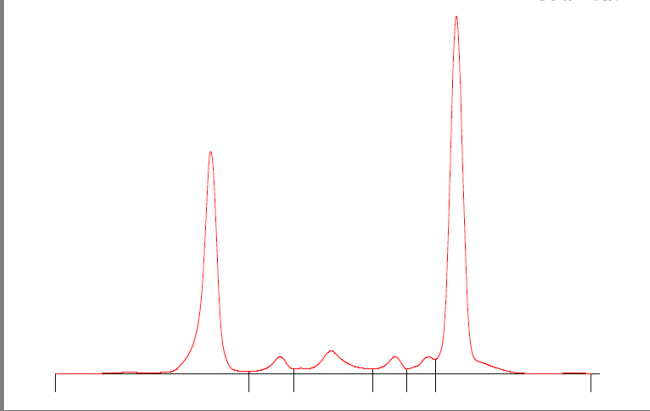
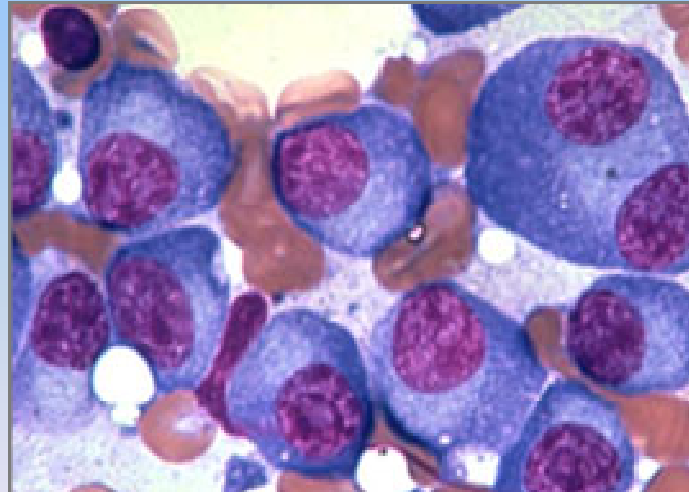


## Le indagini di laboratorio nella diagnosi delle malattie ematologiche: quando il medico e il laboratorista parlano la stessa lingua

Sabato 16 Dicembre 2017 - Aula Magna, Nuovo Arcispedale S. Anna



## Il laboratorio clinico nello scenario del mieloma



**Stefano Pizzicotti**

U.O. Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia

La diversità dei disordini plasmacellulari, la molteplicità delle proteine secrete e la loro variabile concentrazione, fanno sì che non esista un singolo test per diagnosticarle e monitorarle.

Tradizionalmente la rilevazione di componenti monoclonali risiede nella esperienza e nell'abilità del laboratorista nel differenziare ciò che è **poli** - da quello che è **mono** - clonale

# **Due grandi categorie di analisi**

**Esami forensici  
(siero e urine)  
immunofissazione  
Esami biochimici**

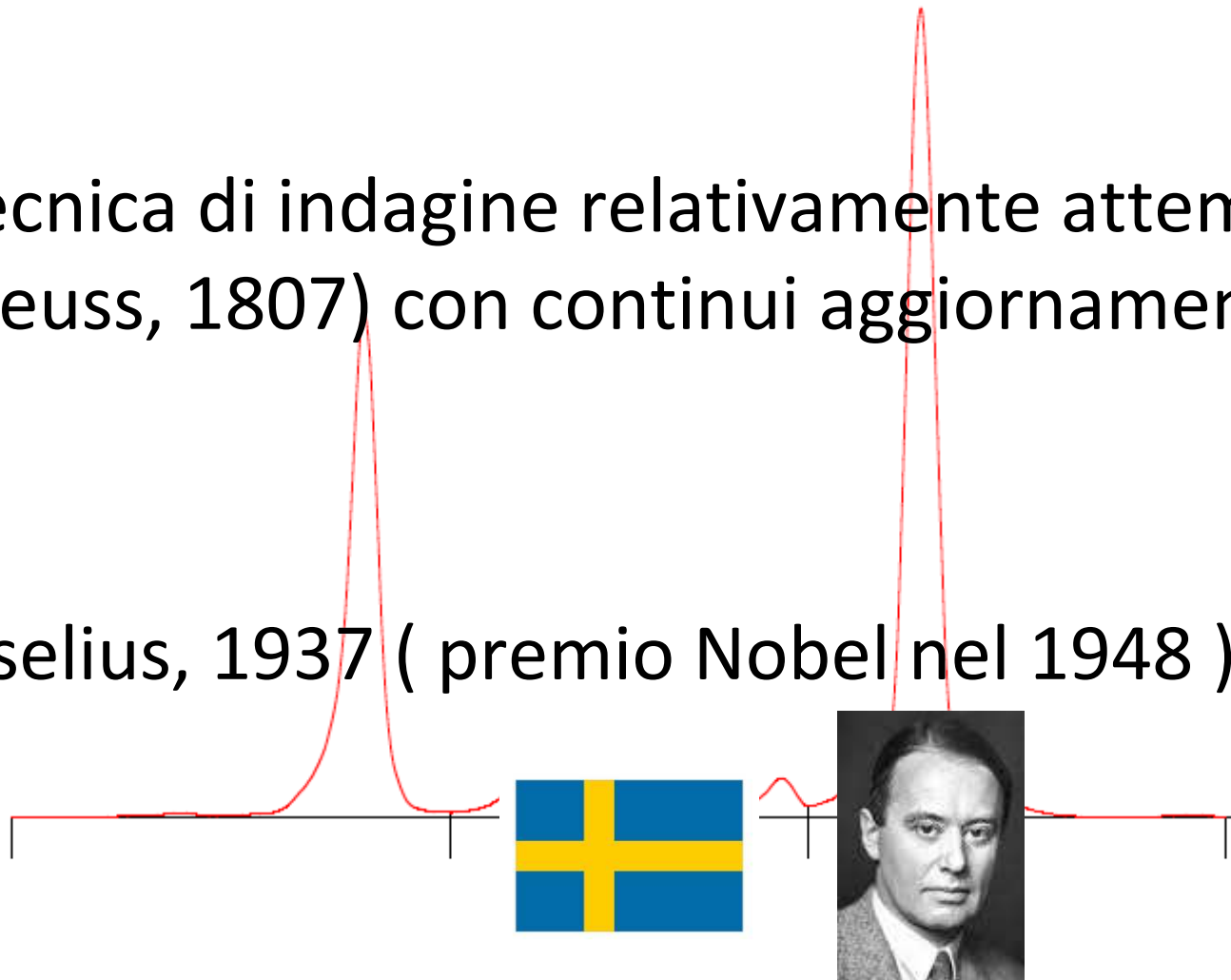
# Esami forensici

- ἤλεκτρον (ambra, pietra con caratteristiche tipiche di caricamento elettrico)
- φόρησις (trasporto)
- movimento unidirezionale di particelle elettricamente cariche, sospese o disciolte in un mezzo liquido conduttore, sotto l'azione del campo elettrico tra due elettrodi.



# Esami forensici

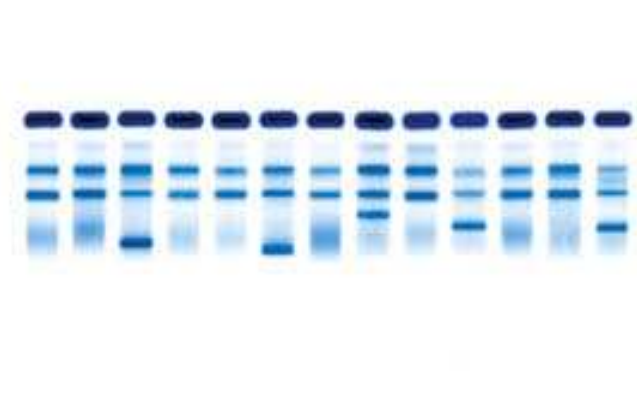
- Tecnica di indagine relativamente attempata (Reuss, 1807) con continui aggiornamenti.
- Tiselius, 1937 ( premio Nobel nel 1948 )



# Esami foretici

- **Substrati**

- Gel agarosio
- Gel poliacrilammide
- SDS-PAGE
- E. bidimensionale
- .....

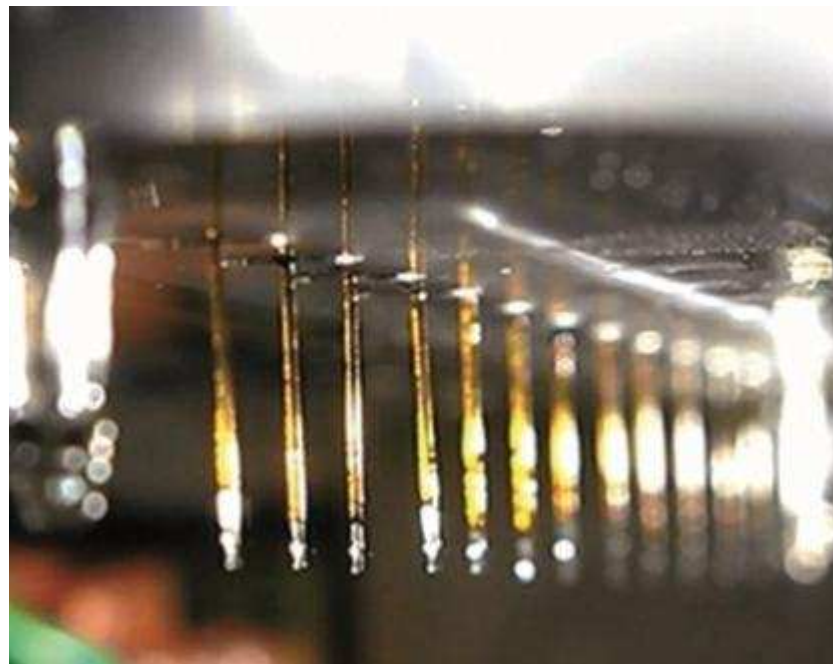


- Le loro “**maglie**” determinano le migrazioni del contenuto del materiale che viene fatto “correre”

# Esami forensici

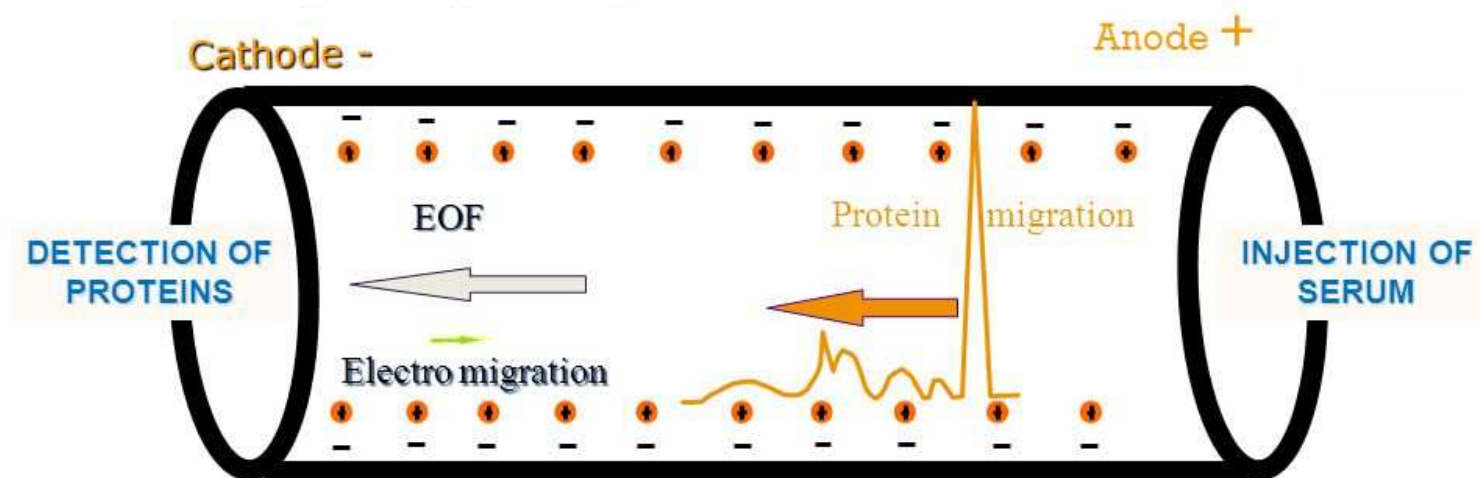
- Esiste anche un'elettroforesi "senza supporto":

## elettroforesi capillare



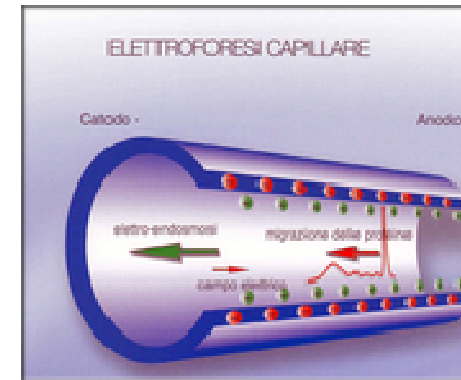
# Esami forensici

I sistemi in uso sono basati sul principio dell'elettroforesi capillare **in fase libera**.



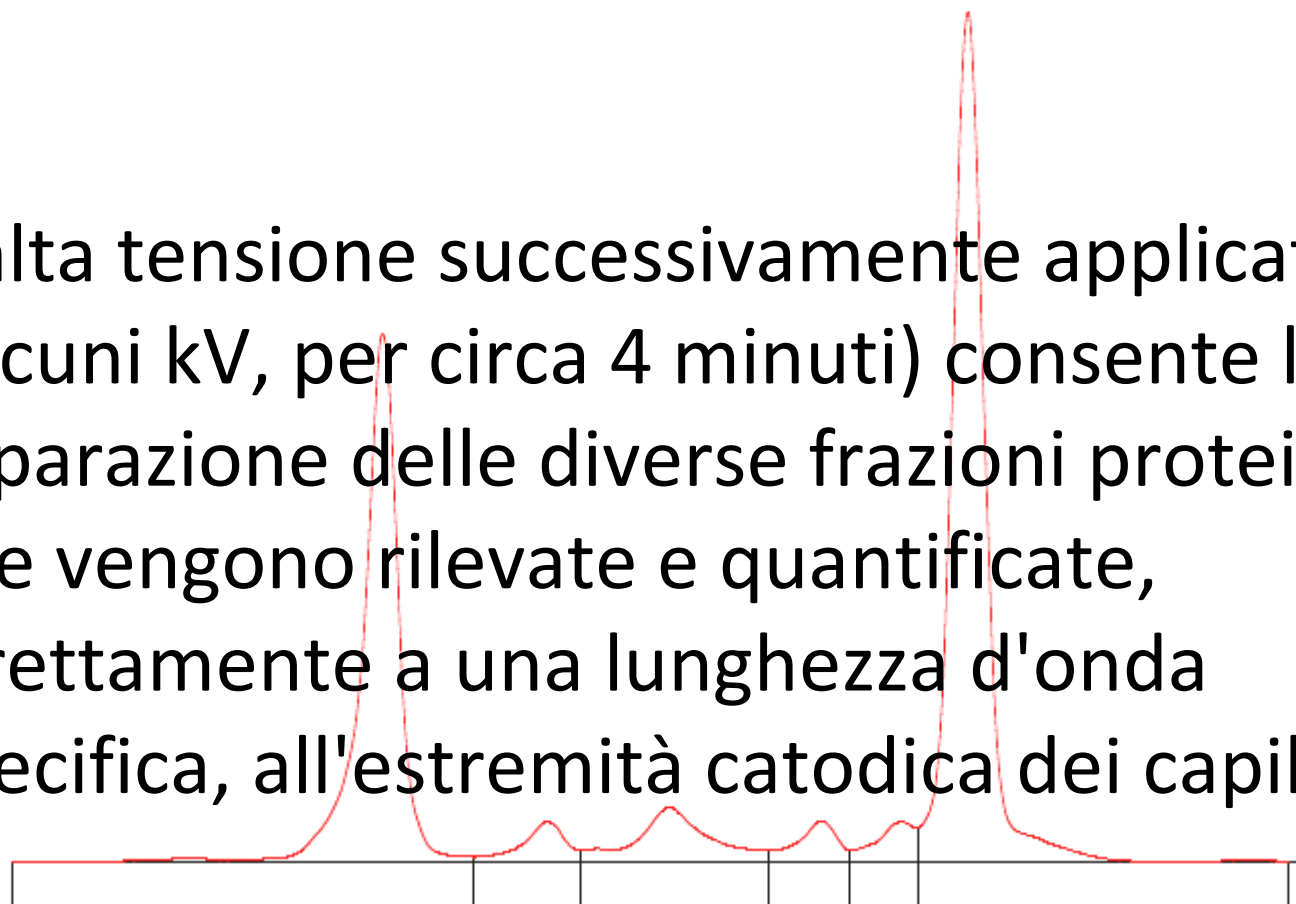
# Esami forensici

La separazione delle molecole cariche avviene in base alla loro mobilità elettroforetica in tampone alcalino ed è determinata da condizioni analitiche particolari di pH, salinità ecc



# Esami foretici

L'alta tensione successivamente applicata (alcuni kV, per circa 4 minuti) consente la separazione delle diverse frazioni proteiche, che vengono rilevate e quantificate, direttamente a una lunghezza d'onda specifica, all'estremità catodica dei capillari.



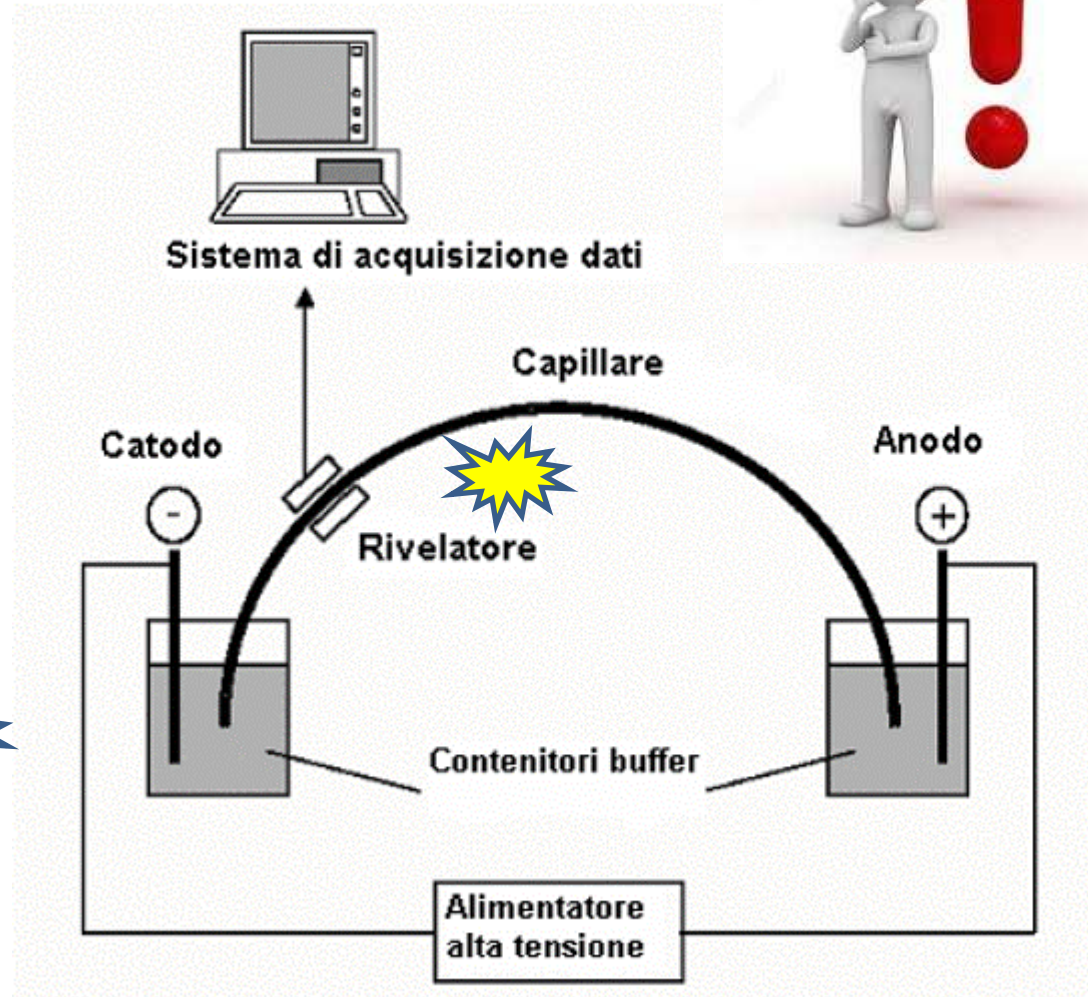
# Esami forensici

- Le componenti del campione si saranno allocate in **ZONE** (**elettroforesi capillare ZONALE, CZE**) a contenuto omogeneo, analogamente alle bande delle elettroforesi su substrati



# Esami forensici

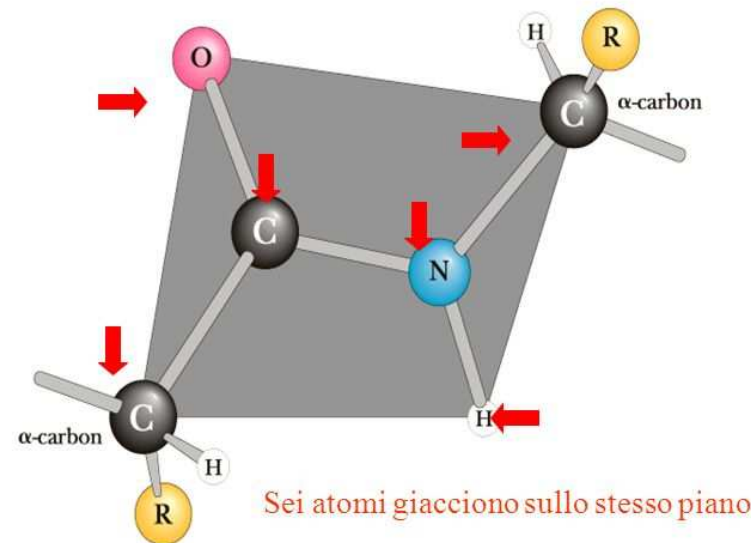
- Il sistema **rilevatore** esegue la sua lettura a 200 nm - zona dell'UV - (molte altre sostanze assorbono nell'UV.....)



# Esami forensici

Il determinante biochimico “letto” dal sistema rilevatore è il legame peptidico, di cui, ovviamente, le proteine sono ricchissime

Il legame peptidico è un sistema planare



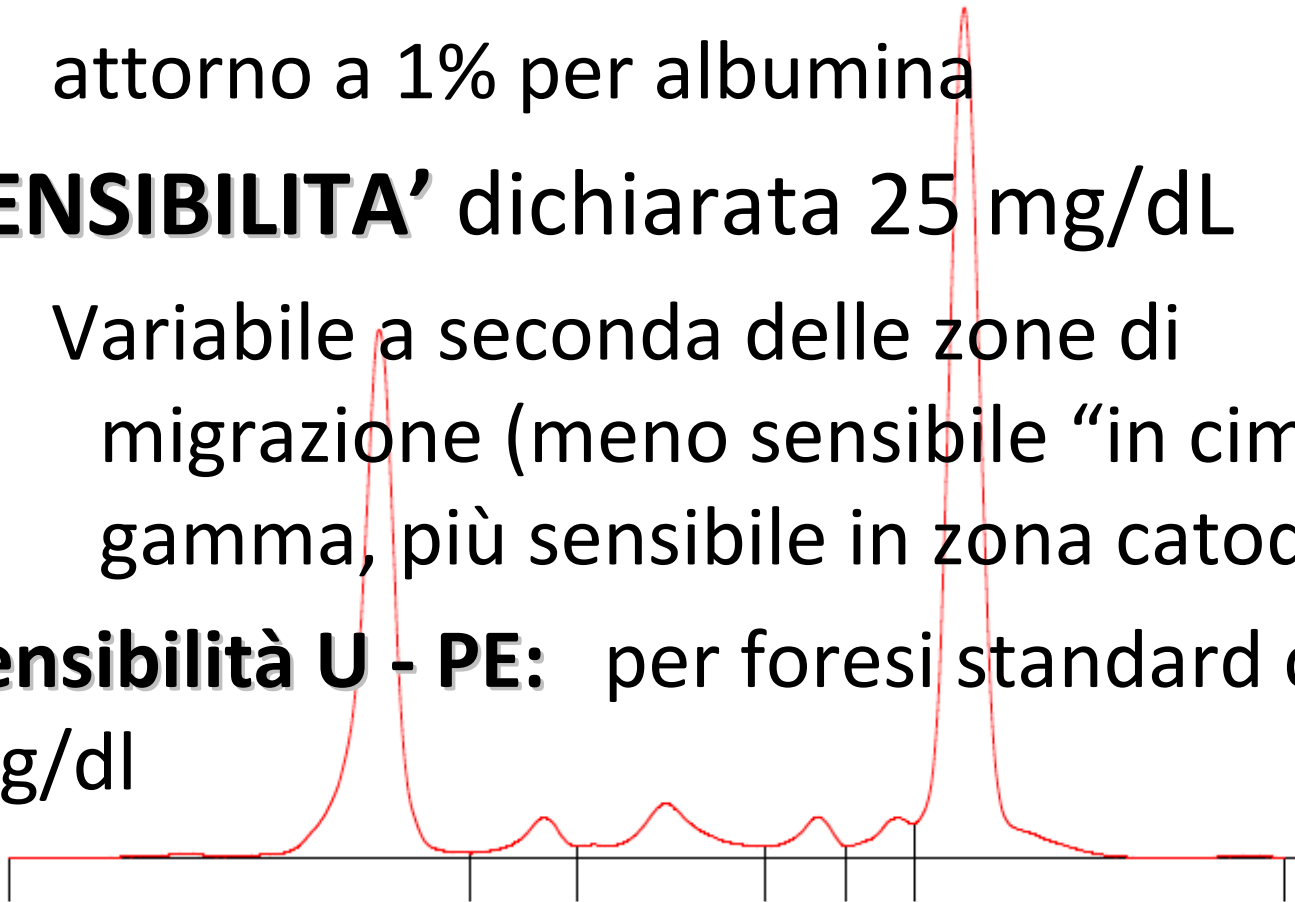
# Elettroforesi capillare

- ✓ Grande passo avanti rispetto al passato
  - ✓ Automazione (esecuzione, interpretazione...)
  - ✓ Rapidità
  - ✓ Separazione
- ✓ Output (>60 campioni/ora)
- ✓ Archiviazione
- ✓ Cost-effectiveness
- ✓ Non stravolgimento della tradizione



# FORESI prestazioni analitiche

- **CV%** attorno al 3% (per beta 1 e beta 2)  
attorno a 1% per albumina
- **SENSIBILITA'** dichiarata 25 mg/dL  
Variabile a seconda delle zone di migrazione (meno sensibile "in cima" alle gamma, più sensibile in zona catodica)
- **Sensibilità U - PE:** per foresi standard circa 2 mg/dl



## **IMMUNOTYPING** siero - urine

- **SENSIBILITA' IFE/s siero:** Circa 30 mg/dl, dipendendo molto da proteine comigranti
- **SENSIBILITA' IFE/s urine:** per urina bj 15 mg/dl circa

# Requisiti IMWG

- ✓ HRE : High Resolution Electrophoresis
  - 6 bande (duplicazione beta 1 – 2, zona di frequente allocazione IgA)
  
- ✓ IFE : Esame di caratterizzazione della CM
  - Tecnica IMMUNOTYPING per sottrazione (s-IFE), meno sensibile ma più specifica
  
- U IFE : Eseguito in due step su urine delle 24 ore ( standardizzazione ancora in progress )



# elettroforesi capillare

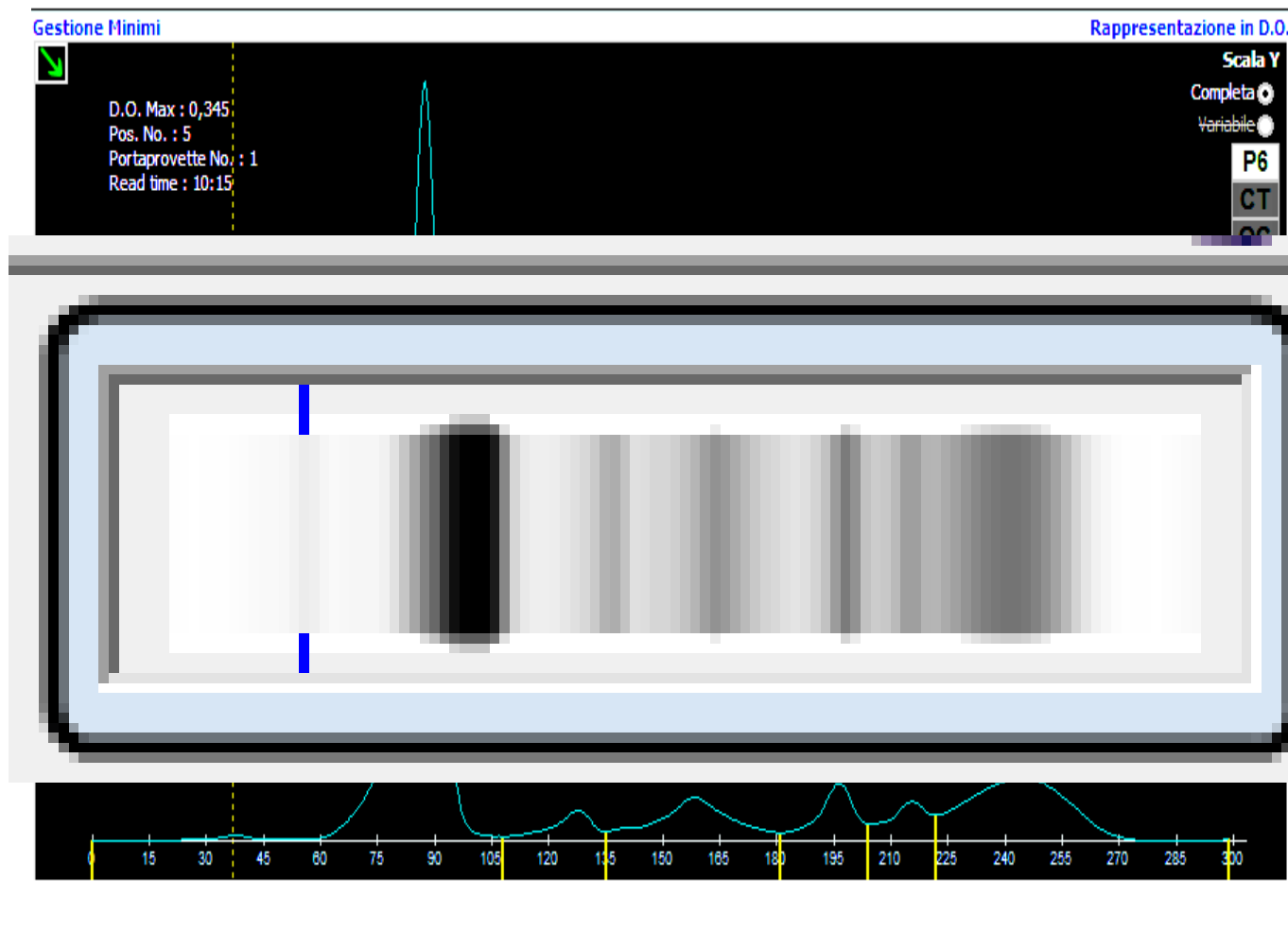
✓ Grande passo avanti rispetto al  
✓ Senza abbassamento della qualità  
passato

- ✓ Sensibilità
- ✓ Riproducibilità
- ✓ Correlazione con la clinica.....

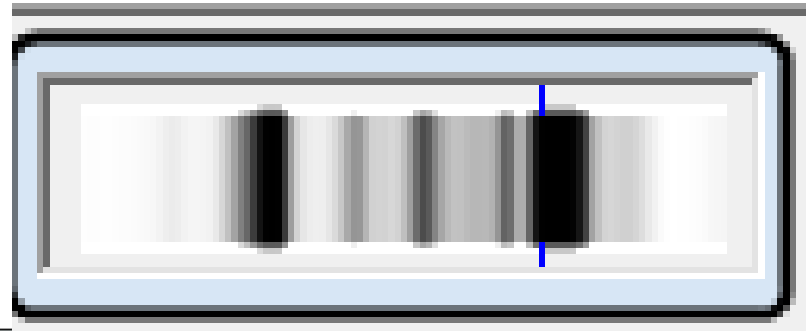
....che è la richiesta  
dei nostri colleghi  
clinici



# Quadri foretici: siero normale

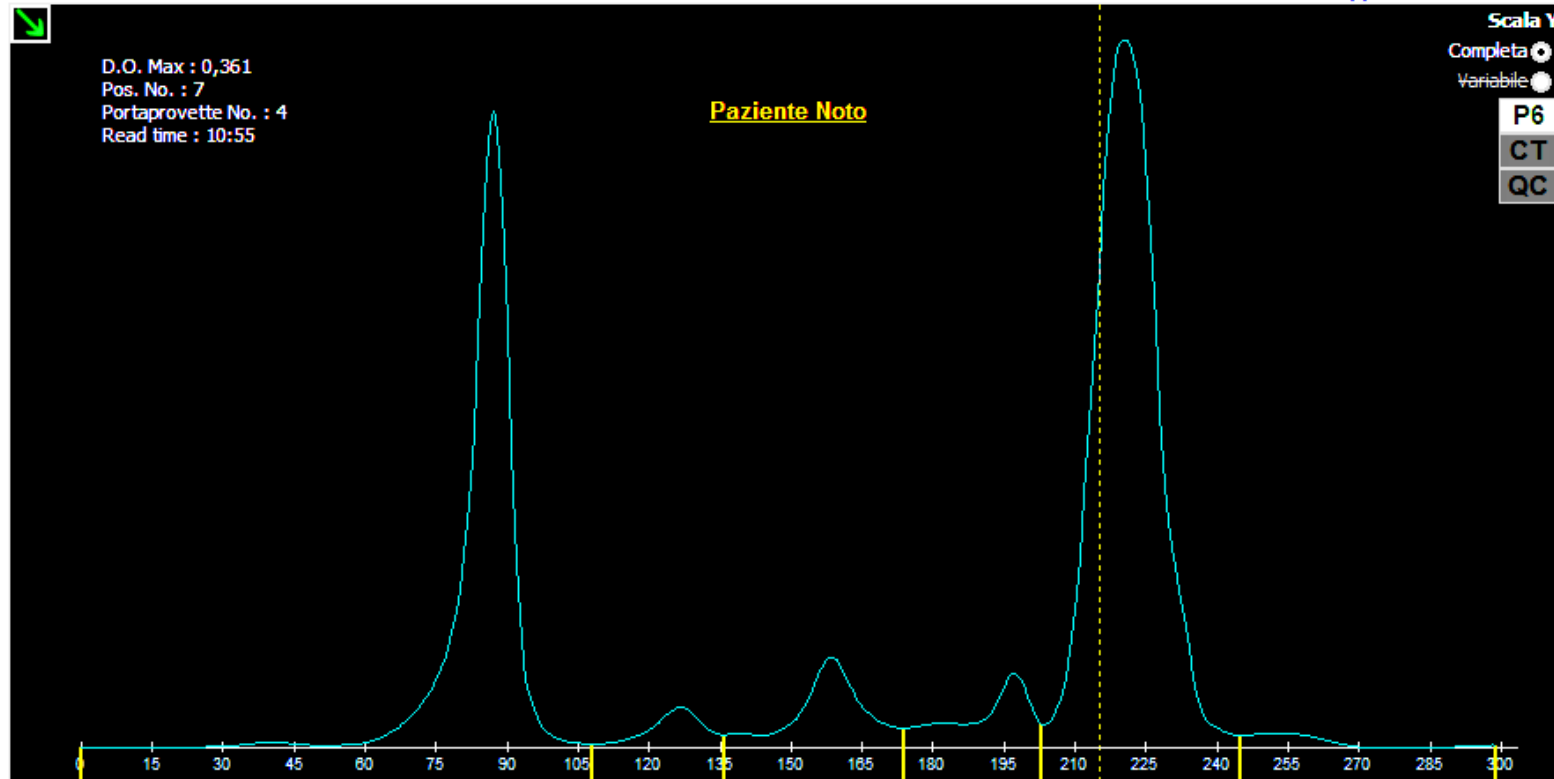


# Quadri forensici: siero (mieloma - beta)

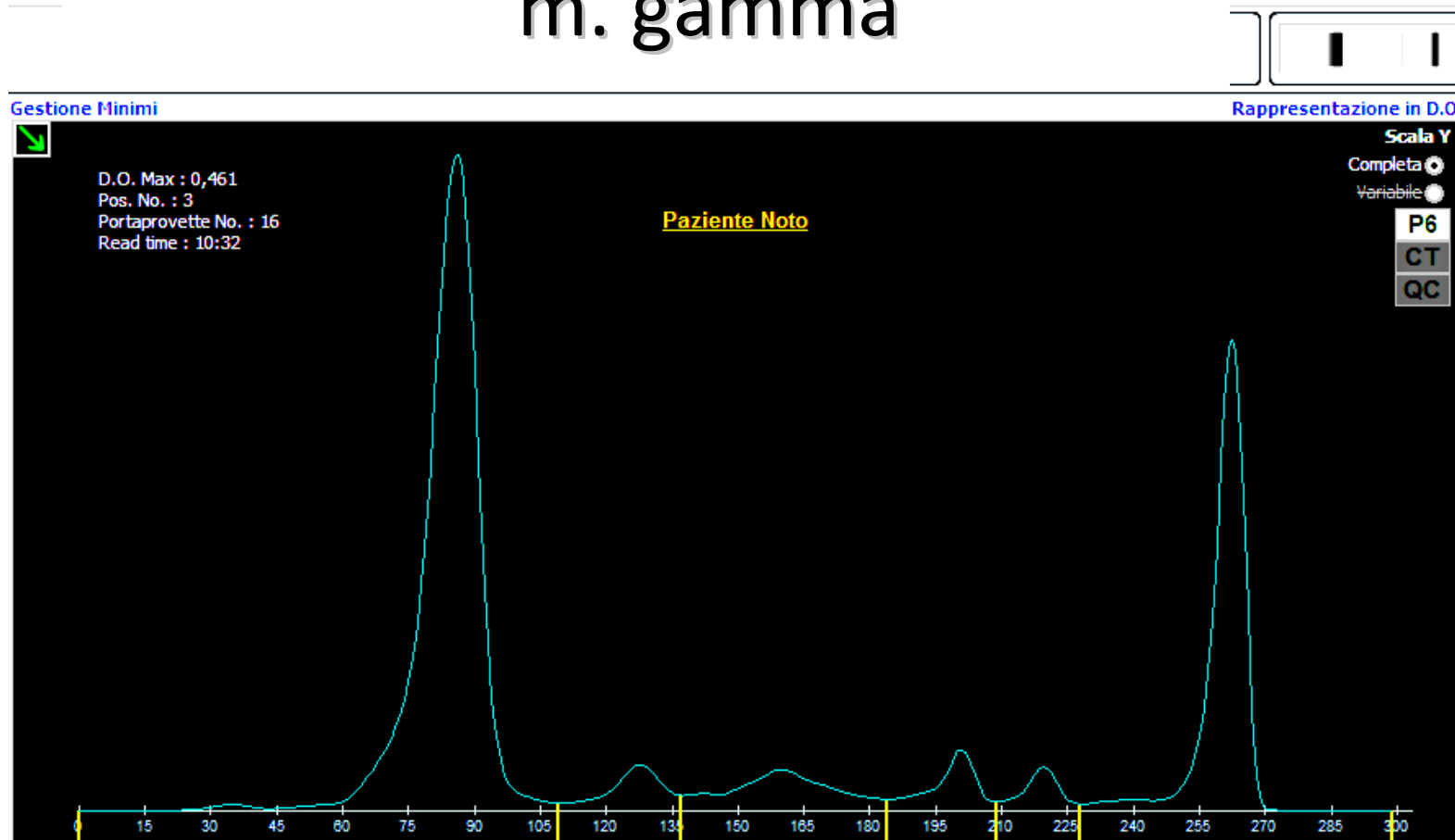


Gestione Minimi

Rappresentazione in D.O



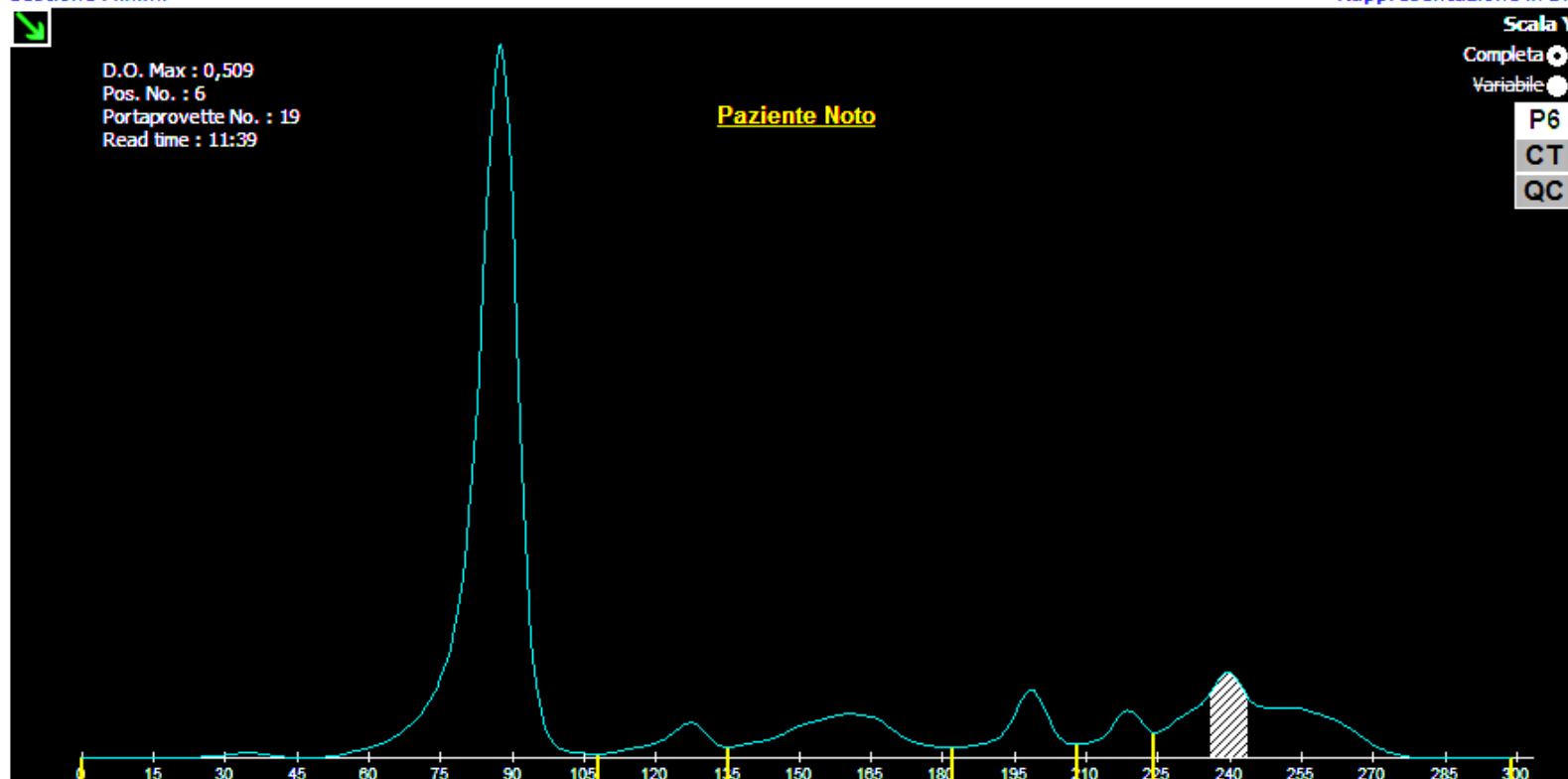
# Quadri foretici: siero c. m. gamma



# Quadri forensici: siero piccola c.m. gamma

Gestione Minimi

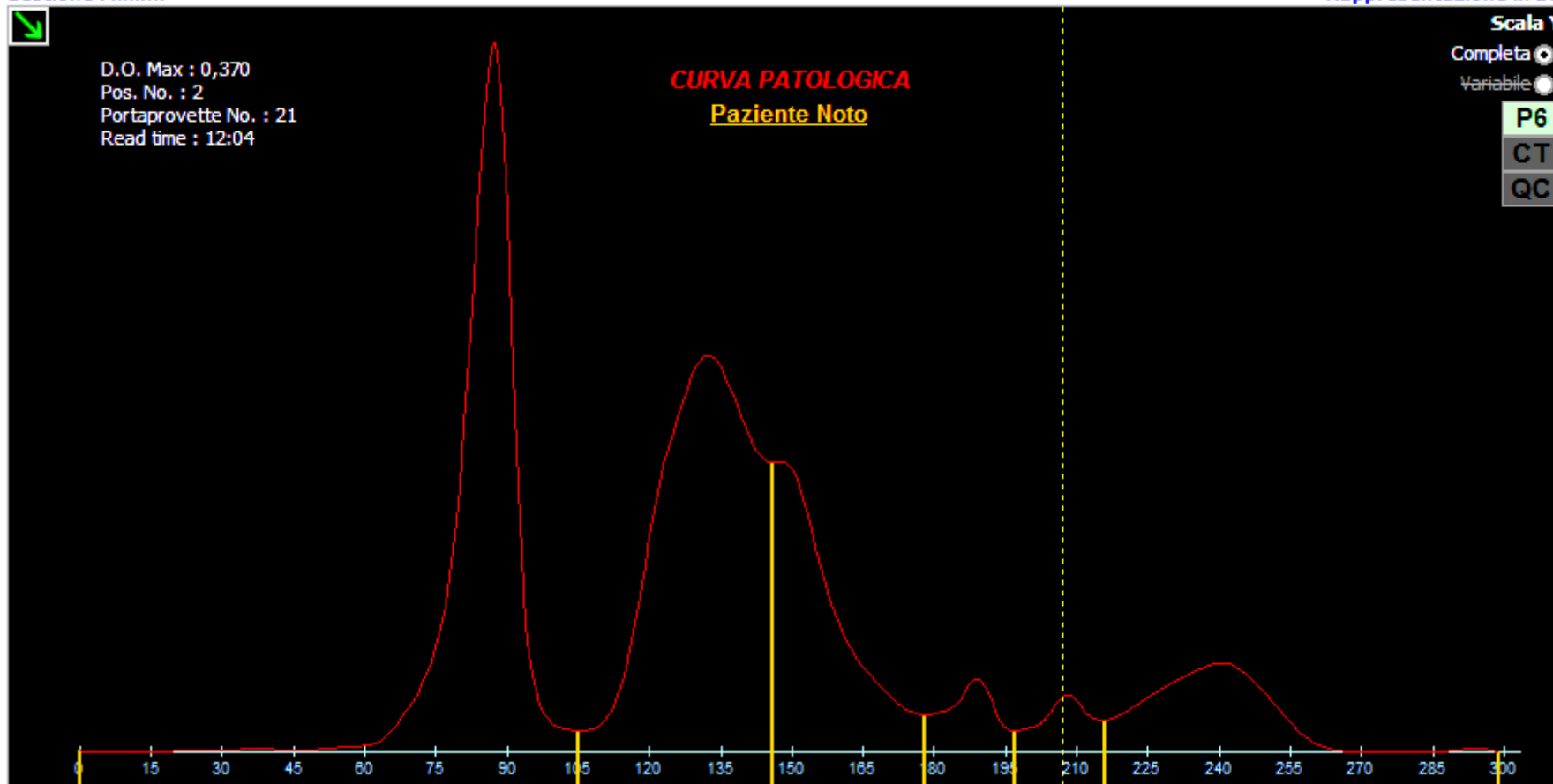
Rappresentazione in D.O.



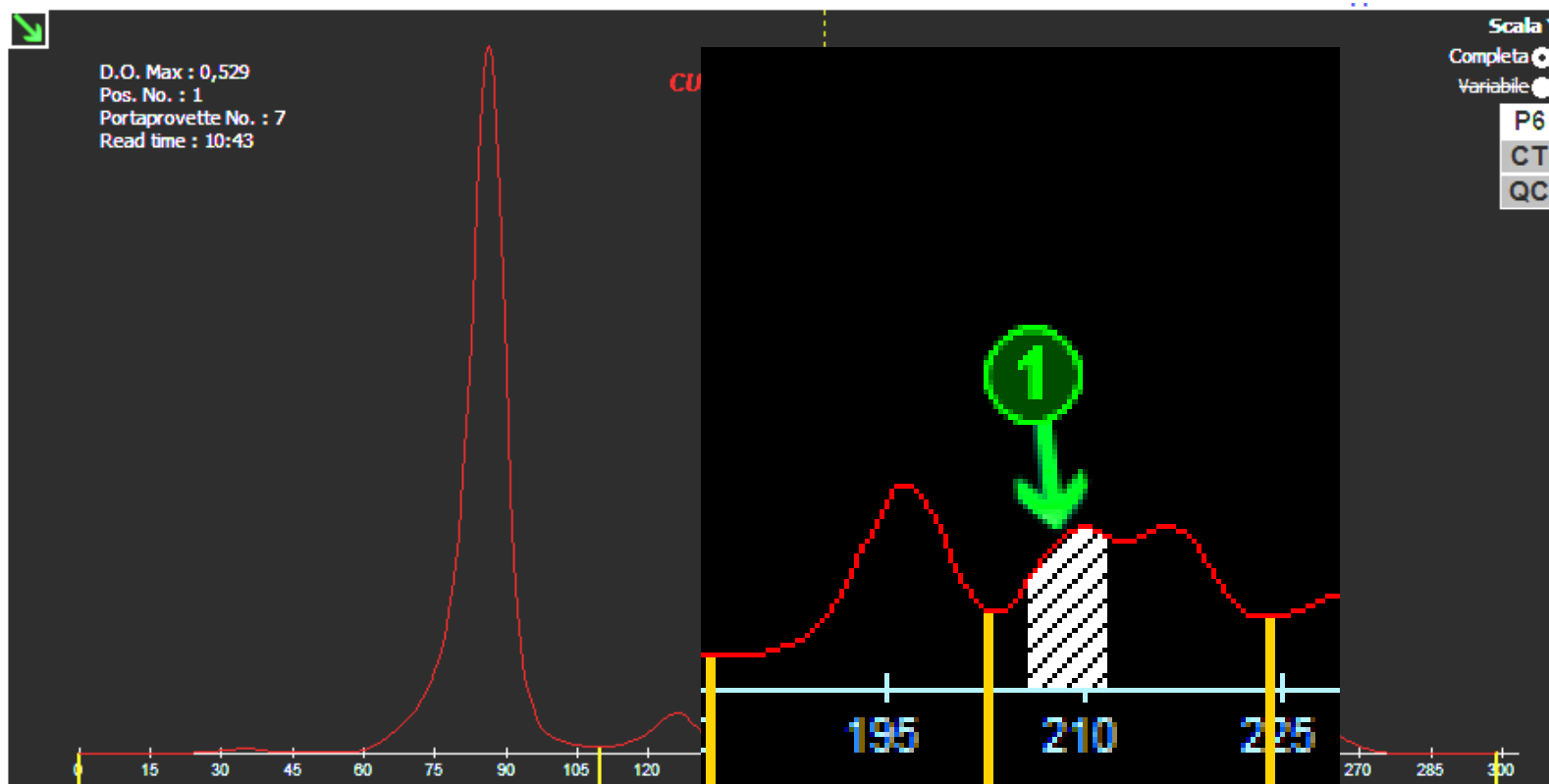
# Quadri forensici: siero c.m. alfa 1

Gestione Minimi

Rappresentazione in D.O.



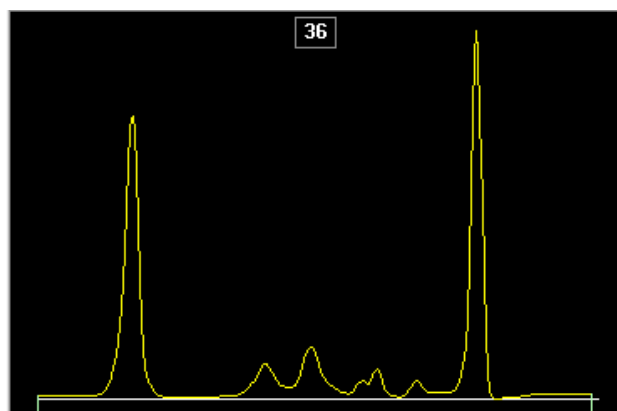
# Quadri forensici: siero piccolissima beta 2



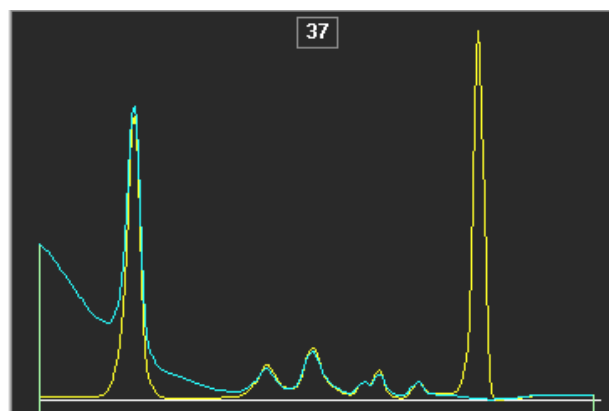
# IMMUNOFISSAZIONE ELETTROFORETICA per sottrazione (IFE/s)

- Utilizzo della stessa piattaforma automatizzata
- Utilizza antisieri (coniugati con una particella di “appesantimento”, submicroscopica) contro una singola catena o pesante o leggera
- Le corse con la “decapitazione del picco” (sottrazione di catena pesante e rispettiva catena leggera), forniranno la diagnosi  
l'isotipo di Immunoglobulina

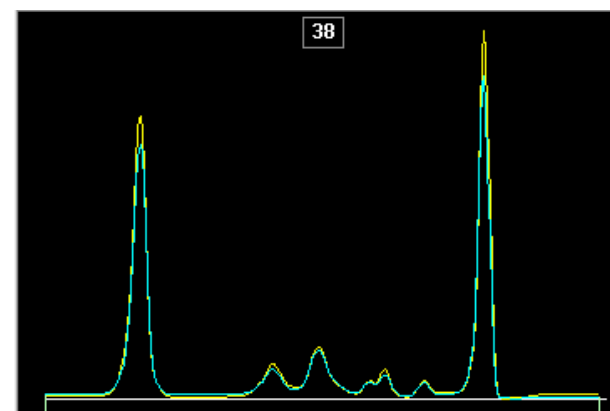
# IMMUNOFISSAZIONE ELETTROFORETICA (IFE/s)



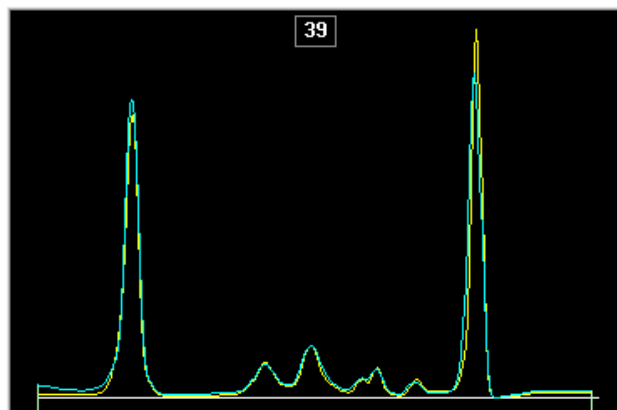
ELP ▾



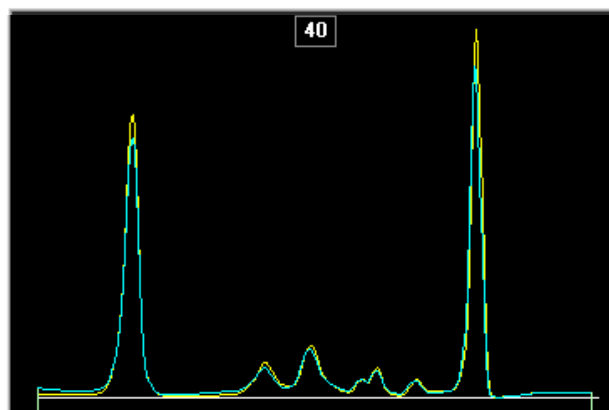
IgG ▾



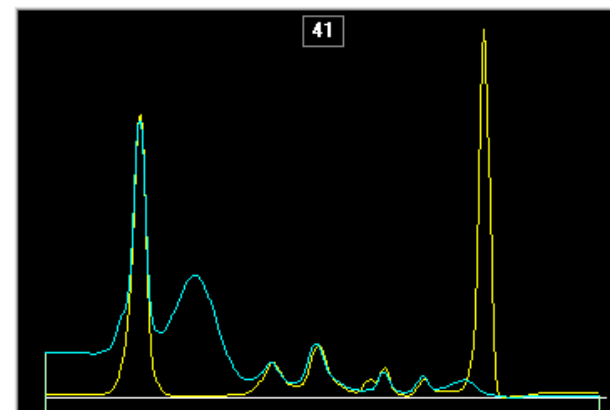
IgA ▾



IgM ▾

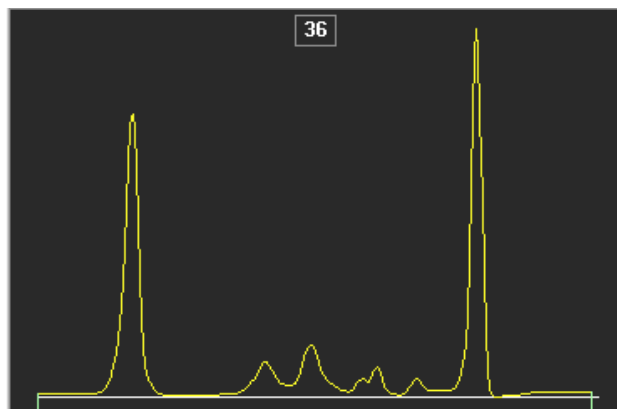


K ▾

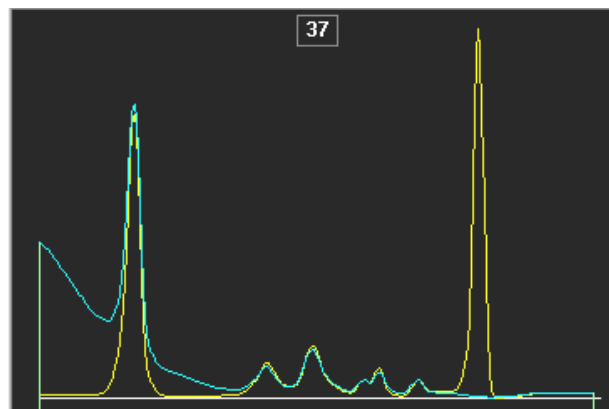


L ▾

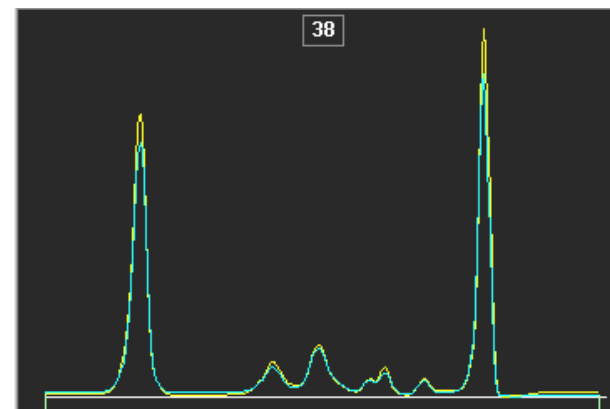
# IMMUNOFISSAZIONE ELETTROFORETICA (IFE)



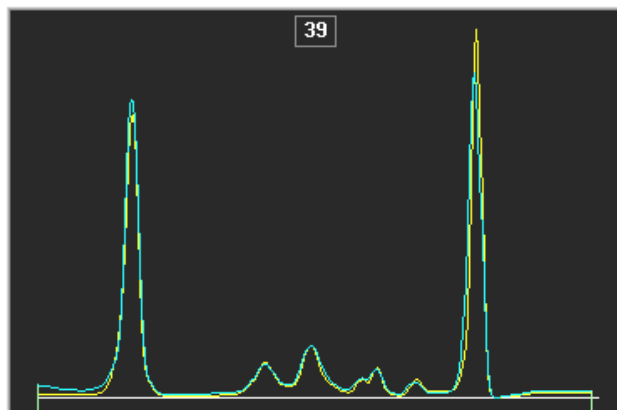
ELP



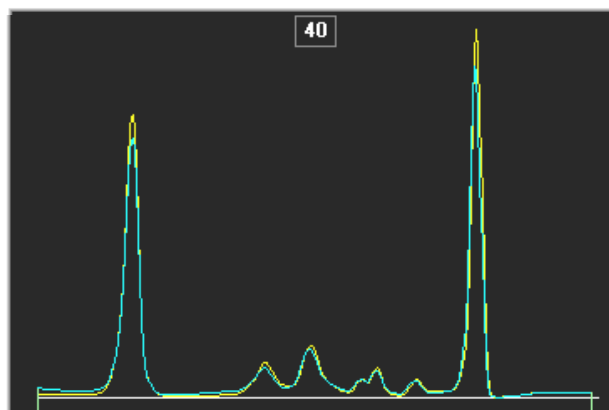
IgG



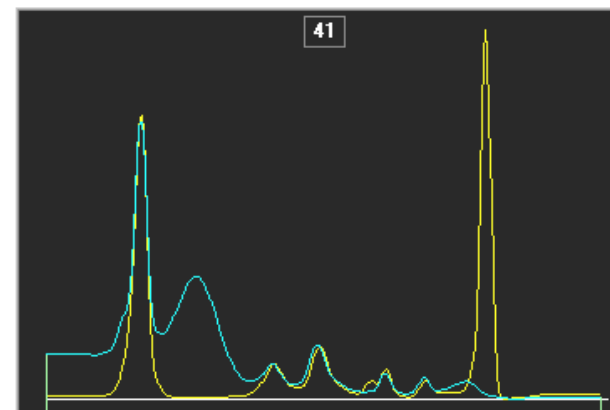
IgA



IgM



K



L

# QUINDI.....

- **FILOSOFIA** del principio analitico
- **TECNOLOGIA** ed **AUTOMAZIONE** del processo analitico
- **PRESTAZIONI** analitiche
- **Fin qui tutto ok, e ad un ottimo livello.**
- **Basterà un HOMO CLICCANS?!?!**



**ASSOLUTAMENTE NO!!**

# CAUSE PIU' FREQUENTI DI INTERFERENZE EXTRA ANALITICHE

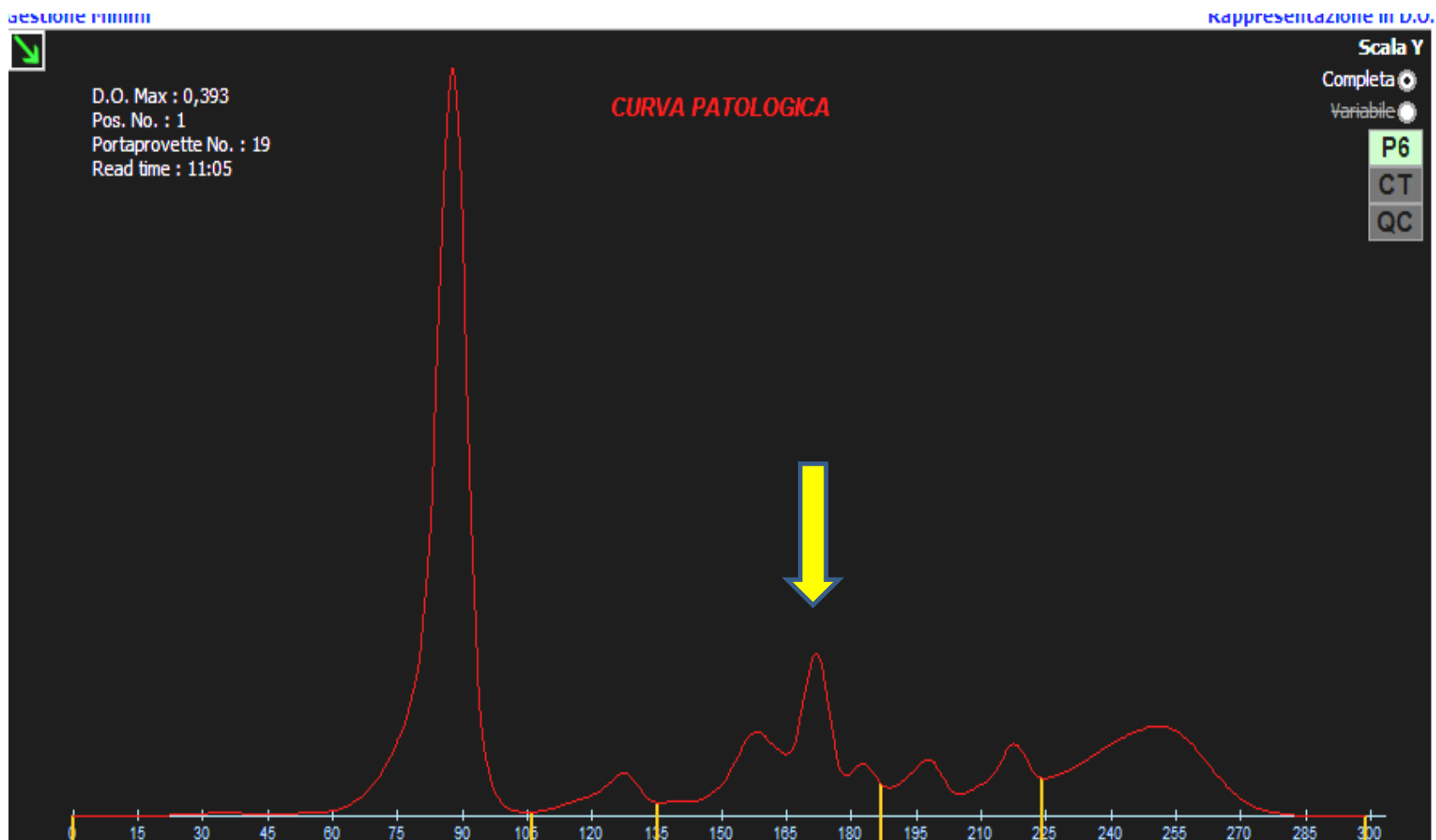


# INTERFERENZE EXTRA ANALITICHE

- Ineliminabili ma prevedibili:
  - Somministrazione di mezzo di contrasto
  - Antibiotici
  - Anticoagulanti
  - ....
  - Farmaci biologici (alba di una nuova generazione di trattamenti) composti da frammenti Fab di IgG ....fino al punto da mimare una presenza residua di c.m.

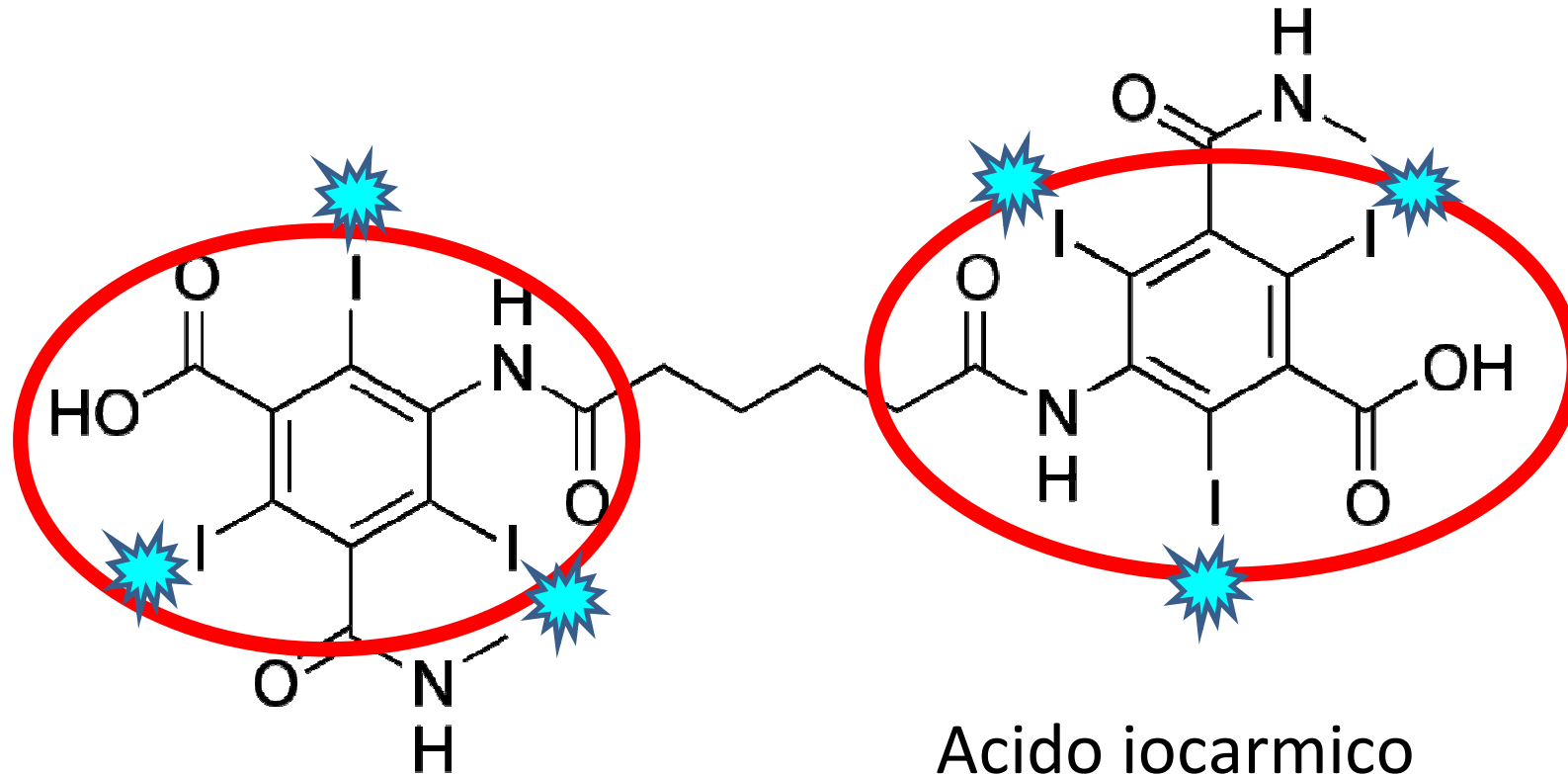
# INTERFERENZE EXTRA ANALITICHE

## mezzo di contrasto



# INTERFERENZE EXTRA ANALITICHE

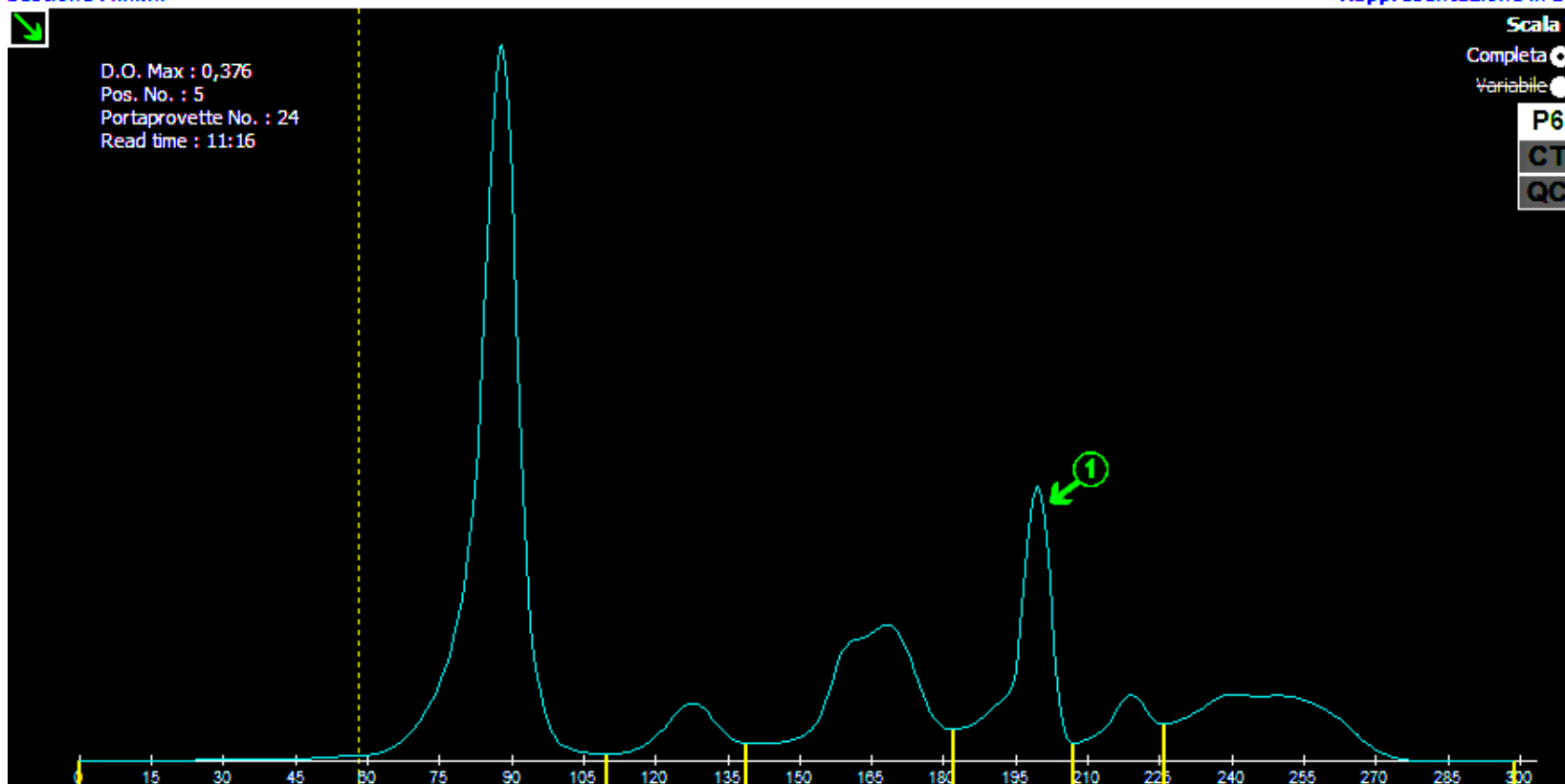
## mezzo di contrasto



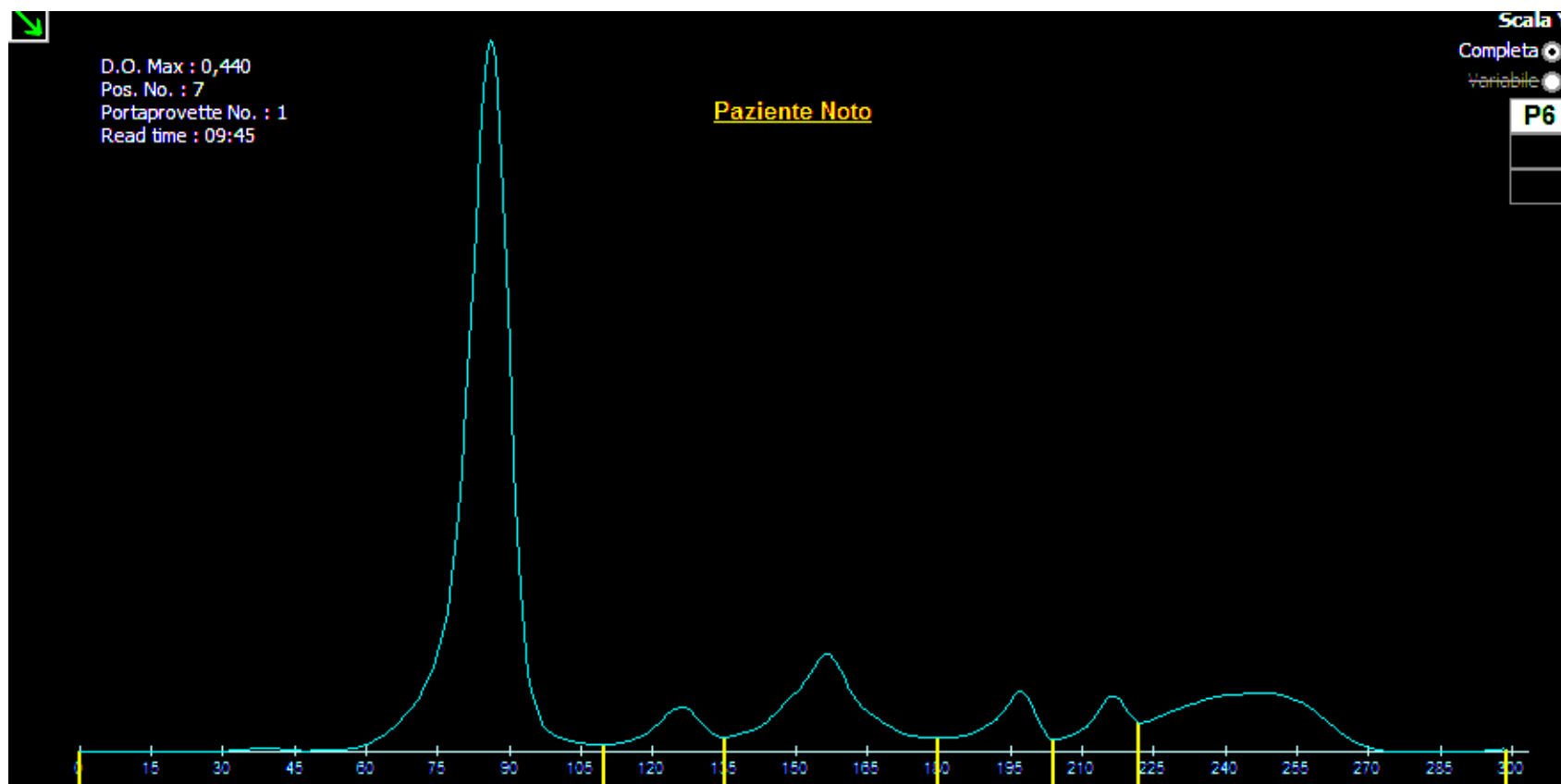
# INTERFERENZE EXTRA ANALITICHE antibiotici 1

Gestione Minimi

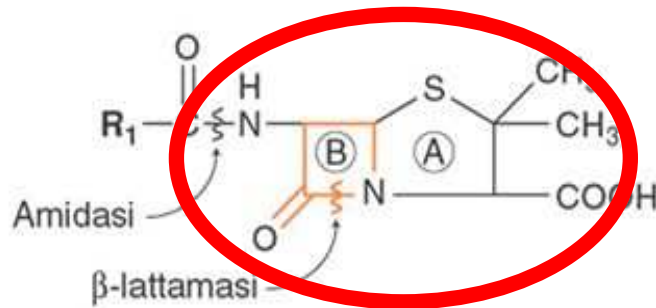
Rappresentazione in D.O.



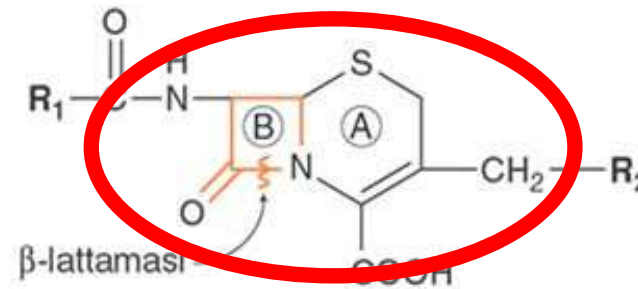
# INTERFERENZE EXTRA ANALITICHE antibiotici 2



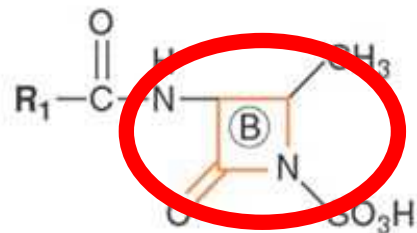
# INTERFERENZE EXTRA ANALITICHE antibiotici 2



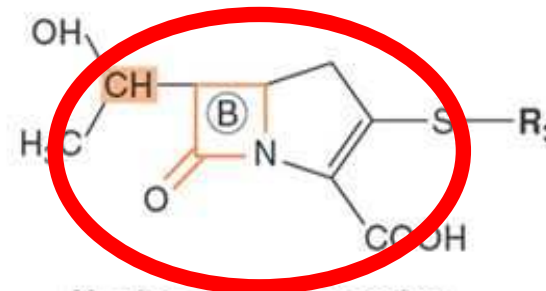
Nucleo delle penicilline



Nucleo delle cefalosporine

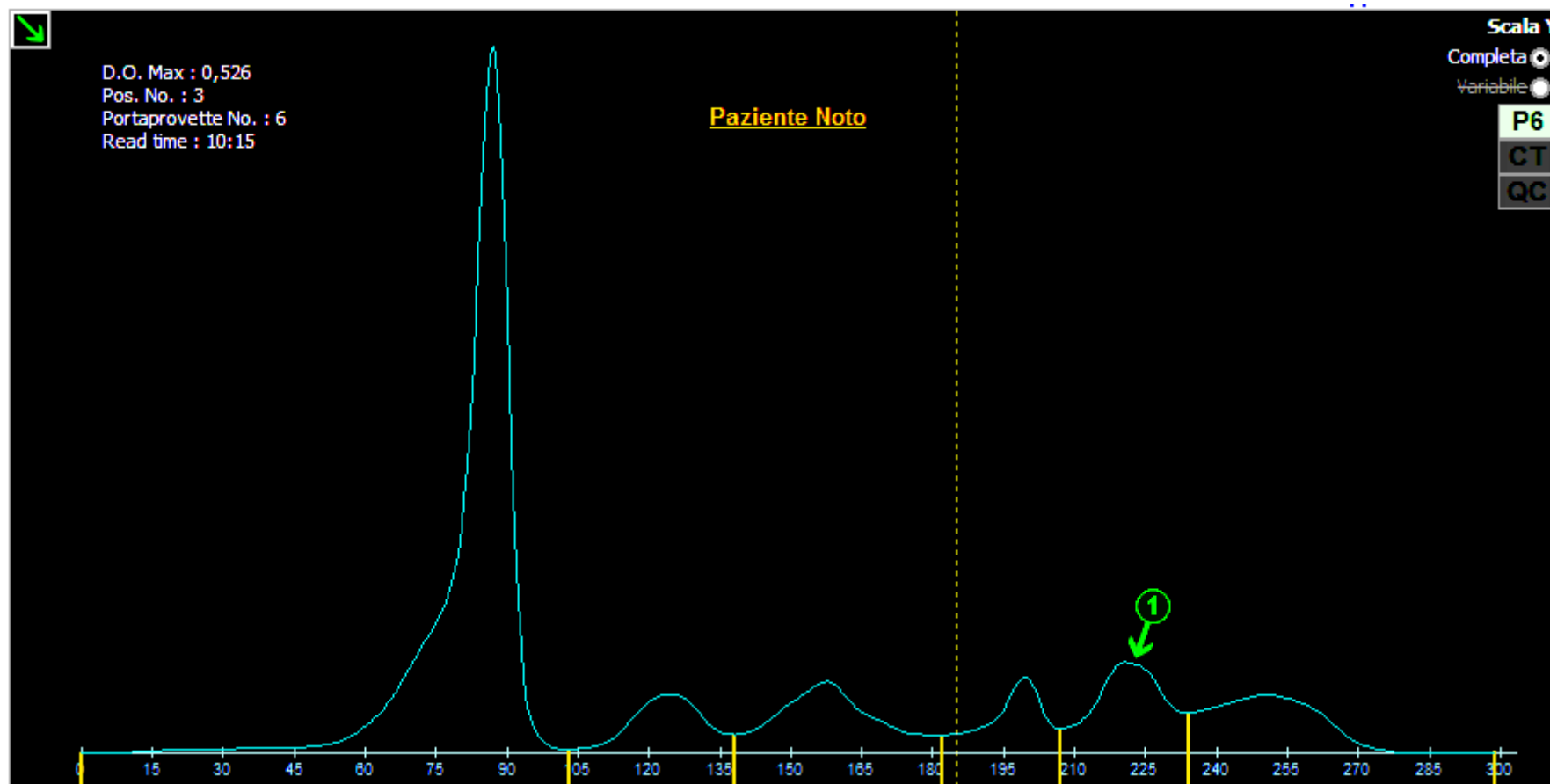


Nucleo monobattamico  
(resistente alle  $\beta$ -lattamasi)

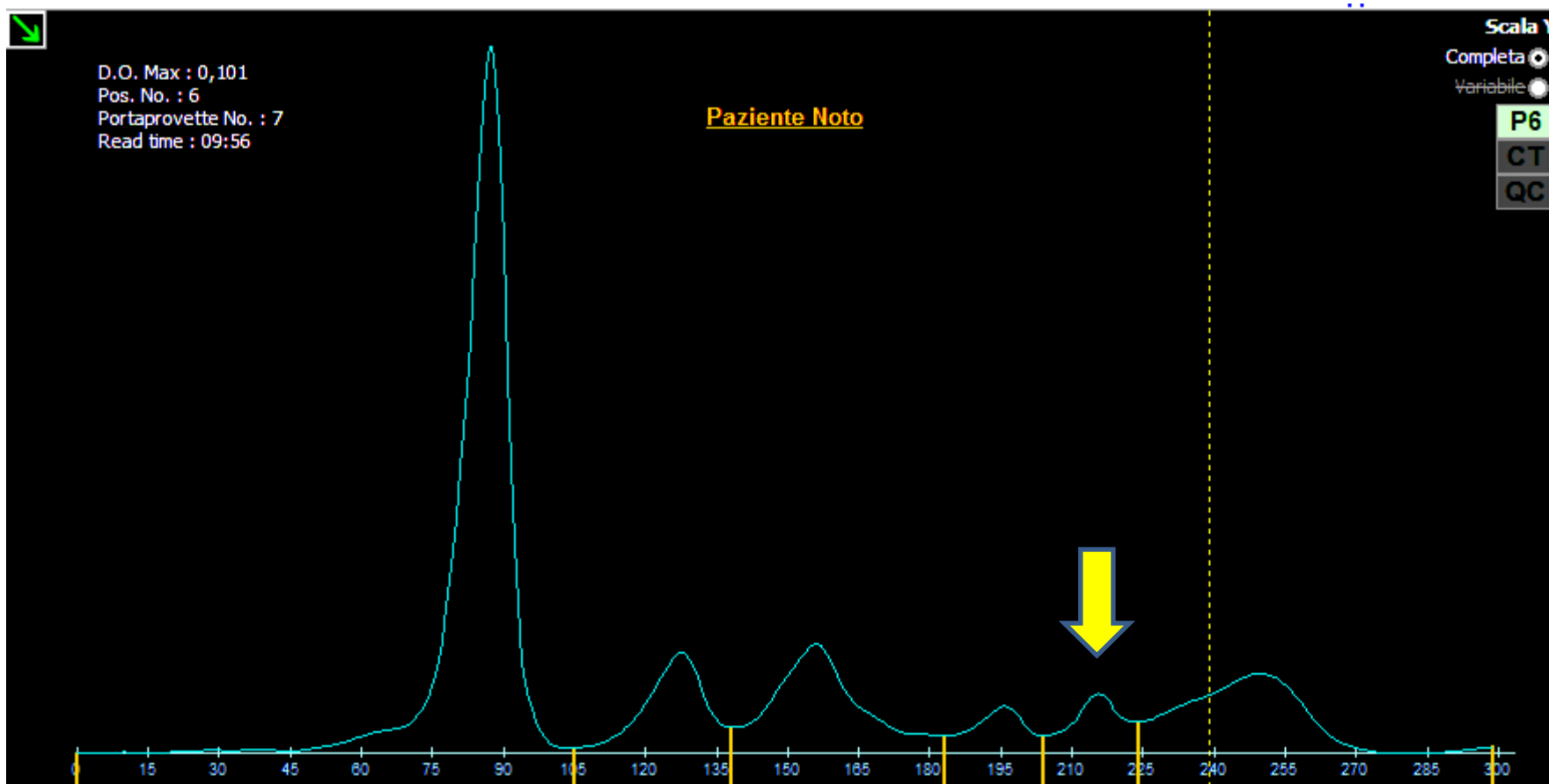


Nucleo carbapenemico  
(alta resistenza alle  $\beta$ -lattamasi)

# INTERFERENZE EXTRA ANALITICHE anticoagulanti (1)



# INTERFERENZE EXTRA ANALITICHE anticoagulanti (2)



## 2. ESAMI IMMUNOLOGICI - BIOCHIMICI

- **Catene leggere libere FREE LIGHT CHAINS misurate nefelometricamente sia su siero che urine:**
  - Il siero è il materiale primario preferito
    - Scarsa compliance nella raccolta 24 ore (pazienti fragili anziani e affetti da co morbidità, raccolta incompleta )
    - Non elevatissima sensibilità su urine
    - .....ma soprattutto il rene non si comporta sempre passivamente come un setaccio inerte, ma può riassorbire e catabolizzare le FLC;
    - i due test non sono intercambiabili

# ESAMI IMMUNOLOGICI - BIOCHIMICI

- **Corollario (compromissione generale) - stadiazione**
- Dosaggi turbidimetrici Immunoglobuline, catene leggere (**TOTALI**) e Beta 2 microglobulina
- (Emocromo)
- Valutazione della funzionalità renale
- Calcemia
- Albumina
- Altro....

# Dalla MGUS alla Plasma Cell Disease: ruolo delle FLC

- La fiammata di entusiasmo, che segue ogni volta che si introduce un test “rivoluzionario”, per di più con issues di **raccomandazioni internazionali** (IMWG guidelines for s-FLC in myeloma and related disorders, 2009), ha lasciato molto freddo il laboratorio: la posizione nazionale ed internazionale dei patologi clinici è **MOLTO PIU' CAUTA**

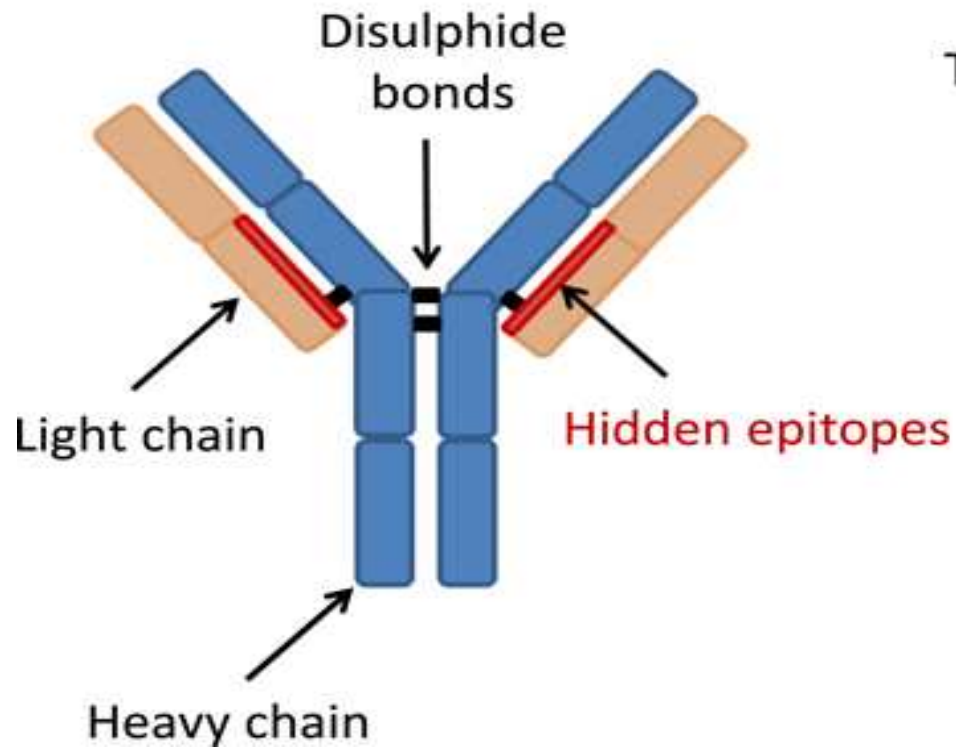
# PCD & FLC



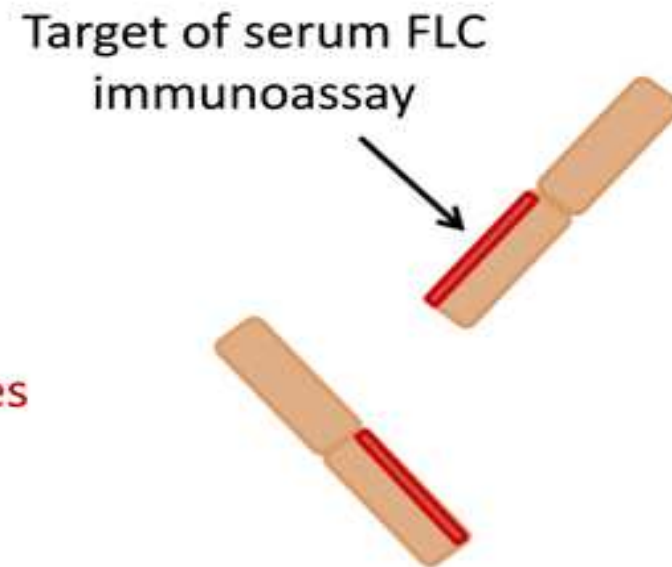
- I “concerns ” sono diversi:
  1. Per quasi un decennio è esistita sul mercato **una sola linea** produttiva monopolistica di anticorpo anti FLC, distribuita e commercializzata sotto diverse vesti, ma unica nella sua biotecnologia
  2. La base sperimentale poggiava sul fatto che i nuovi anticorpi riconoscevano **ESCLUSIVAMENTE** epitopi di catene leggere che venivano esposti **ESCLUSIVAMENTE** in caso di “non-legame” alla catena pesante dell’immunoglobulina

# PCD & FLC

**Immunoglobulin**



**Free light chains**



## PCD & FLC



3. Scarsa ottimizzazione dei singoli test, spesso piattaforma analitica - dipendenti
4. Assenza di uno standard internazionale
5. Mancanza di esportabilità di referto
6. Scarsa conoscenza dell'analita (p.es la sua variabilità biologica nell'adulto sano, la non perfetta quantificazione nel paziente trattato... )  
cui consegue l'impossibilità di stabilire quella **differenza critica** che depone per efficacia (o meno) del trattamento

## PCD & FLC



7. Sensibilità e specificità del test molto vicine al cut – off
8. Non radicale soluzione di nessuno di questi problemi con l'ingresso sul mercato nel 2011 di un test a Poly – Ab (il precedente era Mo – Ab)
9. Non equivalente riconoscimento di forme monomeriche, e polimeriche fra un test e l'altro

# PCD & FLC



10. L'estrema polimerizzazione (specialmente frequente per le  $\lambda$ ) scarsamente riconosciuta con sovrastima fino a 10 volte.
11. Effetti gancio (falsi negativi in eccesso di antigene) non esclusi a priori.....
12. Diluizioni (specialmente delle  $\kappa$ ) non perfettamente lineari

.....

# Riassumendo



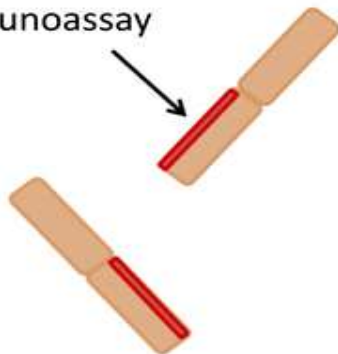
# PCD & FLC

## – Cautela.



- Tutte le indagini immunologiche si basano sul l'assioma del perfetto riconoscimento Ag-Ab e sull'assenza di qualsiasi interferenza nella reazione;
- Ma entrambi, creati in biotechnology lab, sono in grado di riconoscere davvero tutte le FLC ( $10^9 - 10^{10}$  diverse sequenze Fab)?

target of serum FLC  
immunoassay



# PCD & FLC

## – Cautela.



- Nessuno dei test odierni può essere ritenuto superiore agli altri;
- Nessuno è sovrapponibile agli altri, se non paradossalmente, per valori prossimi ai fisiologici;
- Non riescono evidentemente a separare le FLC patologiche dalle normali;
- .....

# PCD & FLC **CONS**



I test per FLC richiederebbero adeguata

**precisione,  
accuratezza,  
specificità e  
riproducibilità**

che oggettivamente allo stato dell'arte, pur migliorando di giorno in giorno, non risultano raggiunti

# PCD & FLC PROS

## NONOSTANTE CIO'



il dosaggio delle flc sul campo ha dato  
indubitabilmente risultati pregevoli, per

- screening,**
- stratificazione del rischio di progressione,**
- monitoraggio,**
- valutazione della risposta al trattamento**

# PCD & FLC



**L'impegno del laboratorio,  
scaturito da questa revisione  
critica multidisciplinare dei  
propri percorsi analitici, sarà  
quindi indirizzato nel  
mettere il test a disposizione  
dei clinici nel più breve  
tempo possibile.**



# PCD & FLC



**L'impegno dello specialista, di  
contro, dovrà essere quello di  
valutare ogni dato  
laboratoristico con rinnovata e  
consapevole attenzione critica  
e con il più stretto legame alla  
clinica, memore dei pros e dei  
cons esposti**



# OGGI a Ferrara

- Solo FLC urinarie con elettroforesi di screening per valutazione di eventuali bande patologiche e successiva immunotipizzazione.
- Refertazione delle sole componenti a catene leggere libere monoclonali
- Campione necessario: ovviamente urina 24 h

# FREE LIGHT CHAINS

- 1847: Henry Bence Jones scrive su un evento già documentato un anno prima da J.F. Heller, che documentò le proprietà fisiche di questa proteina, mettendola in relazione alla “mollities ossium” tipica dei casi gravi di mieloma.



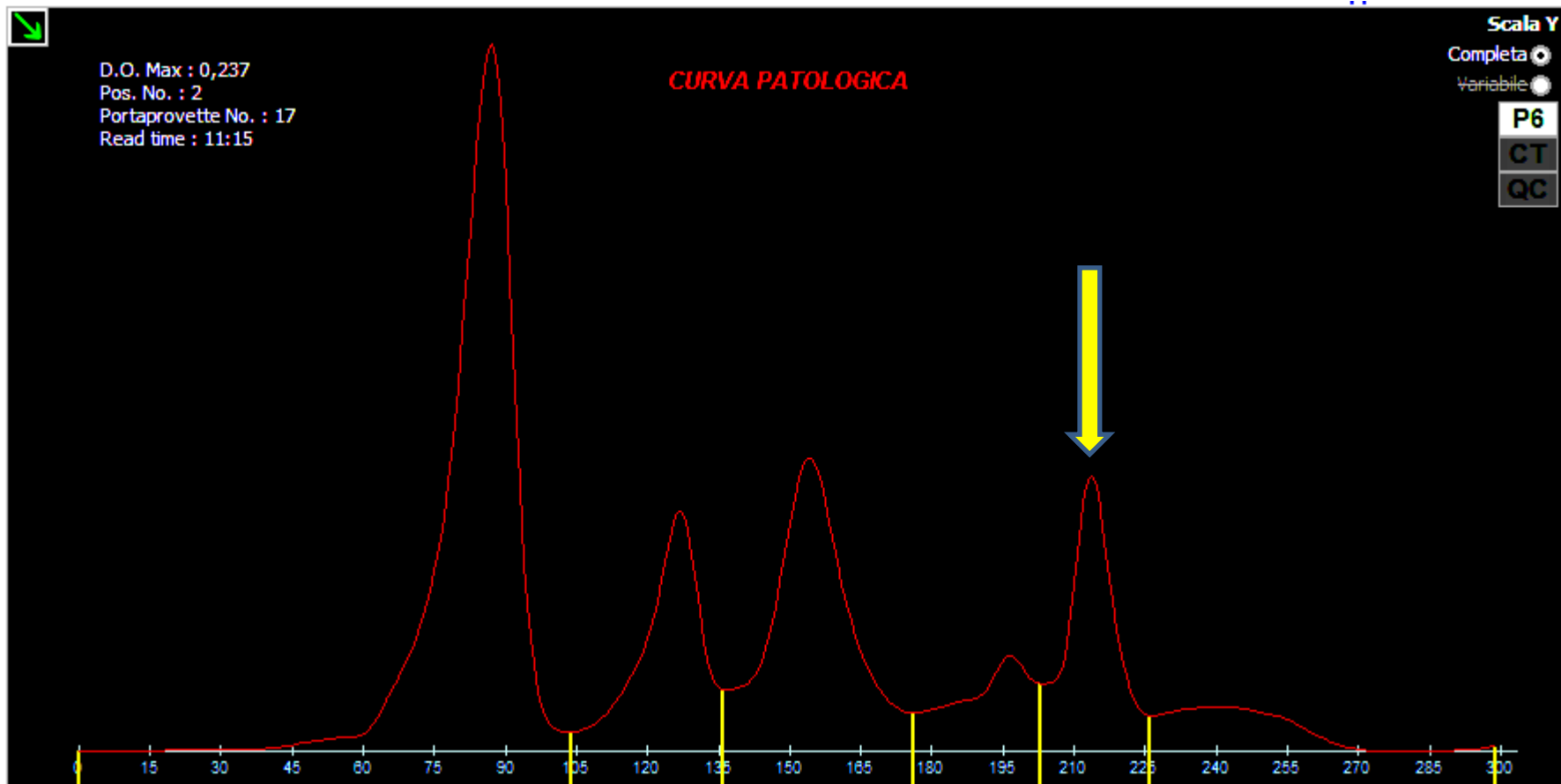
# FREE LIGHT CHAINS

- Ma fino al 1956 non si riuscì a intuire la relazione tra la proteina di Bence – Jones (urinaria) e le proteine del mieloma (siero).



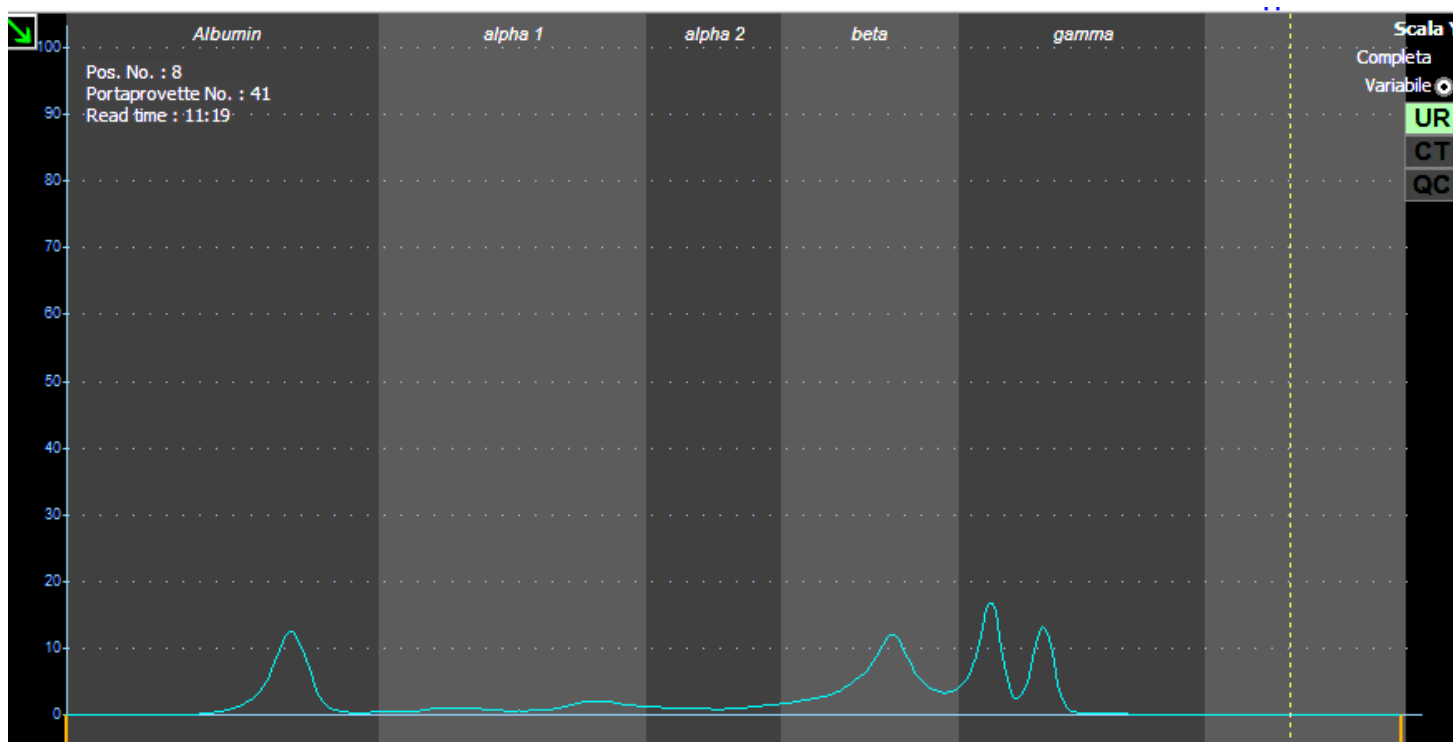
- Solo nel 1956, Korngold e Lipari (**K** e **λ**) scoprirono che la catena leggera della Immunoglobulina patologica del siero e quella emessa nelle urine erano identiche.

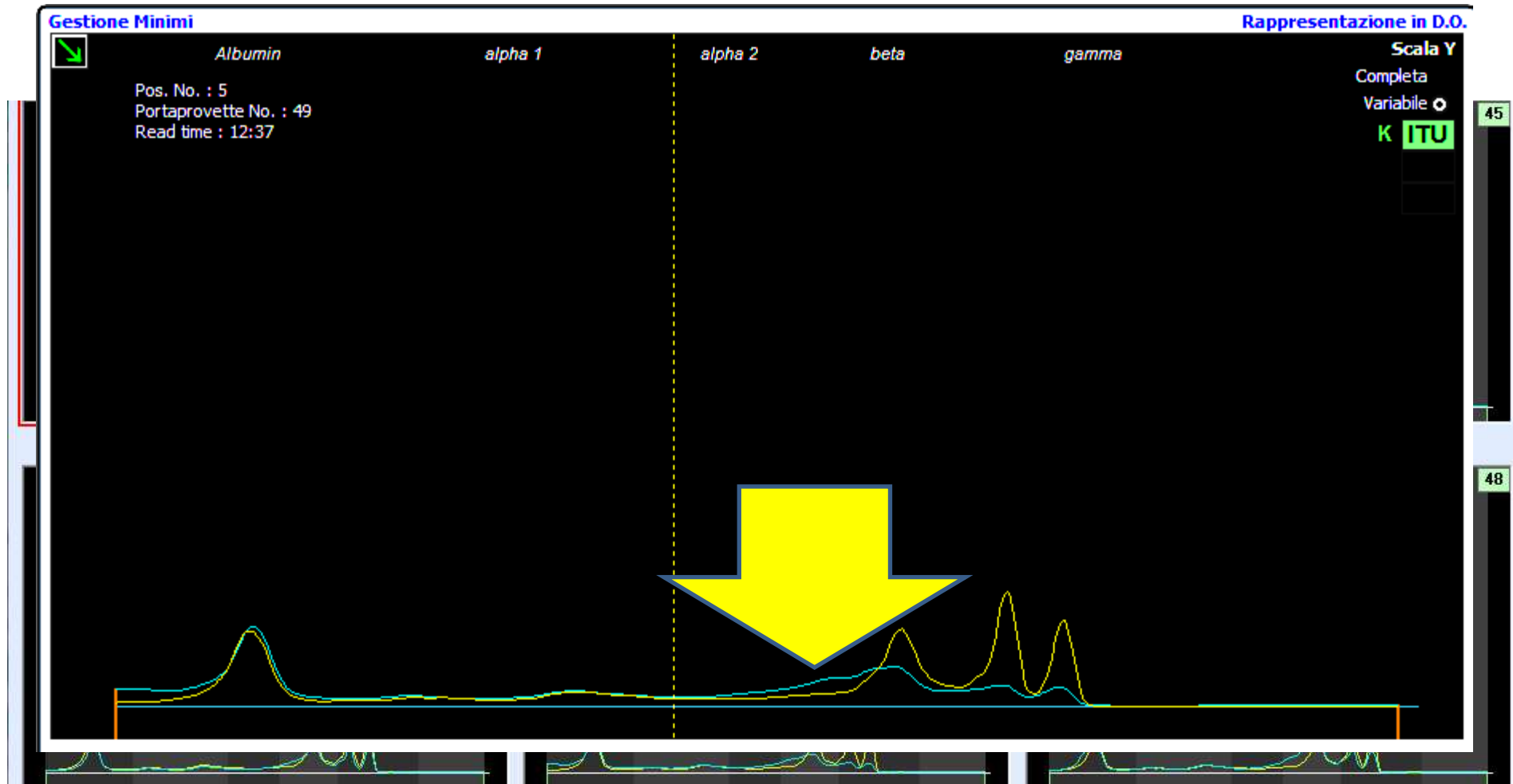
# Mieloma a catene libere lambda



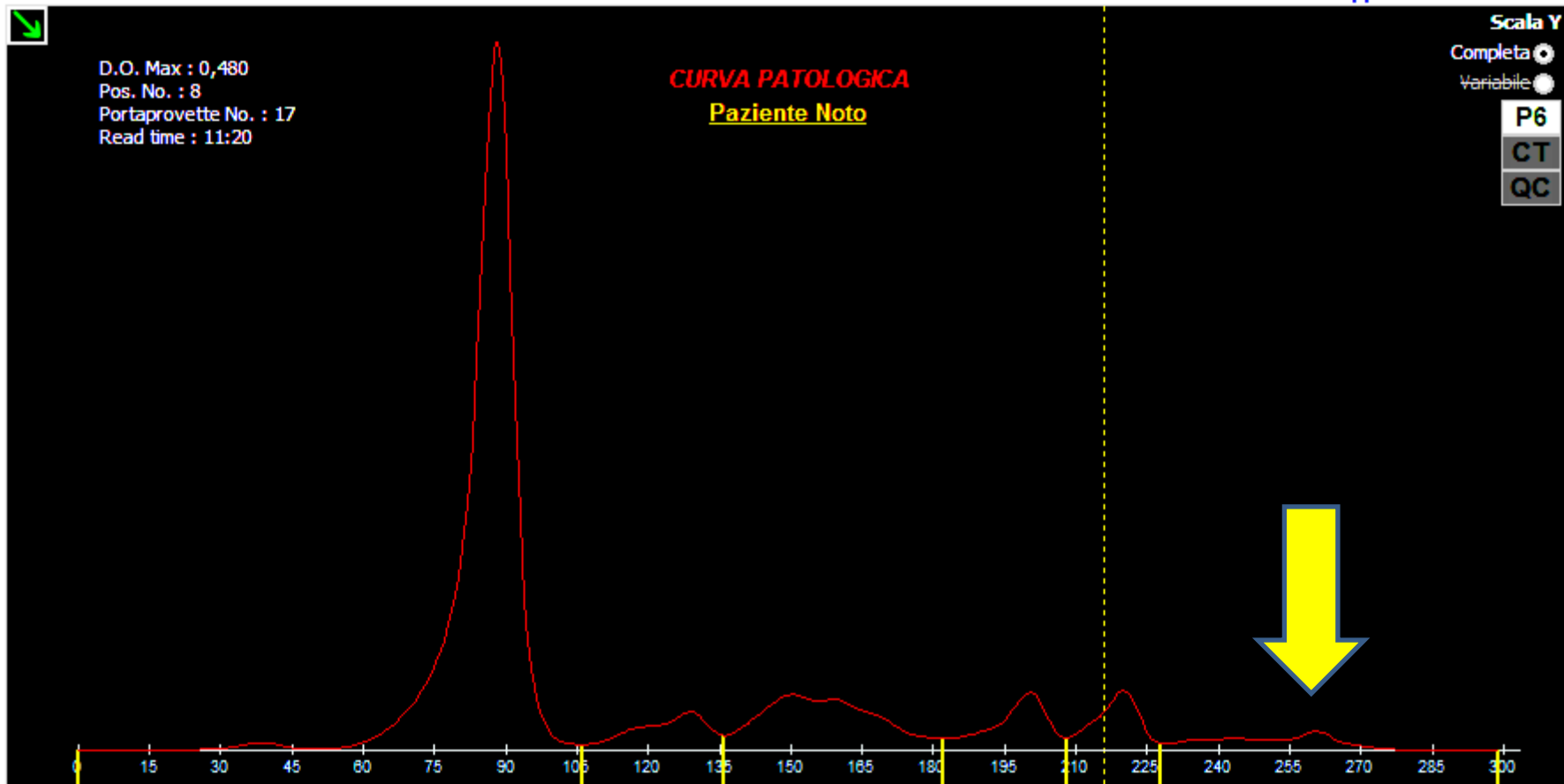
# Quadri foretici: urine

## fenomeno del "ladders"





# Dissociazione siero urine



# Dissociazione siero urine



# Cenni di appropriatezza prescrittiva - elettroforesi

- Fino alla fine degli anni '90, presente ancora in molte prescrizioni (profilo C)
- Primo e secondo decennio del 2000: interventi della Regione per limitare inapproprietezze prescrittive
- Ancora oggi governata in maniera abbastanza labile

# Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance (MGUS) and Smoldering (Asymptomatic) Multiple Myeloma: IMWG Consensus Perspectives Risk Factors for Progression and Guidelines for Monitoring and Management

R.A. Kyle et al  
International Myeloma Working Group

*Leukemia.* 2010 Jun;24(6):1121-7



# Inappropriatezza della richiesta per elettroforesi

La si richiede  
ordinariamente  
per:

- Valutazione stato trofico –  
nutrizionale
- Valutazione indici  
infiammatori
- Valutazione epatopatie –  
nefropatie
- Valutazione assetto lipidico
- .....

# Inappropriatezza della richiesta per elettroforesi (Kyle, 1999)

E' utile  
indispensabile  
(**APPROPRIATA**)

**solo** per:

- Diagnosi, caratterizzazione e monitoraggio delle componenti monoclonali

# Protocolli di invarianza (PROMETEO)

FORESI:

A cadenza  
(se normale)  
non  
inferiore a:

- Una all'anno
- (valido anche per MGUS stabili)

# Inappropriatezza della richiesta per IMMUNOFISSAZIONE (Kyle, 1999)

NON E': dosaggio  
delle  
immunoglobuline

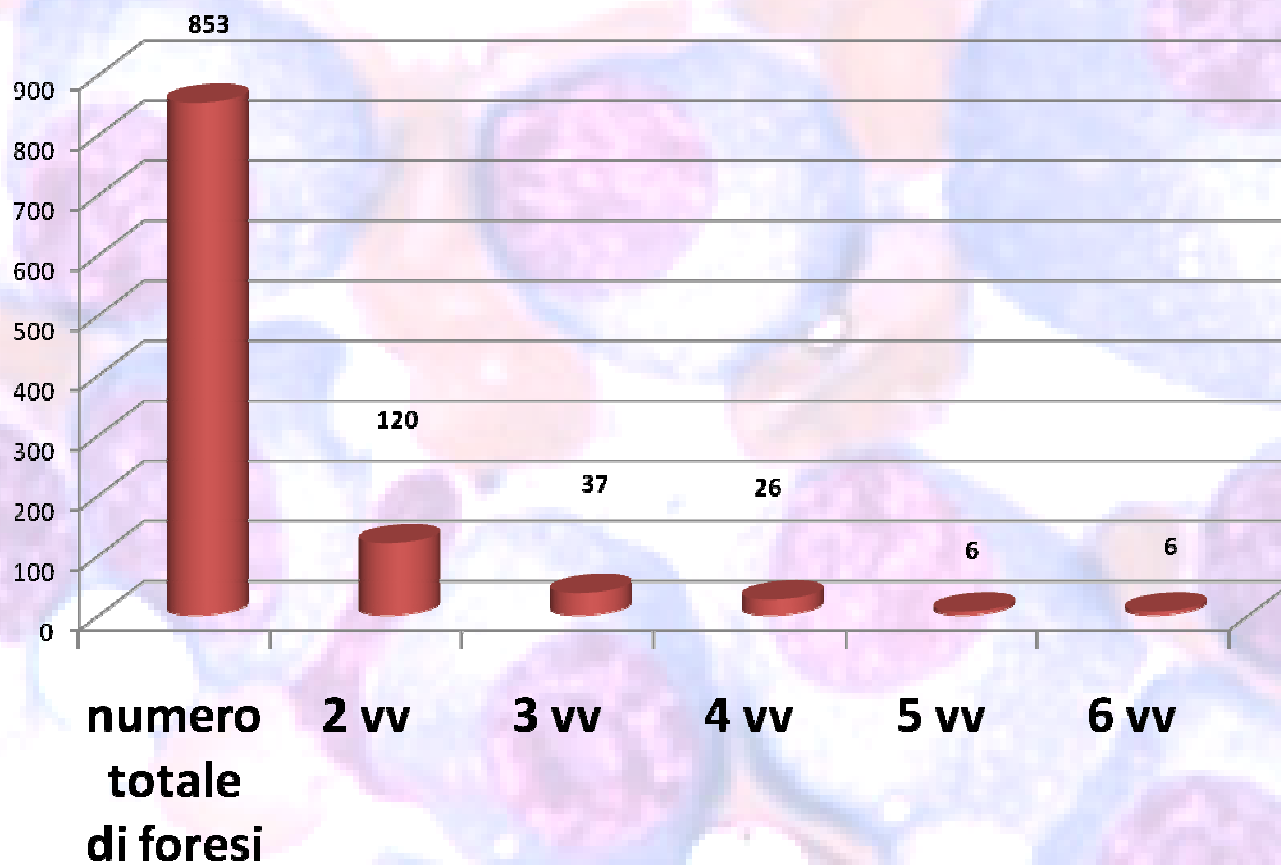
- NON si ripete in caso di stabilità di quantità e di migrazione delle componenti monoclonali

- Studi su donatori danno una prevalenza di MGUS di circa 0.6 % della popolazione.
  - Individui selezionati
  - Giovani
  - Senza grosse morbidità (attenzione la MGUS non è preclusiva della donazione e del trattamento dell'emoderivato)
- Possiamo quindi stimare presuntivamente in 1-2% la prevalenza generica delle MGUS

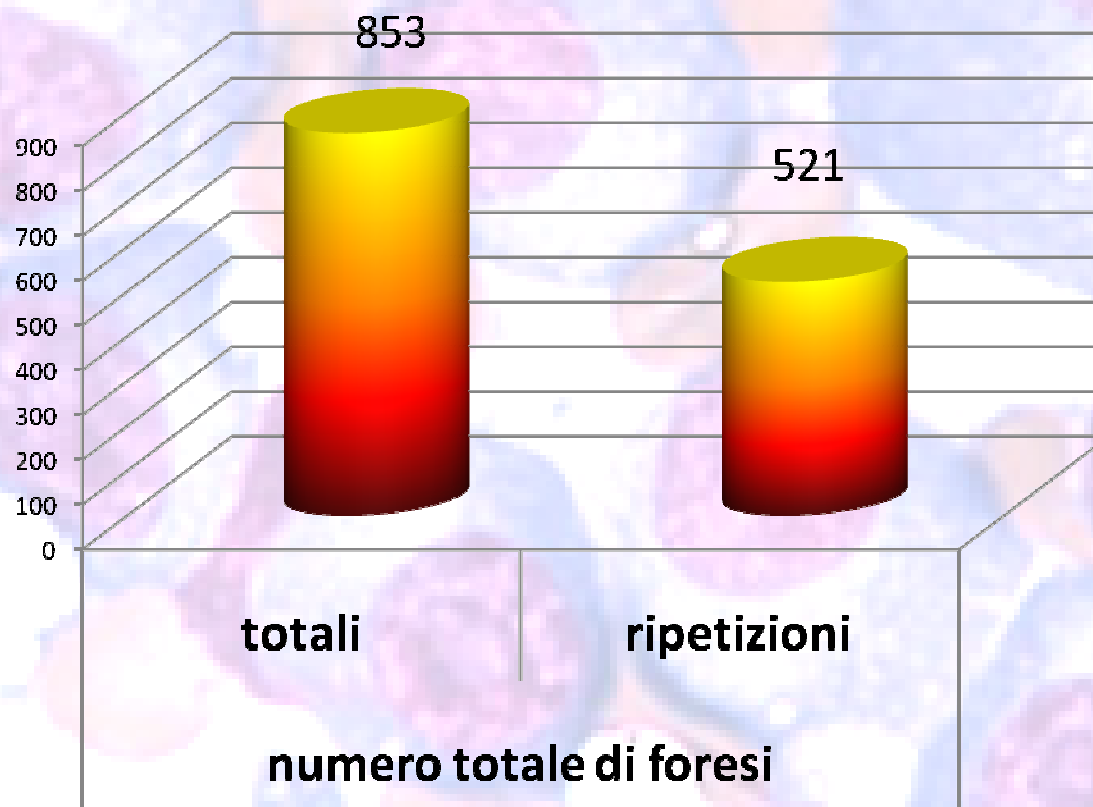
- Inoltre assumiamo (approssimando) allo 0,5 – 1 /100.000 l'**incidenza** di mieloma, con circa 40 / 100.000 di **prevalenza**.
- **ESTREMIZZIAMO** : Una foresi all'anno per tutti (tranne che per i mielomi già diagnosticati) risultano circa 3000 – 4000 foresi
- Ne sono state richieste 49000 ! (gen – nov 2017)

- In questa inappropriata c'è di tutto
  - Età
  - Stato fisiologico (gravidanza....)
  - Ripetizioni (1% delle foresi ambulatoriali è ripetuto dalle due alle quattro volte in un anno)
  - Protocolli (preoperatori....)
  - Abitudini
  - Pseudo necessità (700 richieste di foresi urgenti !)

# Area ematologica in generale

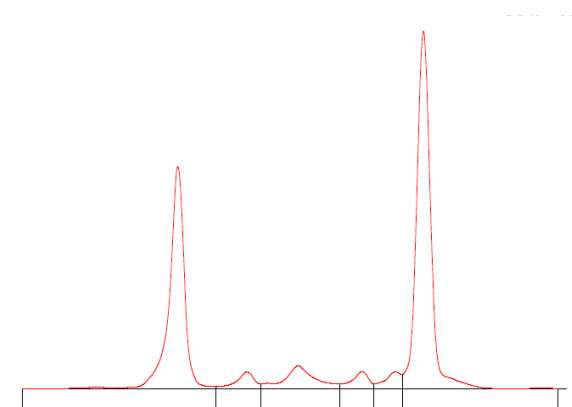


# Area ematologica in generale



# Torniamo in ambulatorio: Foresi patologica!

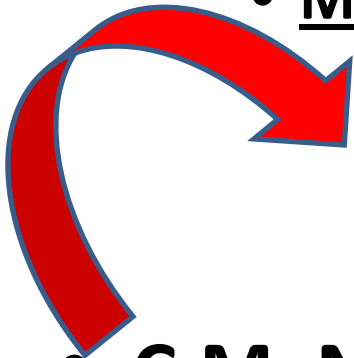
- MGUS: “incidentaloma” durante esami di screening
- 3 – 4 % della popolazione di caucasica sopra i 50 aa.
- Del doppio più frequente negli africani
- Più frequente negli uomini
- Il 58% di tutte le gammopatie stadiate.



# Foresi patologica! Che fare?

## (Kyle, 1999)

- **C.M. NOTA ?**
  - **Immodificata nel tempo per dimensioni, zona di migrazione**
    - » NULLA (permane c.m. ....che migra in zona .....pari al .....%)
    - » NON necessaria ripetizione IFE/s
  - **Modificata per dimensioni, zona di migrazione**
    - » IFE / s del siero per caratterizzazione dell'isotipo patologico, e nuova quantificazione
- **C.M. NON NOTA ?**



## **Foresi patologica! IFE (se necessario)**

- **Non vi sono altri esami reflex o indotti, eseguibili in autonomia dal Laboratorio.**
- Il medico curante (territoriale o ospedaliero) gestirà i passaggi successivi, sulla scorta delle linee guida internazionali, guidato dalla quantificazione della c.m. e dalla clinica.
- Esami di stadiazione già elencati precedentemente

# QUANTIFICAZIONE C.M.

## DA PICCO

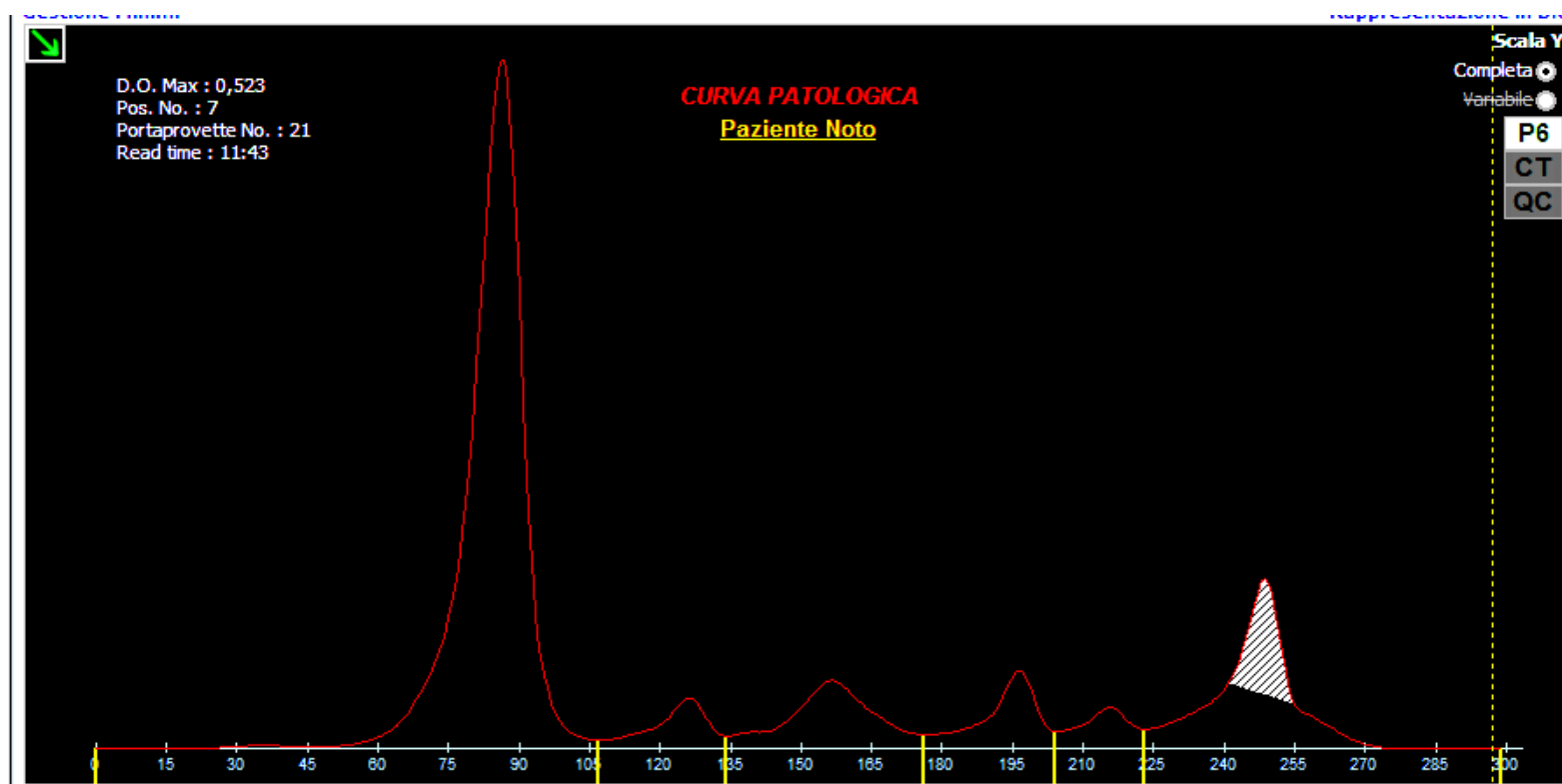
- Algoritmi preconfezionati
- Ausili interpretativi
- Reti neurali
- Ma anche difficoltà in caso di spiccata ipogammaglobulinemia

# QUANTIFICAZIONE C.M.

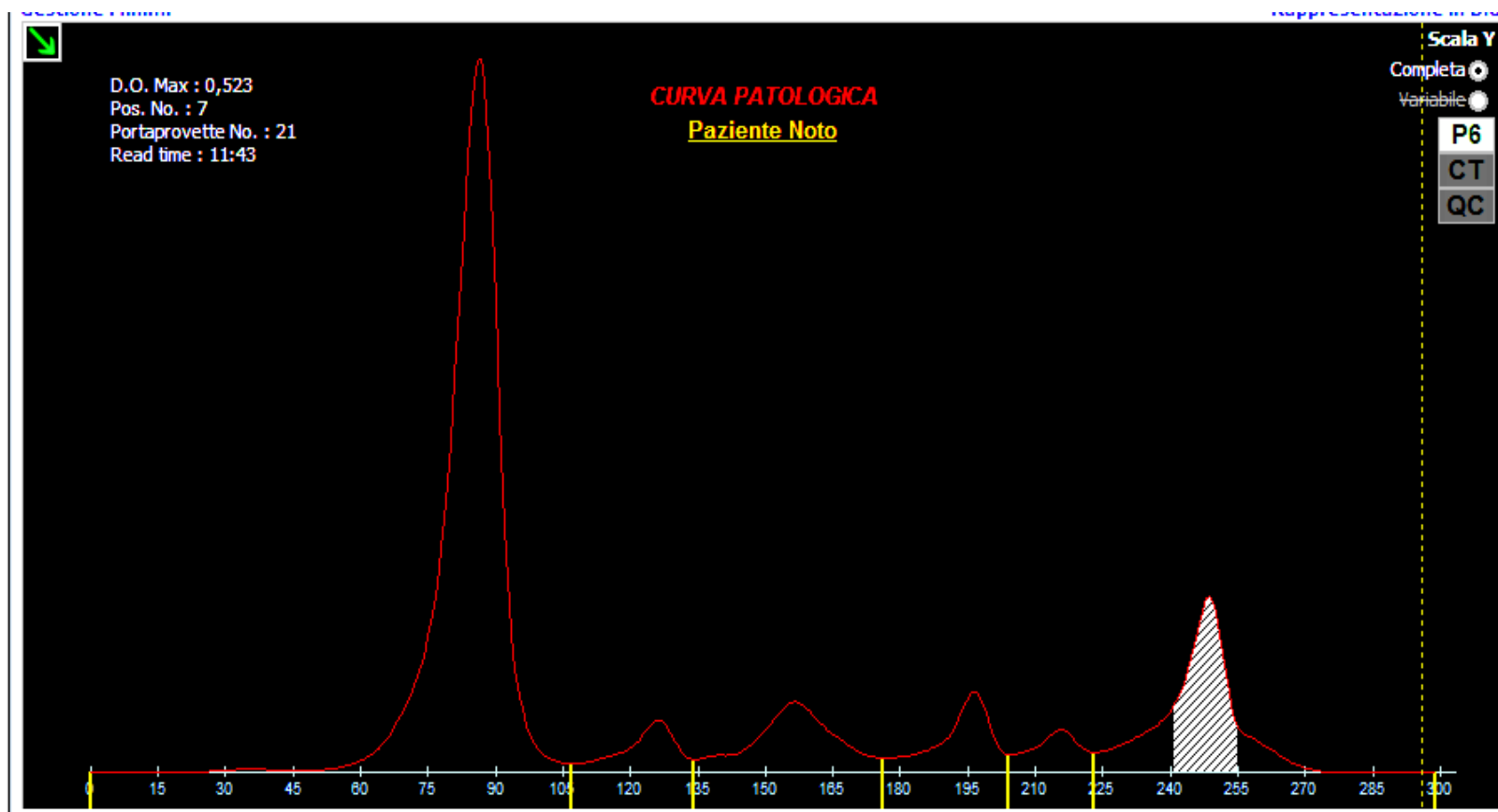
## DA PICCO

- Misurazione dell'area sottesa dalla curva
  - Misura operatore - dipendente
  - Non sempre facile per co – migrazione
  - Possibile errore (tanto più piccolo, quanto la CM è importante)
  - Ipotesi di misura dell'”eccesso” di picco; ancora non validata

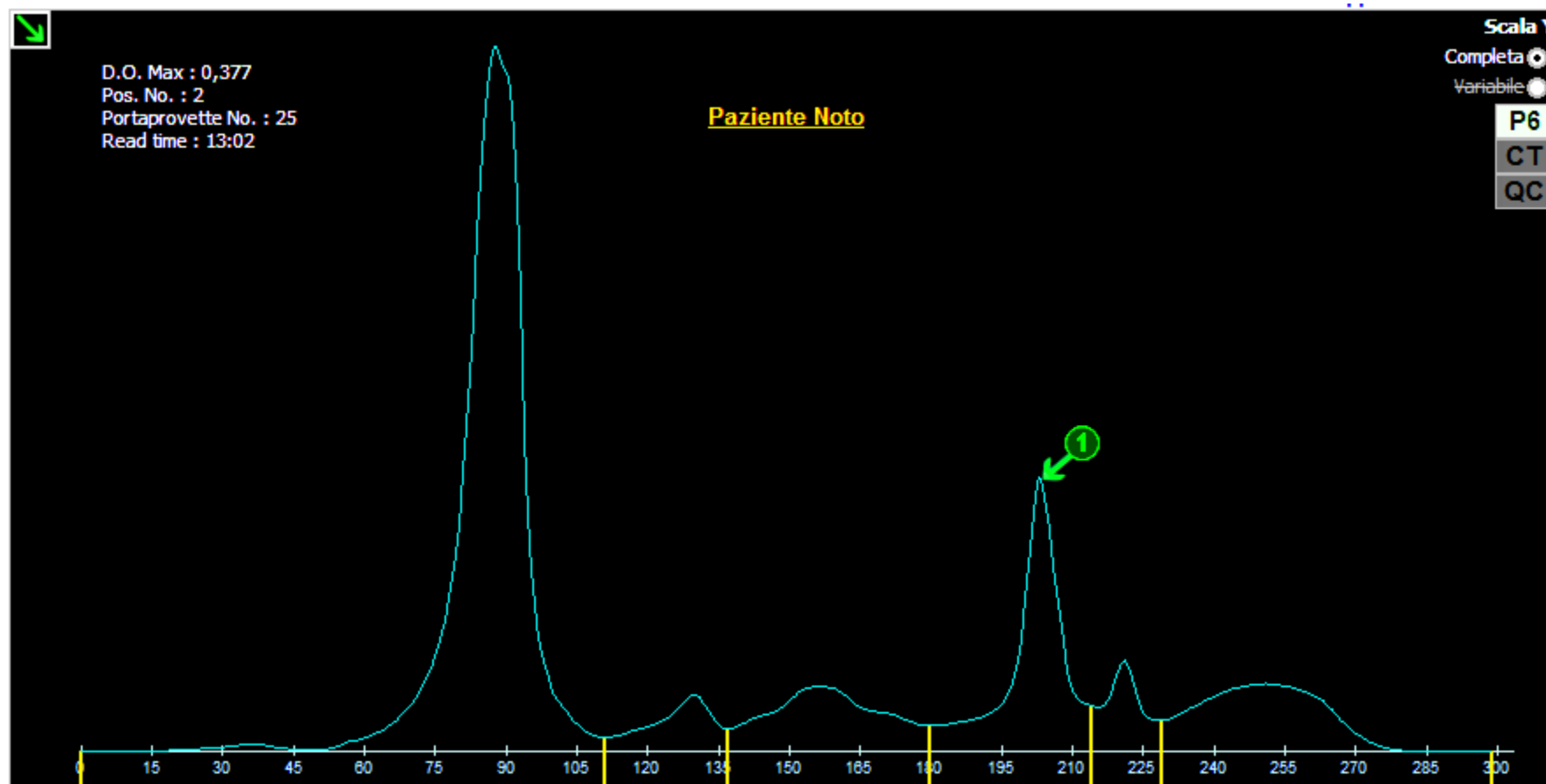
# Quantificazione da “eccesso” di picco



# Quantificazione da picco



# comigrazione



# QUANTIFICAZIONE C.M.

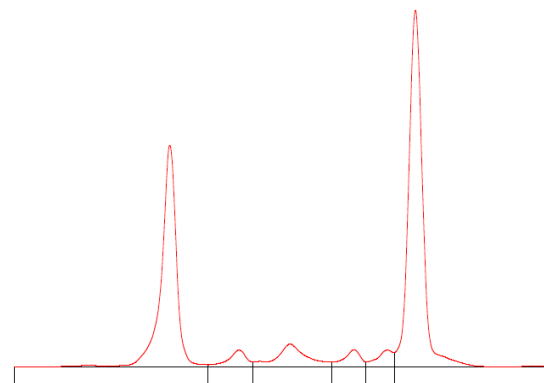
## DA BIOCHIMICA

- Più precisi, ripetibili, esportabili
- Esami turbidimetrici calibrati contro soluzioni standard
- Non distinguono Ig normali da Ig costituenti la CM
- Ottimi in senso assoluto TRANNE che per **C.M. a IgM** (basi steriche biochimiche, pentamero collegato con ponti disolfuro...) = sovrastima (fino a due tre volte il valore interpolato nel calcolo del picco!)

# IMWG



- **Dopo la diagnosi foretica :**

- Emocromo
- Calcemia
- Creatinina
- Proteinuria
  - Elettroforesi
  - Immunofissazione.
- FLC ratio
- Midollo (non sempre...)



- **Controllo ..... dopo quanto?**

# Foresi patologica e storia naturale della gammopatia

- Progressione: stratificazione del rischio di con score prognostici (c.m., midollo, LI, citogenetica..)
- MGUS  MM = da 0,1% a 1% per anno
- SMM  MM = 10% per anno nei primi 5 anni

3% per anno nei successivi 5

1% per anno nei seguenti 15

# IMWG – timing 1

- **Low-Risk MGUS**
- Se la c.m. del siero è  $< 15$  g/L, è di tipo IgG e la FLC ratio è normale, il rischio di eventuale progressione verso il mieloma è basso.
- Midollo osseo o rx total body NON sono indicati come routinari se la valutazione clinica e la biochimica (emocromo, creatinina e calcio) suggeriscono la diagnosi di MGUS.
- In caso di parametri alterati un midollo di base è mandatorio
- **I pazienti dovrebbero essere controllati con foresi a 6 mesi e, se stabili, ogni 2 o 3 anni (in assenza di sintomi clinici suggestivi di peggioramento).**

# IMWG - timing 2

- ***Intermediate-Risk MGUS***
  - CM > 15 g/L,
  - IgA o IgM ,
  - FLC ratio anormale,
  - Midollo baseline.
  - Anemia, insufficienza renale, ipercalcemia, lesioni ossee, o sospetto di AL amiloidosi, impongono indagini citogenetiche convenzionali e FISH sul midollo.
  - Labeling index delle plasma cellule e ricerca con citometri a flusso delle plasmacellule circolanti.
  - TAC addome....

# IMWG –timing 2

- **Intermediate-Risk MGUS**  
**(criteri laboratoristici)**

LDH

B<sub>2</sub> microglobulina

C-reactive protein dovrebbero essere eseguiti in caso di sospetto di mieloma multiplo o Waldenstrom's macroglobulinemia.

In caso di negatività di questi esami

i pazienti dovrebbero essere seguiti con **s-PE** ed emocromo

**dopo 6 mesi, e poi annualmente.**

# TAKE HOME MESSAGE

- Complessità: inaspettata per un esame relativamente semplice
- Integrazione: e non subordinazione laboratorista – tecnologia
- Interpretazione: il richiedente ha i dati definitivi da valutare, liberato da ogni difficoltà interpretativa



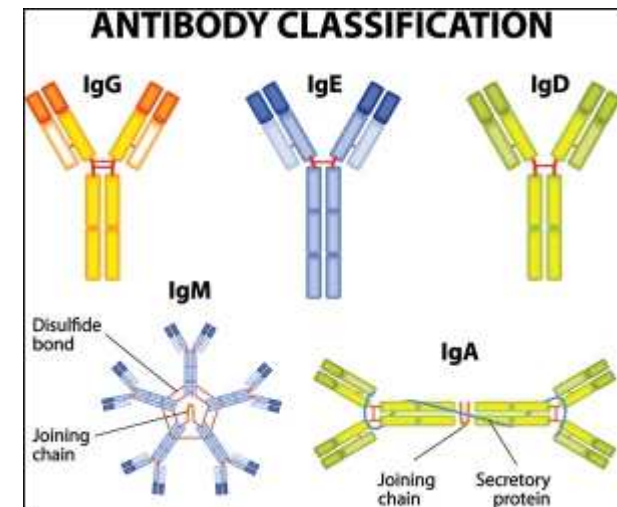
# TAKE HOME MESSAGE

- Conoscenza: delle possibilità e delle peculiarità dell'arsenale diagnostico a disposizione
- Interdisciplinarietà: dei momenti di condivisione di esigenze e delle rispettive offerte di supporto.
- Personalizzazione : di ogni singolo referto ad ogni singolo paziente.



# TAKE LAB MESSAGE

- Implementare la detezone delle c.m. a catene pesanti  $\delta$  (IgD), rarissime ma non sporadiche
- Metodica di dissoluzione con mercaptoetanololo dei ponti disolfuro della sospetta componente a IgM per migliorarne la detezone.
- FLC



Le indagini di laboratorio nella diagnosi delle malattie ematologiche:  
quando il medico e il laboratorista parlano la stessa lingua  
Sabato 16 Dicembre 2017 - Aula Magna, Nuovo Arcispedale S. Anna

## Il laboratorio clinico nello scenario del mieloma



Un plauso alla  
vostra dedizione  
e... **AUGURI!**

**Stefano Pizzicotti**

U.O. Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia