

APPROPRIATEZZA E ARMONIZZAZIONE DELLA DIAGNOSTICA PROTEICA NELLA GESTIONE DELLE DISCRASIE PLASMACELLULARI

Il percorso di laboratorio per la diagnostica proteica è ben descritto dalla Tavola sinottica qui di seguito presentata (1)

Tavola 1
Tavola sinottica degli esami di diagnostica proteica da eseguire per la gestione del paziente con componente monoclonale (CM) nelle diverse situazioni cliniche

Quesito clinico	Esami						Note
	S-EF	S-IFE	Misura CM	S-FLC	PBJ	Ig	
Primo riscontro in assenza di sospetto clinico	SI	-	-	-	-	-	Se S-EF è negativa non si procede con le indagini; se positiva o sospetta si procede come nel caso successivo
Primo riscontro in presenza di sospetto clinico di discrasia plasmacellulare	SI	SI*	SI	SI**	SI**	SI	*Anche se il tracciato S-EF non presenta alterazioni riferibili a CM **Solo uno dei due esami, con la sola eccezione dell'amiloidosi AL
Inquadramento diagnostico	SI	SI	SI	SI	SI	SI	
Diagnostica differenziale	-	-	SI	-	-	-	Unitamente a valutazione del danno d'organo e percentuale delle plasmacellule midollari
Stratificazione del rischio	-	SI	SI	SI	-	-	S-FLC solo in caso di MGUS e mieloma indolente
Monitoraggio MGUS e mieloma indolente	SI	SI	SI	-	SI	-	S-IFE solo in caso di variazioni qualitative della morfologia del tracciato
Monitoraggio e risposta alla terapia nel mieloma multiplo	SI	SI	SI	SI	SI	-	S-IFE solo in caso di variazioni qualitative della morfologia del tracciato e per la definizione della risposta completa S-FLC solo per la definizione della risposta stringente completa e in caso di malattia non misurabile

S-EF, elettroforesi sieroproteica; S-IFE, tipizzazione della CM; S-FLC, catene leggere libere κ e λ del siero; PBJ, proteina di Bence Jones; Ig, immunoglobuline non coinvolte nella monoclonalità; MGUS, gammopatia monoclonale di significato indeterminato.

➤ ELETTROFORESI SIERO PROTEICA

L'elettroforesi siero proteica (S-EF) è nella pratica clinica un esame richiesto frequentemente sia nei pazienti ospedalizzati sia in quelli ambulatoriali. E' un esame non invasivo, poco costoso, facilmente accessibile (è svolto praticamente da tutti i servizi di Medicina di Laboratorio), fonte di indicazione semiquantitativa di alcune proteine plasmatiche (albumina, immunoglobuline). E' in grado di **rilevare la presenza di una componente monoclonale (CM)**; infatti è l'esame di laboratorio di elezione per la rilevazione ed il monitoraggio di gammopatie monoclonali (GM) potenzialmente progredibili in patologie evolutive.

La tecnica elettroforetica permette infatti di evidenziare la presenza di una CM come una proteina singola, migrante in una zona specifica del tracciato permettendone la quantificazione.

E' possibile quantificare la CM (confermata dalla S-IFE) dopo delimitazione del picco del tracciato elettroforetico, calcolandola sulla base della concentrazione delle proteine totali sieriche. Questa misura, seppur non ottimale in quanto fortemente influenzata dall'operatore è l'unica da utilizzare in quanto la misura immunochimica è inaccurata. Qualora, però la CM non sia quantificabile dal tracciato S-EF, perché non ben separata da altre proteine, può essere utilizzata la misura immunochimica della catena pesante della CM pur in presenza di vari problemi analitici (1).

Il metodo elettroforetico adottato per S-EF (tecnica capillare o in gel d'agarosio) deve raggiungere una sensibilità di circa 1 g/L nella rilevazione delle CM e deve essere ad alta risoluzione ossia in grado di

separare in zona beta la proteina transferrina dal Complemento (C3), al fine di poter rilevare anche le CM di scarsa entità presenti in zona beta (2).

INDICAZIONI ALL' ESECUZIONE

- la S-EF può essere ragionevolmente inclusa tra i test di ingresso dei pazienti ospedalizzati con età > 50 anni per individuare l'eventuale presenza di CM per le seguenti motivazioni (3) :
 1. prevalenza non rara di gammopatia monoclonale di incerto significato (MGUS) nella popolazione adulta (3-4% a 50 anni, fino a 8-10% negli ultraottantenni)
 2. possibilità di progressione di MGUS in patologie evolutive maligne anche a distanza di 30 anni
 3. non invasivo
 4. basso costo
- La S-EF è indicata in presenza di sospetto clinico di discrasia plasmacellulare ovvero sintomi associabili alla presenza di CM (1,4,5,6)
- La S-EF è appropriata per il monitoraggio della CM: la misura della CM è criterio necessario nella diagnostica differenziale delle gammopatie monoclonali e per la valutazione della risposta alla terapia (1,7).

La S-EF è indicata come test di screening nei pazienti con trapianto d'organo per evidenziare precocemente l'insorgere di disordini linfoproliferativi e nei pazienti con neuropatie periferiche (8,9).

REFERTAZIONE

La refertazione del tracciato elettroforetico deve essere fatta in modo da consentire al clinico di avere informazioni **chiare e confrontabili** nel caso in cui i referti provengano da laboratori diversi (10).

In particolare occorre definire:

- la eventuale presenza di una CM
- la zona di migrazione della CM
- la concentrazione della CM
- qualora non si osservi una CM, è opportuno dichiararlo

Al fine di raggiungere una refertazione standardizzata, già a partire dal 2009, il GdS proteine della SIBioC diede le seguenti indicazioni, tuttora valide (11) :

1. poiché la S-EF è l'indagine di laboratorio di elezione per la ricerca di CM e non va utilizzata per la valutazione quantitativa delle varie frazioni proteiche, le varie frazioni vanno espresse in % ,con relativo intervallo di riferimento, e non in valore assoluto.
2. l'elettroforesi va sempre accompagnata da un **COMMENTO INTERPRETATIVO***:
 - nel caso non si rilevi, all'ispezione visiva, la presenza di CM sospette, occorre segnalarlo espressamente nel referto, indicando il metodo utilizzato per la elettroforesi siero proteica. L'assenza di evidenza di proteine omogenee sospette nel tracciato, non esclude, necessariamente, una discrasia plasmacellulare.

- nel caso in cui ci sia il sospetto della presenza di CM, va segnalato sul referto , indicando la necessità di conferma con immunofissazione/ immunosottrazione nel caso in cui il laboratorio non la esegua automaticamente al primo riscontro(reflex-test).
 - In caso di componenti monoclonali molto piccole, perché gli effetti patologici possono essere indipendenti dalla concentrazione della CM.
 - In caso si evidenzi lo sdoppiamento delle alfa-1 glicoproteine che pone il sospetto di deficit/eterozigosi dell'alfa1 antitripsina; il parametro più importante per la verifica del deficit , e in particolare della presenza del rischio di un danno polmonare, è la misura della concentrazione plasmatica della proteina che è fisiologica per valori > 1 g/L (17).
 - In presenza di ipogammaglobulinemie consistenti che potrebbero essere il segnale di presenza di CM in zone diverse dalle gamma-globuline o di proteinuria di BJ.
3. La tipizzazione della CM va sempre refertata indicando la classe di catena pesante accompagnata dalla catena leggera. Nel referto , alla diagnosi e nel monitoraggio , va indicata la quantità di CM in g/L,ottenuta dal tracciato elettroforetico. Nel caso in cui la CM sia co-migrante con altre proteine(es. in beta), va segnalato sul referto che non è quantificabile, oppure si quantifica specificando che la quantificazione comprende, ad esempio, “ beta + immunoglobulina monoclonale”. In tal caso è meglio accompagnare al referto il dosaggio delle IgG, IgA, IgM totali (12). La quantificazione va eseguita all'interno del laboratorio, sempre con lo stesso metodo (evidenziazione del picco fino alla base o con triangolazione).
4. Il termine universalmente utilizzato per definire la CM è “ Proteina-M.” Poiché secondo alcuni autorevoli autori (10) ,tale termine può dare adito a confusione, perché può essere interpretato come presenza di Immunoglobulina monoclonale IgM, si propone di adottare i termini di “ Immunoglobulina monoclonale” .
5. Occorre prestare molta attenzione nel refertare “ piccole nuove bande” che compaiono in soggetti sottoposti a trapianto autologo ed allogenico. In questi casi può succedere non solo che compaia al S-EF o all'immunofissazione un quadro oligoclonale, ma possono comparire bande ben definite generalmente <= ad 1 g/L. Tali bande, da segnalare come CM, sono generalmente transitorie (persistono per 1-18 mesi), presenti in pazienti con patologia in fase di remissione e con significato prognostico favorevole.

*in **Allegato A**, i commenti interpretativi di uso comune.

TIPIZZAZIONE COMPONENTI MONOCLONALI

INDICAZIONE ALL'ESECUZIONE

La tipizzazione delle componenti monoclonali deve essere richiesta:

- al primo riscontro occasionale di CM.
- in presenza di sospetto clinico di discrasia plasmacellulare, anche se il tracciato elettroforetico non presenta alterazioni riferibili alla componente monoclonale
- nell'inquadramento diagnostico
- nella stratificazione del rischio
- nel monitoraggio di MGUS e del mieloma indolente, solo in caso di variazioni qualitative della morfologia del tracciato rispetto al primo riscontro

- nel monitoraggio e nella risposta alla terapia nel mieloma multiplo, solo in caso di variazioni qualitative della morfologia del tracciato e per la definizione della risposta completa.
- nel caso di rilevazione di positività per le sole catene leggere libere monoclonali, si consiglia di utilizzare sempre, anche gli antisieri per catene pesanti δ (IgD) e anti ϵ (IgE). Considerati i costi può essere opportuno accentrare tali indagini in pochi laboratori all'interno della regione, ai quali inviare il campione.
- La tipizzazione delle componenti monoclonali viene effettuata mediante immunofissazione su gel di agarosio o mediante immunosottrazione con metodo capillare.

➤ **CATENE LEGGERE LIBERE NEL SIERO (s-FLC) E RAPPORTO K/L (r-FLC)**

La determinazione delle s-FLC Kappa e Lambda e la stima del rapporto Kappa/Lambda (r-FLC) costituiscono un indispensabile parametro nella diagnosi, nella stratificazione del rischio e nel monitoraggio della terapia delle discrasie plasmacellulari. Lo sbilanciamento del rapporto sierico fra catene leggere libere Kappa e Lambda è un efficace indice di clonalità. Costituiscono un marcatore insostituibile nella diagnosi e nel monitoraggio del mieloma "a catene leggere" (micromolecolare) e dell'amiloidosi AL. In particolare, nella diagnosi di amiloidosi AL, all'immunofissazione sierica (s-IF) e delle urine (PBJ) deve essere sempre affiancata la misura delle s-FLC per raggiungere una elevata sensibilità diagnostica. La misura di s-FLC contribuisce, insieme all'esecuzione dei marcatori cardiaci, quali la porzione ammino-terminale del peptide natriuretico di tipo B (NT-proBNP) e le troponine cardiache, alla stratificazione prognostica e permette di seguire i pazienti nel corso della terapia, indicando se la risposta desiderata è stata raggiunta (13).

Sono attualmente disponibili sul mercato due differenti metodi per la misura delle s-FLC. Un metodo determina le concentrazioni di s-FLC su piattaforme analitiche diverse con metodo turbidimetrico o nefelometrico, utilizzando anticorpi policlonali; l'altro metodo, nefelometrico, utilizza una miscela di anticorpi monoclonali.

L'assenza di standardizzazione dei metodi e la presenza di alcuni problemi analitici (imprecisione, variabilità tra lotti di reagenti e tra piattaforme analitiche differenti, fenomeno dell'eccesso di antigene, ridotto recupero dopo diluizione del campione, mancanza di linearità, mancanza di parallelismo tra calibratore policlonali/ campione con s-FLC monoclonali, interferenza da matrice), possono inficiare il risultato che deve pertanto essere refertato dopo attenta valutazione dei risultati delle tecniche qualitative (sEF e IFE).

In attesa di una armonizzazione dei risultati ad opera di Società Scientifiche e/o di miglioramenti tecnologici apportato dalle Ditte Produttrici, è fortemente raccomandata l'esecuzione dell'esame sempre presso lo stesso laboratorio, con lo stesso metodo e la stessa piattaforma analitica, durante il monitoraggio terapeutico. È importante che i laboratori indichino il metodo e piattaforma analitica utilizzato sul referto (13).

La richiesta della misura delle catene leggere totali nel siero e nelle urine non è appropriata, non essendoci evidenze scientifiche sul loro utilizzo nella diagnostica delle discrasie plasmacellulari; l'attuale disponibilità del dosaggio delle catene leggere libere sieriche ne rendono obsoleta la misura. E', quindi, auspicabile che la misura delle catene leggere totali sieriche non rientrino nel pannello degli esami da richiedere.

INDICAZIONE ALL'ESECUZIONE

La determinazione delle s-FLC (catene leggere libere nel siero) Kappa e Lambda e la stima del rapporto Kappa/Lambda devono essere richiesti:

- al primo riscontro occasionale di CM
- in presenza di sospetto clinico di discrasia plasmacellulare in alternativa alla proteina di Bence Jones, con la sola eccezione dell'amiloidosi AL
- nell'inquadramento diagnostico
- per la stratificazione del rischio in caso di MGUS e mieloma multiplo asintomatico (SMM, "smouldering multiple myeloma")
- nella definizione della risposta stringente completa
- nel monitoraggio e nella risposta alla terapia nel mieloma multiplo in caso di malattia non misurabile

REFERTAZIONE

Le concentrazioni di s-FLC Kappa e s-FLC Lambda, espresse in mg/L, e il calcolo del rapporto Kappa/Lambda devono essere riportate nel referto accanto all'intervallo di riferimento, riferito al metodo e alla piattaforma analitica utilizzata.

➤ **PROTEINURIA DI BENCE JONES**

La proteina di Bence Jones (PBJ) costituita da catene leggere libere monoclonali (CLLM), secrete da cellule B derivate da un unico progenitore (clone) **deve essere eseguita solo con l'immunofissazione urinaria , unica tecnica in grado di accertare la monoclonalità e l'assenza della catena pesante (14,15).**

INDICAZIONE ALL'ESECUZIONE

- al primo riscontro occasionale di CM
- in presenza di sospetto clinico di discrasia plasmacellulare in alternativa al dosaggio delle s-FLC (catene leggere libere nel siero) Kappa e Lambda
- nell'inquadramento diagnostico
- nel monitoraggio di MGUS e mieloma asintomatico
- nel monitoraggio e nella risposta alla terapia nel mieloma multiplo (6,16)

La sola ricerca della PBJ può essere effettuata anche su un campione di urina spot, meglio la prima del mattino, mentre per la quantificazione è indispensabile la raccolta delle 24h.

Accertata la presenza, la quantificazione di BJP deve essere effettuata per scansione densitometrica del picco monoclonale del tracciato elettroforetico urinario in rapporto alle proteine totali urinarie (14,15) e alla diuresi delle 24h.

Le LG scoraggiano l'uso dei metodi immunochimici (nefelometria o turbidimetria) per la misura delle catene leggere totali e libere urinarie. E' auspicabile che tali esami non rientrino nel pannello degli esami da richiedere.

Il campione può essere conservato per una settimana a 4-8°C. Qualora necessario, è consigliabile l'utilizzo di un conservante (es. sodio azide).

REFERTAZIONE

Nel referto per la quantificazione della BJ (urine 24 ore) devono almeno comparire **:

- Il dosaggio delle proteine totali urinarie
- La presenza/assenza di BJ quantificate in mg/24 ore

- I metodi utilizzati per la ricerca e la quantificazione (10).

** in **Allegato B**, i commenti interpretativi di uso comune.

➤ **IMMUNOGLOBULINE IgA,IgG, IgM (CLASSI MAGGIORI)**

Le immunoglobuline (Ig) rappresentano un eterogeneo gruppo di proteine con funzione anticorpale. Le IgG sono gli anticorpi della risposta secondaria, la funzione delle IgA sieriche non è conosciuta con precisione, mentre le IgM sono gli anticorpi della risposta primaria (17).

INDICAZIONE ALL'ESECUZIONE

- Le maggiori evidenze sono relative al percorso diagnostico delle immunodeficienze all'interno del quale la misura delle immunoglobuline sieriche rappresenta uno dei parametri cardine . Il più frequente di questi è il deficit selettivo di IgA .
- Nell'ambito del percorso diagnostico e il monitoraggio delle gammopatie monoclonali indicazioni precise sono presenti nelle raccomandazioni di consenso dell'International Myeloma Working Group (4).
- La misura della immunoglobulina monoclonale è prescritta al primo riscontro di CM e al monitoraggio/ controllo
- La misura delle due classi immunoglobuliniche non coinvolte per la verifica di una eventuale immunoparesi è suggerita all'interno della valutazione iniziale del paziente (inquadramento diagnostico)

REFERTAZIONE

Le concentrazioni devono essere espresse in g/L, riportate nel referto accanto all'intervallo di riferimento, basato sulla standardizzazione contro il materiale di riferimento certificato CRM 470.

➤ **VALUTAZIONE DEL DANNO D'ORGANO**

I criteri espressi nei documenti dell'IMWG per la gestione delle Gammopatie Monoclonali di Incerto Significato (MGUS) e mieloma asintomatico (SMM) (4,18) e per la diagnostica differenziale tra mieloma multiplo (MM) e (SMM) (19,20) riassunti nelle Tab 1 e 2, comprendono anche altri parametri di laboratorio; l'inquadramento corretto dei pazienti dipende anche dall'accuratezza di questi parametri suggestivi di danno d'organo (**CRAB**) :

- **Calcio:** occorre selezionare attentamente i metodi disponibili in commercio, in modo che siano preferiti quelli di dimostrata riferibilità metrologica e che soddisfino gli standard di incertezza stabiliti per la loro applicazione clinica (20,21). Il principale obiettivo è ottenere l'affidabilità e l'interscambiabilità dei risultati tra laboratori con l'utilizzo di IR e livelli decisionali comuni.
- **Danno renale:** la valutazione della funzionalità renale deve essere basata sulla stima della velocità di filtrazione glomerulare (eGFR) piuttosto che sulla misura della sola creatinina. Le linee Guida KDIGO del 2012 (22,23) raccomandano di fornire la stima dell'eGFR contestualmente al valore della creatinina plasmatica. La formula per il calcolo, maggiormente accreditata , è la CKD-EPI. Tutta la letteratura concorda sulla necessità che la concentrazione di P-Crea debba essere misurata con un metodo con "bias" minimo verso il materiale di riferimento. I metodi enzimatici, che offrono maggiori garanzie rispetto al tradizionale metodo al picrato, sono consigliati.

- **Anemia:** si raccomanda di attenersi alle raccomandazioni di organismi internazionali e società scientifiche esprimendo la concentrazione della B-Emoglobina in g/L al fine di ridurre l'evidente disomogeneità dell'espressione della misura per il mancato impiego delle unità di misura conformi al Sistema Internazionale (24) .

➤ CRIOGLOBULINE

Le crioglobuline (CRG) sono immunoglobuline che precipitano o gelificano, di solito reversibilmente, a temperature inferiori a 37 °C. La loro ricerca, quantificazione e caratterizzazione è essenziale per la diagnosi ed il monitoraggio clinico e terapeutico dei pazienti affetti da sindromi crioglobulinemiche.

INDICAZIONE ALL'ESECUZIONE

Esse vanno ricercate solo nei pazienti sintomatici caratterizzati dalla triade di Meltzer-Franklin (atralgia, astenia e porpora) o con dati di laboratorio suggestivi, in quanto l'osservazione di crioglobulinemie transitorie e asintomatiche si associa a numerose patologie che innescano un'iperstimolazione delle cellule linfocitarie B, patologie infiammatorie, neoplastiche ed infettive a diversa eziologia.

La classificazione proposta da Brouet et al. ormai 40 anni fa, nonostante le molte modifiche e integrazioni proposte , rimane ancora clinicamente valida (25,26). Questa classificazione prevede tre tipi di crioglobuline:

- tipo I con crioprecipitato composto esclusivamente da una singola immunoglobulina monoclonale, solitamente formato da IgG (IgG1 o IgG3), e occasionalmente da IgM o IgA. Si associa frequentemente a MM o a macroglobulinemia di Waldenström.
- tipo II con precipitato composto da un fattore reumatoide monoclonale, di solito IgM, che lega immunoglobuline IgG policlonali; Il tipo II è il più comune e si associa nella maggior parte dei casi a una infezione da virus dell'epatite C
- tipo III caratterizzato da fattore reumatoide IgM policlonale che lega immunoglobuline IgG policlonali; è associato, solitamente, a malattie autoimmuni.

Poiché la sintomatologia non è mai correlata al valore di criocrito stimato e la concentrazione della CM correlata può essere modesta, riveste particolare attenzione la procedura di trattamento del campione.

E' indubbio che in un'epoca di consolidamento delle attività specialistiche e di corrispondente decentramento dei punti di prelievo, l'aspetto della raccolta del campione, del suo trattamento e della caratterizzazione del crioprecipitato devono essere gestiti con particolare attenzione.

La raccolta del campione di sangue richiede l'uso di provette senza anticoagulanti, mantenute prima e dopo il prelievo a 37°C per almeno 30 minuti fino a completa coagulazione del campione.

- E' sconsigliato l'uso di provette con gel separatore per il rischio di un eventuale rilascio di sostanze interferenti durante l'incubazione a 37°C.
- Il volume minimo di sangue necessario è di 10 mL.
- Alcuni autori (27) enfatizzano la necessità di centrifugare a 37°C il campione ematico e suggeriscono, qualora non sia disponibile una centrifuga a temperatura controllata, di separare il siero dal coagulo senza previa centrifugazione. Anche l'esecuzione di criocrito e tipizzazione deve avvenire a 37°C (28). Per la particolare attenzione che va riservata al prelievo di pazienti crioglobulinemici , si raccomanda di mantenere ogni campione prelevato sempre a 37 °C. in particolare per i dosaggi di Emocromo, PT, Ig, SPE, IFE, complemento e RF. E' opportuno segnalare sul referto che questi dosaggi sono stati eseguiti a 37°C.

- Per la centrifugazione del sangue coagulato si propone di centrifugare a 2500 g per 10 minuti a 37°C oppure 2000 g per 30 minuti a 37°C.
- Dopo la centrifugazione, il surnatante va trasferito in provette graduate di Wintrobe e incubato a 4°C per almeno 7 giorni senza mai congelare e scongelare per evitare significative variazioni di solubilità delle immunoglobuline.
- Dopo 7 giorni, in presenza di crioprecipitato effettuare la determinazione del criocrito, centrifugando la provetta graduata a 2000 g per 15 minuti con una centrifuga a temperatura controllata per mantenere la provetta a 4°. Se sono state incubate a 4°C due provette di Wintrobe, effettuare con la seconda la prova di reversibilità del criocrito a 37°C, per verificare che si tratti effettivamente di una crioglobulina; benché tale procedura sia suggerita dai documenti di riferimento (26,27) non sempre è possibile ottenere sufficiente siero per due provette a causa della criticità dei pazienti oggetto di questa indagine diagnostica.
- Dopo centrifugazione valutare la percentuale di precipitato sul totale di siero presente.
- Per procedere alla tipizzazione è necessario effettuare il lavaggio e la solubilizzazione del crioprecipitato secondo le seguenti indicazioni:
dopo l'eliminazione del siero surnatante, lavare il crioprecipitato per tre volte con soluzione fisiologica a 4 °C, centrifugando a 2000g per 15 min a 4°C, risospendere ogni volta il crioprecipitato per agitazione su vortex. Dopo il terzo lavaggio, eliminare il surnatante e risospendere in uguale volume di soluzione fisiologica e incubare a 37° C fino a completa dissoluzione, procedere quindi alla immunofissazione mantenendo il più possibile la soluzione a caldo.
Sono comunque a disposizione in commercio kit preparativi per la preparazione del crioprecipitato per la tipizzazione.

REFERTAZIONE

- Crioglobulinemia : Presente/ Assente
- Se presente, il criocrito deve essere espresso come rapporto % tra il volume di crioprecipitato e il volume di siero presente
- Tipizzazione : descrizione delle caratteristiche del criocrito (classe delle immunoglobuline riscontrate ed eventuale clonalità) e segnalazione del tipo di crioglobulinemia secondo la classificazione di Bruet (tipo I,II o III)

➤ CONTROLLO DI QUALITA'

La quantificazione della CM nonché di tutti i parametri quantitativi necessari alla corretta gestione del paziente, devono essere inclusi nei programmi di CQI per la verifica di imprecisione e bias del metodo e deve essere prevista la partecipazione ad un programma di VEQ. Per i numerosi parametri qualitativi per i quali è difficilmente allestibile un CQI, è fortemente raccomandata l'adesione ad un programma di VEQ. In entrambi i casi i programmi devono soddisfare i criteri metrologici.

Tabella 1

“CRITERI PER LA DIAGNOSTICA DIFFERENZIALE TRA MGUS,SMM,MM“

Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance (MGUS) DEFINIZIONE

1. Proteina Monoclonale < 30g/L
2. Plasmacellule neoplastiche midollari <10%
3. Assenza di danno d'organo: ipercalcemia, insufficienza renale attribuibile a disordine linfoproliferativo o lesioni ossee

Smoldering Multiple Myeloma (SMM) DEFINIZIONE

1. Proteina Monoclonale (IgG-IgA) > 30g/L
2. Plasmacellule neoplastiche midollari ≥10%
3. Assenza di danno d'organo: ipercalcemia, anemia, insufficienza renale attribuibile a disordine linfoproliferativo plasmacellulare

CLASSIFICAZIONE DEL RISCHIO E ANALISI CORRELATE

MGUS BASSO RISCHIO

1. CM di tipo IgG
2. CM < 15g/L
3. Rapporto catene leggere (FLCR) normale (range 0.26-1.65)
N.B: l'IR relativo ad uno dei due metodi in commercio non è trasferibile all'altro

Primo controllo a 6 mesi dalla diagnosi, se stabile, un controllo ogni 2/3 anni

SMM BASSO RISCHIO

1. CM ≤30g/L
2. Plasmacellule clonali midollari ≤10%
3. FLCR compreso tra 0.125 e 8.0

N.B: l'IR relativo ad uno dei due metodi in commercio non è trasferibile all'altro

Controllo a 2/3 mesi, se stabile, ogni 4/6 mesi nell'anno, se stabile ogni 6/12 mesi

Tabella 2

Nuovi criteri diagnostici dell' "International Myeloma Working Group" emanati nel 2014 per la diagnostica differenziale tra mieloma multiplo (MM) e mieloma asintomatico (SMM)

Mieloma multiplo

Plasmacellule clonali^a midollari ≥10% e presenza di uno o più dei seguenti criteri caratterizzanti il mieloma:

- Presenza di danno d'organo (CRAB)^b:
 - Ipercalcemia: S-Calcio >2,75 mmol/L (>11 mg/dL) oppure >0,25 mmol/L (>1 mg/dL) rispetto al limite superiore di riferimento
 - Anemia: B-Emoglobina <100 g/L oppure <20 g/L rispetto al limite inferiore di riferimento
 - Insufficienza renale: "clearance" della creatinina (misurata) o eGFR calcolata con formula MDRD o CKD-EPI <40 mL/min/1,73 m², oppure S-Creatinina >177 mmol/L (>2,00 mg/dL)
 - Lesioni ossee: una o più lesioni litiche determinate con radiografia, CT o PET-CT
- Uno o più dei seguenti biomarcatori di malignità:
 - Plasmacellule clonali^a midollari ≥60%
 - Rapporto tra catena leggera coinvolta/non coinvolta ≥100; la catena leggera monoclonale deve essere ≥100 mg/L^c
 - >1 lesione focale, visualizzata con MRI

Mieloma asintomatico

- Componente monoclonale sierica (IgG o IgA) ≥30 g/L o componente monoclonale urinaria ≥500 mg/24 ore e/o plasmacellule clonali^a midollari 10-60%
- Assenza dei criteri identificanti il MM

^aLa clonalità deve essere stabilita dimostrando una restrizione delle catene leggere *κ/λ* in citometria a flusso, immunostochimica o immunofluorescenza.

^bIl danno d'organo deve essere attribuibile alla proliferazione plasmacellulare; i criteri CRAB non si applicano se le plasmacellule midollari sono <10%.

^cQuesti valori sono basati su studi effettuati con il reagente Freelite (Binding Site) e non sono validati per concentrazioni di catene leggere libere ottenute con altri metodi.

eGFR, stima della velocità di filtrazione glomerulare; MDRD, "Modification on diet in renal disease"; CKD-EPI, "Chronic kidney disease-epidemiology collaboration"; CT, tomografia assiale computerizzata; PET, tomografia a emissione di positroni; MRI, risonanza magnetica.

Nota bene: il valore della S- Creatinina riportato nella tabella 2 è >177 $\mu\text{mol/L}$ e non mmol/L .

Bibliografia

1. Calдини A., Graziani M.S., Basile U., et al. Il contributo della diagnostica proteica nella gestione delle gammopatie monoclonali. *Biochim Clin* 2014;38:47-53
2. Dolci A., Vernocchi A. per il GdS proteine SIBioC . Aspetti metodologici nella ricerca e caratterizzazione delle componenti monoclonali nel siero. *Biochim Clin* 2012;36:84-89
3. Graziani m.S., Dolci A., Greco c., et al Indicazioni per la richiesta di elettroforesi sieroproteica. *Biochim Clin* 2008;32:48-51
4. Kyle RA, Durie BGM, Rajkumar SV et al. 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.
5. Berenson JR, Kenneth KC, Audell RA et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance: a consensus statement. *Br J Haematol* 2010;50:28-38.
6. Dimopoulos M, Kyle R, Fermand JP, et al. Guidelines for standard investigative workup: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 3. *Blood* 2011;117:4701-5.
7. 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* 2010;148:22-42
8. Lemoine A., Pham .P, Azouly D., Saliba F., Emile JF., Soffroy R., Broet P., Bismuth H., et al. Detection of gammopathy serum protein electrophoresis for predicting and managing therapy of lymphoproliferative disorder in 911 recipients of liver transplants *Blood* 2001; 98, 1332- 1338
9. Tsai DE., Aquil NA., Tomaszewski JE., et al. Serum protein electrophoresis abnormalities in adult solid organ transplant patients with posttransplant lymphoproliferative disorder. *Clin Transpl* 2005; 19(5):644-52
10. Tate J., Caldwell G., Daly J., et al. Recommendations for standardized reporting of protein electrophoresis in Australia and New Zealand .*Annals of Clinical Biochemistry* 2012; 49:242-56
11. Calдини A., Graziani M.S., Terreni A., et al. Indagine sulla modalità di refertazione dell'elettroforesi sieroproteica . *Biochim Clin* 2009;33:62-65
12. Dolci a., Vernocchi A. Aspetti metodologici nella ricerca e caratterizzazione delle componenti monoclonali nel siero *Biochimica Clinica*, 2012, 96:84-89
13. AA.VV . Catene leggere libere nel siero *Biochimica Clinica*, 2013; 37:344-437
14. Graziani MS., Merlini GP., Petrini C. Linee Guida per la ricerca della proteina di Bence Jones. *Biochimica Clinica* 2001;25:23-31
15. Graziani MS., Merlini GP., Petrini C. Guidelines for the analysis of Bence Jones Protein *Clin Chem Lab Med* 2003; 41(3):338-346
16. Dispenzieri A., Kyle R., Merlini G., et al International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in MM and related disorders. *Leukemia* 2009;23:215-24
17. Graziani MS., Calдини A., Basile U., et al Indicazioni per la misura delle principali proteine sieriche *Biochimica Clinica* 2012;36:244-267
18. Landgren O. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering myeloma: new insights into pathophysiology and epidemiology. *Ash education Book* 2010;1: 295-302
19. Rajkumar SV., Dimopoulos MA., Palumbo A., et al International Myeloma Working Group updated for diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncology* 2014 ;15:e538-48
20. Calдини A., Graziani MS. L'aggiornamento dei criteri per la diagnosi di mieloma multiplo da parte dell'International Myeloma Working Group" *Biochimica Clinica* 2015, 39:275-280

21. Infusino I.,Braga.,Paleari R., et al. Il JCTLM: la cooperazione internazionale per promuovere la standardizzazione dei risultati in Medicina di Laboratorio Biochimica Clinica 2011,35:377-381
22. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. Kidney Int Supp 2013;3:1-150
23. Graziani MS. Un aggiornamento delle linee guida internazionali per la valutazione e la gestione della malattia renale cronica. Biochimica Clinica 2013,38:32-38
24. Papa A., Buoro S., Marini A., et al Armonizzazione del referto ematologico con l'impiego di unità di misura conformi al SI Biochimica Clinica 2015;39:627-630
25. Merlini GP. Perché è importante identificare e segnalare le piccole componenti monoclonali Biochimica Clinica 2012; 36 : 25-28
26. Passerini G.,Basile U. Ricerca e caratterizzazione delle crioglobuline: indicazioni per un protocollo condiviso Biochimica Clinica 2010;34:218-222
- 27 . Bakker AJ, Slomp J, de Vries T, et al. Adequate sampling in cyioglobulinaemia: recommended warmly. Clin Chem Lab Med 2003;41:85-9
28. Shihabi ZK. Cryoglobulins: an important but neglected clinical test. Ann Clin Lab Sci 2006;36:395-408.

Documento elaborato da :

Caropreso Paola AOU Molinette - Baldi e Riberi Torino

Gariboldi Angela AOU Molinette - Baldi e Riberi Torino

Germano Laura OSP. Mauriziano Torino

Lombardo Federica AOU Molinette - Baldi e Riberi Torino

Napoli Patrizia ASL TO1 – Oftalmico/ Martini Torino

Nicolò Cinzia AOU S. Luigi di Orbassano (TO)

Patrucco Giovanna ASL Vercelli

Romito Alessandra ASL TO2 – Maria Vittoria Torino

Approvato da :

- Calcagno Lora AO SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo Alessandria
- Crespi Ilaria AOU Ospedale Maggiore di Novara
- Pagliano Rosanna ASL Asti

Supervisorì :

- Caldini Anna Lucia, Graziani Maria Stella per GdS Proteine SIBioC

Allegato A

- **Tracciato normale**
- All'ispezione visiva del tracciato elettroforetico NON si rilevano sospette componenti monoclonali
- Non si osservano componenti monoclonali. Per escluderne la presenza è tuttavia necessario richiedere anche l'immunofissazione su siero e su urine
- **Tracciato con alterazioni**
- si evidenzia la riduzione dell'albumina
- Possibile deficit/ eterozigosi dell' alfa1 antitripsina. Si suggerisce, se clinicamente indicato, di richiedere il dosaggio dell'alfa1 antitripsina.
- Ipergammaglobulinemia: se non c'è corrispondenza clinica si consiglia di eseguire il test di immunofissazione su siero e la ricerca della BJ.
- Quadro oligoclonale : si consiglia rivalutazione tra 30 gg
- **Al primo riscontro:**
- Sospetta presenza di componente monoclonale in zona gammaglobulinica / beta, alfa : segue immunofissazione per conferma.
- **Dopo immunofissazione / tipizzazione :**
- componente monoclonale IgG –kappa/ lambda (e così le altre)
- Presenza di catene leggere monoclonali di classe kappa/lambda: si consiglia la ricerca della proteinuria di Bence Jones
- non si osserva la presenza di alcuna componente monoclonale
- Ricerca componenti monoclonali (immunosottrazione/ immunofissazione):negativa
- Ricerca componenti monoclonali (immunosottrazione/ immunofissazione):test non concludente; si consiglia rivalutazione tra 30-60 gg
- Presenza di componente monoclonale p.es. (IgA Kappa). Poichè la CM comigra con le beta 1 o 2 globuline, la quantificazione non è indicativa della sua effettiva entità.
- presenza di componente M es. IgG kappa. In considerazione della marcata ipergammaglobilemia policlonale , la quantificazione non rispecchia la sua reale entità.
- Presenza di componente monoclonale precedentemente tipizzata (IgG Kappa)

Allegato B

- Ricerca di proteina di BENICE JONES :**negativa** (specificare metodo)
-
- Ricerca di proteina di BENICE JONES: **positiva per presenza** di catene libere tipo K / o λ
- Quantificazione PBJ:mg/24h .