

Gammopatie monoclonali di significato renale: ruolo della medicina di laboratorio

A cura di Martina Zaninotto

La definizione di “gammopatia monoclonale di significato renale” introdotta nell’ambito della diagnostica clinica nel 2012 dall’International Kidney and Monoclonal Gammopathy Research Group (IKMG) e successivamente aggiornata nel 2017 (1,2), prevede un algoritmo diagnostico nel quale il “gold standard” è rappresentato dalla biopsia renale e da indagini in immunofluorescenza che consentono di identificare i depositi di immunoglobulina monoclonale, ma nel contempo definiscono anche le indagini di laboratorio necessarie a supportare la diagnosi e a monitorare l’efficacia della terapia.

L’algoritmo diagnostico è ben descritto nel documento recentemente pubblicato “The evaluation of monoclonal gammopathy of renal significance: a consensus report of the International Kidney and Monoclonal Gammopathy Research Group” (2) che prevede dal punto di vista della medicina di laboratorio, non solo la valutazione della funzionalità renale con i tradizionali test di laboratorio (creatinina e velocità di filtrazione glomerulare stimata eGFR, rapporto albumina/creatinina e proteine totali/creatinina su campione di urina) e dello stato metabolico (glucosio, acido urico, fosforo, cloro e bicarbonati) ma anche indagini di approfondimento mirate a valutare tutti gli aspetti clinicamente rilevanti nell’ambito delle gammopatie monoclonali in generale quali l’elettroforesi sierica e urinaria, l’immunofissazione, la determinazione delle catene leggere libere nel siero.

Tali indagini sono raccomandate e ampiamente utilizzate nella pratica clinica per una corretta identificazione e quantificazione dell’immunoglobulina monoclonale e quindi a scopo diagnostico e di monitoraggio dell’efficacia della terapia (3).

Tali indagini, presentano tutte ben noti limiti e vantaggi che devono essere accuratamente considerati ed attentamente valutati nel loro utilizzo in quanto:

1. **Elettroforesi sierica e urinaria**: indagini con sensibilità inferiore a quella di altri test recentemente proposti, ma caratterizzate da semplicità di esecuzione, basso costo e adeguata accuratezza. In particolare, l’utilizzo della tecnica capillare ormai adottata da molti laboratori, garantisce una elevata accuratezza e precisione nella quantificazione della proteina monoclonale (4). Relativamente all’elettroforesi delle proteine urinarie, che fornisce informazioni clinicamente importanti (concentrazione di proteine totali, di albumina di proteine globulari), va sottolineato che le metodiche attualmente disponibili devono essere correttamente considerate “tecniche semiquantitative”, in quanto l’utilizzo della colorazione dopo la separazione elettroforetica soffre degli svantaggi legati alla diversa affinità dei coloranti per le differenti proteine urinarie presenti nei campioni.
2. **Immunofissazione sierica ed urinaria**: indagine fondamentale per la tipizzazione dell’immunoglobulina monoclonale che prevede, dopo l’elettroforesi in gel d’agarosio, il trattamento con antisieri specifici anti- IgG, IgA, IgM, (e se necessario IgD e IgE), anti-catene leggere libere kappa (κ) e lambda (λ). La comparsa di una banda di precipitazione in

corrispondenza dell'antisiero specifico applicato per la catena pesante, e per la catena leggera, consente di identificare, in maniera diretta, la proteina monoclonale.

L'immunofissazione urinaria prevede l'utilizzo di un campione da una raccolta di urine delle 24 ore, eventualmente sottoposta a concentrazione in relazione alla quantità di proteine totali.

3. Misura delle catene leggere libere (FLC): di recente introduzione e di notevole rilevanza clinica in quanto consente la misura della concentrazione di catene leggere libere κ e λ presenti in circolo con metodi automatizzati immuno-nefelometrici/immuno-turbidimetrici; i valori del rapporto κ/λ rappresentano un fondamentale supporto nell'identificazione della monoclonalità in quanto un valore elevato del rapporto sarà suggestivo di un clone κ ed un basso valore indicherà un clone λ . Per il loro peso molecolare (22.5 kDa e 45 kDa per κ e λ in quanto presenti in forma di monomeri e dimeri rispettivamente), ambedue le molecole vengono liberamente filtrate dal glomerulo e, nel soggetto sano, quasi interamente riassorbite dal filtrato nel tubulo prossimale. La quantità di catene leggere libere policlonali presenti nelle urine di soggetti sani con normale funzionalità renale è quindi molto bassa.

Nel contesto dell'insufficienza renale, l'emivita delle due molecole, e quindi la loro concentrazione sierica, aumenta al diminuire della GFR e, nella progressione di malattia, la loro emivita è sempre più influenzata dalla ridotta clearance da parte del reticolo endoteliale. Poiché la clearance da parte del reticolo endoteliale non discrimina tra i due isotipi in base al peso molecolare, a differenza della clearance renale che preferibilmente elimina le molecole di dimensioni più piccole, nell'insufficienza renale in progressione, la concentrazione sierica di FLC è maggiormente indicativa della velocità di produzione delle stesse che è circa 1.8:1 ($\kappa:\lambda$) (5). Questo processo fisiopatologico si traduce in un aumento dell'intervallo di valori attesi del rapporto κ/λ che, nel paziente con insufficienza renale, risulta più ampio rispetto a quello osservato nella popolazione generale (0.37-3.1 vs 0.26 - 1.65, metodo Freelite). Quando utilizzato nella pratica clinica, questo intervallo "renale" si traduce in una aumentata specificità del metodo di misura (Freelite, Binding Site) per l'identificazione del mieloma che è la causa dell'insufficienza renale acuta, senza una significativa diminuzione della sensibilità (6).

Dal punto di vista analitico, i due metodi maggiormente utilizzati nei laboratori clinici (Freelite, BindingSite e N-latex, Siemens) forniscono risultati significativamente diversi tra loro, oltre che essere diversamente influenzati dalla funzionalità renale (7). È quindi assolutamente necessario che i pazienti vengano monitorati sempre con lo stesso metodo di misura, possibilmente nello stesso laboratorio. Va sottolineato che, benché siano stati sviluppati anticorpi per la determinazione delle catene leggere libere nelle urine, questi metodi non sono ancora validati per la quantificazione delle catene leggere libere nella raccolta di urine delle 24 ore e non possono quindi essere al momento utilizzati per la misura della proteina di Bence Jones, per la quale ci si deve ancora avvalere dell'immunofissazione urinaria.

Infine, in pazienti con patologie associate ad immunoglobuline monoclonali intatte, quali la glomerulonefrite proliferativa con depositi non organizzati di immunoglobuline monoclonali

(PGNMID), l'indagine che tuttora fornisce informazioni clinicamente più accurate è l'immunofissazione urinaria.

4. Nuove indagini e nuove tecnologie: nella diagnostica di laboratorio della patologia in oggetto, l'introduzione di ogni nuovo test in aggiunta a quelli già in uso, ha migliorato significativamente sensibilità e specificità cliniche. Attualmente la letteratura e i primi trials biochimici e clinici descrivono due nuovi test che potranno aumentare ulteriormente sensibilità e specificità diagnostica: *-la spettrometria di massa (MALDI-TOF)* per l'identificazione dell'immunoglobulina monoclonale in base al rapporto massa/carica. Infatti, ciascuna M-FLC ha un rapporto massa/carica unico e specifico ed è quindi possibile identificare la proteina monoclonale anche se presente in concentrazioni molto basse: i limiti di quantificazione dichiarati sono per κ -LC 0.05 g/L e per la catena pesante (HC) 0.25 g/L (8,9); *-gli esosomi urinari*, vescicole extracellulari secrete da varie cellule nel tratto urinario che contengono sia proteine di superficie che citoplasmatiche ed evidenziano l'innato orientamento della cellula. Questo li rende uno strumento interessante di valutazione della proteomica del tratto urinario (10). I primi studi condotti in pazienti con amiloidosi sembrano dimostrare non solo la specificità dell'informazione fornita dalla proteina presente nell'esosoma ma anche la sensibilità nell'evidenziare la scomparsa della stessa in condizioni di remissione della malattia. I dati preliminari sembrano suggerire che gli esosomi urinari potranno essere un valido biomarcatore nella valutazione della risposta renale nelle nefropatie associate a MGRS (11).

Bibliografia

1. Leung N, Bridoux F, Hutchison CA, Nasr SH, Cockwell P, Femand JP, Dispenzieri A et al, International Kidney and Monoclonal Gammopathy Research Group. Monoclonal Gammopathy of Renal Significance: when MGUS is no longer undetermined or insignificant. *Blood* 2012; 120: 4292-5.
2. Leung N, Bridoux F, Batuman V, Chaidos A, Cockwell P, D'Agati VD et al. The evaluation of monoclonal gammopathy of renal significance: a consensus report of the International Kidney and Monoclonal Gammopathy Research Group. *Nat Rev Nephrol* 2019; 15: 45- 59.
3. Leung N, Barnidge DR, Hutchison CA. Laboratory testing in monoclonal gammopathy of renal significance (MGRS). *Clin Chem Lab Med* 2016; 54: 929-37.
4. Jacobs JFM, Turner KA, Graziani MS, et al. An international multi-center serum protein electrophoresis accuracy and M-protein isotyping study. Part II: limit of detection and follow-up of patients with small M-proteins. *Clin Chem Lab Med*. 2020;58(4):547–559.
5. Hutchinson CA, Plant T, Drayson M, Cockwell P, Kountouri M, Basnayake K et al. Serum free light chain measurement aids the diagnosis of myeloma in patients with severe renal failure. *BMC Nephrol* 2008; 9-11.

6. Hutchison CA, Cockwell P, Cook M. Diagnostic accuracy of monoclonal antibody based serum immunoglobulin free light chain immunoassays in myeloma cast nephropathy. *BMC Clin Pathol* 2012;12:12.
7. Hoedemakers RM, Pruijt JF, Hol S, Teunissen E, Martens H, Stam P, et al. Clinical comparison of new monoclonal antibody-based nephelometric assays for free light chain kappa and lambda to polyclonal antibody-based assays and immunofixation electrophoresis. *Clin Chem Lab Med* 2012;50:489–95.
8. Barnidge DR, Dasari S, Botz CM, et al. Using mass spectrometry to monitor monoclonal immunoglobulins in patients with a monoclonal gammopathy. *J Proteome Res.* 2014;13(3):1419–1427.
9. Thoren KL Mass Spectrometry methods for detecting monoclonal immunoglobulins in multiple myeloma minimal residual disease. *Semin Hematol* 2018; 55: 41-43.
10. Hoorn EJ, Pisitkun T, Zietse R, Gross P, Frokiaer J, Wang NS et al. Prospects for urinary proteomics: exosomes as a source of urinary biomarkers. *Nephrology* 2005; 10:283-90.
11. Ramirez-Alvarado M, Barnidge DR, Murray DL, Angela Dispenzieri A, Marin-Argany M et al. Assessment of renal response with urinary exosomes in patients with AL amyloidosis: A proof of concept. *Am J Hematol* 2017; 92: 536-41.