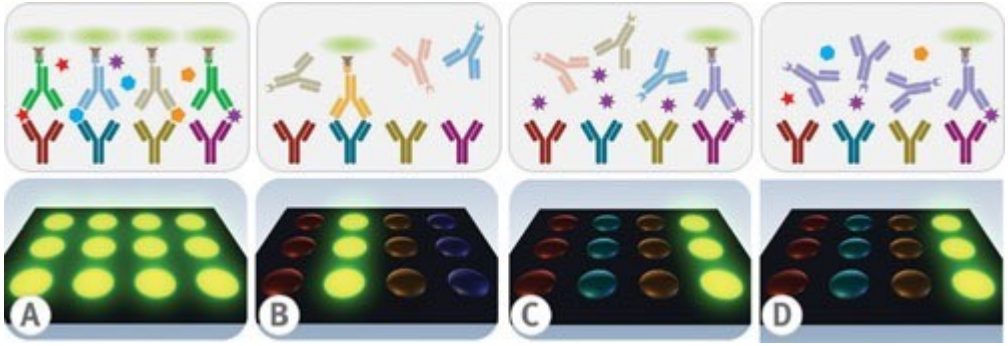
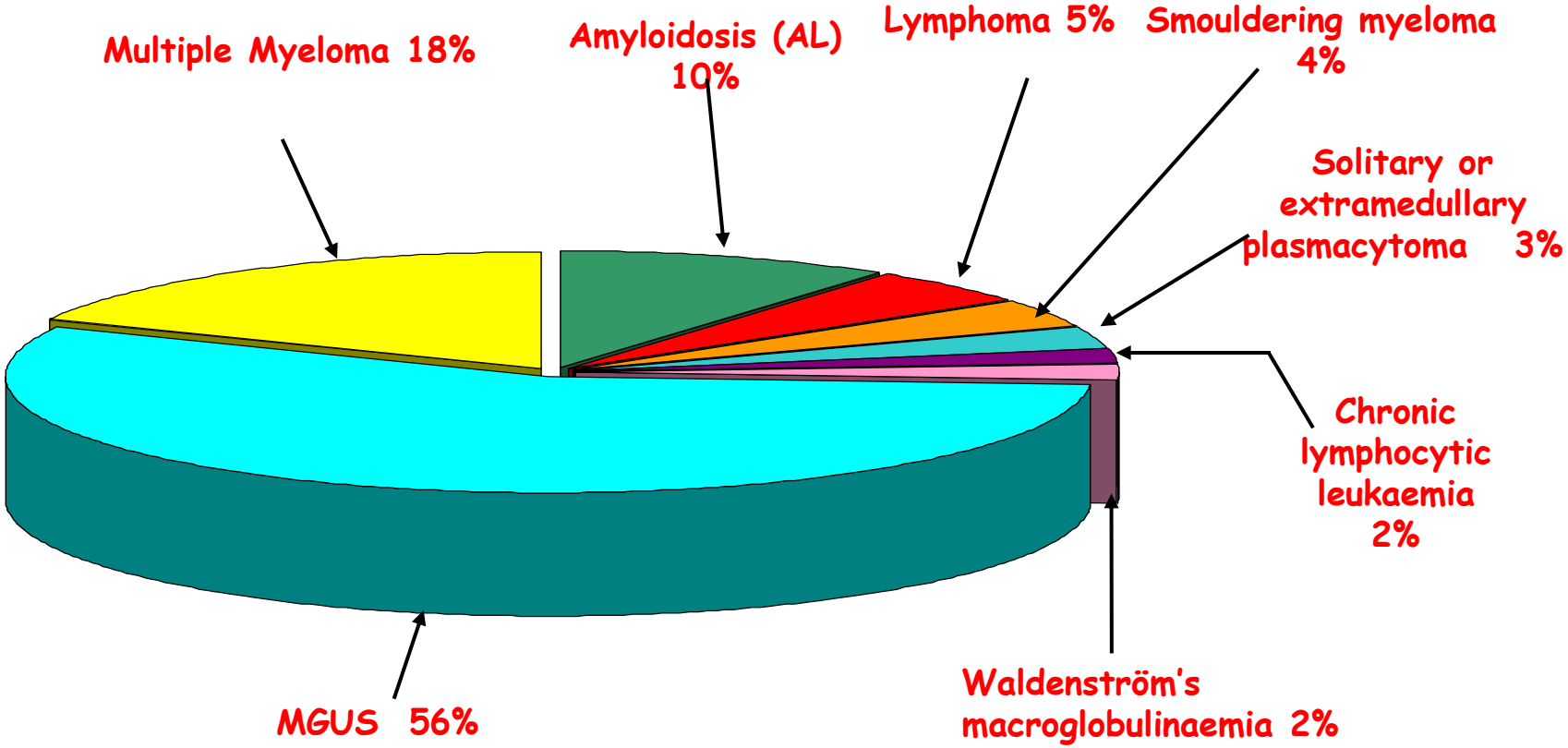
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΠΑΡΑΠΡΩΤΕΙΝΑΙΜΙΩΝ



Φωτεινή Παληογιάννη

Παρουσία μονοκλωνικής πρωτεΐνης σε κλινικές οντότητες



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

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 > 3g/dL)

- Μονοκλωνική πρωτεΐνη στα ούρα
- Λυτικές βλάβες
- Κλινικά συμπτώματα συνοδά/συμβατά με πολλαπλούν μυέλωμα

- CRAB : Υπερασβεστιαιμία, Νεφρική ανεπάρκεια, Αναιμία, Λυτικές Βλάβες Οστών

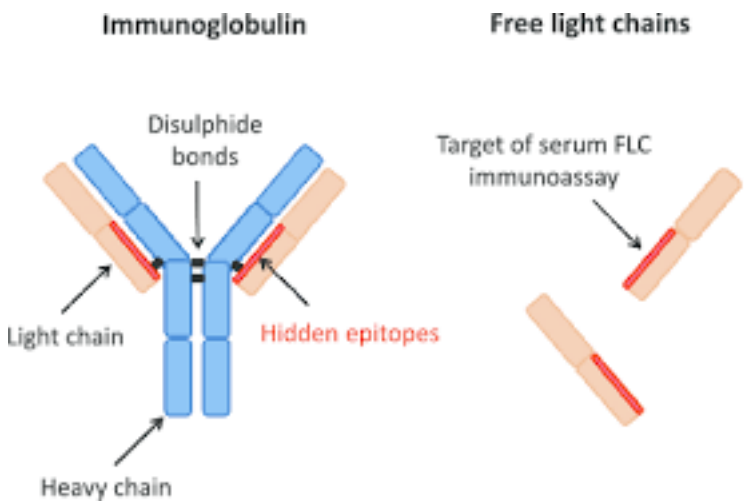
- **Smoldering Myeloma:** Από τα παραπάνω απουσιάζουν τα κλινικά ευρήματα

- **MGUS:** Παρουσία μονοκλωνικής πρωτεΐνης στον ορό < 3g/dL, αριθμός πλασματοκυττάρων στον μυελό <10%, απουσία κλινικών συμπτωμάτων

- N

Ανίχνευση νεοπλασματικού δείκτη-Μ πρωτεΐνη

- Μονοκλωνική πρωτεΐνη που «συνήθως » εκκρίνεται στον ορό



Μονομερές, πολυμερές ή τμήμα του μορίου της ανοσοσφαιρίνης.

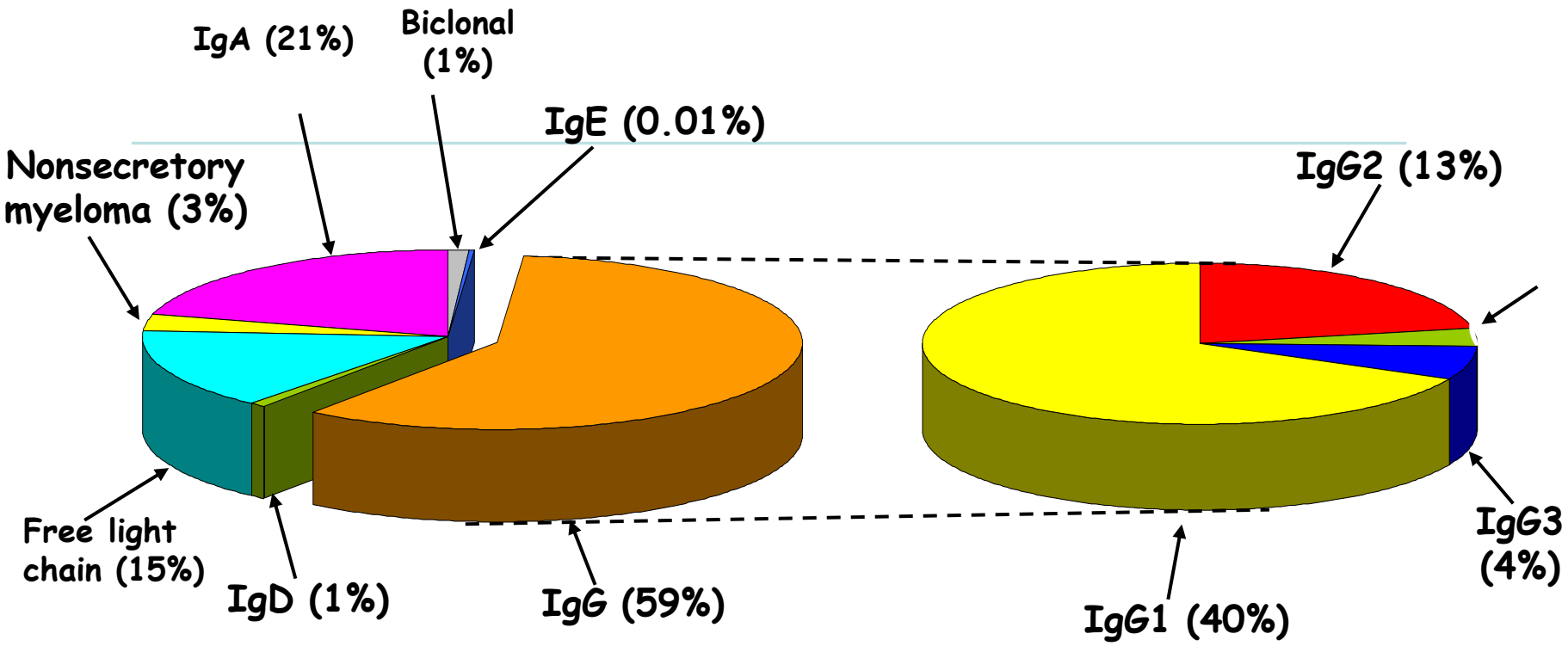
IgG: Αναγνωρίζουν δομικά στοιχεία και μικροβιακά παράγωγα S.aureus, Leptospira, Brucella.

Τρανσφερρίνη

IgM: Λευκωματίνη ορού, καρδιολιπίνη, δομικά στοιχεία Klebsiella.

Άγνωστης ειδικότητας

Τάξεις ανιχνεύσιμων ανοσοσφαιρινών



Μονοκλωνικές ανοσοσφαιρίνες στο πολλαπλούν μυέλωμα

Ig's πλάσματος	Επίπτωση%	Συνύπαρξη Bence- Jones πρωτεϊνουρίας%
IgG	50	60
IgA	25	70
MONO 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

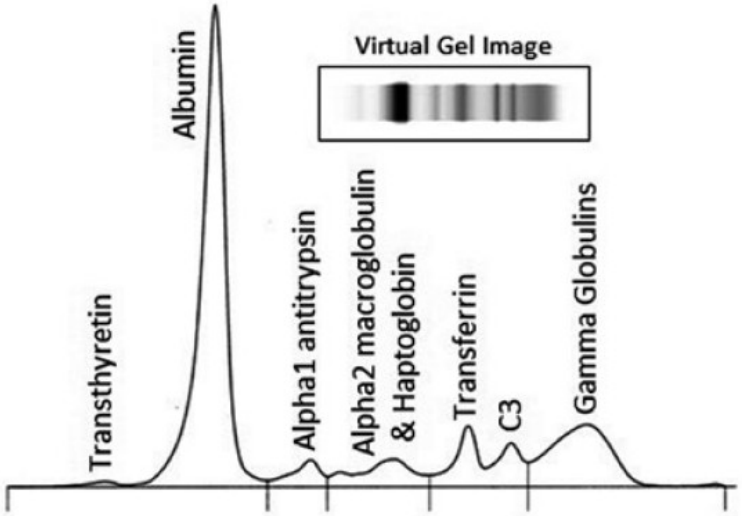
Διάκριση σε 5 διακριτές περιοχές *αλβουμίνη, α1, α2, β και γ.*

- Μονοκλωνικό κλάσμα ανιχνεύσιμο από α2 έως γ περιοχή .
- Ποσοτικά μετρήσιμο ως ποσοστό του συνόλου της περιοχής των σφαιρινών όπου εντοπίζεται.

» Ποσοτικές μέθοδοι

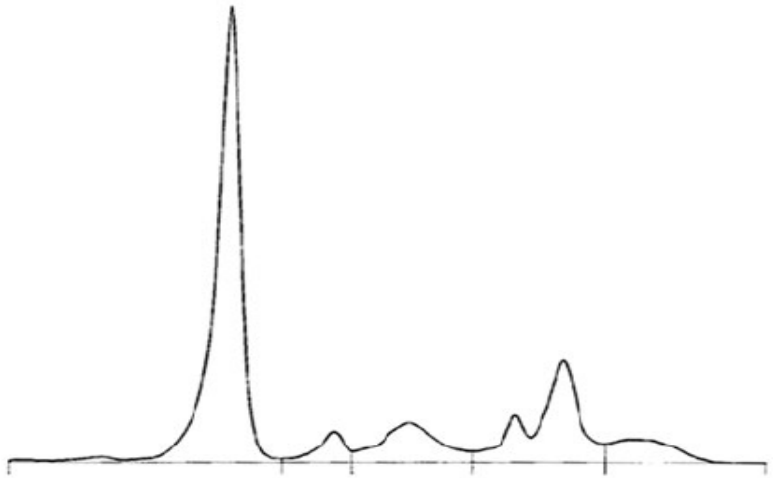
- Κυκλοτερής ανοσοδιάχυση-δεν χρησιμοποιείται πλέον
- Νεφελομετρία

Ανίχνευση μονοκλωνικού κλάσματος στην ηλεκτροφόρηση ορού



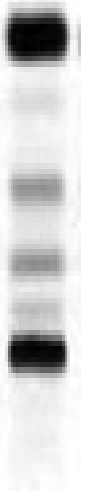
A/G 1.43
T.P. : 6.3

Fractions	%	Ref. %	g/dl	Ref. g/dl
Albumin	58.9	52.9 - 66.9	3.7	3.7 - 4.9
Alpha 1	3.7	3.0 - 5.8	0.2	0.2 - 0.4
Alpha 2	7.2	7.5 - 13.4	0.5	0.5 - 0.9
Beta	12.1	8.5 - 13.7	0.8	0.6 - 1.0
Gamma	18.1	8.8 - 19.2	1.1	0.6 - 1.4



A/G Ratio : 1.32
T.P. : 6.8

Fractions	%	Ref. %	g/dl	Ref. g/dl
Albumin	56.9	52.9 - 66.9	3.9	3.7 - 4.9
Alpha 1	4.1	3.0 - 5.8	0.3	0.2 - 0.4
Alpha 2	11.0	7.5 - 13.4	0.7	0.5 - 0.9
Beta	21.1	8.5 - 13.7	1.4 H	0.6 - 1.0
Gamma	6.9	8.8 - 19.2	0.5 L	0.6 - 1.4



Ποσοτικός προσδιορισμός με νεφελομετρία

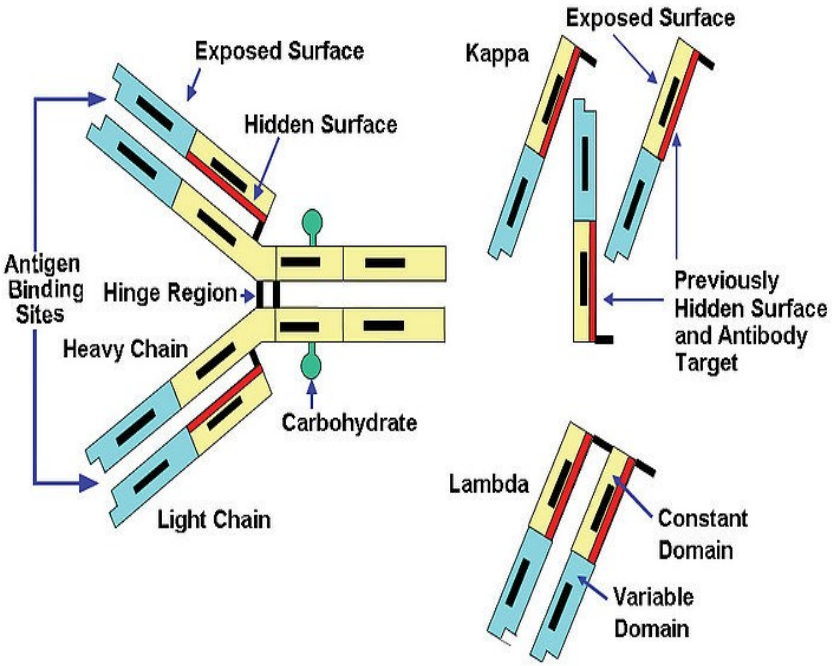
- Αδύνατος ο διαχωρισμός του μονοκλωνικού κλάσματος από το σύνολο της ανοσοσφαιρίνης αλλά ύπάρχουν συνηγορούντα ευρήματα
- Η παρουσία μονοκλωνικού κλάσματος που ανιχνεύει η Η/Λ πρωτεϊνών ΔΕΝ ΑΝΤΑΝΑΚΛΑΤΑΙ ΠΑΝΤΑ σε διαταραχή του συνόλου ποσού των ανοσοσφαιρινών

Ig's (mg/dl)	Παράδειγμα 1	Παράδειγμα 2	Παράδειγμα 3
IgG (ΦΤ:751-1560)	4500	235	1456
IgA (ΦΤ:82-453)	45	48	37
IgM (ΦΤ:46-304)	27	28	25

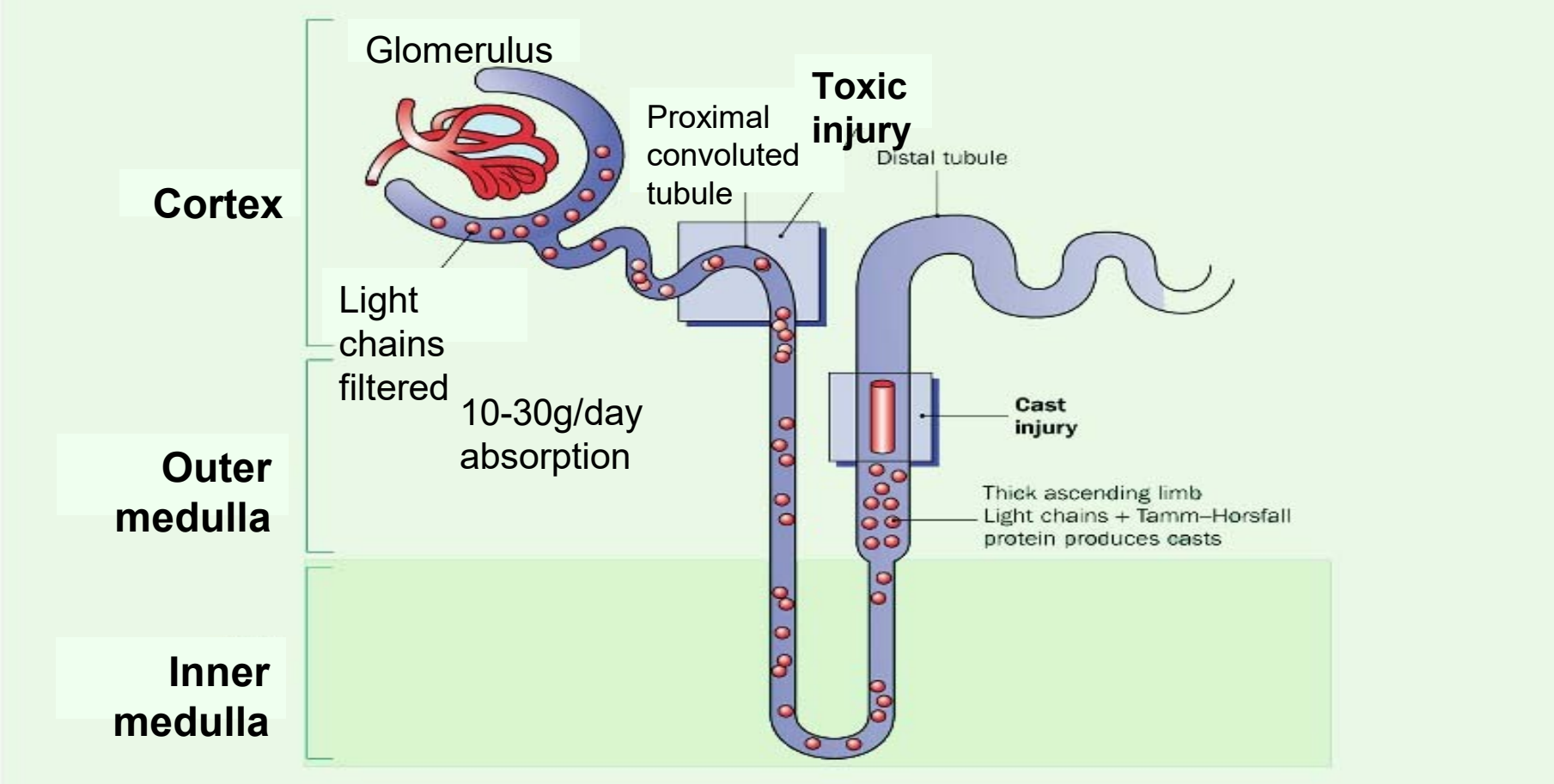
- Αύξηση μιας τάξης ανοσοσφαιρίνης με ταυτόχρονη καταστολή των άλλων τάξεων
- Υπογαμμασφαιριναιμία
- Αλλά και φυσιολογικές τιμές με μόνη ένδειξη την καταστολή των δύο τάξεων.

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 ofpatients with Bence Jones myeloma. Lancet 2003; 361: 489.
- Προσδιορίζει ελεύθερες ελαφριές αλυσίδες σε ορό και ούρα-
- ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΣΤΟ ΡΥΘΜΟ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΟΥΣ ΑΝΤΑΝΑΚΛΑ ΤΟ ΔΥΝΑΜΙΚΟ ΤΟΥ ΚΛΩΝΟΥ
- Πολυκλωνικά αντισώματα που δεν δίνουν διασταυρούμενες αντιδράσεις



Σύνθεση-μεταβολισμός ελαφρών αλυσίδων



Το Β-λεμφοκύτταρο συνθέτει σε περίσσεια (40%) ελαφριές αλυσίδες σε σχέση με τις βαριές. Υπερτερεί η παραγωγή των κ, αλλά επαναρροφάται με διπλάσιο ρυθμό. Σχέση κ/λ σταθερή.

Υπάρχει φυσιολογικά ανιχνεύσιμο ποσό ελεύθερων ελαφριών αλυσίδων κ και λ ΣΤΟΝ ΟΡΟ , στα ούρα – συνάρτηση της νεφρικής λειτουργίας

Συγκέντρωση ανάλογη του ισοζυγίου παραγωγής/ νεφρικής κάθαρσης.

Φυσιολογικές τιμές ελαφρών αλυσίδων
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**

Ταυτοποίηση μονοκλωνικού κλάσματος

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ

» **Ανοσοηλεκτροφόρηση**

Δεν χρησιμοποιείται πλέον αν και δίνει στοιχεία για το παθολογικό ή όχι του κλάσματος.

» **Capillary electrophoresis-Immunosubstraction**

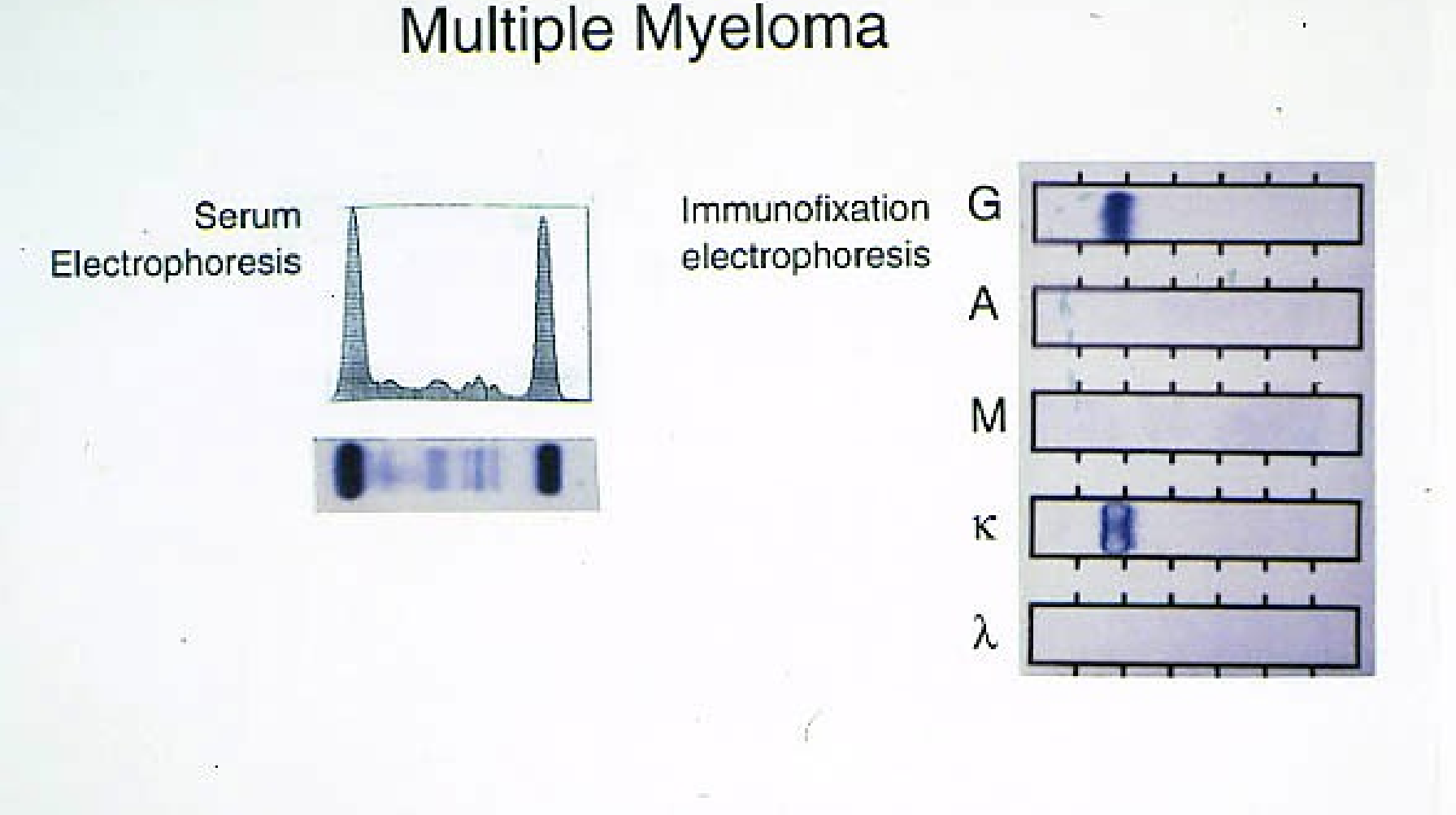
Συνδυασμός ηλεκτροφόρησης σε τριχοειδές και ανοσοκαθίζησης. Όχι τόσο ευαίσθητη, μη επαρκώς αξιολογημένη

» **Ανοσοκαθήλωση (Immuno Fixation Electrophoresis, IFE)**

Συνδυασμός ηλεκτροφόρησης / αντίδρασης αντιγόνου αντισώματος πάνω στο πήκτωμα αγαρόζης.

Η ΠΛΕΟΝ ΕΝΔΕΔΕΙΓΜΕΝΗ ΣΤΗΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ -ΔΕΝ Ε΄ΙΝΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΗ

Ανοσοκαθήλωση- IFE



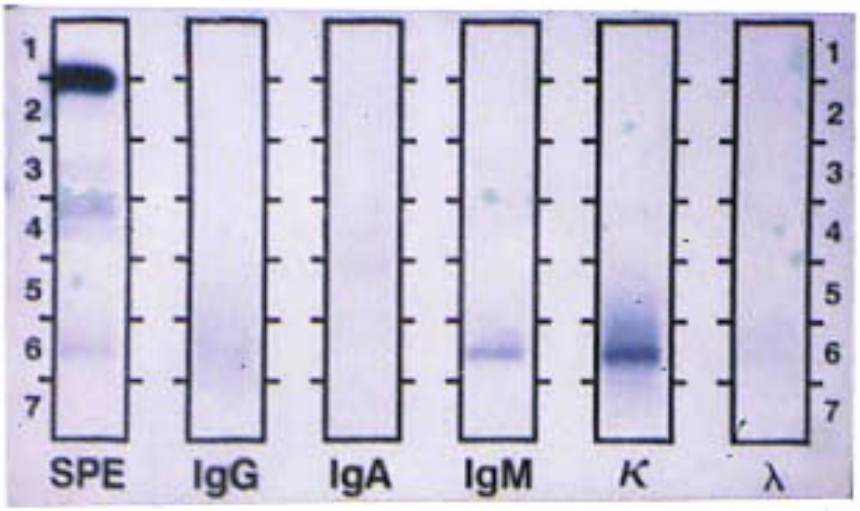
Ημιποσοτική μεθοδολογία πιο ευαίσθητη από την ηλεκτροφόρηση στην αρχική διάγνωση

ΔΕΝ Ε΄ΙΝΑΙ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΙΚΗ για παρακολουθηση θεραπείας

Ανοσοκαθήλωση- IFE

Waldenstroms Macroglobulinemia

Serum Immunofixation electrophoresis



Μέθοδοι προσδιορισμού μονοκλωνικής πρωτεΐνης ούρων

- Ελαφρές αλυσίδες ΔΕΝ ΑΝΙΧΝΕΥΟΝΤΑΙ με το stick ούρων το οποίο ανιχνεύει αλβουμίνη όταν αποβάλλεται σε ποσά >300mg/day.

- Η ιδιότητα των κ/λ αλυσίδων (Bence Jones λεύκωμα) να ανιχνεύονται με βάση τη πρόκληση θολερότητας σε διαφορετικές θερμοκρασίες έχει ΧΑΜΗΛΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΚΑΙ ΕΧΕΙ 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 το πιο αντιπροσωπευτικό.

Urine Protein Electropheresis
μέτρηση μονοκλωνικής ανοσοσφαιρίνης στα ούρα 24h

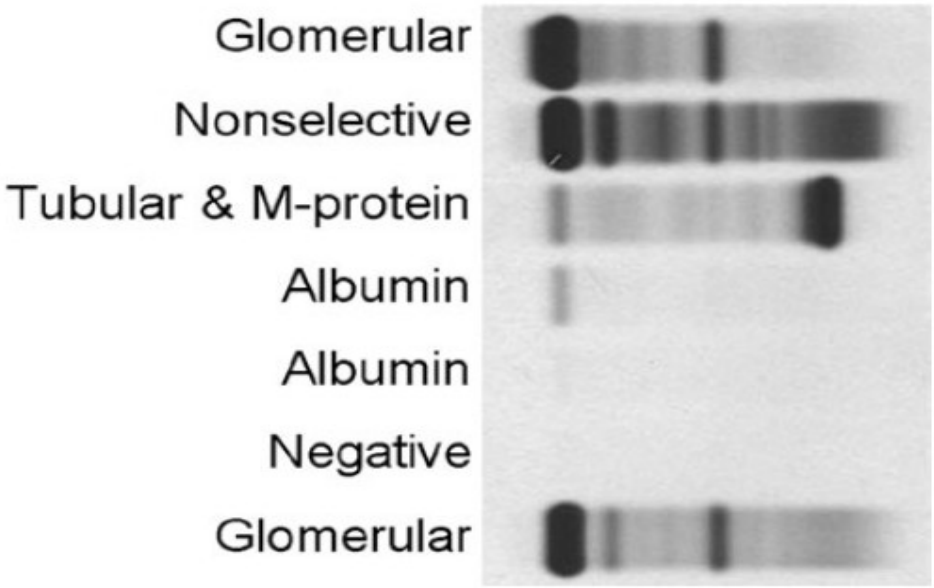
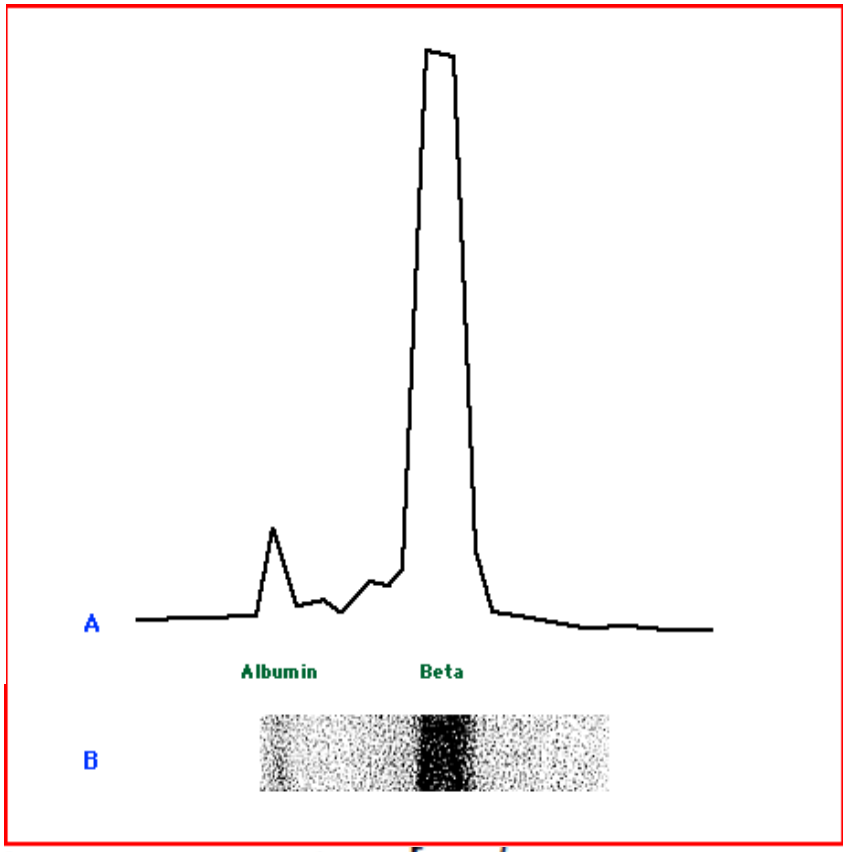


FIGURE 17 Several urine protein electrophoretic patterns are shown from concentrated urine samples. The arrow indicates the M protein in the third sample.

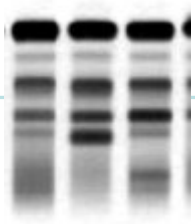


follows: MFLC/24 h = (total protein concentration [mg/ml]) × (ml/24 h) × (% MFLC by densitometry).

Αρχική ανίχνευση-Screening

Διάκριση μονοκλωνικής πρωτεΐνης από πολυκλωνικές ανοσοσφαιρίνες

» Ηλεκτροφόρηση ορού



» IFE εάν υπάρχουν στοιχεία- Έμμεσα στοιχεία από νεφελομετρία

» Ποσοτικοποίηση των FLC

- παθολογικές σε 100% LCMM
- 95% A
- 60% NSMM
- 90-95% MM
- 40% MGUS

» Ανίχνευση μονοκλωνικής πρωτεΐνης στα ούρα ΣΥΝΙΣΤΑΤΑΙ ΜΟΝΟ σε υποψία Αμυλοείδωσης και ΕΠΕΤΑΙ της ανίχνευσης μονοκλωνικού κλάσματος στον ορό

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

Διαβάθμιση κινδύνου

- Το αρχικό screening με FLC, β2 μικροσφαιρίνη και αλβουμίνη χρησιμοποιείται για πρόγνωση του πολλαπλού μυελώματος (ΜΜ)
- *Snozek CL et al, 2008, Leukemia 22:1933–1937*

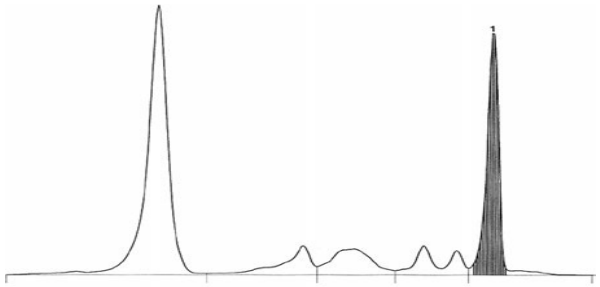
- FLC, μέγεθος μονοκλωνικού κλάσματος, ποσοστό (PEL) και ταυτότητα μονοκλωνικού κλάσματος (IFE) χρησιμοποιούνται στην αξιολόγηση κινδύνου μετάπτωσης από MGUS σε ΜΜ
- *Rajkumar SV et al, 2005, Blood 106:812–817*

- FLC μαζί με ποσοστό πλασματοκυττάρων στο μυελό αξιολογούν τον κίνδυνο μετάπτωσης από SMM σε ΜΜ.
- *Larsen JT et al, 2013. Leukemia 27:941–946.*

- *FLC: Ελεύθερες αλυσίδες*
- *PEL: Ηλεκτροφόρηση ορού*

Παρακολούθηση πορείας νόσου

Ποσοτικοποίηση της Μ πρωτεΐνης- PEL
Η ΣΥΝΙΣΤΩΜΕΝΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΌΤΑΝ ΤΟ ΚΛΑΣΜΑ ΕΊΝΑΙ ΜΕΤΡΗΣΙΜΟ
Προβλήματα στην ποσοτικοποίηση – αξιόπιστα μετρήσιμα κλάσματα ΜΟΝΟ > 1g/dl στον ορό ή >200mg/24h στα ούρα
Dispensieri et al, Leucemia 2009, 23:215-
International myeloma working group

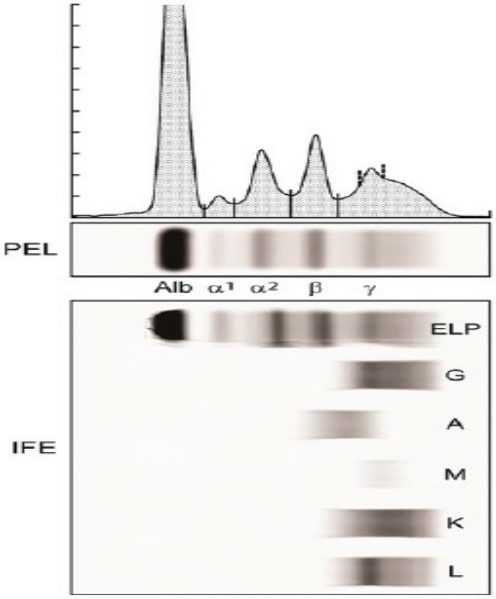


A/G Ratio : 0.98
T.P. : 7.8

Fractions	%	Ref. %	g/dl	Ref. g/dl
Albumin	49.6	50.9 - 65.5	3.9	3.6 - 4.9
Alpha 1	7.4	4.4 - 9.9	0.6	0.3 - 0.8
Alpha 2	9.4	6.3 - 13.1	0.7	0.5 - 1.1
Beta	7.4	8.6 - 14.2	0.6	0.6 - 1.1
Gamma	26.2	8.8 - 19.2	2.0 H	0.6 - 1.5
1	24.7		1.9	

Αδύνατο να ποσοτικοποιηθεί κλάσμα μέσα στη β-περιοχή

Νεφελομετρία-ΕΜΜΕΣΗ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑ γιατί ανιχνεύει το σύνολο της τάξης της ανοσοσφαιρίνης συμπεριλαμβανομένου και του μονοκλωνικού κλάσματος.



Μέτρηση FLC- **ΜΟΝΟ ΕΆΝ ΔΕΝ ΕΊΝΑΙ ΑΞΙΟΠΙΣΤΑ ΜΕΤΡΗΣΙΜΑ ΤΑ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΚΛΑΣΜΑΤΑ**

PEL : Protein ELectrophoresis

Παρακολούθηση ανταπόκρισης στη θεραπεία

1. Μέτρηση μονοκλωνικού κλάσματος σε ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών –ΌΧΙ ελεύθερες αλυσίδες
2. Μέτρηση ελεύθερων αλυσίδων σε αμυλοείδωση και όπου ΔΕΝ Ε΄ΙΝΑΙ ΔΥΝΑΤΗ η μέτρηση κλάσματος στην ηλεκτροφόρηση πρωτεινών.
3. Ανοσοκαθήλωση όταν ελέγχεται πλήρης ύφεση

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 ≥ 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

[a]iFLC, 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.

Συγκριτική μελέτη δεικτών νόσου στην παρακολούθηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία

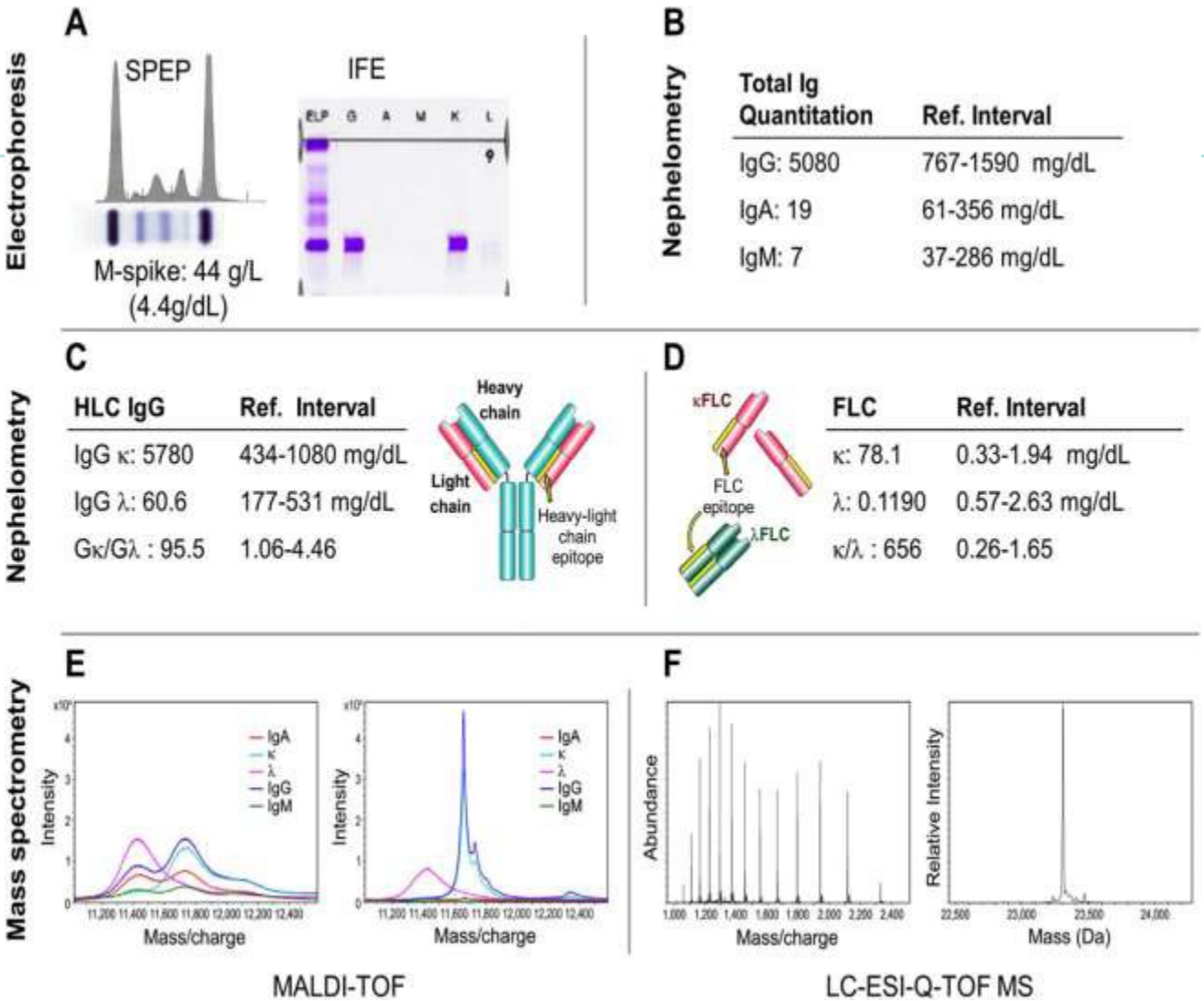
Katzmann et al 2011, Clin. Chem 56:1687-1692

Ποικιλία μετρήσεων σε φάση κλινικής ύφεσης

8%- Μέτρηση μονοκλωνικού κλάσματος
12%- Μέτρηση ανοσοσφαιρινών με νεφελομετρία
28%- Μέτρηση FLC
36%- Μέτρηση μονοκλωνικού κλάσματος στα ούρα

Η μέτρηση όλου του μορίου της μονοκλωνικής ανοσοσφαιρίνης παραμένει η σταθερότερη μεταβλητή για την παρακολούθηση της νόσου –όπου είναι δυνατόν.

Μεθοδολογία υπό αξιολόγηση
Φασματωφοτομετρία μάζης -MALDITOF



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 για αρχικό screening.**
- **Ηλεκτροφόρηση/ανοσοκαθήλωση ούρων ΠΑΝΤΑ σε ήδη ταυτοποιηθέν κλάσμα.**
- **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**

Για να είναι κλινικά σημαντικό το εργαστηριακό εύρημα

- Καμμία μεθοδολογία κατ' αποκλειστικότητα δεν έχει την απαιτούμενη ευαισθησία για διάγνωση, σταδιοποίηση, πρόγνωση
- ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΗ Η ΧΡΗΣΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΥ ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΥ.
- 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.
- ΕΞΟΡΘΟΛΟΓΙΣΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΟΡΩΝ ΤΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ.