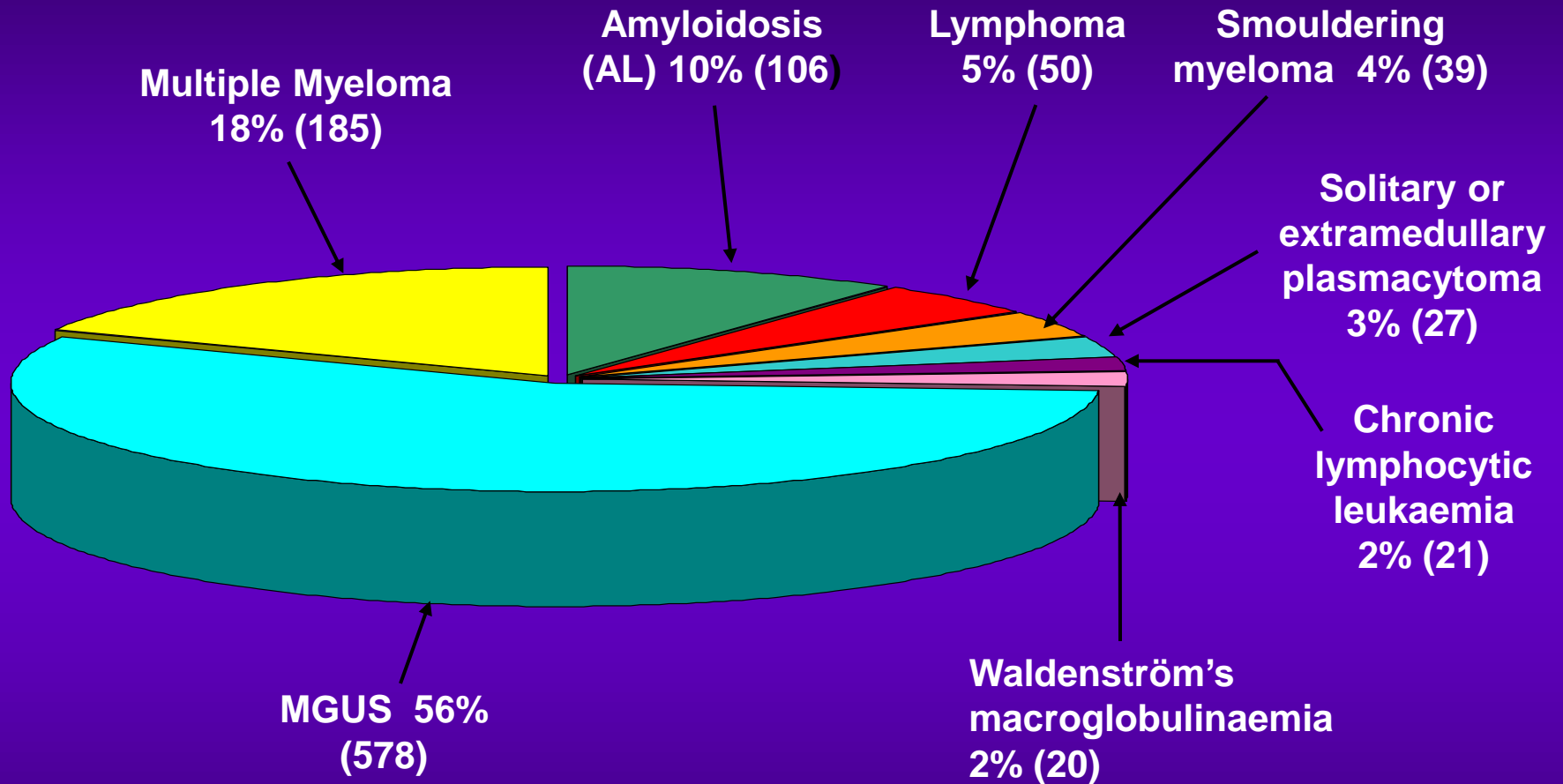


***ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΣΕ ΑΣΘΕΝΗ
ΜΕ ΠΙΘΑΝΗ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΗ
ΓΑΜΜΑΣΦΑΙΡΙΝΟΠΑΘΕΙΑ***

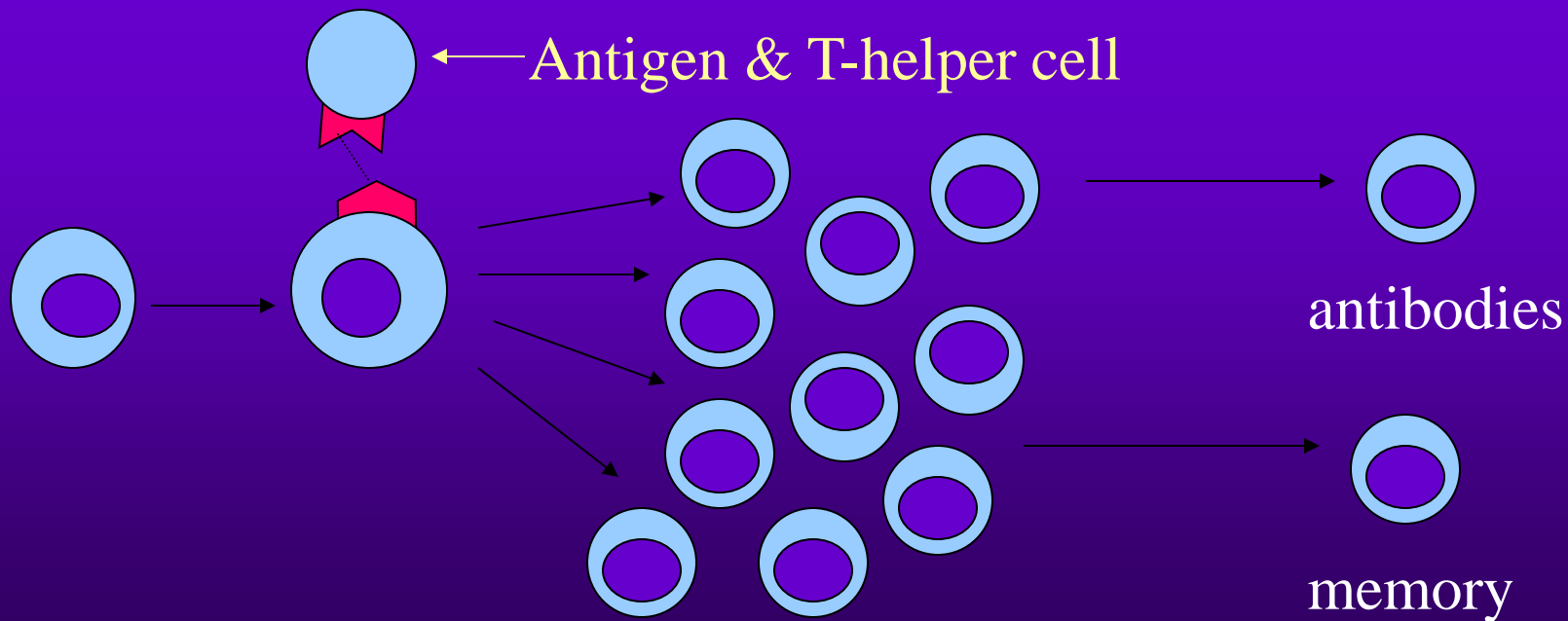
Φ.ΠΑΛΗΟΓΙΑΝΝΗ

**Καθηγήτρια Μικροβιολογίας-Ανοσολογίας
Λοιμώξεων**



Distribution of clinical diagnoses in 1026 patients with a serum monoclonal protein detected at the Mayo Clinic in 1992.

Ανάπτυξη κλώνου



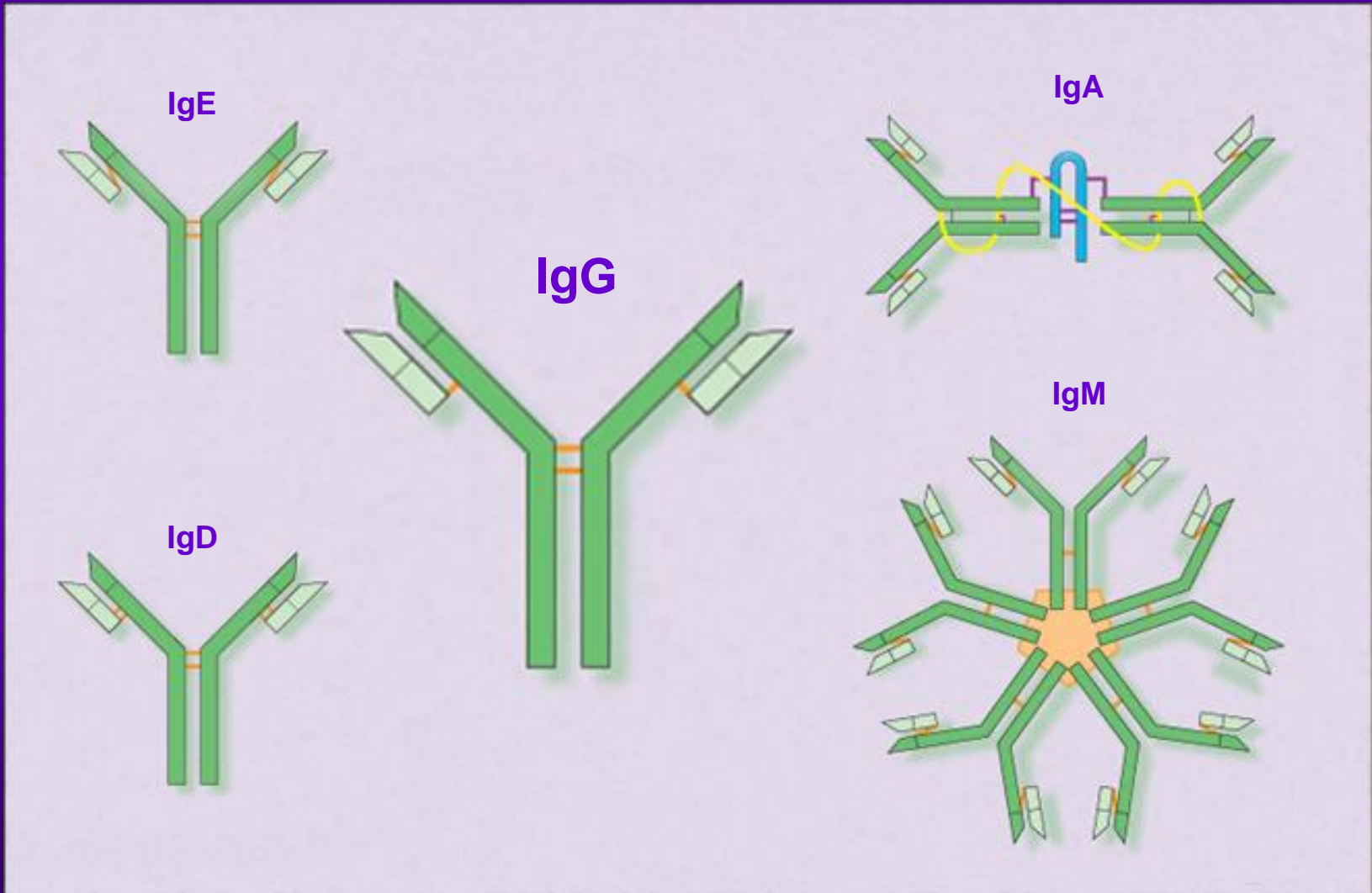
ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΗΣ ΠΟΛΥΚΛΩΝΙΚΗΣ ΓΑΜΜΑΣΦΑΙΡΙΝΟΠΑΘΕΙΑΣ

- Μονοκλωνική γαμμασφαιρινοπάθεια: ομάδα διαταραχών που χαρακτηρίζονται από πολλαπλασιασμό ενός κλώνου πλασματοκυττάρων που παράγει ομοιογενή-μονοκλωνική πρωτεΐνη (M-protein, παραπρωτεΐνη).
- Πολυκλωνική γαμμασφαιρινοπάθεια: οφείλεται σε αντιδραστική ή φλεγμονώδη εξεργασία.

Σημαντική η διάκριση μεταξύ των δύο: υπερανάπτυξη ενός κλώνου σημαίνει ήδη εγκατεστημένη ή εν δυνάμει κακοήθεια.

- **ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΕ ΗΛΙΚΙΩΜΕΝΑ ΑΤΟΜΑ ΑΝΙΧΝΕΥΟΝΤΑΙ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΚΛΑΣΜΑΤΑ**

Immunoglobulin Structure



ΦΥΣΗ-ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

- Μονομερές, πολυμερές ή τμήμα του μορίου της ανοσοσφαιρίνης
- Τμήμα: κυρίως κ ή λ(Bence –Jones πρωτεΐνη)
σπάνια βαρειά αλυσίδα ή τμήμα αλυσίδας
- Μπορεί να μην έχει βρεθεί τι αναγνωρίζει, κάποιες αναγνωρίζουν μικροβιακά αντιγόνα

Μονοκλωνικές ανοσοσφαιρίνες στο πολλαπλούν μυέλωμα

<i>Ig's</i> πλάσματος	Επίπτωση%	Συνύπαρξη Bence-Jones πρωτεΐνουρίας%
<i>IgG</i>	50	60
<i>IgA</i>	25	70
<i>ΜΟΝΟ κ η λ</i>	20	100
<i>IgD</i>	2	100
<i>IgM</i>	1	100
<i>IgE</i>	0.1	Ποικίλλει
Δικλωνική	1	-
Μη ανιχνεύσιμη	<1	0

Προσδιορισμός πρωτεϊνών στον ορό

- **Ποιοτικές μέθοδοι**

Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Διάκριση σε 5 διακριτές περιοχές **αλβουμίνη, α1, α2, β και γ.**

Μονοκλωνικό κλάσμα ανιχνεύσιμο από α2 έως γ περιοχή .

Ποσοτικά μετρήσιμο ως ποσοστό του συνόλου της περιοχής των σφαιρινών όπου εντοπίζεται.

- **Ποσοτικές μέθοδοι**

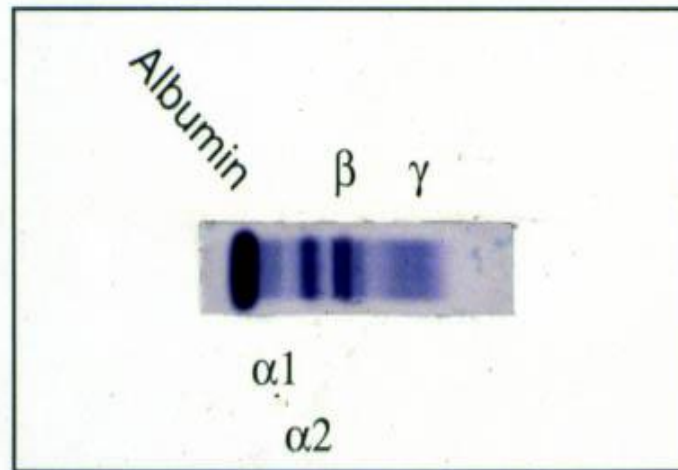
Κυκλοτερής ανοσοδιάχυση

Νεφελομετρία

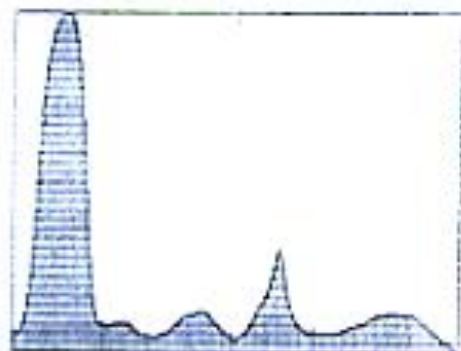
Serum Protein Electrophoresis

Separation in an electric field on agarose gel
pH of buffer
Isoelectric point of protein

Stained with Amido Black



Quantitation of Serum Paraprotein



Fraction	Rel%		G/dL
Albumin	61.5		4.18
Alpha 1	3.8		0.26
Alpha 2	8.5	--	0.58
Beta	12.7	+++	0.86 +
Gamma	13.5		0.92

Total G/dL : 6.80

A/G: 1.60

Serum Protein Electrophoresis

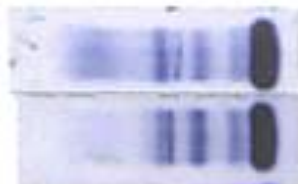
Polyclonal increase in gamma globulins



Normal

Abnormal

Hypogammaglobulinemia



Normal

Abnormal

Monoclonal gammopathy (paraprotein)



Normal

Abnormal

Ταυτοποίηση μονοκλωνικού κλάσματος

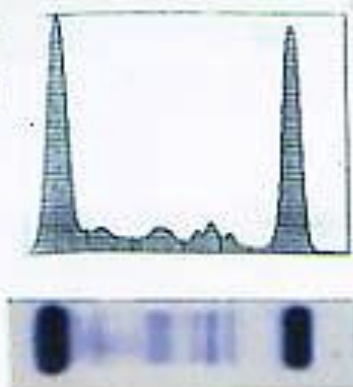
Μεθοδολογίες

- **Ανοσοηλεκτροφόρηση**
Δεν χρησιμοποιείται πλέον αν και δίνει στοιχεία για το παθολογικό ή όχι του κλάσματος.
- **Ανοσοκαθήλωση (Immuno Fixation Electrophoresis, IFE)**
Συνδυασμός ηλεκτροφόρησης / αντίδρασης αντιγόνου αντισώματος πάνω στο πήκτωμα αγαρόζης.

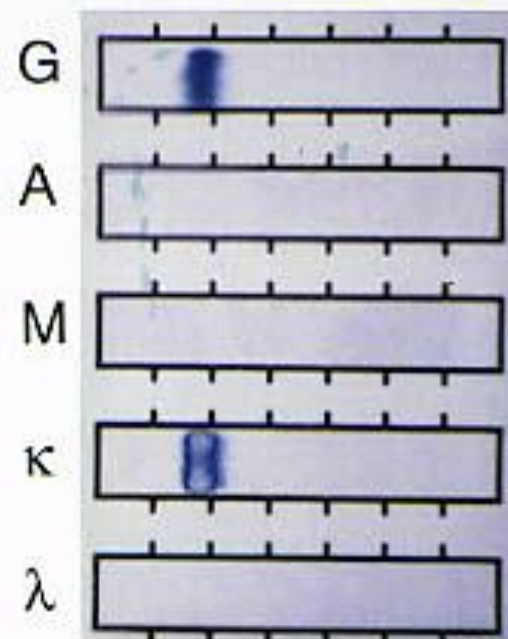
Η ΠΛΕΟΝ ΕΝΔΕΔΕΙΓΜΕΝΗ ΣΤΗΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ.

Multiple Myeloma

Serum
Electrophoresis

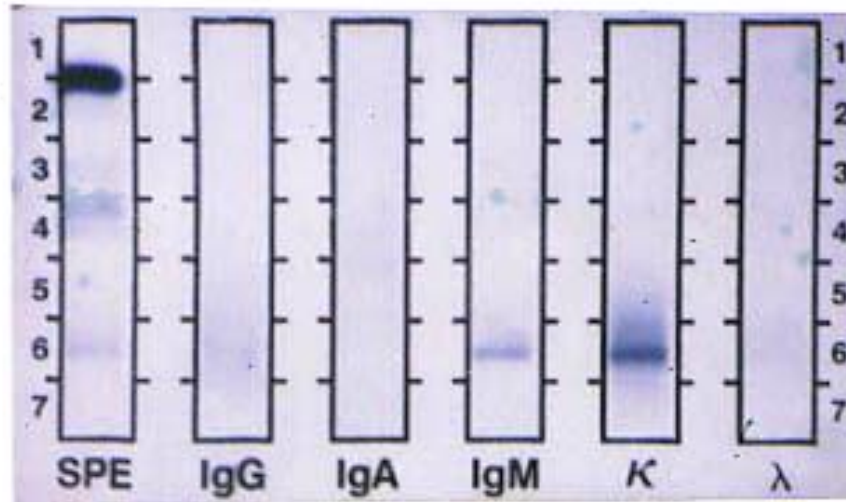


Immunofixation
electrophoresis



Waldenstroms Macroglobulinemia

Serum Immunofixation electrophoresis



ΠΟΣΟΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

- **ΝΕΦΕΛΟΜΕΤΡΙΑ**

Συμπλέγματα αντιγόνου-αντισώματος μετρώνται με βάση την ανάκλαση που προκαλούν σε προσπίπτον φως οργάνου. Ποσοτικοποίηση με βάση πρότυπη καμπύλη.

ΕΧΕΙ ΤΗΝ ΜΕΓΑΛΥΤΕΡΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΚΑΙ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ ΔΙΝΕΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΕ ΛΕΠΤΑ

ΔΙΑΧΩΡΙΖΕΙ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΤΑΞΕΙΣ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ

ΑΝΙΧΝΕΥΕΙ ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ κ και λ ΑΛΥΣΙΔΕΣ

ΔΕΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΖΕΙ IgD.

ΕΙΝΑΙ Η ΠΙΟ ΑΚΡΙΒΗΣ ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΛΛΑ ΛΙΓΟΤΕΡΟ ΕΥΑΙΣΘΗΤΗ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ.

- **ΚΥΚΛΟΤΕΡΗΣ ΑΝΟΣΟΔΙΑΧΥΣΗ (ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ IgD)**

Ακριβής, ειδική, αποτελέσματα σε 2 ημέρες

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΟΥΡΙΑΣ

- **Πρωτεϊνουρία**

- Αποβολή πρωτεΐνης >150mg ημερησίως.
- 15-20 mg του συνόλου που αποβάλλεται φυσιολογικά είναι αλβουμίνη

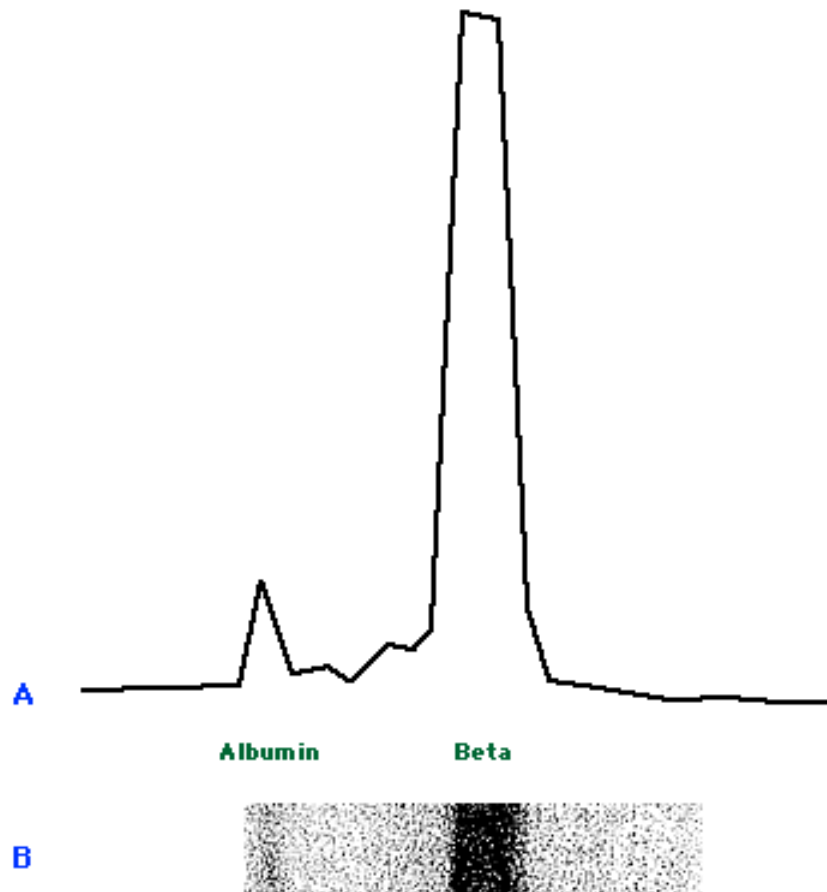
Φυσιολογικά στα ούρα διηθούνται σε μικρά ποσά ΜΟΝΟ οι ελαφρές αλυσίδες λόγω μικρού μεγέθους. Υπερπαραγωγή τους συνεπάγεται αυξημένη αποβολή.

Ανίχνευση του πλήρους μορίου ανοσοσφαιρίνης ανιχνεύεται ΜΟΝΟ σε σπειραματική βλάβη

ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ ΟΥΡΩΝ

- Ελαφρές αλυσίδες **ΔΕΝ ΑΝΙΧΝΕΥΟΝΤΑΙ** με το stick ούρων το οποίο ανιχνεύει αλβουμίνη όταν αποβάλλεται σε ποσά $>300\text{mg/day}$.
- Η ιδιότητα των κ/λ αλυσίδων (**Bence Jones λεύκωμα**) να ανιχνεύονται με βάση τη πρόκληση θολερότητας σε διαφορετικές θερμοκρασίες έχει **ΧΑΜΗΛΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΚΑΙ ΤΕΙΝΕΙ ΝΑ ΕΓΚΑΤΑΛΕΙΦΘΕΙ**.
- Ποσοτικός προσδιορισμός σε δείγμα ούρων 24ώρου ανιχνεύει ολικό λεύκωμα συμπεριλαμβανομένων και των κ/λ αλυσίδων.
- **ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΚΛΟΓΗΣ: ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΟΥΡΩΝ ΣΕ ΑΓΑΡΟΖΗ (ΣΥΜΠΥΚΝΩΜΕΝΟ ΔΕΙΓΜΑ)**.

Urine Protein Electrophoresis

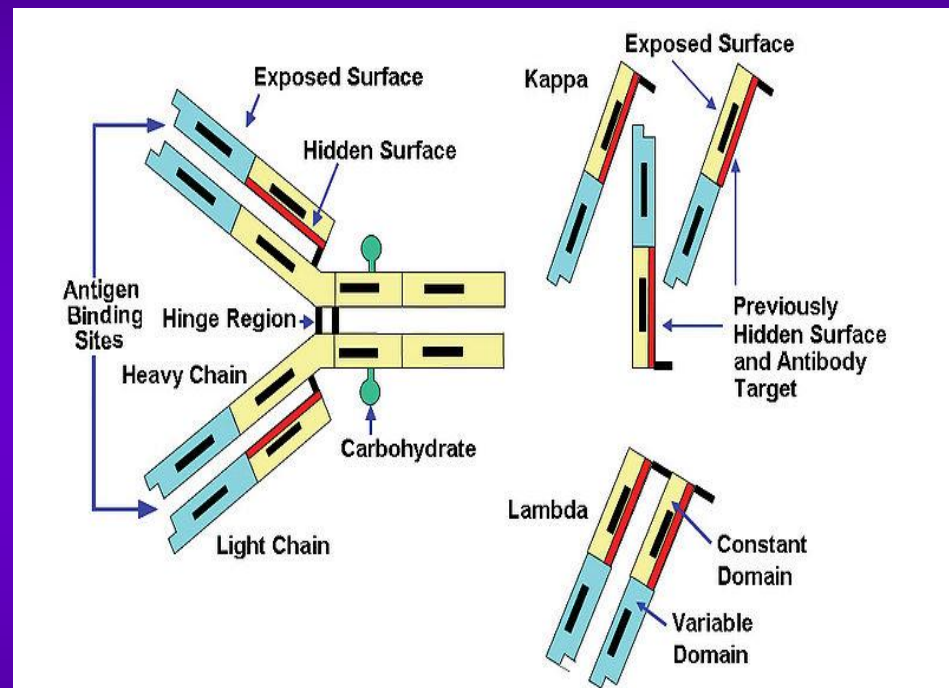


ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ ΟΥΡΩΝ

- *Ανοσοκαθήλωση σε συμπυκνωμένο δείγμα ούρων.*
- *Η ποσοτική μέθοδος ανίχνευσης αλυσίδων κ ή λ στα ούρα είναι εφικτή με νεφελομετρία, χρησιμοποιείται στην παρακολούθηση θεραπείας **ΣΥΜΠΛΗΡΩΝΕΙ** αλλά **ΔΕΝ ΑΝΤΙΚΑΘΙΣΤΑ** την **ΑΝΟΣΟΚΑΘΗΛΩΣΗ**.*

Ποσοτικός προσδιορισμός ελεύθερων ελαφριών αλυσίδων

- **Νέα μεθοδολογία:**
- Bradwell AR et al Clin Chem 2001;47: 4: 680.
- Bradwell AR, et al. Serum test for assessment of patients with Bence Jones myeloma. Lancet 2003; 361: 489.
- Προσδιορίζει ελεύθερες ελαφριές αλυσίδες σε ορό και ούρα.
- Πολυκλωνικά αντισώματα που δεν δίνουν διασταυρούμενες αντιδράσεις



Φυσιολογικές τιμές *Katzmann JA et al Clin. Chem 2002, 48:1437*

- **κ FLC: 3.3-19.4mg/l**
- **λ FLC: 5.7-26.3mg/l**
- **Normal FLC κ/ λ: 0.26-1.65**

- **FLC κ/ λ > 1.65 μονοκλωνική κ παραπρωτεϊναιμία**
- **FLC κ/ λ < 0,26 μονοκλωνική λ παραπρωτεϊναιμία**

- **Ο ΛΟΓΟΣ ΠΑΡΑΜΕΝΕΙ ΣΤΑΘΕΡΟΣ ΣΤΙΣ ΠΟΛΥΚΛΩΝΙΚΕΣ ΓΑΜΜΑΣΦΑΙΡΙΝΟΠΑΘΕΙΕΣ ΠΑΡΑ ΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΛΥΤΩΝ ΑΡΙΘΜΩΝ**

ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΔΙΑΓΩΣΤΙΚΩΝ ΔΟΚΙΜΑΣΙΩΝ ΓΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΓΑΜΜΑΣΦΑΙΡΙΝΟΠΑΘΕΙΩΝ

- **SCREENING**
- **ΠΡΩΤΟ: ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΟΡΟΥ ΣΕ ΑΓΑΡΟΖΗ**
Εάν ανιχνεύεται μονοκλωνικό κλάσμα ταυτοποίηση με **ΑΝΟΣΟΚΑΘΗΛΩΣΗ**

Εάν το μονοκλωνικό κλάσμα είναι $>1.5\text{g/dl}$ / ακολουθεί ηλεκτροφόρηση/ανοσοκαθήλωση ούρων ή sFLC.
- **ΔΕΥΤΕΡΟ: Ποσοτικός προσδιορισμός ανοσοσφαιρινών με νεφελομετρία.**

Σε υπογαμμασφαιριναιμία,

αύξηση μιας τάξης ανοσοσφαιρίνης με ταυτόχρονη καταστολή των άλλων ακόμη και εντός των φυσιολογικών ορίων

ΕΠΙΒΑΛΛΕΤΑΙ ΑΝΟΣΟΚΑΘΗΛΩΣΗ ΑΚΟΜΑ ΚΑΙ ΟΤΑΝ ΔΕΝ ΕΙΝΑΙ ΔΙΑΚΡΙΤΗ ΚΟΡΥΦΗ ΣΤΗΝ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΟΡΟΥ.

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΩΝ ΔΟΚΙΜΑΣΙΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΜΥΕΛΩΜΑ ΚΑΙ ΣΥΝΑΦΕΙΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ

Dispensieri et al, Leucemia 2009, 23:215-International myeloma working group.

- Ηλεκτροφόρηση ορού, ανοσοκαθήλωση, sFLC επαρκούν.
- Ηλεκτροφόρηση/ανοσοκαθήλωση ούρων **ΠΑΝΤΑ** σε ήδη ταυτοποιηθέν κλάσμα.
- sFLC έχουν την μεγαλύτερη προγνωστική σημασία σε ΟΛΕΣ τις πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες.
- sFLC συνιστάται για παρακολούθηση ασθενών με πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες ιδιαίτερα σε αυτούς με αμυλοείδωση ή ολιγοεκκριτικό μυέλωμα.
- sFLC **ΔΕΝ ΑΝΤΙΚΑΘΙΣΤΟΥΝ** την ηλεκτροφόρηση ούρων σε ασθενείς με ήδη μετρηθέν κλάσμα.
- rFLC **ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΟ** κριτήριο πλήρους ανταπόκρισης στη θεραπεία

Take home message

- Καμμία μεθοδολογία κατ' αποκλειστικότητα δεν έχει την απαιτούμενη ευαισθησία για διάγνωση, σταδιοποίηση, πρόγνωση.
- Ο καταλληλότερος συνδυασμός μεθοδολογιών ανάλογα με την συγκεκριμένη κλινική εικόνα είναι αλήθεια που επαναδιαπραγματεύεται με περισσότερες μελέτες και μετααναλύσεις.
- Απαραίτητη η εκτίμηση όλων των εργαστηριακών ευρημάτων μαζί.
- Απαραίτητη η σύγκριση με προηγούμενα αποτελέσματα.
- Απαραίτητος ο ποιοτικός έλεγχος του εργαστηρίου.