno tubulare. Entrambe queste situazioni complicano abitualmente le malattie associate a CM.

Per quanto riguarda l'uso di antisieri anti CL totali, il danno glomerulare e il suo andamento possono essere valutati con la clearance dell'albumina e della transferina, ma l'interferenza della reazione con le Ig intatte richiede il dosaggio anche di queste e l'uso di "indici" che amplificano inevitabilmente l'errore analitico (8) e (9).

Con gli antisieri anti CL libere quest'ultimo problema è evitato e il danno tubulare con le sue variazioni può essere valutato con il dosaggio della alfa-1 micro e retinol binding protein (RBP).

Poiché dal punto di vista clinico è molto importante valutare la differenza critica fra valori successivi piuttosto che un'accuratezza di cui non si può essere analiticamente garanti e poiché la variabilità fra metodi è inevitabile, la quantificazione delle CLLM per il monitoraggio di un soggetto con CM dovrebbe essere sempre eseguita in uno stesso laboratorio utilizzando lo stesso metodo analitico.

### Ricerca delle crioglobuline

Una nota particolare merita lo studio delle crioglobuline, proteine che precipitano a temperature al di sotto di 37 °C: da ciò deriva l'importanza di mantenere la linea del caldo per il prelievo, la centrifugazione e la coagulazione che devono assolutamente avvenire a 37 °C fino alla separazione del siero. Al fine di non perdere le ipocrioglobuline tardive un'aliquota di siero viene messa per una settimana a 4 °C in un tubo di Wintrobe per determinare un eventuale criocrito. Sul crioprecipitato, opportunamente trattato, viene quindi eseguita l'IFE per la tipizzazione della crioglobulinemia.

## Monitoraggio

Una volta escluse patologie rilevanti correlate alla CM, i pazienti, classificati come MGUS, devono essere sottoposti ogni anno ad una quantificazione della CM nel siero e nelle urine per controllare che non avvengano cambiamenti, e clinici e di laboratorio, dovuti al viraggio della MGUS in disordini linfoproliferativi. I pazienti, invece, con diagnosi di mieloma multiplo, macroglobulinemia di Waldstrom, disordini B linfoproliferativi, amiloidosi, malattie da deposito di catene leggere, neuropatie e CM in trattamento devono essere controllati con elettroforesi e con quantizzazione della CM del siero e delle urine ogni uno o due mesi. Infatti la quantizzazione della CM fornita dal laboratorio documenta l'efficacia o meno della terapia in atto, per cui, se non c'è cambiamento di migrazione della CM all'elettroforesi, è inutile e costoso ripetere l'IFE: infatti per il clinico è utile sapere se, rispetto all'ultimo controllo, si è ridotta la CM e non ritipizzare una molecola già nota.

## Bibliografia

1. 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.
2. Società Italiana di Biochimica Clinica (SIBioC). Commissione 05 – Proteine. L'elettroforesi 1° e 2°. Raccomandazioni provvisorie SIBioC. *Biochim Clin* 1985; 9:1127-34.
3. Keren DF. Procedures for the evaluation of monoclonal immunoglobulins. *Arch Pathol Lab Med* 1999; 123: 126-32.
4. Aguzzi F, Bienvenu J, Jones R, Wicher JT. Monoclonal gammopathies- KLR : a new diagnostic tool. *Diagnostic Pasteur, Marnes La Coquette*, 1991.
5. Keren DF. Consensus guidelines for evaluating monoclonal gammopathies. *Article Archives* 1999;10: Vol. 10, n. 1.
6. Kyle RA. Sequence of testing for monoclonal gammopathies. *Arch Pathol Lab Med* 1999; 123:114-8.
7. Graziani MS, Merlini PG, Petrini C. Linee guida per la ricerca della proteina di Bence Jones. *Biochim Clin* 2001;25: Vol. 25, n. 1.
8. Gasparro C, Bergami MR, Verri A, Rovescala M, Dolce R, Aguzzi F. Detection of Bence Jones Proteins by automated Immunonephelometric measurement of IgG, kappa and lambda light chains on QM300 (Sanofi Diagnostics Pasteur). *Biochim Clin* 1992;16:1230-33.
9. Gasparro C, Verri A, Rovescala M, Dolce R, Bergami MR, Aguzzi F. Possibilità e limiti di una tecnica quantitativa su BNA per la ricerca della proteina di Bence Jones nella urine. *Biochim Clin* 1992;16:1233-7.