

NOTE DE CURS

Diagnosticul imunochimic al gamapatiilor monoclonale

Immunochemical diagnostic of monoclonal gammopathies

Ileana Funduc*

Rezumat

Gamapatiile monoclonale constituie un grup de tulburări caracterizat prin proliferarea unei singure clone de plasmocite care produce o proteină monoclonală omogenă (proteina „M”). O varietate largă de tehnici sunt folosite pentru testarea și cuantificarea proteinelor monoclonale. După ce sunt enumerate bolile în care proteina monoclonală ar trebui analizată, este descrisă succesiunea optimă a testării imunochimice pentru diagnosticarea și monitorizarea acestor pacienți, cu cele mai eficiente metode de analiză de laborator.

Cuvinte cheie: proteină monoclonală, electroforeză, imunochimie

Abstract

The monoclonal gammopathies constitute a group of disorders characterized by the proliferation of a single clone of plasma cells that produces a homogenous monoclonal protein („M”-protein). A wide variety of techniques are available for the screening characterization and quantification of monoclonal proteins. After the enumeration of the diseases in which a monoclonal protein should be analyzed, the optimal sequence of immunochemical testing to diagnose and monitor these patients with the most effective laboratory analyses methods is described.

Key words: monoclonal protein, electrophoresis, immunochemistry

INTRODUCERE

Gamapatiile monoclonale constituie un grup de tulburări caracterizate prin proliferarea unei singure clone de plasmocite care produce o proteină monoclonală omogenă (așa-numitul component monoclonal sau para-proteină „M”). Determinarea calitativă și cantitativă a compo-

nentului monoclonal este extrem de importantă pentru diagnostic, evaluarea masei tumorale, a evoluției bolii și a răspunsului la terapie.

Bolile în care apar componentii monoclonali sunt⁶:

- mielomul multiplu,
- macroglobulinemia Waldenström,

*Adresa pentru corespondență: Barajul Uzului 2, bloc Y16, scara A, apt.18, sector 3, 032796, București.
Tel.: 0724 210670, Fax: 021 3407668, E-mail: fmzg@xnet.ro

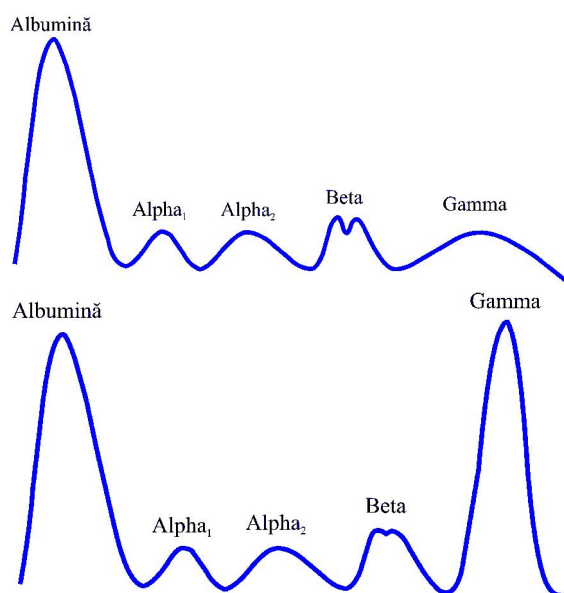


Figura 1 Traseu densitometric rezultat în urma electroforezei proteinelor unui ser normal (sus) și a unui ser de la un pacient cu gamapatie monoclonală (jos)⁶.

- amiloidoza,
- boala lanțurilor ușoare,
- boala lanțurilor grele,
- unele limfoproliferații maligne B.

Este extrem de important să se facă diferența între un component monoclonal și unul policlonal. Apariția componentului monoclonal este asociată de un proces malign sau potențial malign, în timp ce prezența unui component policlonal se datorează unui proces inflamator sau reactiv. Structural, componentul monoclonal este caracterizat prin prezența unui singur tip de lanț ușor (κ sau λ), spre deosebire de cel policlonal în care sunt prezente ambele tipuri de lanțuri ușoare (κ și λ). Vizualizarea pe traseul electroforetic de asemenea diferă, componentul monoclonal apărând sub forma unei bandări înguste, bine limitate, spre deosebire de cea a componentului policlonal, în care bandarea care este largă și difuză.

Analiza serului trebuie să fie efectuată prin metode sensibile și rapide de detectare și evaluare a prezenței para-proteinei „M”, respec-

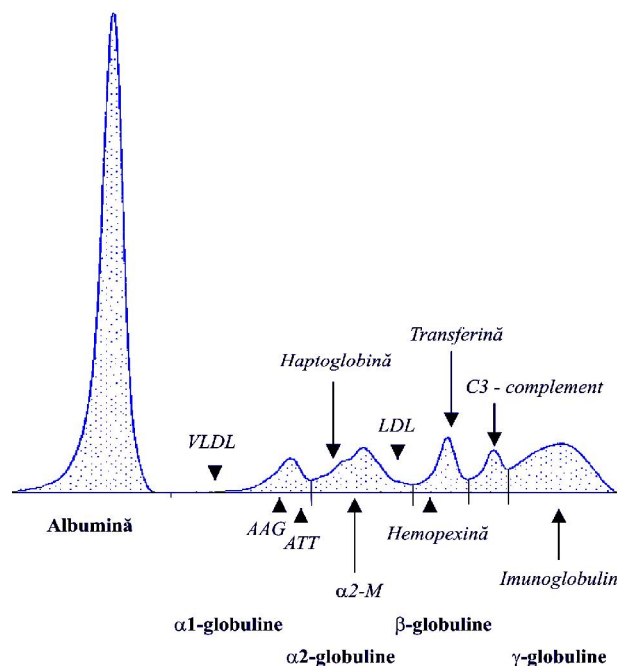


Figura 2 Traseu densitometric rezultat în urma electroforezei capilare a proteinelor dintr-un ser normal (6 fracțiuni)⁴

tiv a tipului de lanț greu și ușor.

METODELE UTILIZATE PENTRU IDENTIFICAREA ȘI EVALUAREA COMPONENTULUI MONOCLONAL

METODE BIOCHIMICE

Electroforeza zonală în gel implică migrarea proteinelor într-un câmp electric.

Migrarea electroforetică este dependentă de mulți factori :

- punctul izoelectric al moleculei de separat;
- concentrația și pH-ul tamponului;
- caracteristicile gelului;
- temperatura gelului în timpul migrării;
- caracteristicile curentului aplicat;
- colorantul folosit.

Electroforeza cu rezoluție scăzută se-

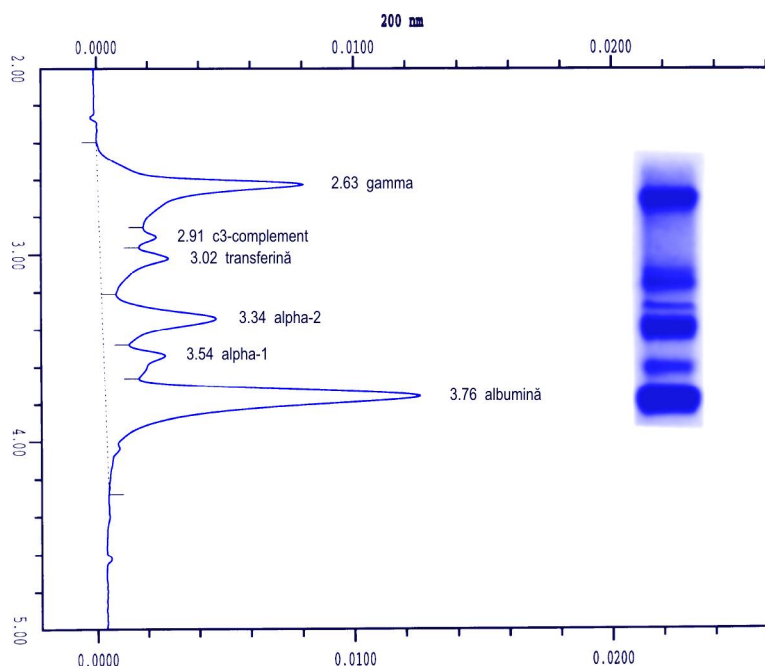


Figura 3 Electroforeza capilară zonală a unui ser cu component monoclonal⁵

pară 5 fracțiuni⁶(Figura 1), extremele anodice și catodice sunt mai puțin distincte, nu controlează temperatura în timpul migrării (creșterea acesteia afectează rezoluția), componenții mici pot comigra cu alte fracțiuni proteice.

Electroforeza de înaltă rezoluție⁴ separă 6 fracțiuni (desparte β în β_1 - transferină și β_2 - C'3) (Figura 2), depistează componenții monoclonali de toate mărimile, controlează temperatura, grosimea gelului și modul de aplicare a probei.

Electroforeza automată are prevăzut un sistem de răcire pentru reglarea temperaturii, iar operațiunile de aplicare, fixare, colorare, spălare și densitometrie se efectuează automat.

Separarea electroforetică se finalizează prin scanarea densitometrică a gelului, obținându-se valorile relative ale fracțiunilor separate în raport cu suma lor. Evaluarea densitometrică permite izolarea componentului monoclonal pe un fond policlonal, dar nu face față în ca-

zul în care mobilitatea acestuia este identică cu cea a unei fracțiuni non-monoclonale.

Colorantul are afinitate diferită față de diferitele fracțiuni electroforetice, ceea ce face ca răspunsul densitometric să nu fie linear.

Electroforeza capilară^{1,5} (Figura 3), ușor mai sensibilă decât electroforeza de înaltă rezoluție, permite efectuarea unui număr mare de determinări într-o perioadă scurtă de timp, nu necesită suport și trepte intermediare (fixare, colorare, spălare), iar evaluarea finală se face în spectrul U.V.

Electroforeza proteinelor serice poate prezenta unele limite datorate tipului de electroforeză folosit, a pregătirii preanalitice incorecte a probei supuse separării sau a prezenței diversilor componenți din amestecul de separat. Gay-Bellile și col.² prezintă, de exemplu, diferența rezultatelor migrării aceluiași ser prin două tipuri de electroforeză (Figura 4).

Componentul monoclonal poate fi omis în diverse situații:

- comigrarea cu o altă fracțiune proteică;
- includerea într-o crioglobulină și pierderea prin coagulare și centrifugare sau precipitarea pe start;
- polimerizarea în complexe mari (lanț greu α în boala lanțurilor grele) și vizualizare sub forma unei pete difuze, diferite de o bandă îngustă bine delimitată.

În alte situații, componentul monoclonal poate fi asimilat cu o bandă care nu are nimic comun cu un component monoclonal:

- prezența în concentrații crescute a proteinei C reactive situată la extrema catodică a zonei γ , atunci când se folosesc tamponuri care conțin Ca^{2+} ;
- prezența fibrinogenului în zona

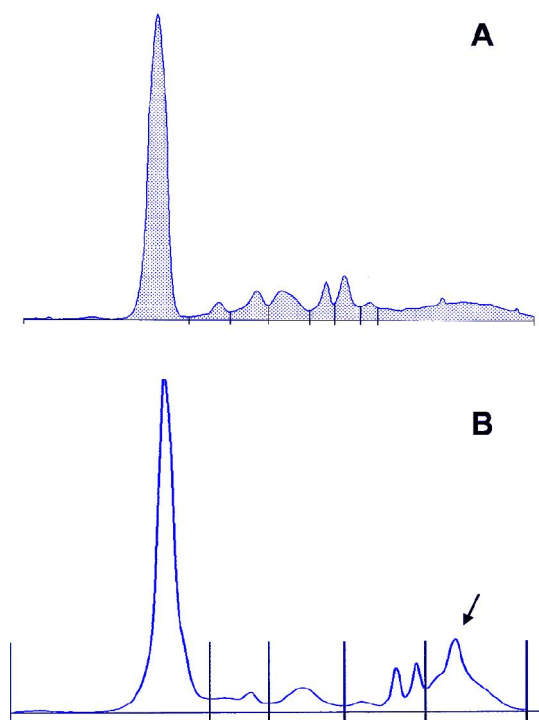


Figura 4. Electroforeza unui ser cu o proteină monoclonală. (A) Electroforeză în gel de agaroză: proteina M din zona γ aproape că nu se distinge; (B) Electroforeză capilară: proteina monoclonală se poate vizualiza (vezi săgeata)²

anodală γ în cazul unei coagulări incomplete sau anormale;

- contaminarea bacteriană a probeilor sau înghețarea și dezghețarea repetată, pot conduce la apariția fragmentelor IgGfc care dau bandări în zona γ ;
- prezența complexelor imune circulante se vizualizează prin una sau mai multe bandări (factorul reumatoid IgM monoclonal complexat cu IgG policlonal – crioglobuline de tip II);
- prezența altor proteine (transferină, C'3).

METODE IMUNOCHIMICE¹

Imunelectroforeza este o metodă calitativă, laborioasă, subiectivă și tot mai rar utili-

zată.

Imunofixarea, metodă calitativă, care în cazul unei suspiciuni se efectuează obligatoriu chiar dacă pe electroforeză nu apare componentul monoclonal. Mai sensibilă decât electroforeza, această analiză odată făcută, nu se mai repetă, decât dacă se modifică aspectul calitativ al migrării electroforetice sau pentru confirmarea remisiunii complete. Cu ajutorul antiserurilor specifice, ea tipează componentul monoclonal din punct de vedere al lanțului greu și ușor.

Dificultatea majoră a acestei metode – și, de fapt, a tuturor metodelor ce identifică componentul monoclonal cu ajutorul antiserurilor specifice – este determinarea diluției optime pentru detectarea acestuia: prezența unei paraproteine „M” în concentrație mică se poate omite dacă diluția serului este prea mare, iar prezența unui component masiv mono- sau policlonal ar putea conduce la un efect de exces de anticorpi, când complexele imune mici sunt spălate.

Dacă antiserul nu este specific, se pot obține rezultate fals pozitive datorită reacției cu alte proteine sau prin faptul că nu poate diferenția componenții monoclonali de cei policlonali.

Componentul monoclonal se poate tipa și evalua prin procedeul de **imunoeliminare**² – metodă indirectă, complet automată, care constă în incubarea serului cu paturi de Sefaroză cuplate cu antiserurile corespunzătoare, după care supernatantele se reanalizează pentru a determina reactivul care elimină anomalia electroforetică (Figura 5).

Imunodifuzia radială este o metodă cantitativă subiectivă, limitată, care se aplică din ce în ce mai puțin.

Turbidimetria și nefelometria, metodele cele mai fidele în prezent, se bazează pe sisteme de detectare optice ce măsoară concentrația particulelor foarte mici suspendate într-un lichid. Punerea în contact a unui antigenului cu anticorpii corespunzători duce la formarea unui complex imun în suspensie. Lumina care trece prin cuveta de reacție este difractată cu un anu-

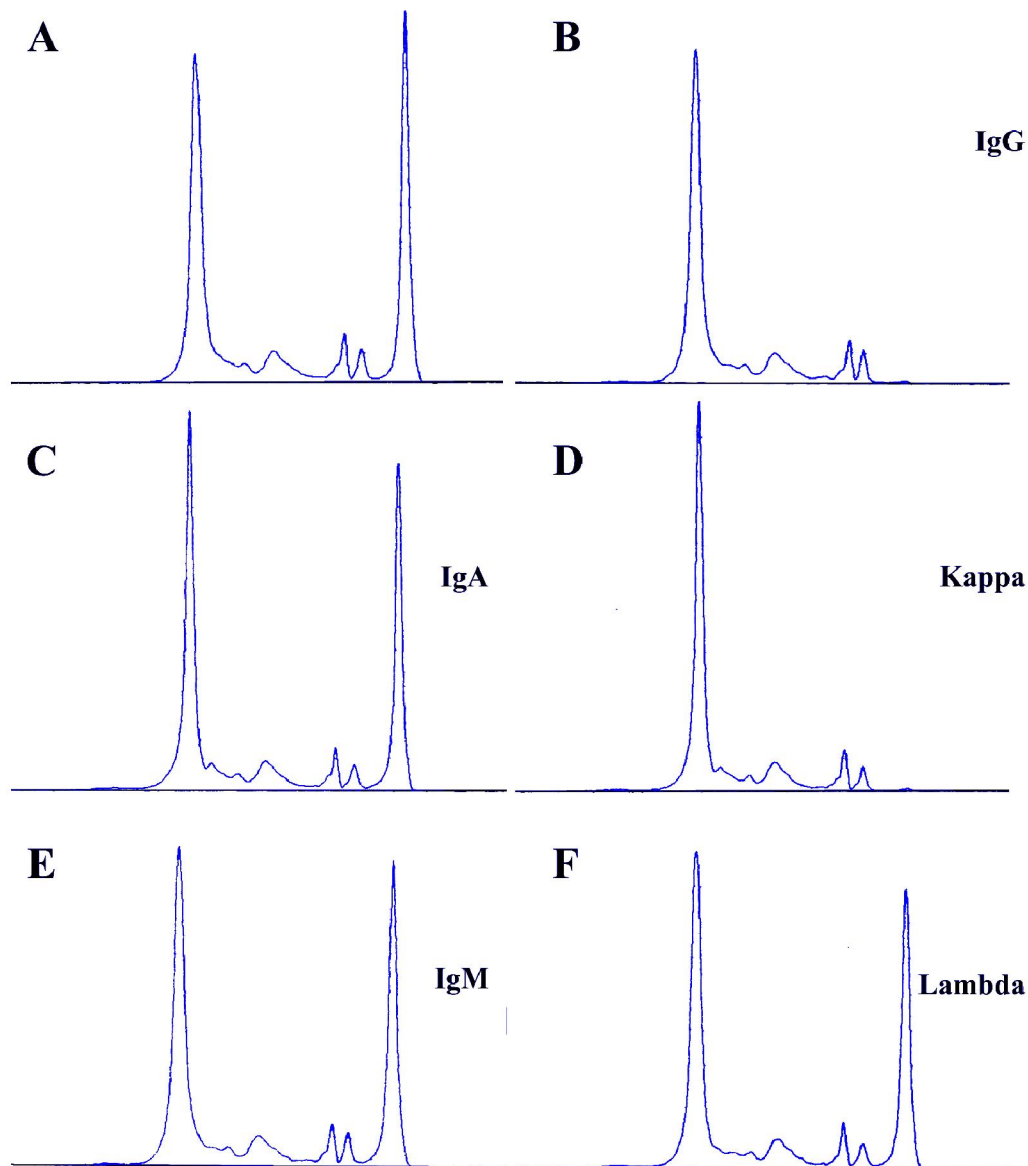


Figura 5. Exemplu de imunoeliminare în cazul unui ser cu IgG monoclonal tip κ localizat în zona γ . Serul de control netratat (A) a fost supus acțiunii a 5 anticorpi monoclonali, respectiv pentru lanțurile grele γ , α , μ (B,C,E) și de lanțuri ușoare κ și λ (D,F). Dispariția (imunoeliminarea) bandării din zona γ (B) și a lanțului κ (D) a indicat tipul componentului monoclonal (IgG κ)⁵.

mit unghi față de axa optică, în funcție de mărimea complexului imun și de lungimea de undă a luminii. În același timp, o parte mai puțin semnificativă se va transmite.

Turbidimetria se bazează pe principiul

măsurării intensității luminii transmise. Nefelometria se bazează pe principiul măsurării intensității luminii dispersate. Reacțiile imunochimice din cuvete sunt identice atât în turbidimetrie cât și în nefelometrie; doar principiul de detec-

tare diferă.

Nefelometria nu este un test screening, ci o metodă adjuvantă. Ea se efectuează doar în prezența clară a unei proteine M.

Bolnavilor cu sensibilitate la frig trebuie să li se determine crioglobulinele³, căci în compoziția lor intră cel mai frecvent, sub formă de component monoclonal, IgM. Aceste proteine sunt solubile la 37°C, reprecipită la rece și procesul este reversibil. Sângele este recoltat și transportat la 37°C și serul separat se menține la 4°C timp de 7 zile. Dacă, după acest interval, se observă un precipitat clar care se dizolvă la cald, este vorba de crioglobuline, care se vor cuantifica și caracteriza imunochimic după solubilizare.

Cele arătate mai sus constituie doar o parte din analizele necesare diagnosticării unei gamapatii monoclonale. Verdictul final îl dă numai medicul clinician, care are capacitatea de a corela toate datele clinice și de laborator legate de această maladie pentru a emite un diagnostic corect.

Bibliografie

1. Attaelmann M., Levinson S.S. – Protein Electrophoresis – Clin.Chem. 2000; 46; 1230-1238.
2. Bossuyt X., Mariën G. – False-Negative Serum Protein Electrophoresis in a sample with an IgM Monoclonal Protein by Semiautomated Gel Electrophoresis – Clin.Chem.2005; 51; 270.
3. Funduc I., Derșidan M., Dima I. – Principii și metode de analiză a crioglobulinelor. În: Păun R. – Tratat de Medicină Internă Hematologie partea II-a – București : Editura Medicală, 1999: 1186-1190.
4. Gay-Bellile C., Bengoufa D., Houze P et al. - Automated Multicapillary Electrophoresis for Analysis of Human Serum Proteins – Clin. Chem.2003; 49; 1909-1915
5. Henskens Y.M.C., van Diejen-Visser M.P. – Capillary zone electrophoresis as a tool to detect proteins in body fluids: reproducibility, comparison with conventional methods and a review of the literature – Ned Tijdschr Klin. Chem. 2000; 25; 219-229.
6. O'Connell T.X., Horita T.J., Kasravi B. – Understanding and interpreting serum protein electrophoresis – American Family Physician 2005; 1; 105-112.