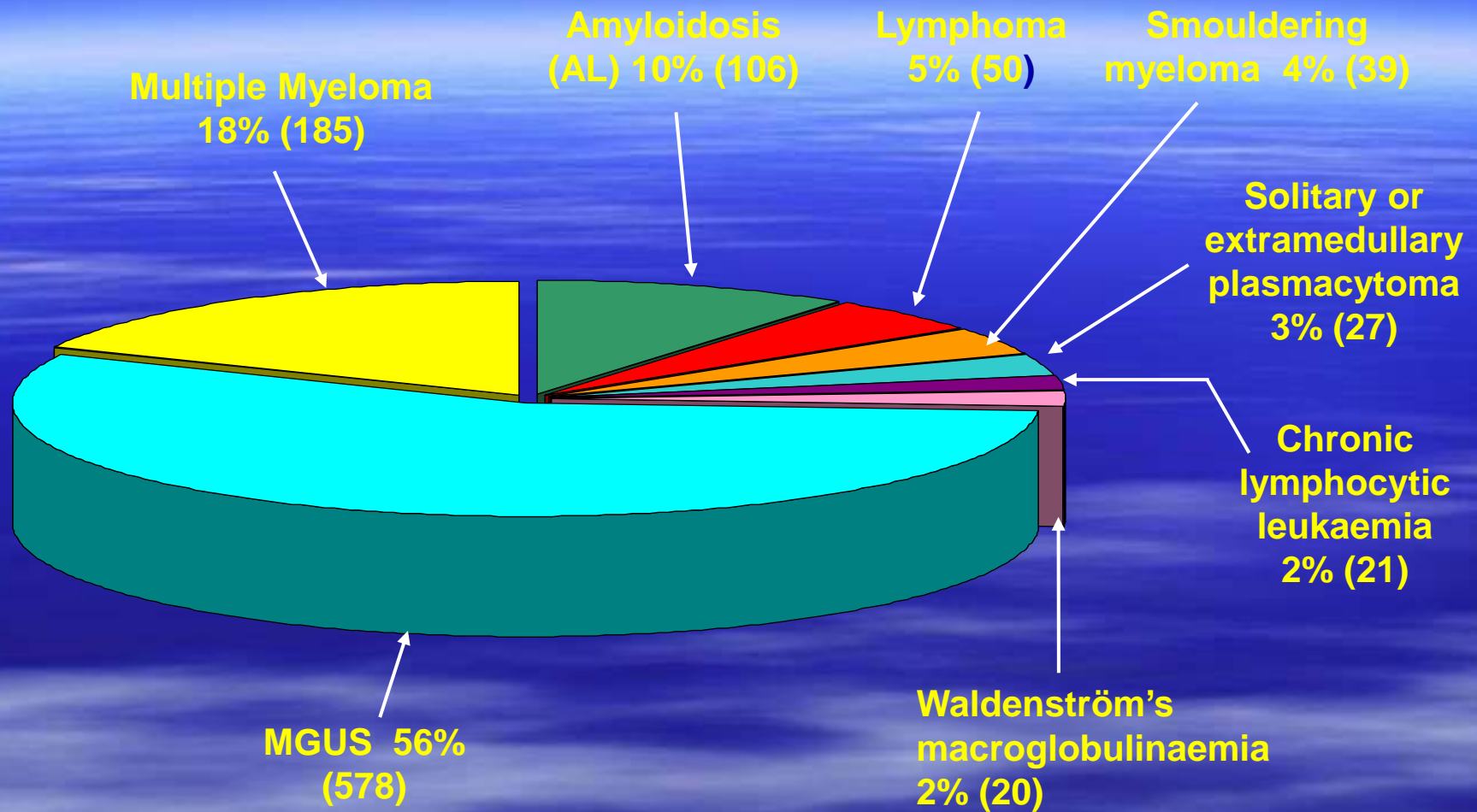


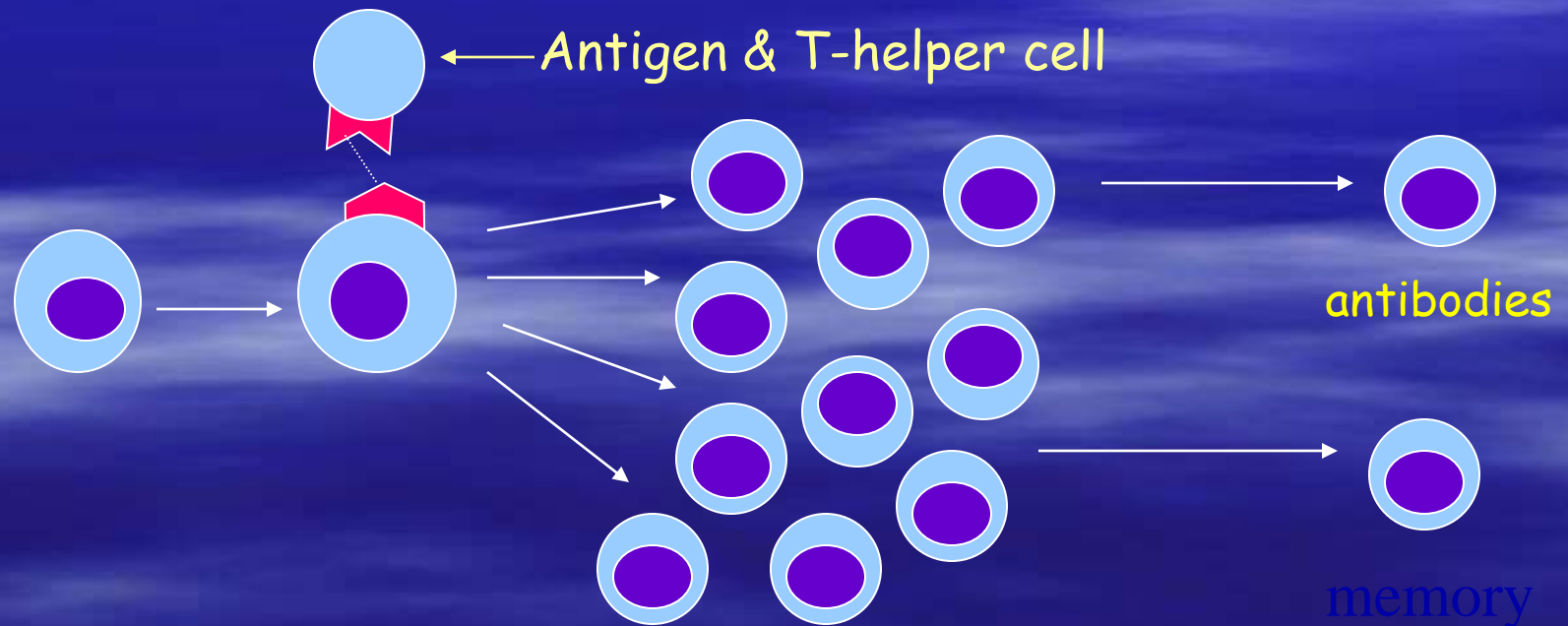
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ
ΠΑΡΑΠΡΩΤΕΙΝΑΙΜΙΩΝ**

Φ.ΠΑΛΗΟΓΙΑΝΝΗ 2018



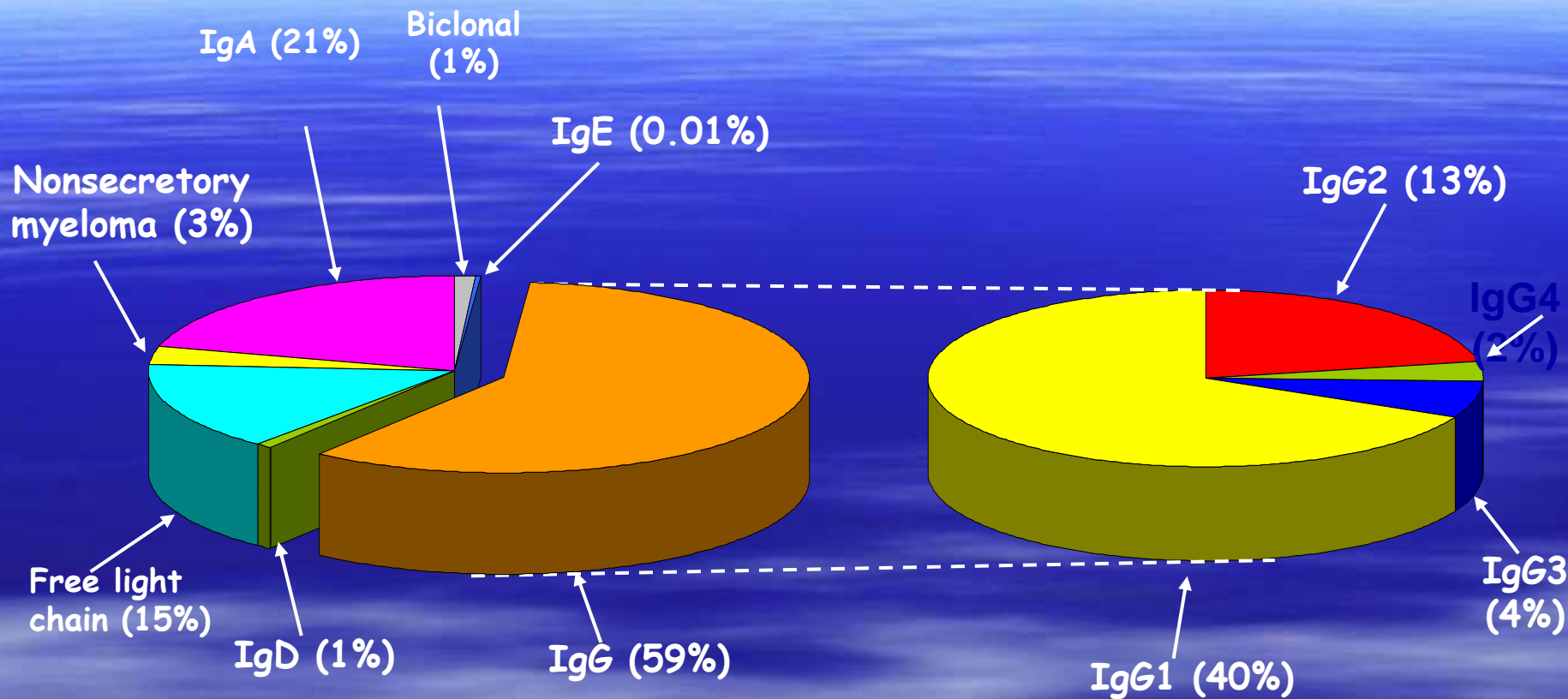
Distribution of clinical diagnoses in 1026 patients with a serum monoclonal protein detected at the Mayo Clinic in 1992.

Ανάπτυξη κλώνου



Φύση- λειτουργία μονοκλωνικής πρωτεΐνης

- Μονομερές, πολυμερές ή τμήμα του μορίου της ανοσοσφαιρίνης.
- IgG: Αναγνωρίζουν δομικά στοιχεία και μικροβιακά παράγωγα *S.aureus*, *Leptospira*, *Brucella*.
- Τρανσφερίνη
- IgM: Λευκωματίνη ορού, καρδιολιπίνη, δομικά στοιχεία *Klebsiella*.
- Άγνωστης ειδικότητας

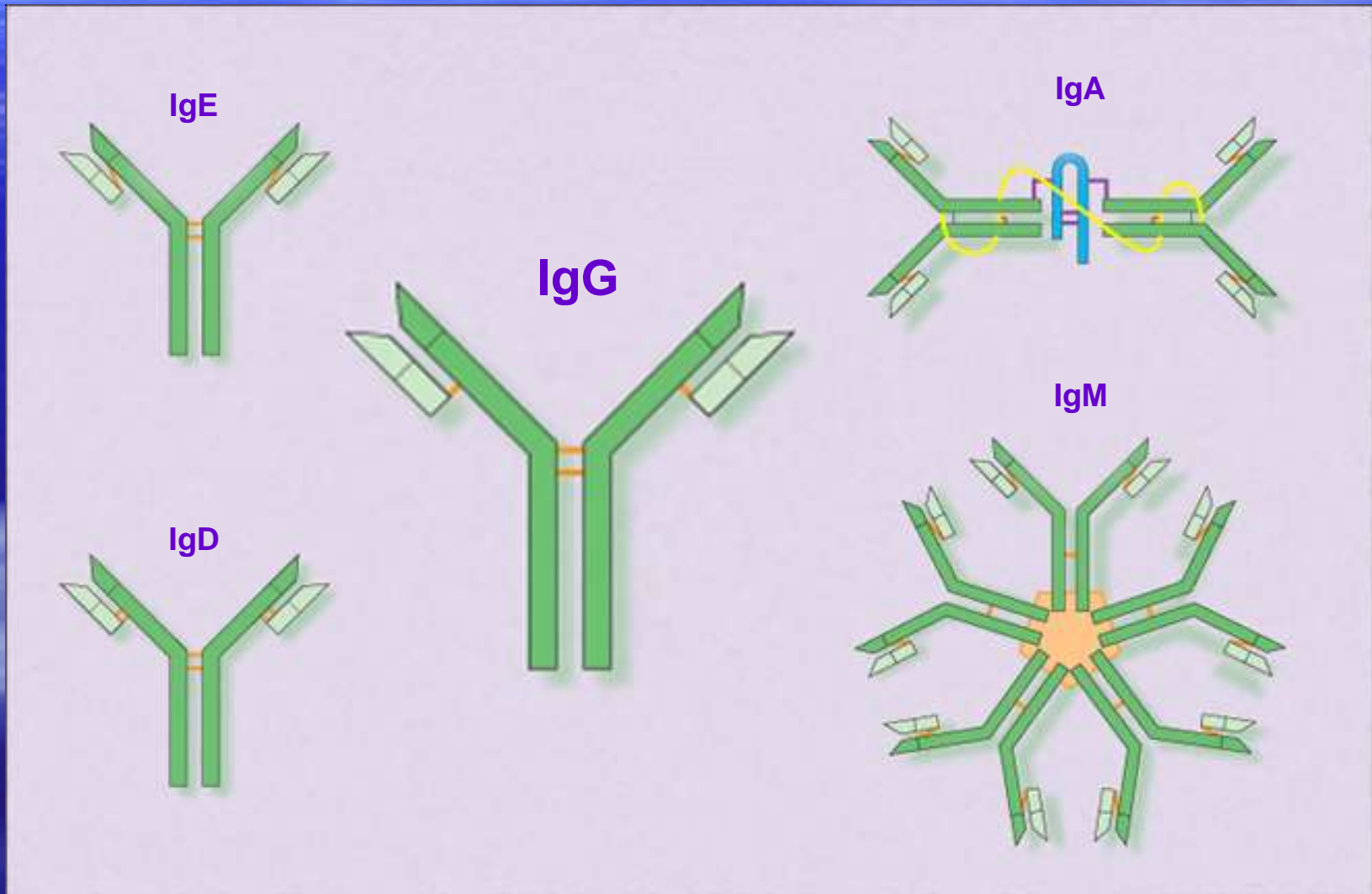


• Classification of MM based upon monoclonal protein from the UK MRC Multiple Myeloma trials.

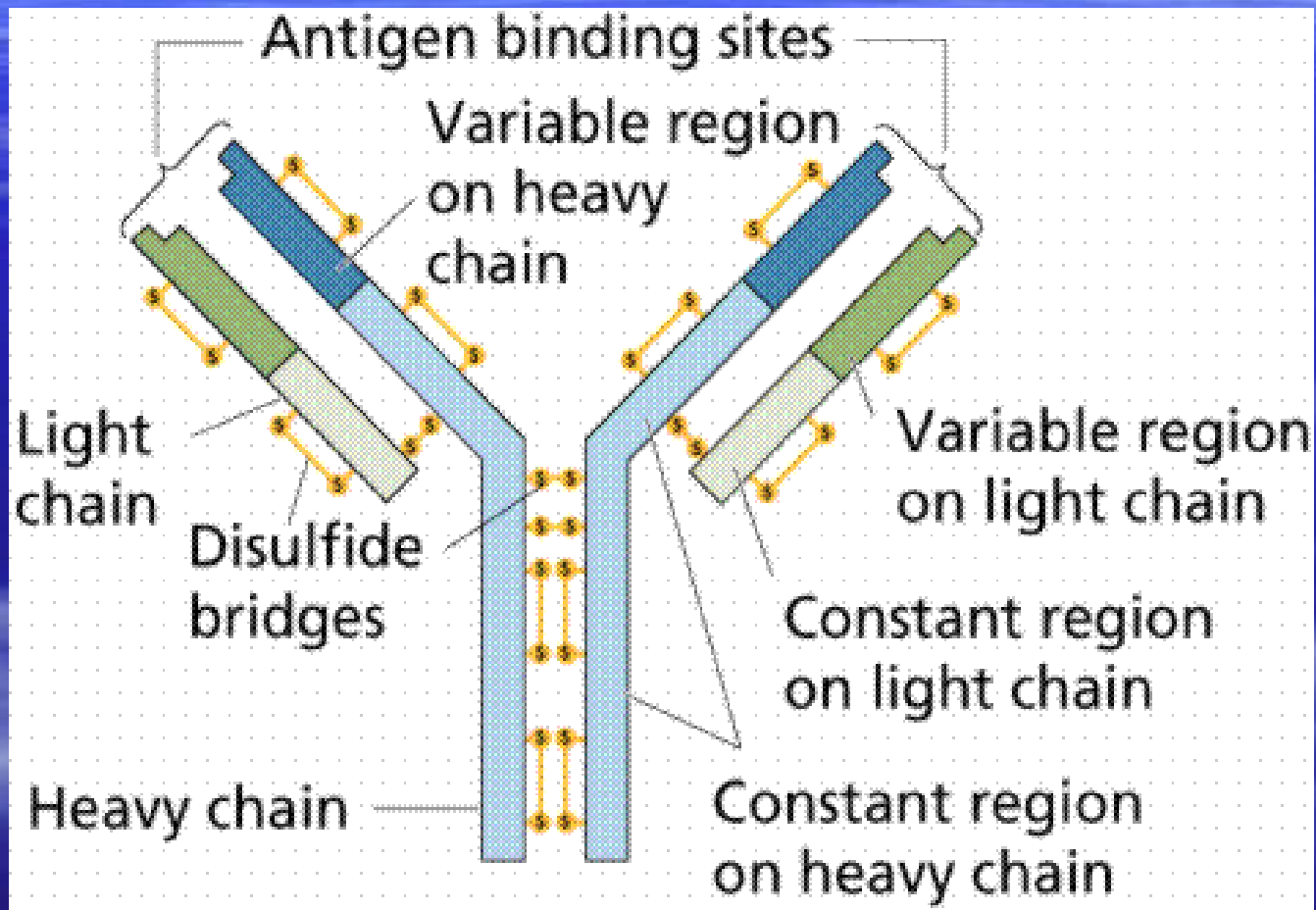
Διαγνωστικά κριτήρια μυελώματος

- Παρουσία πλασματοκυττάρων στο μυελό των οστών σε ποσοστό μεγαλύτερο του 10% του συνολικού πληθυσμού ΚΑΙ ένα από τα ακόλουθα
- Μονοκλωνική πρωτεΐνη στον ορό (συνήθως $> 3\text{g/dL}$)
 - Μονοκλωνική πρωτεΐνη στα ούρα
 - Λυτικές βλάβες
 - Κλινικά συμπτώματα συνοδά/συμβατά με πολλαπλούν μύελωμα
- CRAB : Υπερασβεστιαμία, Νεφρική ανεπάρκεια, Αναιμία, Λυτικές Βλάβες Οστών
- **Smoldering Myeloma:** Από τα παραπάνω απουσιάζουν τα κλινικά ευρήματα
- **MGUS:** Παρουσία μονοκλωνικής πρωτεΐνης στον ορό $< 3\text{g/dL}$, αριθμός πλασματοκυττάρων στον μυελό $< 10\%$, απουσία κλινικών συμπτωμάτων

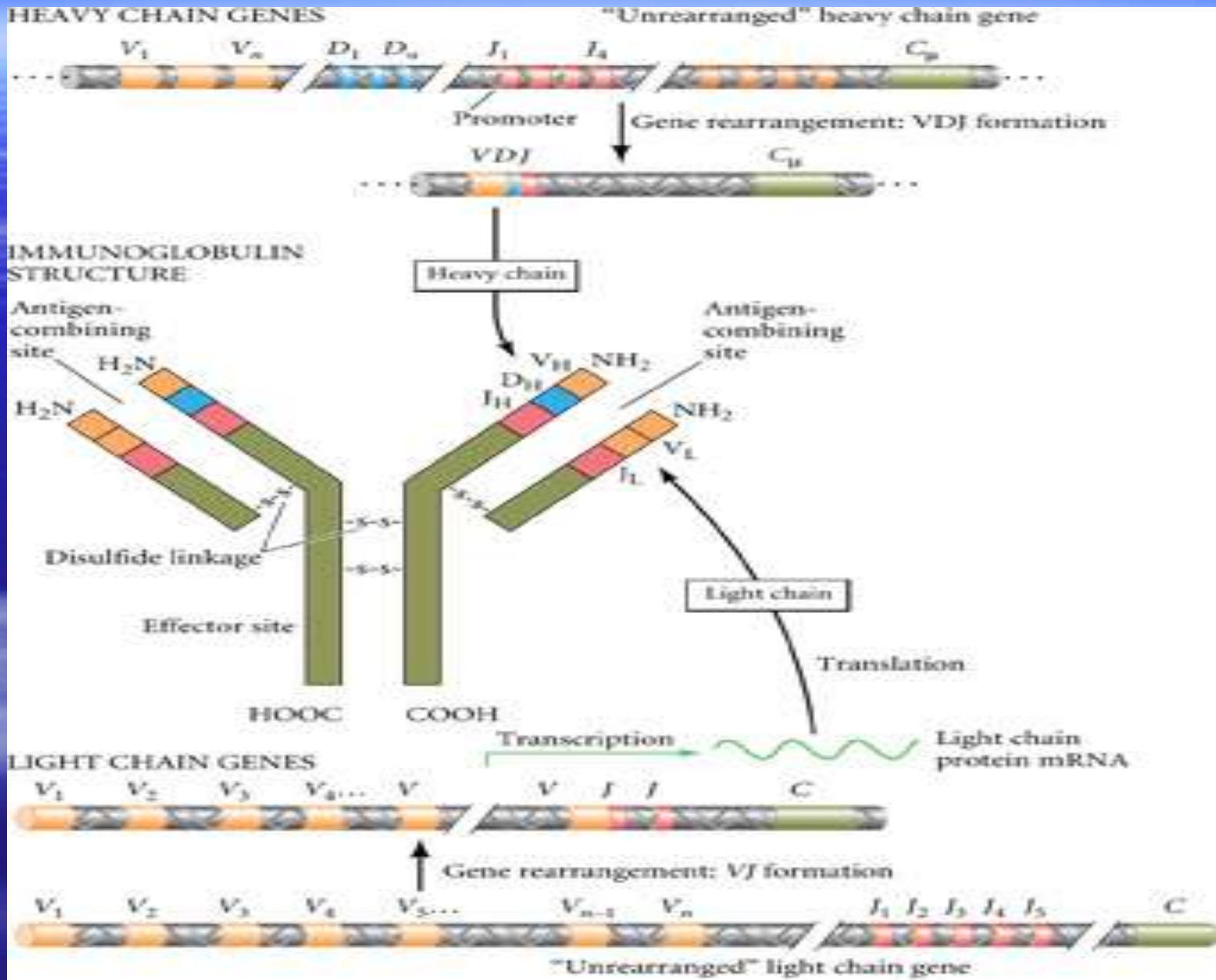
Immunoglobulin Structure



Immunoglobulin Structure



Σύνθεση ανοσοσφαιρινών

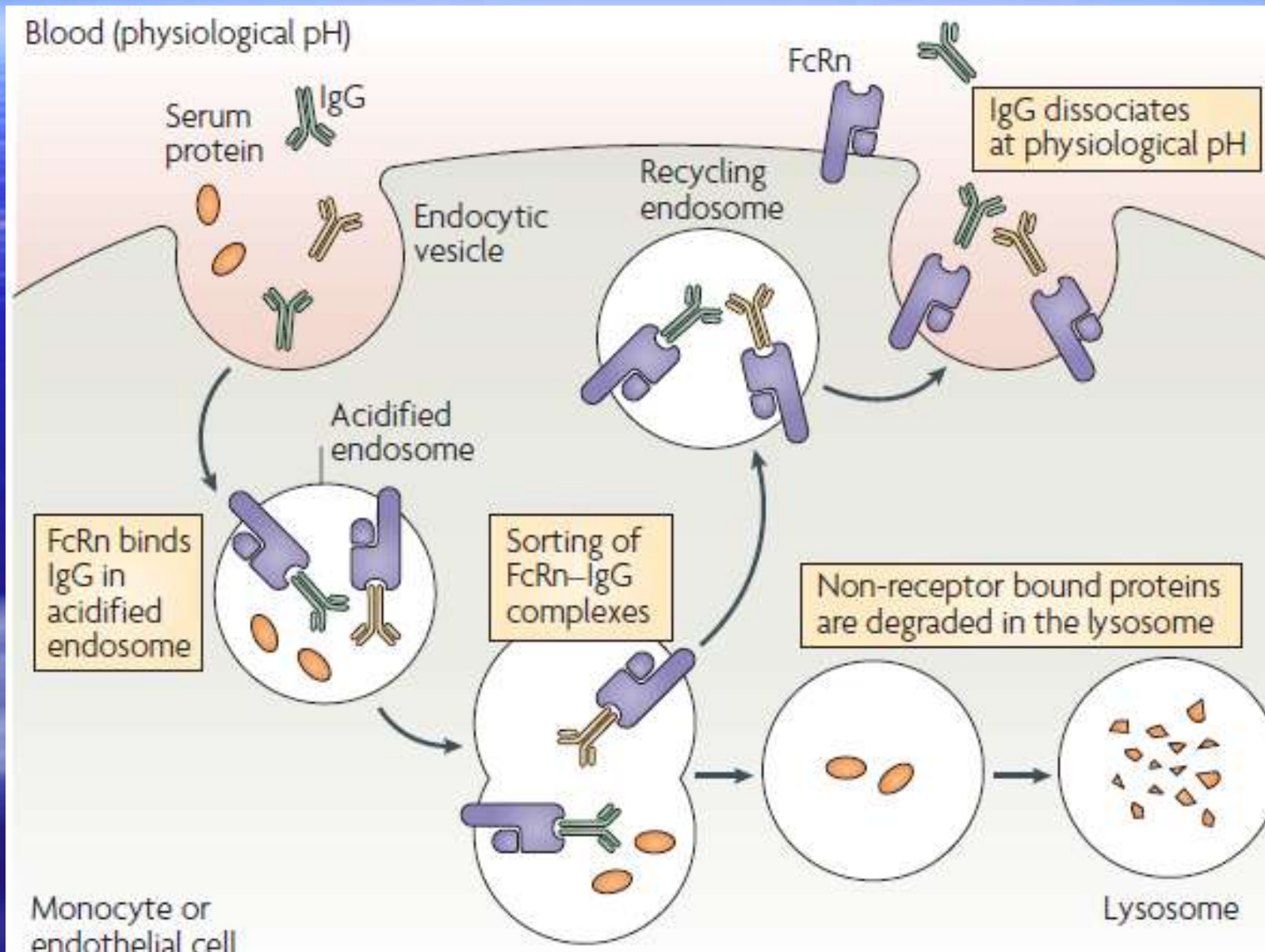


Φυσιολογία

Properties of Immunoglobulin Isotypes

Class or Subclass									
Properties	<i>IgM</i>	<i>IgD</i>	<i>IgG1</i>	<i>IgG2</i>	<i>IgG3</i>	<i>IgG4</i>	<i>IgA1</i>	<i>IgA2</i>	<i>IgE</i>
Adult level range (age 16–60) in serum (mg/ml) ^b	0.25– 3.1	0.03 -0.4	5– 12	2–6	0.5– 1	0.2– 1	1.4– 4.2	0.2– 0.5	0.0001– 0.0002
Approximate % total Ig in adult serum	10	0.2	45– 53	11– 15	3–6	1–4	11– 14	1–4	0.004
Synthetic rate (mg/kg weight/day)	3.3	0.2	33	33	33	33	19– 29	3.3– 5.3	0.002
Biological half- life (days)	5–10	2–8	21– 24	21– 24	7–8	21– 24	5–7	4–6	1–5
Molecular weight† KD	900	150	150	150	150	150	150- 600	150- 600	190

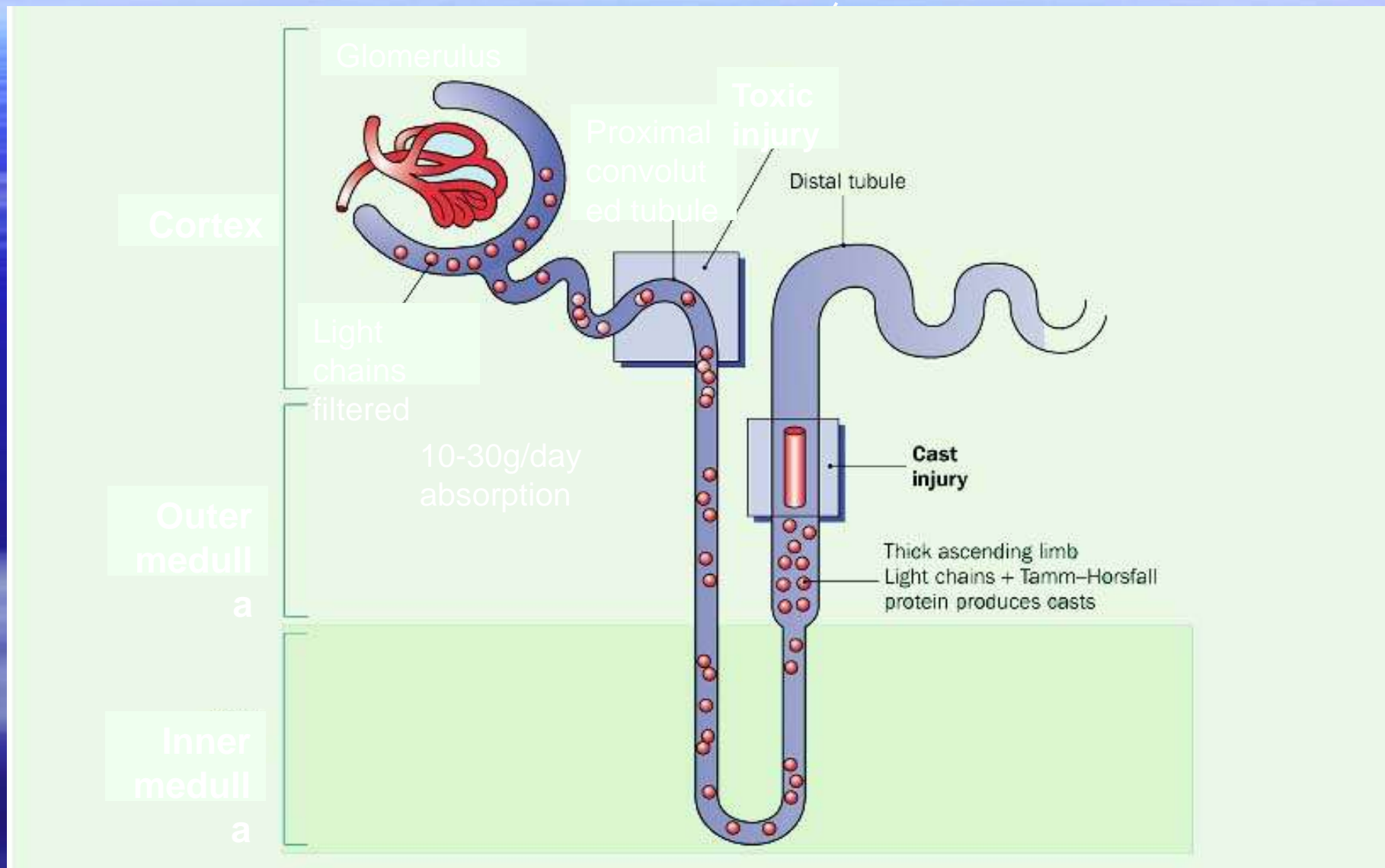
Ομοιόσταση της IgG



Σύνθεση ελαφρών αλυσίδων

- Το Β-λεμφοκύτταρο συνθέτει σε περίσσεια (40%) ελαφριές αλυσίδες σε σχέση με τις βαριές. Υπερτερεί η παραγωγή των κ, αλλά επαναροφάται με διπλάσιο ρυθμό. Σχέση κ/λ σταθερή.
- Υπάρχει φυσιολογικά ανιχνεύσιμο ποσό ελεύθερων ελαφριών αλυσίδων κ και λ αλλά όχι στα ούρα.
- Συγκέντρωση ανάλογη του ισοζυγίου παραγωγής/νεφρικής κάθαρσης.
- Περνούν το σπείραμα λόγω μικρού μεγέθους.
- Έντονη άσκηση/νεφρική βλάβη: αύξηση των ελαφριών αλυσίδων .

Μεταβολισμός ελαφριών αλυσίδων



Μονοκλωνικές ανοσοσφαιρίνες στο πολλαπλούν μυέλωμα

■ Ig's πλάσματος	Επίπτωση%	Συνύπαρξη Bence-Jones πρωτεϊνουρίας%
■ IgG	50	60
■ IgA	25	70
■ ΜΟΝΟ κ η λ	20	100
■ IgD	2	100
■ IgM	1	100
■ IgE	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

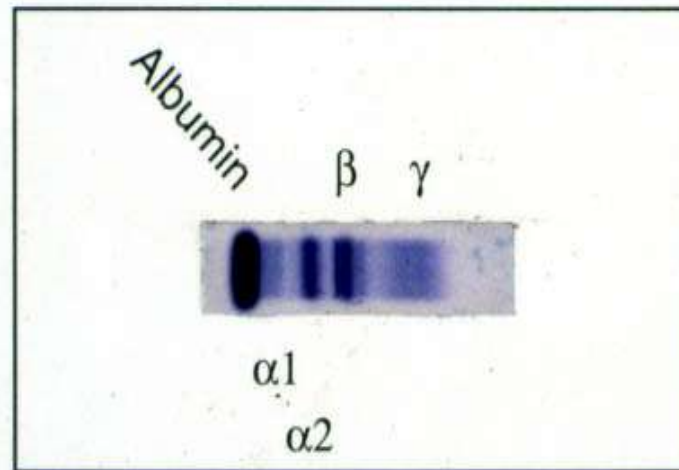
Κυκλοτερής ανοσοδιάχυση

Νεφελομετρία

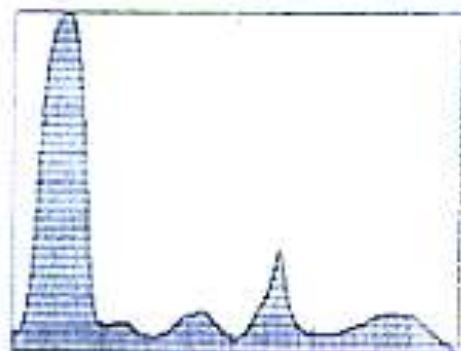
Serum Protein Electrophoresis

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

Stained with Amido Black



Quantitation of Serum Paraprotein



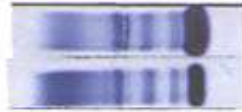
Fraction	Rel%		G/dL
Albumin	61.5		4.18
Alpha 1	3.8		0.26
Alpha 2	8.5	--	0.58
Beta	12.7	+++	0.86 +
Gamma	13.5		0.92

Total G/dL : 6.80

A/G: 1.60

Serum Protein Electrophoresis

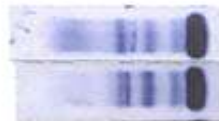
Polyclonal increase in gamma globulins



Normal

Abnormal

Hypogammaglobulinemia



Normal

Abnormal

Monoclonal gammopathy (paraprotein)



Normal

Abnormal

Οι IgG κινούνται στη γ-περιοχή ΑΛΛΑ οι IgA , IgM και free κ,λ μπορεί να ΚΡΥΒΟΝΤΑΙ μέσα σε αυξημένες β- σφαιρίνες

Ταυτοποίηση μονοκλωνικού κλάσματος

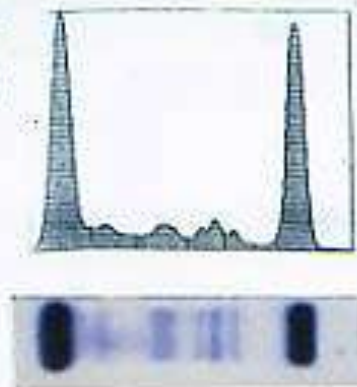
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ

- **Ανοσοηλεκτροφόρηση**
Δεν χρησιμοποιείται πλέον αν και δίνει στοιχεία για το παθολογικό ή όχι του κλάσματος.
- **Capillary electrophoresis**
Συνδυασμός ηλεκτροφόρησης σε τριχοειδές και ανοσοκαθίξεσης.
Όχι τόσο ευαίσθητη, μη επαρκώς αξιολογημένη
- **Ανοσοκαθήλωση(Immuno Fixation Electrophoresis, IFE)**
Συνδυασμός ηλεκτροφόρησης / αντίδρασης αντιγόνου αντισώματος πάνω στο πήκτωμα αγαρόζης.

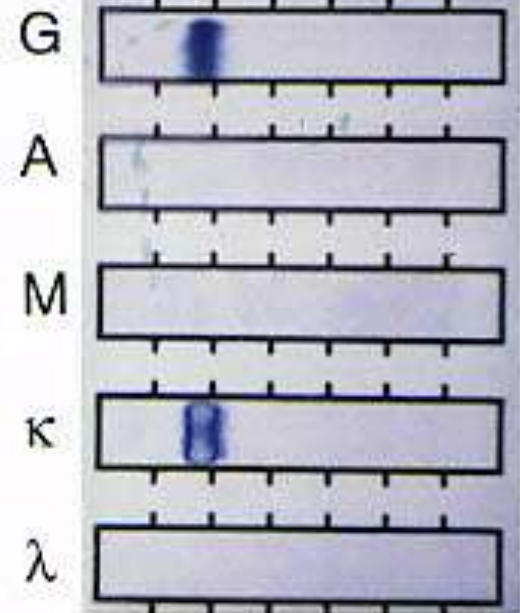
Η ΠΛΕΟΝ ΕΝΔΕΔΕΙΓΜΕΝΗ ΣΤΗΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ-ΔΕΝ ΕΊΝΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΗ!!

Multiple Myeloma

Serum
Electrophoresis

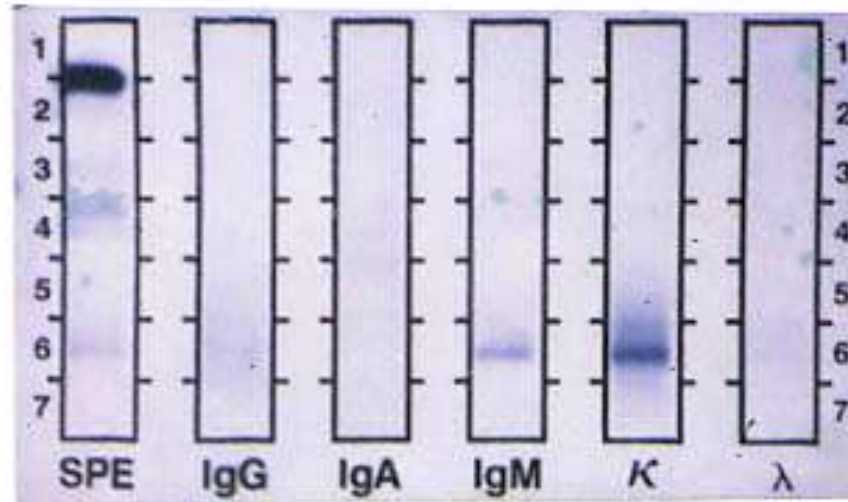


Immunofixation
electrophoresis



Waldenstroms Macroglobulinemia

Serum Immunofixation electrophoresis



Ποσοτικές μέθοδοι

■ 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

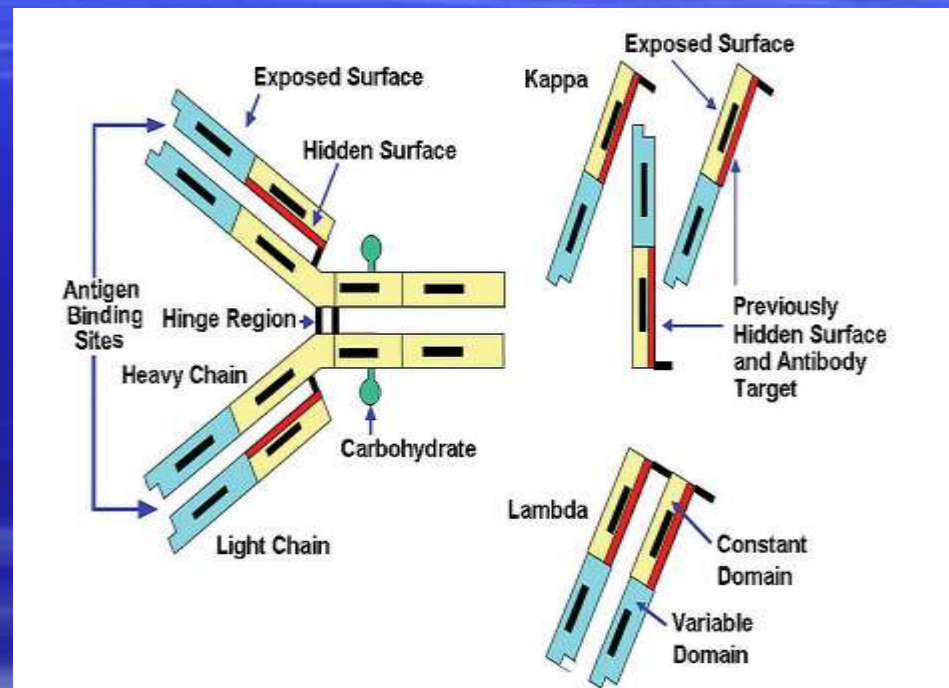
ΔΕΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΖΕΙ IgD.

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

- ΚΥΚΛΟΤΕΡΗΣ ΑΝΟΣΟΔΙΑΧΥΣΗ (ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ IgD)
Ακριβής, ειδική, αποτελέσματα σε 2 ημέρες. Τείνει να εγκαταλειφθεί.

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



Σύγκριση ευαισθησίας μεθοδολογιών

	Kappa	Lambda	Diagnostic requirement
SPE	500 – 2,000mg/L	500-2,000mg/L	Monoclonal band
IFE	150-500mg/L	150-500mg/L	Monoclonal band
Free light chains	1.5mg/L	3.0mg/L	Abnormal κ/λ ratio

Περιορισμοί μεθοδολογίας
Dispensieri et al, Leucemia 2009, 23:215

ΑΙΤΙΟ	ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ
Ποικιλία μεταξύ διαφορετικών παρτίδων αντιδραστηρίων	10-20%
Περίσσεια αντιγόνου	Μεγάλα ποσοστά μείωσης
Μη αναγνωρίσιμοι επίτοποι	Ασύνηθες
Πολυμερισμός	Ασύνηθες (ψευδής αύξηση X10)

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 παραπρωτεΐναιμία
- FLC κ/ λ < 0,26 μονοκλωνική λ παραπρωτεΐναιμία
- Ο ΛΟΓΟΣ ΠΑΡΑΜΕΝΕΙ ΣΤΑΘΕΡΟΣ ΣΤΙΣ ΠΟΛΥΚΛΩΝΙΚΕΣ ΓΑΜΜΑΣΦΑΙΡΙΝΟΠΑΘΕΙΕΣ ΠΑΡΑ ΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΛΥΤΩΝ ΑΡΙΘΜΩΝ
- Φυσιολογικό FLC κ/ λ σε 5-10% των περιπτώσεων πολλαπλού μυελώματος και σε 40% των MGUS

Κλινική χρησιμότητα του λόγου ελεύθερων αλυσίδων

- rFLC: μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως παράγων κινδύνου σε MGUS. Χρήσιμος στην αξιολόγηση μικρών μονοκλωνικών κλασμάτων
- Μαζί με επίπεδα β2-μικροσφαιρίνης και αλβουμίνης αξιολογείται ως δείκτης επιβίωσης σε πολλαπλούν μυέλωμα.
- Συναξιολογείται ως παράγων κινδύνου μετάπτωσης μη εκκριτικού μυελώματος σε μυέλωμα
- Αξιολογείται ως δείκτης ανταπόκρισης στη θεραπεία στην αμυλοείδωση και το πλασματοκύττωμα .

Ανίχνευση πρωτεϊνουρίας

■ Πρωτεϊνουρία

- Αποβολή πρωτεΐνης $>150\text{mg}$ 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

Ποσοτικός προσδιορισμός λευκώματος ούρων ΔΕΝ ΔΙΑΚΡΙΝΕΙ πρωτεϊνουρία μονοκλωνικής γαμμασφαιρινοπάθειας από Νεφρωσικό σύνδρομο

Μέθοδοι προσδιορισμού μονοκλωνικής πρωτεΐνης ούρων

- 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)**.
- **ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΑΛΥΣΙΔΩΝ ΟΥΡΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑ ΟΥΡΩΝ 24ΩΡΟΥ**.

Urine Protein Electrophoresis

μέτρηση μονοκλωνικής ανοσοσφαιρίνης στα ούρα 24h

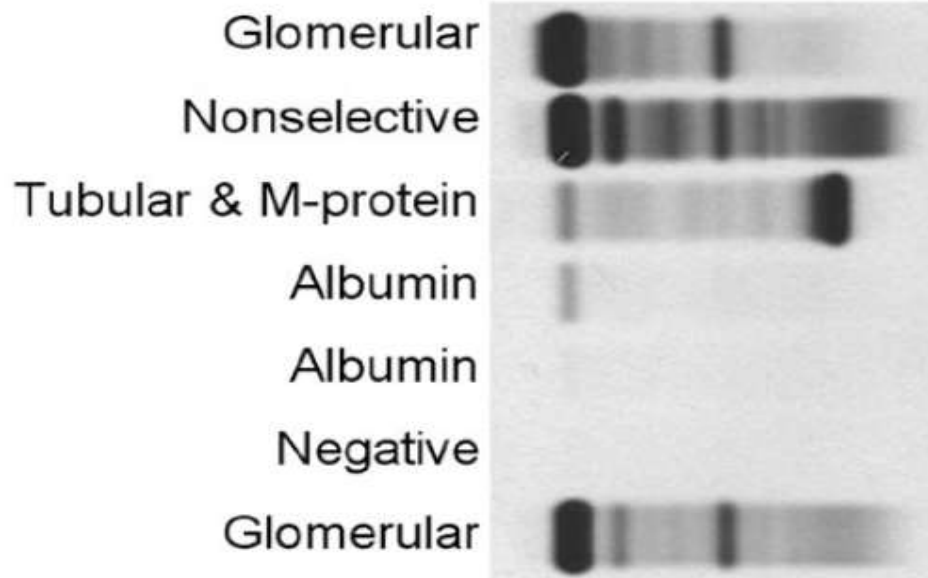
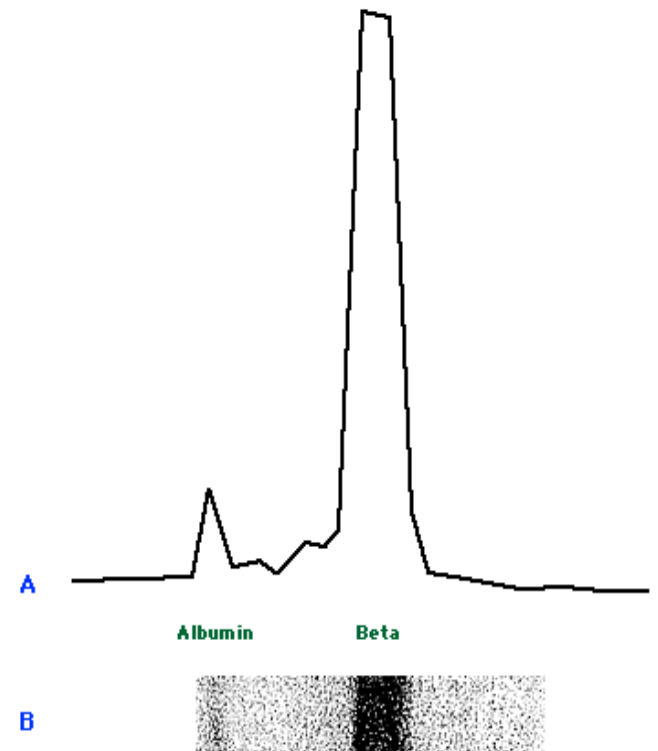


FIGURE 17 Several urine protein electrophoretic patterns are shown from concentrated urine samples. The arrow indicates the M protein in the third sample.



follows: $MFLC/24\text{ h} = (\text{total protein concentration [mg/ml]} \times (\text{ml}/24\text{ h}) \times (\% \text{ MFLC by densitometry}))$.

Πότε συνιστάται ανοσοκαθήλωση ούρων

- Όταν στη διαφορική διάγνωση μπαίνει η αμυλοείδωση και οι διαγνωστικές δοκιμασίες στον ορό είναι φυσιολογικές.
- Εάν υπάρχει ήδη ταυτοποιημένη νόσος των βαρειών αλυσίδων επιβεβαιώνει τη διάγνωση
- Εάν ταυτοποιηθεί μονοκλωνική πρωτεΐνη στον ορό, η παρουσία της σε ούρα 24ώρου είναι χρήσιμος δείκτης αξιολόγησης της νεφρικής λειτουργίας

Παράδειγμα

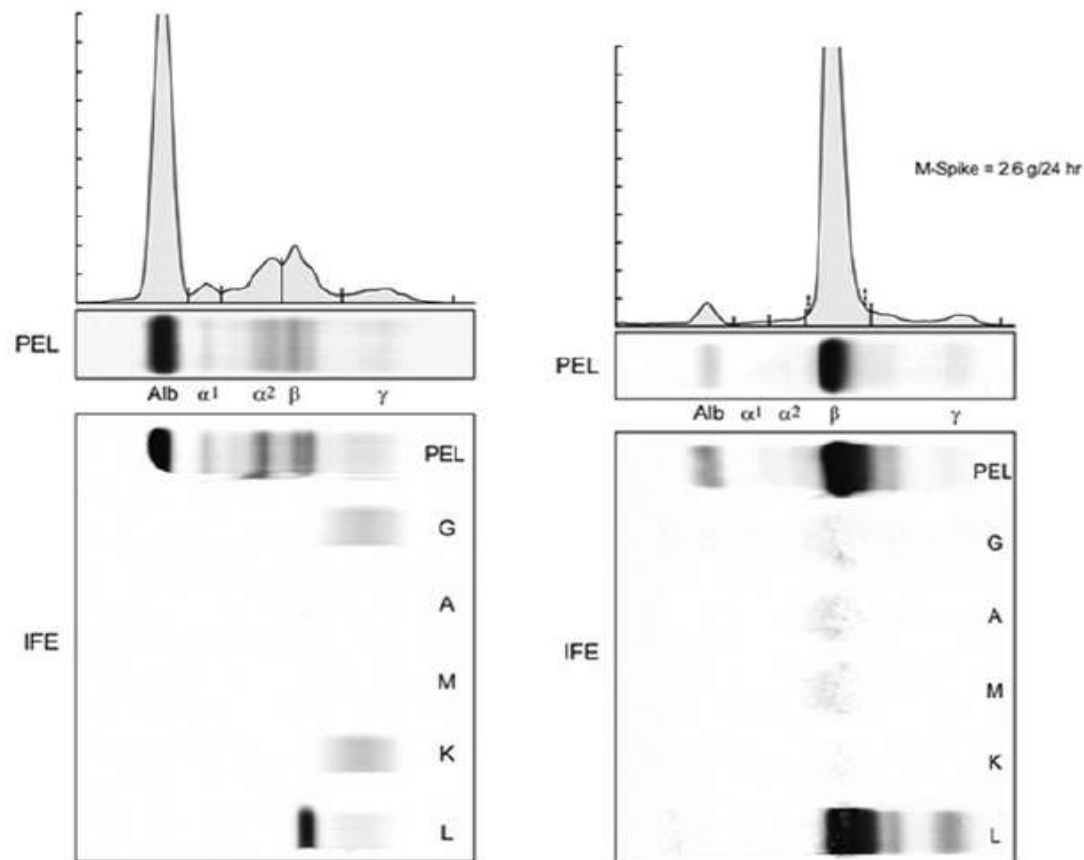


FIGURE 3 Light-chain multiple myeloma serum (left) and urine (right) tested by PEL and IFE.

Παράδειγμα

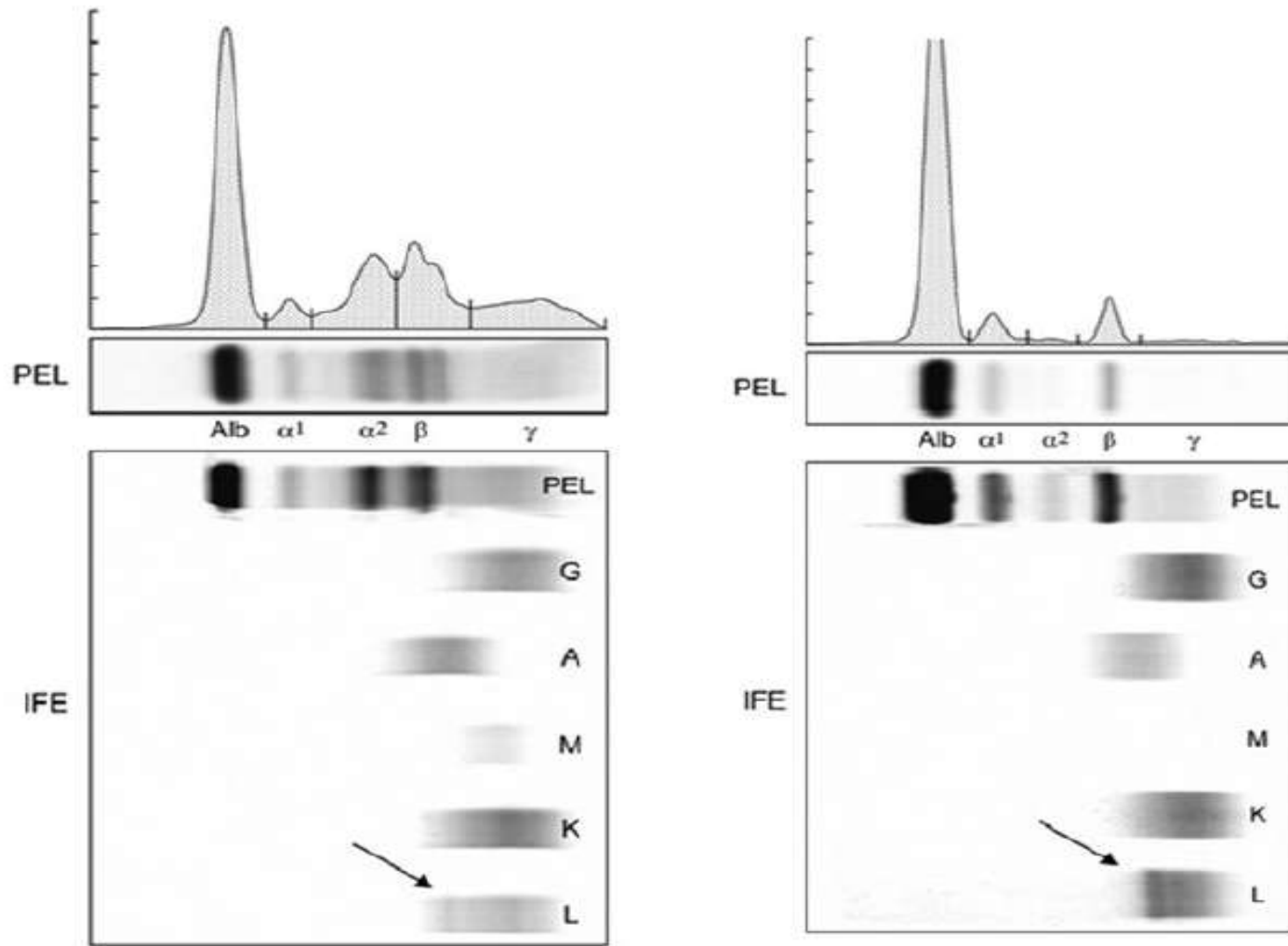
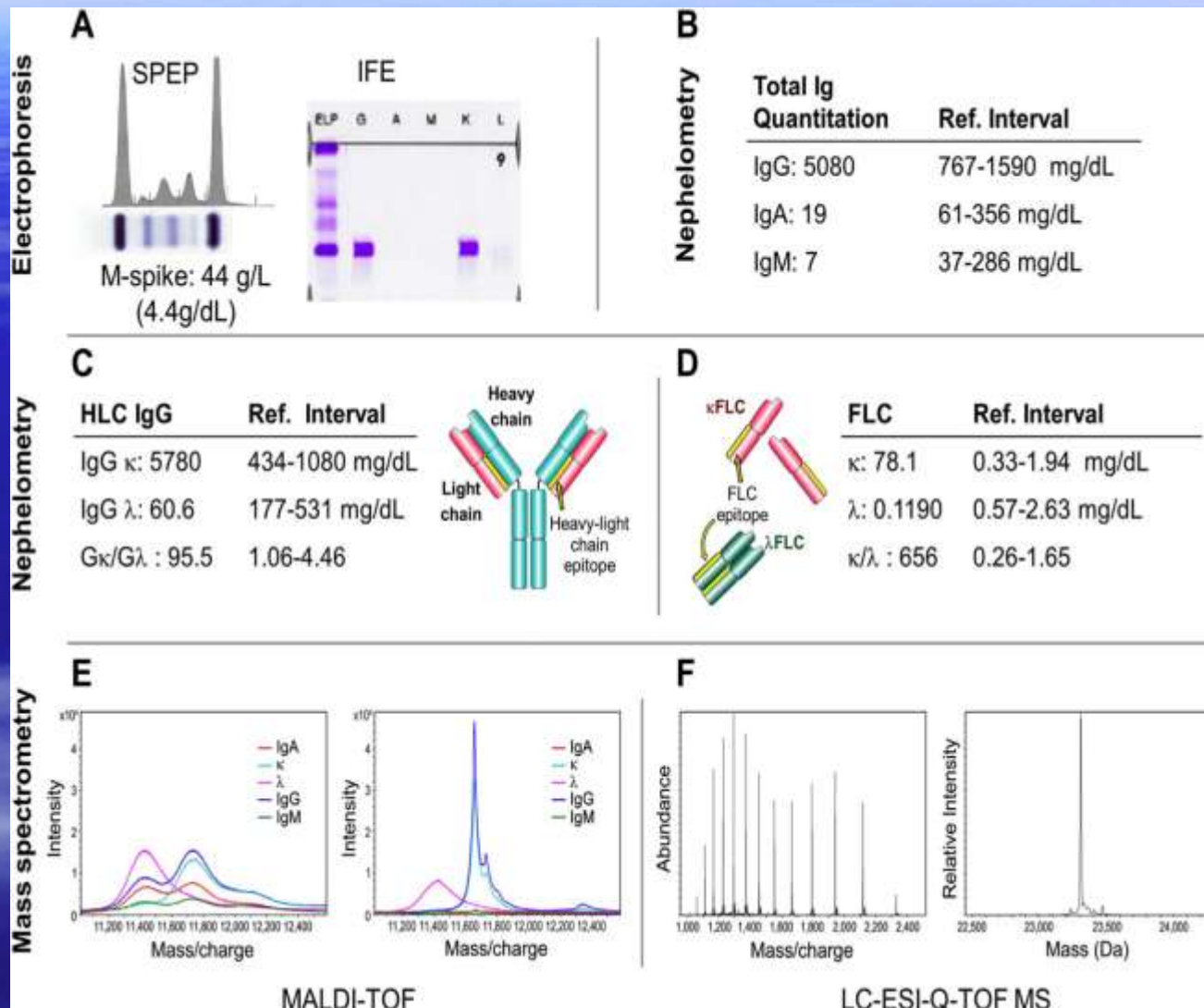


FIGURE 4 Primary amyloid tested by serum (left) and urine (right) PEL and IFE.

Μεθοδολογίες υπό αξιολόγηση- MALDI-TOF



Ταυτοποίηση μονοκλωνικού κλάσματος ούρων

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

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.

■ ΎΤΑΝ ΥΠΑΡΧΕΙ

- Υπογαμμασφαιριναιμία,

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

- ΕΠΙΒΑΛΛΕΤΑΙ ΑΝΟΣΟΚΑΘΗΛΩΣΗ ΑΚΟΜΑ ΚΑΙ ΎΤΑΝ 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, **ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑ 24ωρου.**
- rFLC **ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΟ** κριτήριο πλήρους ανταπόκρισης στη θεραπεία
- s: serum r:ratio

Παρακολούθηση Θεραπείας

TABLE 4 Response criteria for FLC determination^a

Disease	FLC level and/or response or recommendation				
	Minimal measurable	Partial response	Complete response	Stringent complete response	Progression
AL without measurable serum or urine M protein	iFLC \geq 10 mg/dl	50% reduction	Normal rFLC and bone marrow, complete response by IFE	ND	50% increase of iFLC to $>$ 10 mg/dl
MM without measurable serum or urine M protein	iFLC 10 mg/dl	50% reduction of dFLC	ND	Normal rFLC, complete response by IFE, and bone marrow	50% increase of dFLC
MM with measurable disease	Do not test FLC	Do not test FLC	Do not test FLC	Normal rFLC and bone marrow, complete response by IFE	Do not test FLC

^aiFLC, involved free light chain; rFLC, ratio of free kappa/free lambda light chain; dFLC, difference between involved FLC types and uninvolved FLC types; ND, not determined. This table was modified from reference 66.

Παρακολούθηση Θεραπείας

TABLE 5 International Myeloma Working Group criteria for response to therapy

Response	IMWG criteria
Stringent complete response	Complete response, normal rFLC, and absence of clonal cells in bone marrow by immunohistochemistry or immunofluorescence
Complete response	Negative serum and urine IFE, disappearance of any soft tissue plasmacytomas, and $\leq 5\%$ plasma cells in bone marrow
Very good partial response	Serum and urine M protein seen by IFE but not by electrophoresis or $\geq 90\%$ reduction in serum M protein plus a urine M protein level of < 100 mg/24 h
Partial response	$\geq 50\%$ reduction of serum M protein and reduction in 24-h urinary M protein by $\geq 90\%$ or to < 200 mg/24 h

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΑΞΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ rFLC

ΝΟΣΗΜΑ	ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ
Νοσος ελαφριών αλυσίδων	100%
Αμυλοείδωση	90-95%
Μη εκκριτικό μυέλωμα	60-70%
Μυέλωμα (πλήρες μόριο)	90-95%
MGUS	40%

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.