

Indicazioni per la quantificazione delle componenti monoclonali nel siero

Arialdo Vernocchi¹, Alberto Dolci² per il Gruppo di Studio SIBioC - Medicina di Laboratorio Proteine

¹Servizio di Medicina di Laboratorio, IRCCS MultiMedica, Milano

²UOC Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera "Luigi Sacco", Milano

ABSTRACT

Recommendations for the quantification of serum monoclonal components (MC). The quantification of MC provides a surrogate for monitoring the size of the population of malignant cells in patients affected by plasma cell disease (PCD). Consequently, clinical and laboratory guidelines on diagnosis, risk stratification and monitoring of PCD recommend MC quantification as a key information for patient management. To do that, liquid phase immunochemical determination of IgG, IgA and IgM in serum should not be used, because of the inability of the technique to distinguish between monoclonal and polyclonal immunoglobulins. However, new available immunoassays specifically measuring free light chains, or the "so-called" Hevylite assay, may reliably quantify specific MC. As a general recommendation, MC should be quantified on agarose gel electrophoresis by scanning densitometry or from capillary zone electrophoresis readout only, provided that a high resolution electrophoresis is performed and a low concentration MC obscured by other proteins is not present. For integration of the MC peak on electrophoresis, perpendicular drop method is recommended. MC is a critical "analyte" as the potential analytical pitfalls (detection limit depending on the position of the MC and on the polyclonal background, poor linearity of scanning methods, precision performance) show. Thus, a comprehensive program of IQC of MC quantification should be implemented as well as an EQAS.

INTRODUZIONE

L'elettroforesi delle sieroproteine (EF), eseguita su supporto di gel di agarosio (AGE) o mediante elettroforesi capillare (CZE), è la tecnica che permette di rilevare l'omogeneità molecolare delle immunoglobuline e quindi la presenza di una componente monoclonale (CM) (1). L'importanza degli aspetti metodologici nella ricerca delle CM nel siero è già stata illustrata in uno specifico documento del Gruppo di Studio "Proteine" della SIBioC (2).

La ricerca delle CM e la loro successiva quantificazione è l'indicazione principale per la richiesta di EF (3). Obiettivo prioritario di questo documento è ribadire l'importanza clinica della quantificazione delle CM nell'ambito delle malattie linfoproliferative della linea plasmacellulare, esaminare gli aspetti critici dell'approccio analitico a questa determinazione e fornire indicazioni operative derivate dalle evidenze disponibili su questo specifico argomento.

IMPORTANZA CLINICA DELLA QUANTIFICAZIONE DELLE CM

L'importanza clinica della quantificazione delle CM deriva dalla sua correlazione con le dimensioni del clone cellulare in proliferazione nel midollo, purché secernente. Pertanto, la quantificazione delle CM rappresenta un biomarcatore, surrogato della biopsia osteo-midollare, necessario, anche se non sufficiente, per:

- porre diagnosi differenziale tra componente monoclonale di incerto significato (MGUS) (CM <30 g/L) e mieloma multiplo (MM) (CM ≥30 g/L) (4, 5);
- definire alla diagnosi il rischio di progressione di una MGUS verso una malattia linfoproliferativa maligna come MM e macroglobulinemia di Waldenström (MW), rischio stimato intorno a 1%/anno, che non si stabilizza nel tempo (6, 7);
- definire il rischio di progressione del MM asintomatico ("smoldering") (SMM) verso il MM clinicamente conclamato, rischio definito a ~10%/anno per i primi 5 anni e che poi scende a ~3%/anno nei successivi 5 anni e a 1-2%/anno nei successivi 10 (6);

Corrispondenza a: Alberto Dolci, UOC Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera "Luigi Sacco", Via G.B. Grassi 74, 20157 Milano. Tel. 0239042290, Fax 0250319835, E-mail dolci.alberto@hsacco.it

Ricevuto: 29.01.2015

Accettato: 30.01.2015

d) valutare la risposta al trattamento in corso di MM e disordini correlati (8, 9).

Per queste ragioni, la quantificazione della CM è esplicitamente indicata tra le determinazioni da eseguire nella valutazione iniziale dei pazienti con sospetto clinico di MM e, se la diagnosi conferma il sospetto clinico, anche nel monitoraggio della malattia (5, 10). Infine, è importante sottolineare altri due aspetti relativi all'impiego della quantificazione delle CM nella pratica clinica:

- nella linea guida dell'“International Myeloma Working Group” che definisce i criteri di risposta al trattamento nel MM è stato introdotto il concetto di “malattia misurabile” basato sulla quantificazione della CM, eventualmente anche urinaria (proteina di Bence Jones) o la determinazione delle catene leggere libere (FLC) nel siero, come prerequisito per l'applicazione dei criteri descritti (8);
- la concentrazione della CM è solo uno dei criteri che consente di valutare il suo impatto clinico. Infatti, in patologie linfoproliferative meno comuni, ma non per questo clinicamente meno gravi, come l'amiloidosi AL, le malattie da deposizione di immunoglobuline monoclonali (MIDD) e la sindrome POEMS (“Polyneuropathy, Organomegaly, Endocrinopathy, M protein and Skin changes”), le manifestazioni cliniche (e in definitiva la prognosi) sono determinate più dalle caratteristiche fisico-chimiche e/o anticorpali della proteina monoclonale che non dall'espansione del clone cellulare (11-13).

METODI PER LA QUANTIFICAZIONE DELLE CM

La CM è una immunoglobulina completa (IgG nel ~70% dei casi, IgA e IgM nel ~15%, raramente IgD ed eccezionalmente IgE) oppure una FLC κ o λ (15-20% del totale delle CM) o, in casi estremamente rari, una catena pesante γ , α o μ , in ogni caso secreta da un singolo clone di derivazione B linfocitaria. La CM è rilevabile sul tracciato dell'EF come una frazione omogenea dal tipico aspetto morfologico di picco alto e stretto (Figura 1). L'intervallo di concentrazione di una CM può variare da <1 g/L a >80 g/L, per cui ai metodi candidati per la sua determinazione è richiesta un'estesa linearità.

Per la quantificazione delle CM sono disponibili sostanzialmente due tecniche analitiche: metodi immunochimici e quantificazione sul tracciato EF.

Metodi immunochimici in fase liquida

La quantificazione di una CM con metodi di immunoturbidimetria o immunonefelometria è caratterizzata da un'elevata inaccuratezza, che deriva essenzialmente da limiti analitici intrinseci a queste tecniche, quali:

a) aspecificità per la CM dell'anticorpo anti-IgG, IgA o IgM, che non è evidentemente in grado di discriminare tra immunoglobuline monoclonali e policlonali, né tra le differenti CM, qualora sul tracciato ne siano presenti più di una della stessa classe. Questo è particolarmente importante nel monitoraggio dei

pazienti con MM e MW, in quanto con la progressione della malattia l'incremento della CM si associa alla riduzione della quota policlonale dell'immunoglobulina (14);

b) mancanza di commutabilità tra il calibratore policlonale del saggio e la CM del campione. Gli antisieri utilizzati nei saggi immunochimici in fase liquida sono ottenuti mediante immunizzazione dell'animale con una grande varietà di immunoglobuline policlonali affinché, per ogni classe, siano idealmente riconosciuti tutti gli iso- e gli allotipi (14). Per la stessa ragione, anche il calibratore è policlonale e reagisce con l'antisiero utilizzato nel saggio in maniera differente dalla CM del campione, generando segnali scarsamente confrontabili (14). Inoltre, è risaputo che ogni CM si comporta in maniera peculiare in termini di capacità legante con gli anticorpi policlonali presenti nell'antisiero di un saggio immunochimico (15);

c) eccesso di antigene. Per quanto descritto, gli epitopi peculiari di ciascuna CM sono riconosciuti solo da una piccola parte degli anticorpi presenti nella miscela policlonale dell'antisiero. Questo espone il sistema analitico al rischio di eccesso di antigene, al quale le tecniche immunochimiche in fase liquida sono particolarmente esposte, soprattutto in presenza di CM di notevole entità (14).

d) differente risposta del saggio alle differenti forme molecolari nelle quali si può presentare la CM. Questo accade quando la CM tende ad aggregarsi, come nel caso delle CM IgM, che in immunonefelometria mostrano una sovrastima sistematica media di ~80% rispetto alla quantificazione sul tracciato dell'EF. Tale sovrastima dipende dalla struttura pentamerica delle IgM circolanti che aumenta la diffusione della luce incidente (“light scattering”), amplificando di conseguenza il segnale rilevato (15).

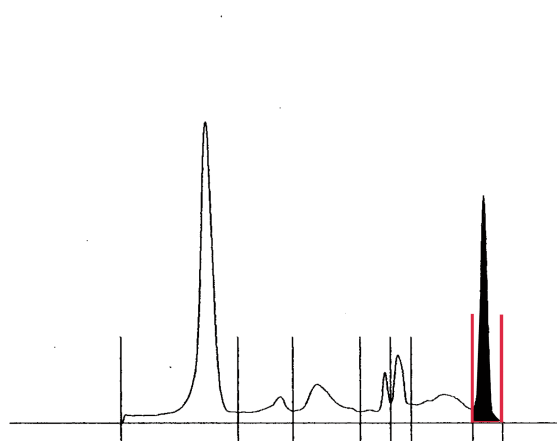


Figura 1

Tracciato di elettroforesi capillare con evidente componente monoclonale in zona γ -globulinica dal tipico aspetto morfologico di picco alto e stretto. La componente monoclonale viene quantificata sul tracciato come percentuale dell'area sottesa tra i due limiti di integrazione, posti manualmente dall'operatore, a partire dalla linea di base.

Sono ora disponibili saggi immunochimici in fase liquida che misurano proteine differenti dalle immunoglobuline complete e forniscono informazioni utili, anzi, per alcune CM, imprescindibili, sull'entità della CM:

a) la determinazione delle FLC κ e λ con saggi che utilizzano anticorpi policlonali o monoclonali ad alta affinità specifici per gli epitopi delle FLC (16, 17), nascosti dalle catene pesanti nelle immunoglobuline complete, permette di quantificare le CM di FLC, comprese quelle amiloidogeniche, anche se di piccola entità, comigranti con altre proteine all'EF o non rilevabili sul tracciato per probabile aggregazione delle FLC (18). Agli aspetti analitici e clinici della determinazione delle FLC è stato recentemente dedicato un numero monografico di *Biochimica Clinica*, al quale si rimanda per ulteriori approfondimenti (19);

b) recentemente, è stato sviluppato un nuovo saggio immunoturbidimetrico, denominato "Hevylite" (The Binding Site), che utilizza anticorpi policlonali in grado di riconoscere gli epitopi conformazionali esposti tra la regione costante delle catene pesanti e la regione costante delle catene leggere delle immunoglobuline. Questi anticorpi identificano, per IgG, IgA e IgM, le immunoglobuline montanti catene κ e quelle montanti catene λ , permettendo quindi la determinazione specifica di IgG κ e IgG λ , IgA κ e IgA λ o IgM κ e IgM λ e il calcolo del rispettivo rapporto (20). Le caratteristiche di attendibilità analitica di questo metodo non sono ancora state tuttavia approfonditamente valutate e descritte in letteratura. Considerando anche che la tecnica si basa su anticorpi e calibratori policlonali, potrebbe essere esposta ai problemi analitici descritti. Pertanto, è necessario attendere verifiche definitive prima di poterla raccomandare per la quantificazione delle CM nella pratica clinica.

È stata infine proposta la stima della CM sottraendo la quota policlonale della classe coinvolta con l'applicazione di 4 algoritmi successivi che richiedono la determinazione di IgG, IgA, IgM e catene leggere totali κ e λ . Questo approccio, oltre a essere indaginoso, mostra limiti di inaccuratezza incompatibili con il suo impiego clinico (21).

Quantificazione sul tracciato EF

Le CM rilevate all'EF possono essere quantificate mediante delimitazione del picco monoclonale sullo stesso tracciato elettroforetico e quantificazione percentuale dell'area sottesa tra i due limiti di integrazione a partire dalla linea di base (Figura 1), con analisi in densitometria per l'AGE o in spettrofotometria per la CZE. I limiti di integrazione della CM devono essere posti manualmente sul tracciato dall'operatore. Per stimare la concentrazione della CM, la sua percentuale così determinata va quindi moltiplicata per la concentrazione delle proteine totali determinata sullo stesso campione. Anche questo approccio analitico presenta dei limiti intrinseci, che devono essere conosciuti e possibilmente controllati, quali:

a) interferenza nella misura da parte di eventuali

proteine comigranti con la CM, che rendono la quantificazione inesatta. Ciò è anche imputabile alla difficoltà o all'impossibilità di definire i limiti di integrazione della CM sul tracciato (22-24);

b) imprecisione totale, che deriva dalla somma dell'imprecisione di due misure, la determinazione delle proteine totali e l'integrazione della CM sul tracciato. L'imprecisione analitica di quest'ultima misura è inversamente e non linearmente correlata alla concentrazione della CM ed, espressa come CV, è stata stimata in CZE pari a ~2,5% per una CM di ~40%, percentuale che mediamente corrisponde alla concentrazione critica per la diagnosi di MM (30 g/L). Tale imprecisione dipende quasi esclusivamente dalla variabilità intra- e interoperatore nel posizionamento dei limiti di integrazione della CM sul tracciato. Infatti, a concentrazioni equivalenti, è maggiore dell'imprecisione totale delle frazioni elettroforetiche, le quali sono separate sulla base di limiti predefiniti dal programma informatico del sistema analitico (25);

c) scarsa linearità di entrambe le tecniche utilizzate. L'AGE sottostima le CM a concentrazione più elevata, particolarmente le IgG, per effetto della saturazione della capacità legante del gel per il colorante e per l'intrinseca, ridotta linearità della tecnica densitometrica (15, 24). Questa scarsa linearità nella misura delle CM IgG >20 g/L può avere importanti ricadute pratiche nel monitoraggio dei pazienti con MM in trattamento. Ciò è dovuto, specie per le CM di maggior entità, al fatto che le modificazioni di concentrazione delle CM IgG non riflettono la riduzione della massa neoplastica in proliferazione clonale, producendo un'indicazione falsamente negativa nella risposta del paziente alla terapia (15). La CZE mostra invece buona linearità fino a ~15 g/L di CM, concentrazione al di sotto della quale si rileva una sovrastima sistematica proporzionale per interferenza delle immunoglobuline policlonali, tanto che le CM <3,5 g/L che migrano in zona γ -globulinica non sono accuratamente quantificabili, perché a queste concentrazioni la misura dipende prevalentemente dal fondo policlonale (26). Questo effetto è ancora più evidente in presenza di ipergammaglobulinemia policlonale (27).

d) scarsa correlazione tra la misura densitometrica in AGE e quella spettrofotometrica in CZE, specie per alte concentrazioni di CM. In particolare, si rileva un "bias", indipendente dalla classe immunoglobulinica, correlato alla concentrazione della CM, con l'AGE che rispetto alla CZE sovrastima le CM <20 g/L e sottostima quelle >20 g/L. Il riscontro è stato sostanzialmente confermato su tutti i sistemi automatici per CZE disponibili sul mercato, confrontati con differenti saggi di AGE (28-30), anche se in uno di questi studi i due metodi valutati mostravano una buona correlazione nella misura della CM fino a concentrazioni ≤ 25 g/L (29). Va sottolineato che la qualità analitica della misura delle CM in AGE varia significativamente in funzione delle caratteristiche dei metodi utilizzati (2, 30).

e) modificazioni strutturali delle CM, specialmente se costituite da IgM o FLC, che tendono ad aggregarsi,

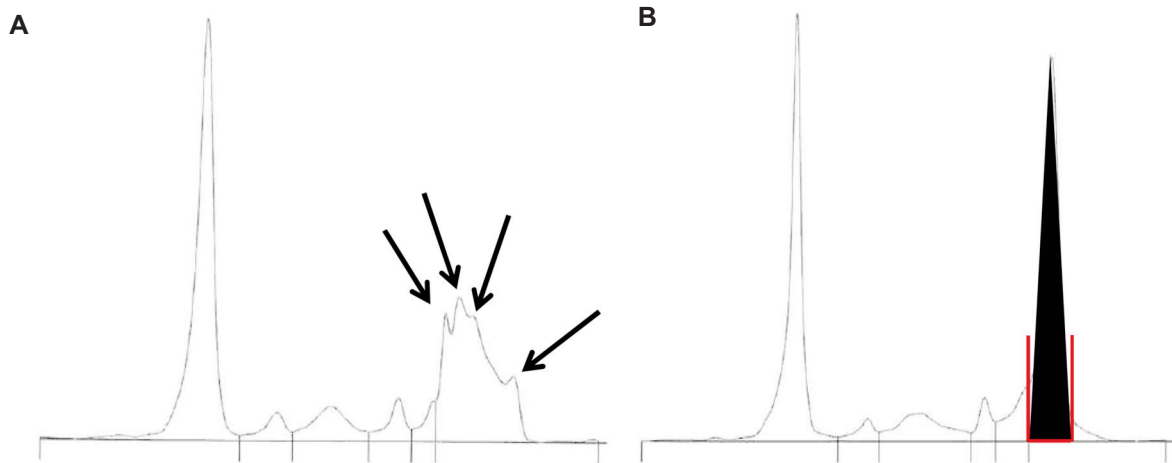


Figura 2

Tracciati di elettroforesi capillare di una componente monoclonale IgM prima (A) e dopo (B) trattamento del siero con acetilcisteina. Prima del trattamento, sul tracciato appaiono 4 componenti monoclonali in zona γ -globulinica non chiaramente separabili tra loro (indicate dalle frecce) che, dopo il trattamento, confluiscono in una sola componente monoclonale accuratamente quantificabile. L'efficacia del pretrattamento con acetilcisteina dimostra che in circolo questa IgM monoclonale tende a polimerizzare in 4 diversi stati di aggregazione, corrispondenti ai picchi rilevabili sul tracciato del siero nativo.

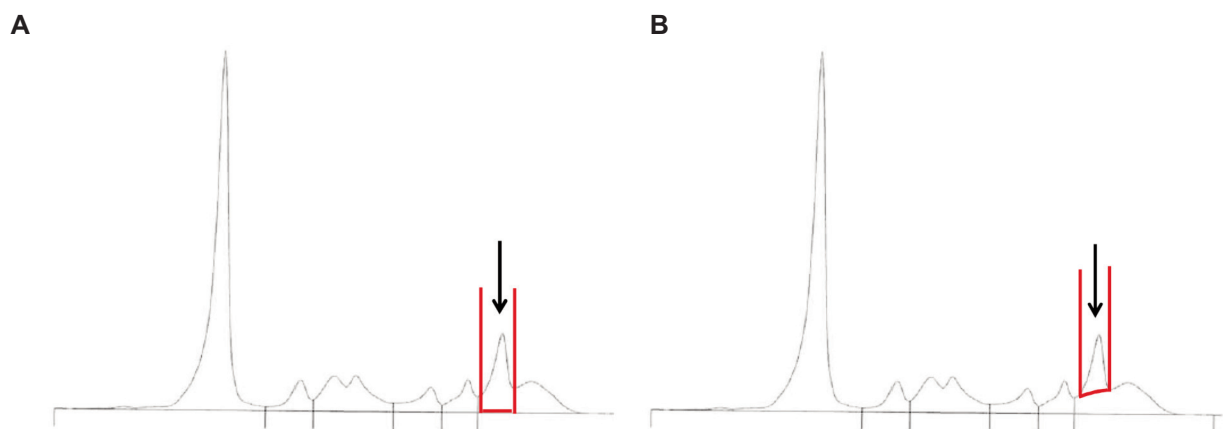


Figura 3

Opzioni metodologiche per la quantificazione di una componente monoclonale in zona γ -globulinica in presenza di un fondo policlonale consistente. Nel tracciato A è applicato l'approccio tradizionale con integrazione dell'area sottesa tra i due limiti di integrazione a partire dalla linea di base, mentre nel tracciato B è utilizzato l'approccio alternativo con integrazione del picco monoclonale a partire dalla tangente con il fondo policlonale che pertanto viene escluso dalla quantificazione.

rendendo così inaccurata la loro quantificazione. Nel caso delle CM IgM, un pretrattamento del siero con sostanze riducenti i legami disolfuro, come 2-mercaptoetanololo o acetilcisteina, può essere efficace nel disaggregare la CM e renderla quantificabile sul tracciato (Figura 2) (31). Nel caso delle CM di FLC, la determinazione immunochimica è la scelta alternativa, come già descritto. Tuttavia, per tutte le CM non determinabili sul tracciato EF, che rappresentano nella pratica clinica la maggior parte delle CM di FLC, tale opzione diviene prioritaria (32). Anche nei casi di CM quantificabile sul tracciato EF, la misura delle FLC è consigliabile, perché permette di monitorare l'efficacia del trattamento con maggiore sensibilità rispetto all'EF

quando la CM si riduce drasticamente e non è più misurabile sul tracciato dell'EF.

Anche per la quantificazione della CM sul tracciato dell'EF è stato proposto un approccio alternativo che prevede l'esclusione del fondo policlonale mediante interpolazione del tracciato e l'integrazione del picco monoclonale a partire dalla tangente con questo fondo (Figura 3). Questo approccio tende a eliminare l'interferenza da immunoglobuline policlonali che, con l'approccio convenzionale, può sovrastimare fino al 58% le CM che migrano in zona γ con concentrazioni comprese tra 10 e 20 g/L e si dimostra lineare fino a 1,5 g/L di CM (27).

L'interferenza da immunoglobuline policlonali con

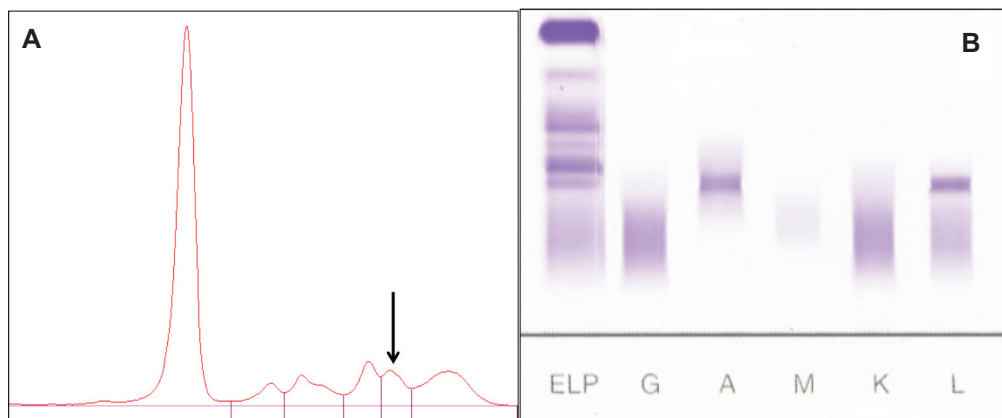


Figura 4

Caso di componente monoclonale IgA λ migrante in zona β_2 -globulinica, confermata all'immunofissazione in gel di agarosio (B), comigrante in elettroforesi capillare (A) con il fattore C3 del complemento. È evidente l'impossibilità di separare sul tracciato elettroforetico la componente monoclonale dalla proteina comigrante.

l'approccio convenzionale può condurre a valutazioni cliniche errate nel monitoraggio dei pazienti con MM o MW, soprattutto in concomitanza di un incremento policlonale delle IgG del paziente, giacché questo determina un incremento spurio della quantità di CM misurata sul tracciato EF tale da simulare una progressione di malattia (27).

RACCOMANDAZIONI PER LA QUANTIFICAZIONE DELLE CM

Ogni CM rilevata all'EF deve essere quantificata mediante lettura del picco monoclonale sul tracciato dell'EF, come raccomandato nelle linee guida di laboratorio (1-3, 14, 18, 33), ma anche cliniche (8, 34-36), ormai da decenni, almeno in Italia (37). Tuttavia questo approccio è applicabile solo quando il metodo utilizzato per l'esecuzione dell'EF è ad alta risoluzione (2, 33) e la CM è ben delimitabile sul tracciato e chiaramente separata dalle altre proteine presenti nella stessa zona elettroforetica. Questo requisito è difficilmente soddisfatto dalle piccole CM (<1 g/L). Nel caso non sussistano questi prerequisiti, pur con tutti i limiti analitici sopra descritti, si può considerare l'utilizzo di un metodo immunochimico in fase liquida per la stima della CM, specie in determinati casi discussi in seguito (24).

Interferenza da proteine comigranti con CM

L'interferenza da proteine comigranti è frequente nelle CM che migrano in zona α_2/β -globulinica, dove si sovrappongono ad aptoglobina (zona α_2), transferrina (zona β_1) e fattore C3 del complemento (zona β_2). Queste CM (spesso IgA) sono difficilmente delimitabili sul tracciato elettroforetico oppure del tutto oscurate dalle proteine comigranti se di piccola entità (Figura 4). In questi casi:

a) la quantificazione immunonefelometrica o immunoturbidimetrica risulta più accurata della quantificazione eseguita sul tracciato dell'EF, soprattutto se ripetuta sullo stesso sistema analitico (8, 18, 34, 35). Per la quantificazione delle CM IgA, in particolare, è riportata un'ottima correlazione tra AGE e immunonefelometria ("slope", 0,92; intervallo di confidenza al 95%: 0,87-1,02) per un ampio intervallo di concentrazione (11-67 g/L), al contrario delle CM IgG e soprattutto IgM che mostrano un'evidente sovrastima del metodo immunochimico (15);

b) uno studio preliminare conferma che il saggio Hevlyte è più accurato della determinazione delle singole classi di immunoglobuline (IgG, IgA, IgM) nella quantificazione delle CM non determinabili sul tracciato elettroforetico, poiché in grado di misurare specificamente l'immunoglobulina (catena pesante + catena leggera) che costituisce la CM, oltre che di stimare il rapporto tra immunoglobuline κ e λ della stessa classe (38). Tuttavia, il dato deve essere confermato in studi clinici più robusti per poter essere considerato definitivamente validato (39);

c) alcune linee guida suggeriscono di misurare le CM comigranti con altre proteine con entrambe le tecniche disponibili (elettroforetica e immunochimica), per fornire al clinico maggiori informazioni (10, 24). Questo approccio garantisce al laboratorio anche un utile strumento per rilevare eventuali problemi analitici, ad es., derivati da alterazioni strutturali della CM, nel caso di incongruenze palesi tra i risultati dei due metodi (31). L'applicazione di questo duplice approccio richiede tuttavia che nel referto compaia un commento interpretativo dei risultati onde evitare pericolose incomprensioni. Inoltre, nel caso emergano incongruenze palesi tra i risultati dei due metodi, è necessario identificare con i necessari approfondimenti qual è il risultato spurio ed eliminarlo dal referto (24);

d) alcuni studi consigliano la quantificazione di

tutta la frazione elettroforetica, refertata poi come "zona α_2 (o β_1 o β_2) + CM" (22, 24). Il rationale di questo approccio risiede da un lato nella migliore accuratezza della misura rispetto al tentativo di separare la CM dalle altre proteine, dall'altro dalla constatazione che queste proteine (soprattutto transferrina e fattore C3 del complemento) sono sostanzialmente stabili e spesso presenti in concentrazioni trascurabili rispetto alla CM. Si può quindi assumere che le modificazioni quantitative rilevate nella zona elettroforetica coinvolta siano imputabili quasi esclusivamente alla CM (22). Tuttavia, quest'ultima constatazione, certamente valida alla diagnosi di una nuova CM, non sempre rimane tale durante il monitoraggio, quando la riduzione della CM indotta dalla terapia tende a capovolgere i rapporti tra le proteine comigranti nello stesso punto dell'EF, amplificando così il ruolo di quelle diverse dalla CM.

MM secernente FLC

Nel caso dei MM secernenti FLC, che rappresentano ~15-20% di tutti i MM, la quantificazione elettroforetica della CM è spesso difficoltosa, sia per la minima entità della CM e sia per la sua frequente migrazione in zona pre- γ -globulinica, compresi i casi eccezionali descritti in zona α_1 . In queste circostanze, come pure nei pazienti con malattia da deposizione di catene leggere e con mieloma oligosecerno, è certamente più accurata la determinazione immunochimica delle FLC e, in particolare, della FLC che costituisce la CM (8, 32). La stessa raccomandazione vale per i pazienti con amiloidosi AL, per i quali la quantificazione immunochimica della CM di FLC κ o λ rappresenta uno strumento indispensabile per la diagnosi, la stratificazione prognostica e il monitoraggio della risposta alla terapia (18, 32, 40), anche se in questa patologia il quadro clinico non dipende solo dall'espansione clonale midollare (13).

Aspetti specifici

In ogni caso, è assolutamente necessario che non si confrontino mai le determinazioni nel tempo della stessa CM, quando esse siano state eseguite con differenti approcci metodologici. Se si utilizza, come raccomandato, la determinazione della CM sul tracciato dell'EF, è inoltre opportuno impiegare sempre la stessa tecnica per l'EF, eseguita preferibilmente nello stesso laboratorio, in quanto le misure di una CM sul tracciato in AGE o in CZE non sono interscambiabili (24, 28-30). Si raccomanda anche che uno dei supporti informatici disponibili in laboratorio (sistema informatico gestionale, "middleware" o postazione di lavoro dell'analizzatore per EF) consenta di valutare risultati e traccati precedenti, sia al momento della quantificazione della CM su un nuovo campione, sia in fase di valutazione dei risultati successivi di uno stesso paziente. Ciò al fine di poter valutare esattamente la stessa CM nel tempo, aspetto cruciale e non sempre immediato nelle gammopatie biclonali o in caso di comparsa di un'ulteriore CM in

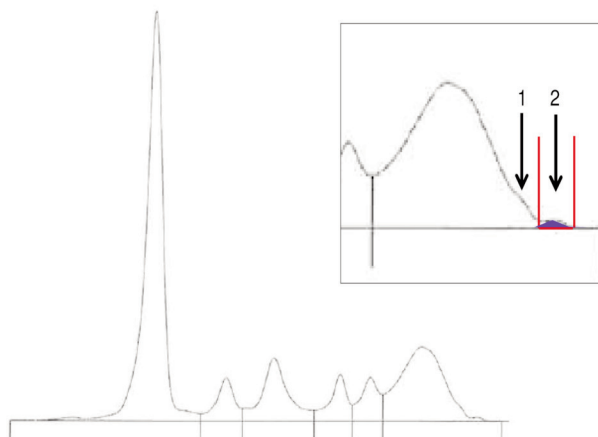


Figura 5

Tracciato di elettroforesi capillare con due componenti monoclonali in zona γ -globulinica di piccola entità (<1 g/L) in un contesto di ipergammaglobulinemia policlonale. Appare evidente come la componente monoclonale 2, ben separata dalle immunoglobuline policlonali, sia accuratamente quantificabile, benché molto piccola, mentre la componente monoclonale 1 non è quantificabile per l'interferenza nella misura del consistente fondo policlonale.

corso di MM (24).

Rimane da discutere un ultimo aspetto: fino a quale concentrazione è possibile e consigliabile eseguire la quantificazione della CM? In pratica non è possibile definire una concentrazione assoluta per la quantificazione di una CM sul tracciato EF, in quanto essa dipende strettamente dalla concentrazione delle proteine che migrano nella stessa zona, compreso il fondo di immunoglobuline policlonali per la zona γ (Figura 5). Quando questo fondo è prevalente sulla CM è raccomandabile considerare la CM non quantificabile e refertarla come tale. In genere, si considera comunque inaccurata e quindi non raccomandabile la misura di una CM <1 g/L (24, 30), anche se in uno studio di linearità condotto diluendo progressivamente tre diverse CM (IgG, IgA e IgM, migranti in zona γ) in una miscela di sieri con γ -globulinemia policlonale fisiologica, è stato rilevato che per valori <3,5 g/L la misura della CM era in pratica espressione del fondo policlonale (26). Come detto in precedenza, nel caso in cui si rilevi un'evidente CM in zona γ in presenza di un concomitante incremento delle γ -globuline policlonali, si può considerare l'utilizzo dell'interpolazione del tracciato, in quanto ciò consentirebbe di escludere il fondo policlonale e di quantificare la CM a partire dalla tangente con il fondo stesso (27). Questo approccio è però sconsigliato come metodo elettivo. Infatti, la CM viene sottostimata rispetto all'interpolazione convenzionale e questo può risultare fuorviante nell'applicazione clinica del risultato a scopo diagnostico, prognostico o di monitoraggio della gammopatia monoclonale, se confrontato con i livelli decisionali stabiliti con l'approccio convenzionale. Inoltre, anche se non è dimostrato definitivamente, in teoria nel fondo policlonale comigra anche una parte di

CM con conseguente rischio di sottostima della sua quantificazione.

Con i metodi immunochimici è teoricamente possibile quantificare una CM fino al limite di rilevabilità del saggio. In pratica, in presenza di piccole CM, l'interferenza da immunoglobuline policlonali rende però inaccurata la stima della CM.

A livello clinico, e in particolare per il MM, la malattia misurabile è stata definita come una CM nel siero ≥ 10 g/L oppure con concentrazione della FLC coinvolta ≥ 100 mg/L, in presenza di un rapporto κ/λ alterato, o come una CM urinaria ≥ 200 mg/24 ore, aspetto quest'ultimo che esula dagli scopi di questo documento (8). Al di sotto di queste concentrazioni le variazioni dell'entità della CM non sono applicabili come criterio di risposta al trattamento (8).

CONCLUSIONI

Abbiamo riassunto nella Tabella 1 le indicazioni fornite per la quantificazione della CM, con la raccomandazione di considerare la misura della CM come qualunque altro analita misurato in laboratorio. Come tale, questo esame dovrebbe essere incluso nel programma di CQI per l'imprecisione e l'inesattezza e dovrebbe anche essere prevista la partecipazione a uno dei programmi di VEQ disponibili. A questo proposito, una questione ancora aperta è la definizione della variabilità "biologica" dell'analita CM, con tutti i parametri associati dai quali derivare i traguardi analitici per l'imprecisione e l'inesattezza dei metodi EF e per l'accuratezza della quantificazione della CM. In letteratura sono disponibili alcuni studi e un commento (25, 41, 42), che non risolvono però il problema di fondo. La CM è una proteina anomala, presente esclusivamente in corso di una gammopatia monoclonale, per la quale è intrinsecamente incompatibile il concetto stesso di variabilità biologica, riferito per definizione a variazioni fisiologiche del misurando. Uno studio prodotto sull'argomento ha

dimostrato che le variazioni quantitative della CM in pazienti con MGUS clinicamente stabili non eccedevano la variabilità analitica della misura in un "follow-up" di 30 mesi, per cui la variabilità "biologica" della CM era da considerarsi trascurabile (25). Uno studio successivo, invece, ha previsto il calcolo della variabilità a lungo termine (5 anni) dell'analita CM misurato sul tracciato dell'EF in pazienti con MGUS valutati retrospettivamente. I risultati definiscono un CV intraindividuale pari a 7,8%, ricavato sottraendo alla variabilità totale la variabilità analitica del metodo di misura (CZE). Tuttavia, era compresa una variazione della CM < 5 g/L tra i criteri di arruolamento dei pazienti con MGUS, per cui lo studio partiva già con un certo grado di variabilità, imputabile alla patologia, come errore sistematico della stima della variabilità totale (41). Sembra pertanto azzardato pensare di ricavare da questi dati i traguardi analitici di imprecisione, inesattezza e inaccuratezza della misura della CM, mentre utili per l'applicazione clinica del dato sono i valori di differenza critica derivati dallo studio associati per di più a diversi livelli di probabilità statistica del valore (41, 42).

Come opzione per un ulteriore miglioramento della qualità analitica della misura della CM sul tracciato dell'EF, con particolare riferimento alla sua precisione, le aziende produttrici di sistemi automatici per EF potrebbero valutare l'efficacia del posizionamento automatico dei limiti di integrazione della CM, ricavato dal calcolo della derivata seconda (esatto punto di flesso), al fine di ridurre drasticamente la variabilità interoperatore di questa misura, che, come descritto, è la principale fonte di imprecisione analitica di questo metodo di quantificazione delle CM (25). Ulteriori, più sofisticati sviluppi tecnologici, teoricamente alla portata di bioinformatici esperti nell'integrazione di curve, adattando magari alla separazione elettroforetica algoritmi applicati ad altre tecniche separative (ad es., spettrometria di massa e cromatografia), sono raccomandabili in futuro per sviluppare nuovi programmi informatici in grado di

Tabella 1

Riassunto delle indicazioni per la quantificazione delle componenti monoclonali (CM) nel siero nella diagnosi, stratificazione di rischio e risposta al trattamento delle malattie linfoproliferative della linea B linfocitaria

- Ogni CM rilevata all'elettroforesi delle sieroproteine (EF) deve essere quantificata mediante lettura del picco monoclonale sul tracciato. La misura si esegue delimitando il picco monoclonale e quantificando la percentuale dell'area sottesa tra i due limiti di integrazione a partire dalla linea di base in rapporto alla concentrazione delle proteine totali.
- Nel caso in cui la CM non sia ben delimitabile sul tracciato o non chiaramente separata dalle altre proteine presenti nella stessa zona elettroforetica, la CM può essere misurata utilizzando un metodo immunochimico in fase liquida. Questo approccio risulta particolarmente accurato per le CM di tipo IgA.
- In alternativa, per la misura sul tracciato dell'EF delle CM comigranti con altre proteine in zona α_2 (o β_1 o β_2)-globulinica, è applicabile la quantificazione di tutta la frazione elettroforetica, refertata poi come "zona α_2 (o β_1 o β_2) + CM".
- Per le CM costituite da catene leggere libere, la determinazione immunochimica della CM con i saggi specifici è sempre raccomandata.
- L'approccio alternativo della quantificazione della CM sul tracciato EF con integrazione del picco monoclonale a partire dalla tangente con il fondo policlonale e non a partire dalla linea di base è sconsigliato come approccio elettivo a causa della sottostima della CM rispetto all'approccio convenzionale, il che rende inapplicabili i criteri clinici basati sulla quantificazione della CM. In casi particolari può però rappresentare un'alternativa applicabile, a condizione di specificarlo chiaramente nel referto.
- Nel monitoraggio di un singolo paziente è assolutamente indispensabile utilizzare sempre lo stesso approccio metodologico per la quantificazione della CM, unica modalità che rende confrontabili le misure longitudinali nel tempo.

quantificare in modo più accurato e riproducibile le CM, almeno fino a certi livelli di concentrazione.

RINGRAZIAMENTI

Gli autori ringraziano per la partecipazione alla discussione dei contenuti di questo documento, parte fondamentale della sua realizzazione, il Presidente SIBioC F. Ceriotti, il coordinatore della Divisione Scientifica della SIBioC G. Lippi, il coordinatore del Gruppo di Studio "Proteine" SIBioC G. Merlini, i componenti dello stesso M.S. Graziani, A. Caldini, M. Mussap e i colleghi P. Natali, G. Patelli, S. Maoggi, G. Righetti e A. Lalli.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- Caldini A, Graziani MS, Basile U, et al. per il Gruppo di Studio SIBioC "Proteine". Il contributo della diagnostica proteica nella gestione delle gammopatie monoclonali. *Biochim Clin* 2014;38:47-53.
- Dolci A, Vernocchi A per il Gruppo di Studio SIBioC "Proteine". Aspetti metodologici nella ricerca e caratterizzazione delle componenti monoclonali nel siero. *Biochim Clin* 2012;36:84-9.
- Graziani MS, Dolci A, Greco C, et al. per il Gruppo di Studio SIBioC "Proteine". Indicazioni per la richiesta di elettroforesi sieroproteica. *Biochim Clin* 2008;32:48-51.
- International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol* 2003;121:749-57.
- Kyle RA, Rajkumar SV. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia* 2009;23:3-9.
- Kyle RA, Durie BGM, Rajkumar SV on behalf of the International Myeloma Working Group. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. *Leukemia* 2010;24:1121-7.
- Van de Donk NW, Palumbo A, Johnsen HE, et al. on behalf of the European Myeloma Network. The clinical relevance and management of monoclonal gammopathy of undetermined significance and related disorders: recommendations from the European Myeloma Network. *Haematologica* 2014;99:984-96.
- Durie BGM, Harousseau JL, Miguelet JS, et al. on behalf of International Myeloma Working Group. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia* 2006;20:1467-73.
- Rajkumar SV, Harousseau JL, Durie BGM, et al. Consensus recommendations for the uniform reporting of clinical trials: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 1. *Blood* 2011;117:4691-5.
- Dimopoulos M, Kyle R, Fermand JP, et al. Consensus recommendations for standard investigative workup: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 3. *Blood* 2011;117:4701-5.
- Merlini G, Stone MJ. Dangerous small B clones. *Blood* 2006;108:2520-30.
- Merlini G. Perché è importante identificare e segnalare le piccole componenti monoclonali. *Biochim Clin* 2012;36:25-8.
- Milani P, Palladini G, Graziani MS, et al. Componenti monoclonali piccole ma dannose. *Biochim Clin* 2013;37:431-4.
- Merlini G, Aguzzi F, Whicher J. Monoclonal gammopathies. *J Int Fed Clin Chem* 1997;9:171-6.
- Murray DL, Ryu E, Snyder MR, et al. Quantitation of serum monoclonal proteins: relationship between agarose gel electrophoresis and immunonephelometry. *Clin Chem* 2009;55:1523-9.
- Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, et al. Highly sensitive, automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine. *Clin Chem* 2001;25:23-32.
- Te Velthuis H, Knop I, Stam P, et al. N Latex FLC – new monoclonal high-performances assays for the determination of free light chains kappa and lambda. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:1323-32.
- Palladini G, Russo P, Bosoni T, et al. Identification of amyloidogenic light chains requires the combination of serum-free light chain assay with immunofixation of serum and urine. *Clin Chem* 2009;55:499-504.
- AA.VV. Catene leggere libere nel siero. *Biochim Clin* 2013;37:344-437.
- Harding S, Young P, Di Fazio M, et al. Intact immunoglobulin heavy/light chain paired assay. *Biochim Clin* 2013;37:365-9.
- Bergon E, Miravalles E. Estimation of serum M-protein concentration from polyclonal immunoglobulins: an alternative to serum protein electrophoresis and standard immunochemical procedures. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:1156-62.
- Sheldon JM, Riches PG. Biochemical and immunological investigations. In: Gahrton G, Durie BGM, Samson DM eds. *Multiple myeloma and related disorders*. London: Arnold Publisher, 2004:125-54.
- Keren DF. Heavy/light-chain analysis of monoclonal gammopathies. *Clin Chem* 2009;55:1606-8.
- Tate J, Caldwell G, Daly J, et al. Recommendations for standardized reporting of protein electrophoresis in Australia and New Zealand. *Ann Clin Biochem* 2012;49:242-56.
- Luraschi P, Infusino I, Merlotti C, et al. Analytical variation in the measurement of serum monoclonal component by capillary electrophoresis. *Clin Chim Acta* 2004;349:151-6.
- 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;43:721-3.
- Schild C, Wermuth B, Trapp-Chiappini D, et al. Reliability of M-protein quantification: comparison of two peak integration method on Capillarys 2. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:876-7.
- 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;44:609-11.
- Infusino I, Dolci A, Panteghini M. Confronto tra due sistemi per elettroforesi capillare e in gel d'agarosio per la ricerca e caratterizzazione di componenti monoclonali nel siero. *Biochim Clin* 2008;32:554-8.
- Bakker JA, Elderman-van der Werf C, van Abbema T. Detection and quantitation of M-proteinemia: comparison of various methods for serum protein electrophoresis. *Clin Chem Lab Med* 2012;50:77-80.

31. Keren DF. 2-Mercaptoethanol treatment improves measurement of an IgMκ M-protein by capillary electrophoresis *Clin Chem* 2001;47:1326-7.
32. 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;23:215-24.
33. Keren DF. Procedures for the evaluation of monoclonal immunoglobulins. *Arch Pathol Lab Med* 1999;123:126-32.
34. Keren DF, Alexanian R, Goeken JA, et al. Guidelines for clinical and laboratory evaluation of patients with monoclonal gammopathies. *Arch Pathol Lab Med* 1999;123:106-7.
35. Bird J, Behrens J, Westin J, et al. UK Myeloma Forum (UKMF) and Nordic Myeloma Study Group (NMSG): guidelines for the investigation of newly detected M-proteins and the management of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS). *Br J Haematol* 2009;147:22-42.
36. Bird JM, Owen RG, D'Sa S, et al. Guidelines for the diagnosis and management of multiple myeloma 2011. *Br J Haematol* 2011;154:32-75.
37. Aguzzi F. L'elettroforesi delle siero proteine. Raccomandazione provvisoria SIBioC. *Biochim Clin* 1985;9:1127-33.
38. Ludwig H, Milosavljevic D, Zojer N, et al. Immunoglobulin heavy/light chain ratios improve paraprotein detection and monitoring, identify residual disease and correlate with survival in multiple myeloma patients. *Leukemia* 2013;27:213-9.
39. Bird JM, Owen RG, D'Sa S, et al. Guidelines for the diagnosis and management of multiple myeloma 2014. http://www.bcshguidelines.com/documents/MYELOMA_GUIDELINE_Feb_2014_for_BCSH.pdf.
40. Merlini G, Palladini G. Le catene leggere libere circolanti nella gestione del paziente con amiloidosi AL. *Biochim Clin* 2013;37:347-51.
41. Katzmann JA, Snyder MR, Rajkumar SV, et al. Long-term biological variation of serum protein electrophoresis M-spike, urine M-spike, and monoclonal serum free light chain quantification: implications for monitoring monoclonal gammopathies. *Clin Chem* 2011;57:1687-92.
42. Fraser CG. Improved monitoring of differences in serial laboratory results. *Clin Chem* 2011;57:1635-37.