

Obtížně interpretovatelné nálezy elektroforéz a imunofixací u pacientů s mnohočetným myelomem po autologní transplantaci

Kušnierová P.^{1,2}, Zeman D.^{1,2}, Šigutová, R.^{1,2}, Švagera Z.^{1,2}, Zahradová L.^{3,4}, Hájek R.^{3,4}

¹Ústav laboratorní diagnostiky, Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice Ostrava

²Katedra biomedicínských oborů, Lékařská fakulta, Ostravská univerzita

³Klinika hematooonkologie, Fakultní nemocnice Ostrava

⁴Katedra interních oborů, Lékařská fakulta, Ostravská univerzita

SOUHRN

Cíl studie: studium abnormálních gradientů včetně nových monoklonálních imunoglobulinů a oligoklonálních pásů u pacientů s mnohočetným myelomem po autologní transplantaci.

Typ studie: retrospektivní analýza

Materiál a metody: Do studie bylo zařazeno 100 pacientů Kliniky hematooonkologie Fakultní nemocnice Ostrava s diagnostikovaným mnohočetným myelomem po autologní transplantaci od listopadu 2013 do srpna 2016. K identifikaci a kvantifikaci paraproteinů byla použita standardní elektroforéza sérových proteinů a imunofixační elektroforéza. V případě nejasného nálezu byla doplněna izoelektrická fokusace v agarózovém gelu s následným afinitním imunoblottingem.

Výsledky: Změny v imunofixačním nálezu byly pozorovány průměrně po dvou měsících (rozmezí 1-8 měsíců) po autologní transplantaci u 46 % pacientů. U šesti z nich (13 %) byla pozorována změna izotypu, u 17 (37 %) přechodný průkaz oligoklonality, u 23 (50 %) změna izotypu a současně přechodný průkaz oligoklonality. K návratu k původnímu imunofixačnímu nálezu došlo průměrně za 14 měsíců (rozmezí 4-32 měsíců) od autologní transplantace.

Závěr: Průkaz nových monoklonálních gradientů či přechodná přítomnost oligoklonálních pásů u pacientů po autologní transplantaci pravděpodobně představuje přechodný jev související s obnovou produkce imunoglobulinů bez známek negativního klinického významu a relapsu onemocnění.

Klíčová slova: elektroforéza sérových proteinů, imunofixační elektroforéza, izoelektrická fokusace, monoklonální imunoglobulin, oligoklonalita, mnohočetný myelom.

SUMMARY

Kušnierová P., Zeman D., Šigutová, R., Švagera Z., Všíanský F., Zahradová L., Hájek R.: Interpretation difficulties in electrophoresis and immunofixation findings in patients with multiple myeloma after autologous transplantation

Objective: The study of abnormal gradients including new monoclonal immunoglobulins and oligoclonal bands in patients with multiple myeloma after autologous transplantation

Design: Retrospective study.

Material and Methods: 100 multiple myeloma patients after autologous transplantation between November 2013 and August 2016 from the Clinic of Haematooncology, University Hospital Ostrava, were included in the study. For the identification and quantification of paraproteins, standard serum protein electrophoresis and immunofixation electrophoresis were used. Exceptionally, in case of equivocal results, agarose isoelectric focusing with subsequent affinity-mediated immunoblotting was performed.

Results: Changes in immunofixation result were observed 2 months (mean; range 1-8 months) after the autologous transplantation in 46 % of patients. In 6 (13 %) of them isotype switch was observed, in 17 (37 %) transient oligoclonal profile, and in 23 (50 %) isotype shift as well as transient oligoclonal profile. Return towards the original immunofixation result was observed 14 months (mean; range 4-32 months) after the autologous transplantation.

Conclusion: Observation of new monoclonal gradients or transient presence of oligoclonal bands in patients after autologous transplantation probably represents a transient phenomenon linked to the recovery of immunoglobulin production without any negative clinical significance in sense of a disease relapse.

Keywords: serum protein electrophoresis, immunofixation electrophoresis, isoelectric focusing, monoclonal immunoglobulin, oligoclonality, multiple myeloma.

Úvod

Mnohočetný myelom je charakterizován klonální proliferací plazmatických buněk a produkcí monoklonálního imunoglobulinu konstantního izotypu a konkrétního lehkého řetězce, tzv. paraproteinu. Změna izotypu paraproteinu nebo přechodná přítomnost oligoklonálních

pásů je často popisována po alogenní i autologní transplantaci a také po intenzivní chemoterapii u pacientů s leukémií [1-6]. Příčinou může být změna v produkci paraproteinu maligními plazmatickými buňkami, vznik druhého maligního klonu nebo se může jednat o dočasný následek myeloablativní terapie [4,7,8]. Přechodná přítomnost abnormálních gradientů/oligo-

klonálních pásů může představovat značný problém pro laboratoř provádějící interpretaci elektroforetických nálezů.

Metodika

Do studie bylo zařazeno 100 pacientů z Kliniky hematologie Fakultní nemocnice Ostrava s diagnostikovaným mnohočetným myelomem po autologní transplantaci v období listopad 2013 až srpen 2016. K identifikaci a kvantifikaci paraproteinů byla použita standardní elektroforéza sérových proteinů (Hydragel 30 Protein β 1- β 2, kat. č.: S-4141, SEBIA) a imunofixací elektroforéza (Hydragel 4 IF, kat. č.: S-4804, SEBIA), doplněné o stanovení polyklonálních imunoglobulinů (N Antisera to Human Immunoglobulins IgG, IgA and IgM, kat. č. OSAS, OSAR, OSAT, Siemens) a stanovení volných lehkých řetězců (Freelite Kappa SPA PLUS kit, kat. č. LK016.L.S; Freelite Lambda SPA PLUS kit, kat. č. LK018.L.S. The Binding Site Ltd.). V případě nejasného nálezu, popř. podezření na paraprotein tvořený pouze volnými lehkými řetězci byla provedena imunofixace s těžkými řetězci γ , α , μ , δ , ϵ a příslušnými lehkými řetězci κ , free κ , λ , free λ , případně doplněna izoelektrická fokusace v agarózovém gelu s následným afinitním imunoblotingem (IEF/AIB, modifikovaná in-house metoda C. J. Sindica) [9-12]. Ke statistickému zpracování dat byl použit program MedCalc, verze 16.1.2.

Table 1: Paraprotein characterization at initial diagnosis in 100 patients with multiple myeloma

Ig	No. of Patients
IgG κ	42
IgG κ & free κ	4
IgG λ	13
IgG λ & free λ	8
IgA κ	10
IgA λ	7
IgA λ & free λ	3
IgM λ & free λ	1
Free κ	7
Free λ	5

Table 2: Number of patients with apparent isotype switch

Year	N	Isotype unchanged	Isotype change
2013	7	5	2
2014	23	10	13
2015	37	17	20
2016	33*	12	8

*13 patients were evaluated with regard to short term monitoring of patients after autologous transplantation

Výsledky

Do studie bylo zařazeno 45 % žen (N = 45; medián věku $61,1 \pm 8,1$ let) a 55 % mužů (N = 55; medián věku $60,9 \pm 7,1$ let). Přehled typu paraproteinů v době stanovení diagnózy je uveden v Tabulce 1. Změny v imunofixačním nálezu byly popsány u 46 % pacientů (N = 46). U 13 % (6 pacientů) byla pozorována změna izotypu paraproteinu, u 37 % (17 pacientů) přechodný průkaz oligoklonality a u 50 % (23 pacientů) změna izotypu a přechodná přítomnost oligoklonálních pásů, Tabulka 2, obr. 1 3. Medián intervalu identifikace odlišného paraproteinu/oligoklonálních pásů od původního nálezu na imunofixaci po autologní transplantaci byl 2 měsíce (rozmezí 1-8 měsíců), medián intervalu návratu k původnímu nálezu na imunofixaci byl 14 měsíců (rozmezí 4-32 měsíců). Nicméně je zde nutno zohlednit krátkou dobu sledování pacientů po provedené autologní transplantaci (zahájení autologních transplantací ve Fakultní nemocnici Ostrava od 2. pol. roku 2013). Kaplan-Meierova analýza přežití vzhledem k přítomnosti/nepřítomnosti abnormálních gradientů nevykazuje statisticky významný rozdíl mezi oběma studovanými skupinami (P = 0,5887), obr. 4.

Diskuse

Tato práce potvrzuje výskyt odlišných typů monoklonálních imunoglobulinů, popř. přechodnou přítomnost oligoklonálních pásů u pacientů s mnohočetným myelomem po autologní transplantaci. Také Mitus a kol. [1] popisují přechodné oligoklonální a monoklonální gamapatie u více než 50 % pacientů po alogenní a syngenní transplantaci kostní dřeně průměrně za 84 dnů po transplantaci přetrvávající průměrně 175 dnů. Zent a kol. [4] oproti tomu publikovali, že 10 % (55) pacientů mělo přítomné abnormální proteinové pásy, z toho 48 pacientů oligoklonální pásy a 23 z nich popsanou změnu izotypu paraproteinu (16 mělo přítomné jak oligoklonální pásy, tak paraprotein odlišného izotypu). Nicméně morfologická vyšetření a průtoková cytometrie neprokázaly u této skupiny pacientů změnu izotypu klonálních plazmatických buněk. Současně i Hovenga a kol. se zabývali podobnou problematikou [7]. U 73 % pacientů pozorovali nové oligoklonální a monoklonální pásy tři měsíce po autologní transplantaci. Převažovaly typy IgG λ a IgG κ . U 48 % případů vymizely oligoklonální pásy průměrně za 22 měsíců po transplantaci, zatímco u 52 % případů přetrvával výskyt oligoklonálních pásů 31 měsíců. Také Maisnar a kol. [5] publikovali přítomnost abnormálních proteinových pásů u 43 % pacientů s mediánem dva měsíce (rozmezí 1 až 6 měsíců) po autotransplantaci. Popsané rozdíly ve frekvenci výskytu abnormálních proteinových pásů mezi našimi výsledky a výsledky jednotlivých výzkumných skupin pravděpodobně souvisí se sensitivitou používaných analytických metod a příslušných diagnostických souprav.

Dále jsme srovnávali délku přežití pacientů v závislosti na přítomnosti/nepřítomnosti abnormálních gradientů/oligoklonálních pásů. Na rozdíl od výše citovaných

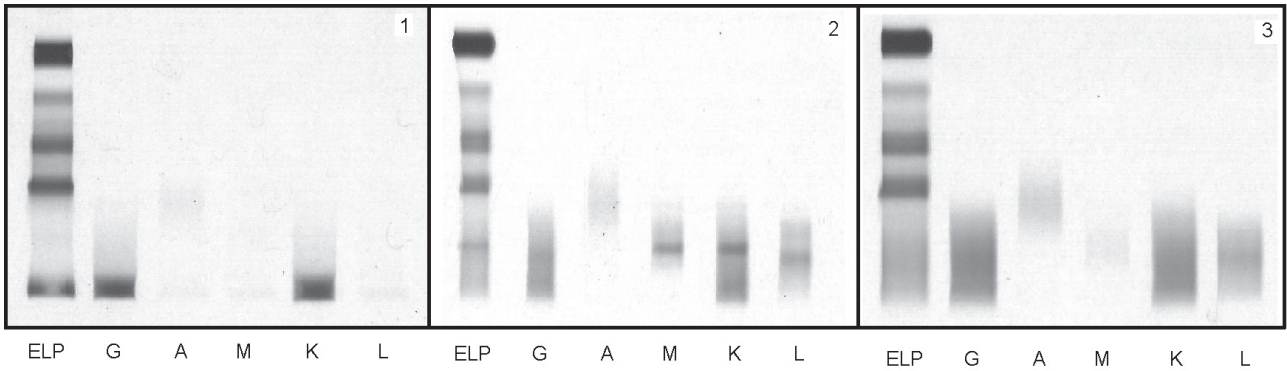


Fig. 1. Ig isotype switching in patient after autologous transplantation;
 1 The findings of the immunofixation electrophoresis at initial diagnosis – monoclonal protein IgG κ
 2 Five months after autologous transplantation – monoclonal protein IgM κ & free λ (2 gradients)
 3 Eleven months after autologous transplantation - negative finding

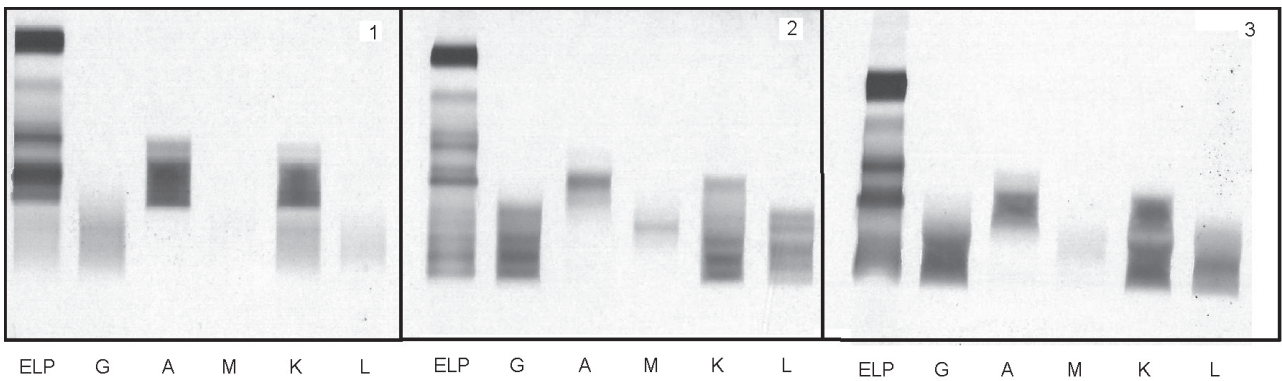


Fig. 2. Transient presence of oligoclonal bands in patient after autologous transplantation;
 1 The findings of the immunofixation electrophoresis at initial diagnosis – monoclonal protein IgA κ
 2 Four months after autologous transplantation – initial monoclonal protein IgA κ and oligoclonal bands
 3 Nine months after autologous transplantation - original monoclonal immunoglobulin IgA κ

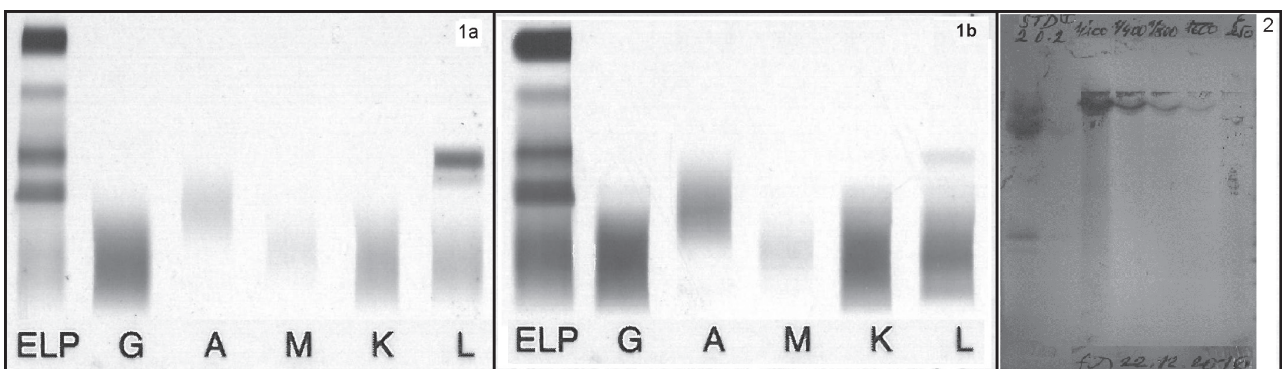


Fig. 3. Patient with paraprotein composed of monoclonal free light chains lambda. The findings of the immunofixation electrophoresis at initial diagnosis (1a), immunofixation with anti-IgD and anti-IgE antisera was negative, and positive reaction was observed with anti-free lambda antiserum (not shown); reappearance of monoclonal free lambda band, barely visible by immunofixation (1b) but clearly demonstrated using isoelectric focusing even at 1/1600 dilution of serum (2).

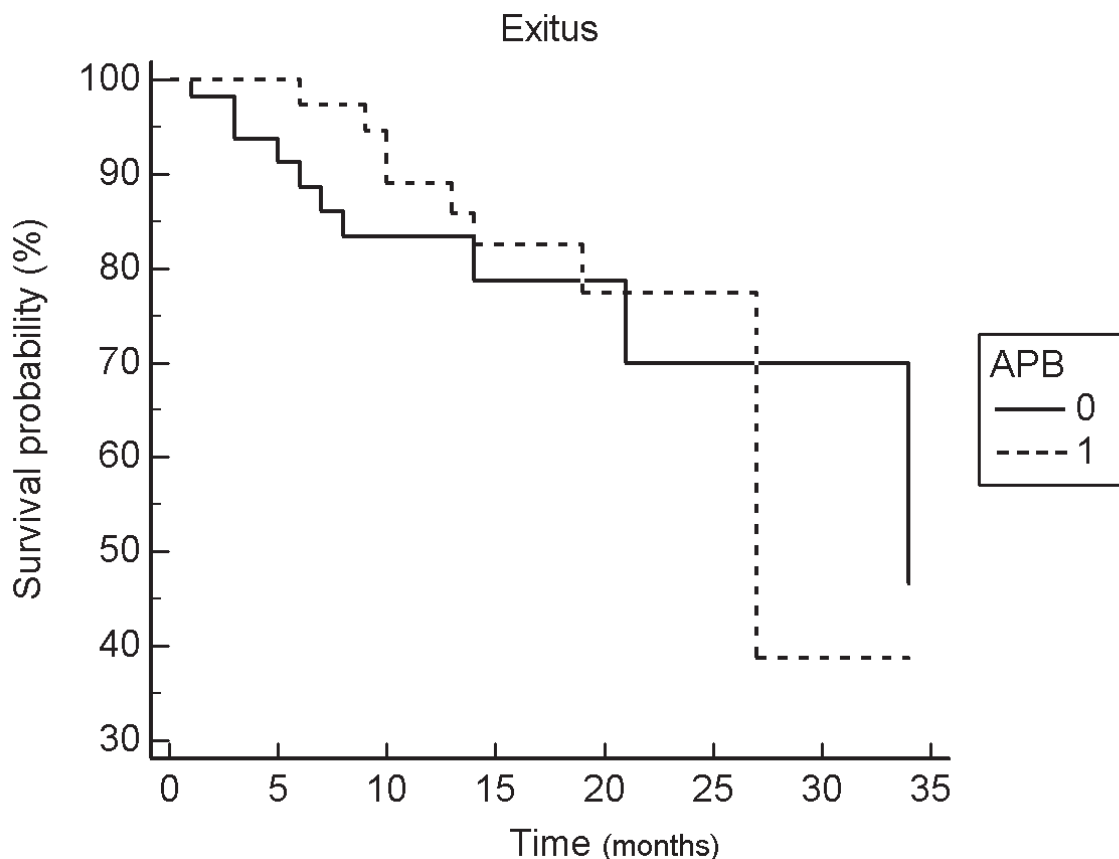


Fig. 4. Kaplan – Meier survival curves according to the presence (1) or absence (0) of abnormal protein bands (APB) on immunofixation electrophoresis

práci jsme neprokázali statisticky významný rozdíl mezi oběma skupinami, což může souviset i s poměrně krátkým intervalem studovaných pacientů po podstoupené autologní transplantaci.

V současné době se setkáváme s těmito nálezy čím dál častěji. Je velmi důležité odlišit přítomnost původního monoklonálního gradientu od nových abnormálních pásů především v gama-migrační zóně. Pokud nemáme k dispozici původní informaci o elektroforetické pohyblivosti, izotypu paraproteinu a třídě lehkých řetězců, může dojít k chybnému přiřazení denzitometricky vyhodnocené koncentrace anomálního gradientu původnímu paraproteinu. Tento fakt vyžaduje archivaci gelů za účelem srovnání. Ve většině případů pak takovéto nálezy popisujeme jako průkaz nového/odlišného anomálního gradientu (od původního paraproteinu), popř. více gradientů migrujících v příslušných zónách - oligoklonální profil anebo zdůrazníme přítomnost původního monoklonálního imunoglobulinu a popíšeme výskyt dalších diskrétních anomálních gradientů příslušné třídy a typu s poznámkou, že klinický význam těchto přechodně se vyskytujících pásů není zcela jasný.

Závěr

Průkaz nových anomálních gradientů nebo oligoklonálních pásů po autologní transplantaci u pacientů s mnohočetným myelomem je běžný a podle citovaných studií nemá pravděpodobně žádný negativní

klinický význam a neměl by být považován za známku relapsu onemocnění. Přesto je nutno poskytovat klinickým pracovníkům podrobnou informaci o jejich výskytu, neboť nelze vyloučit, že v některých případech může dojít ke skutečnému relapsu se změnou izotypu monoklonálního imunoglobulinu.

Poděkování

Ráda bych poděkovala Ing. F. Všianskému za pomoc při statistickém zpracování dat.

Literatura

1. **Mitus, A. J., Stein, R., Rapoport, J. M. Antin, J. H., Weinstein, H. J., Alper, C. A., Smith, B.R.** Monoclonal and oligoclonal gammopathy after bone marrow transplantation. *Blood*, 1989, 74, p. 2764–2768.
2. **Gerritsen, E. J. A., Van Tol, M. J. D., Lankester, A. C., van der Weijden-Ragas, C. P. M., Jol-van der Zijde, C. M., Ouderman-Gruber, N. J., Radl, J., Vossen, J.M.** Immunoglobulin levels and monoclonal gammopathies in children after bone marrow transplantation. *Blood*, 1993, 82, p. 3493–3502.
3. **Gerritsen E. J. A. Van Tol, M. J. D., Van't Veer, M. B., Wels, J. M. A., Khouw, I. M. S. L., Touw, C. R., Jol-van der Zijde, C. M., Hermans, J., Rumke, H. C., Radl, J., Vossen, J. M.** Clonal dysregulation of the antibody response to tetanus-toxoid after bone marrow transplantation. *Blood*, 1994, 84, p. 4374-4382.

4. **Zent, C. S., Wilson, C. S., Tricot, G., Jagannath, S., Siegel, D., Desikan, K. R., et al.** Oligoclonal protein bands and Ig isotype switching in multiple myeloma treated with high-dose therapy and hematopoietic cell transplantation. *Blood*, 1998, 91, p. 3518–3523.
5. **Maisnar, V., Tichý, M., Smolej, L., Zák, P., Radocha, J., Palička, V., Malý, J., Bláha, V.** Isotype class switching after transplantation in multiple myeloma. *Neoplasma*, 2007, 54(3), p. 225–228.
6. **Hall S. L., Tate, J., Gill, D., Mollee, P.** Significance of abnormal protein bands in patients with multiple myeloma following autologous stem cell transplantation. *Clin. Biochem. Rev.*, 2009, 30, p. 113–118.
7. **Hovenga, S., de Wolf, J. T., Guikema, J. E., Klip, H., Smit, J. W., Smit Sibinga, C. T.** Autologous stem cell transplantation in multiple myeloma after VAD and EDAP courses: a high incidence of oligoclonal serum Igs post transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, 2000, 25, p. 723–728.
8. **Guikema, J. E., Vellenga, E., Veeneman, J. M., Hovenga, S., Bakkus, M. H., Klip, H., et al.** Multiple myeloma related cells in patients undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.*, 1999, 104, p. 748–754.
9. **Sindic, C. J., Laterre, E. C.** Oligoclonal free kappa and lambda bands in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other neurological diseases. An immunoaffinity-mediated capillary blot study. *J. Neuroimmunol.*, 1991, 33, p. 63–72.
10. **Zeman, D., Vaníčková, Z., Benáková, H., Havrdová, E.** Volné lehké řetězce typu kappa v likvoru a seru. *Klin. Biochem. Metab.*, 2002, 10(31), p. 98–102.
11. **Nováčková, L., Zeman, D.** Detection of oligoclonal IgG bands in cerebrospinal fluid and serum: comparison between commercial immunofixation method and homemade affinity immunoblotting method and evaluation of interobserver agreement. *Klin. Biochem. Metab.*, 2011, 19(40), p. 229–233.
12. **Zeman, D., Hradílek, P., Kušnierová, P. et al.** Oligoclonal free light chains in cerebrospinal fluid as markers of intrathecal inflammation. Comparison with oligoclonal IgG. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc, Czech Repub.* 2015, 159, p. 104–114.

Do redakce došlo 17. 1. 2017

Adresa pro korespondenci:
RNDr. Pavlína Kušnierová, Ph.D.
Oddělení klinické biochemie,
Ústav laboratorní diagnostiky
Fakultní nemocnice Ostrava
17. listopadu 1790, 708 52 Ostrava-Poruba
e-mail: pavlina.kusnierova@fno.cz