

Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi immüfiksasyon elektroforezi verilerinin değerlendirilmesi

Data evaluation of Ankara Numune Training and Education Hospital immunofixation electrophoresis

Müjgan Ercan¹, Esra Oğuz¹, Sema Uysal¹, Sevilay Sezer¹, Canan Topçuoğlu¹, Fatma Meriç Yılmaz^{1,2}

ÖZET

Amaç: İmmüfiksasyon elektroforezi (IFE), monoklonal gammopatilerin (MG) tanı, takip ve tedavi sürecinin yönlendirilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Monoklonal gammopatiler; malignite potansiyeli olan ya da malign hastalıklardan multipl myelom (MM), Waldenstrom makroglobulinemisi (WM), soliter plazmositom, önemi bilinmeyen monoklonal gamapati (MGUS), plazma hücreli lösemi ve amiloidozu (AL) kapsamaktadır. Çalışmamızda, Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Merkez Laboratuvarında Ocak 2011 -Temmuz 2011 tarihleri arasında çalışılmış olan IFE verilerinin retrospektif olarak incelenerek sunulması amaçlanmıştır.

Yöntemler: IFE laboratuvarımızda İnterlab G26 cihazında çalışılmaktadır. Çalışmamızda Ocak-Temmuz 2011 tarihleri arasında çalışılan tüm IFE sonuçları incelenmiştir. Sonuçlar MG sıklığı, MG türü ve hastaların aldığı tanı açısından değerlendirilmiştir.

Bulgular: Ocak-Temmuz 2011 tarihleri arasında toplam 688 hastaya IFE yapılmış, 126 (%18,3)'sında MG tespit edilmiştir. MG tespit edilen hastaların 72 (%57,1) 'si erkek, 54 (%42,9)'ü kadındı. İzotip dağılımları IgG kappa %41,3, IgG lambda %35,6, IgA kappa %11,5, IgA lambda %5,8, IgM kappa %3,8, IgM lambda %1,9 şeklindeydi. Hastaların tanılar; MM (%65,9), WM (%0,07) ve MGUS (%33) olarak belirlendi.

Sonuç: MG tespit edilen hastalarda en sık görülen patern IgG kappa idi. Hastaların en çok aldığı tanı ise MM idi. Laboratuvarımıza IFE istemi ile başvuran hastalarda MG saptanma oranı ise %18 olarak bulundu. Bu oranın düşüklüğü, hastaların önce serum protein elektroforezi (SPE) ile değerlendirilip MG varlığı ya da şüphesinde IFE istemi yapılmasının önemini ortaya koymaktadır.

Anahtar kelimeler: Monoklonal gamapati, immüfiksasyon elektroforezi, multipl myelom

ABSTRACT

Objective: The immunofixation electrophoresis (IFE) is a method used for the diagnosis, monitoring and treatment of monoclonal gammopathies (MG). The monoclonal gammopathies include premalignant or malignant disease such as multiple myeloma, Waldenström's makroglobulinaemia (WM), plasmacytoma, monoclonal gamapati of undetermined significance (MGUS), plasma cell leukemia and amiloidosis (AL). We aimed to evaluate IFE reports analyzed in Ankara Numune Teaching and Research hospital from January to July 2011.

Methods: IFE was studied by Interlab G26 in our laboratory. In this study, all IFE reports examined which analyzed between January and July 2011. The results assessed for frequency and type of MG and also for diagnosis of the disease.

Results: A total of 688 patients from January to July 2011 were studied by IFE and 126 (18.3%) patients have been identified as MG. There were 72 (57.1%) men and 54 (42.9%) women in patients with MG. Distribution of isotypes were IgG kappa 41.3%, IgG lambda 35.6%, IgA kappa 11.5%, IgA lambda 5.8%, IgM kappa 3.8% and IgM lambda 1.9%. There were MM (65.9%), WM (0.07%) and MGUS (33%) in patients with MG.

Conclusion: IgG kappa was the most common type of MG and MM was the most common disease in these patients. MG detection rate was 18% in patients requested IFE test. The decreased rate has shown that at first serum protein electrophoresis must studied and then IFE test must be performed in patients who have an uncertainty of MG. *J Clin Exp Invest* 2013; 4 (2):148-152

Key words: Monoclonal gammopathies, immunofixation electrophoresis, multiple myeloma

¹ Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Merkez Biyokimya Laboratuvarı

² Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ABD

Correspondence: Esra Oğuz,

Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hast. Merkez Biyokimya Laboratuvarı, Ankara, Türkiye Email: dr_esrafirat@hotmail.com

Received: 09.01.2013, Accepted: 01.07.2012

Copyright © JCEI / Journal of Clinical and Experimental Investigations 2013, All rights reserved

GİRİŞ

Monoklonal gammopatiler (MG), immünglobulin (Ig) salgılayan plazma hücrelerinin tek bir klonunun proliferasyonu ile karakterize neoplastik hastalıklar grubudur [1].

Plazma hücre diskrazileri, immünotik diskraziler, lenfosit diskrazileri, plazma hücre neoplazmaları, monoklonal gammopatiler, immunoglobopatiler, paraproteinemiler ve disproteinemiler olarak da isimlendirilen bu hastalıkların iki temel özelliği vardır. Birincisi; Ig sentezleyebilme özelliğine sahip plazma hücrelerinin denetimsiz çoğalmaları, ikincisi ise bu hücreler tarafından sentezlenen ve plazmaya salınan homojen Ig veya Ig alt parçasının bulunmasıdır. Bu proteine tek bir plazma hücre klonundan geliştiği için 'Monoklonal Protein' veya 'M protein' adı verilir. Ig'ler, birbirlerine disülfid bağıyla bağlı iki ağır ve iki hafif zincir (kappa veya lambda) içerirler, M protein bir Ig'in tümü olabileceği gibi (G, A, D, E veya M), ağır zincirlerden veya hafif zincirler (lambda veya kappa) gibi alt birimlerden bir tanesi de olabilmektedir [2]. Monoklonal Ig, serum veya idrar elektroforezinde sınırları keskin bir band olarak görülür (M-proteini). Bu band monoklonal serbest hafif zincirinden oluşuyorsa Bence Jones protein (BJP) olarak adlandırılır. Bazı durumlarda birden fazla klon, MG nedeni olabilir, biklonal veya çok nadir olarak trikonal olabilir[3]. Plazma hücre hastalıklarının, tüm hematolojik malignitelerin %7'sini oluşturmaktadır [4]. 2012 yılı Amerika Birleşik Devletleri verilerine göre yıllık Myeloma insidansı 21,700 ve ölüm sayısı ise 10,710'dur [5].

MG, MM, WM, soliter plazmositom, MGUS, plazma hücreli lösemi, ağır zincir hastalığı ve AL'yi kapsayan, malign ya da malignite potansiyeli olan klonal bir oluşumla ilişkilidir. MGUS, yaygın olarak görülen, serumda monoklonal Ig (M-protein) bulunan, MM veya lenfomaya ait klinik bulguları olmayan bir durumdur. Genellikle yaşlılarda görülür. 50 yaş ve üstü popülasyonda sık görülen premalign hastalıklardandır. Wadhera ve arkadaşlarının derlemesine göre prevalansı %3,2'dir. Prevalansı cinsiyetle değişiklik göstermektedir (kadınlarda %3,7, erkeklerde %2,9). Yaşla artan prevalansa sahiptir. 50-59 yaş arası %1,7 iken 80 yaş üstünde bu değer %6,6'ya ulaşmaktadır [6].

Plazma hücre diskrazilerinin temel özelliği, karakteristik protein anormallikleridir. M-proteinlerinin tespit edilmesinde kullanılan İmmümfiksasyon Elektroforezi (IFE), MG'lerin tanı, takip ve tedavi sürecinin yönlendirilmesinde kullanılan bir tekniktir. İmmümfiksasyon elektroforezi (IFE), monoklonal gammopatilerde sentezlenen monoklonal proteinin türünü ta-

nımlamak amacı ile kullanılan bir tekniktir ve protein elektroforezi ve immünpresipitasyon tekniklerini bir araya getirmektedir. İlk olarak 1964 yılında Alfonso tarafından tanımlanmıştır [7]. İmmünglobülin çalışma prosedürü ise 1976 yılında sunulmuştur [8].

Çalışmamızda, Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Merkez Laboratuvarı'nda Ocak 2011 - Temmuz 2011 tarihleri arasında çalışılmış olan IFE verilerinin retrospektif olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

YÖNTEMLER

Bu çalışmada, Ocak-Temmuz 2011 tarihleri arasında Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hematoloji ve Medikal Onkoloji kliniğine başvuran 688 hastanın IFE sonuçları retrospektif olarak MG sıklığı, gammapatinin cinsi ve hastaların aldığı tanı açısından değerlendirilmiştir. Her bir hasta sonucu MG çeşidi yönünden yorumlanmıştır. Serum IFE örnekleri şekil 1'de sunulmuştur.

İmmümfiksasyon elektroforezinin aşamaları: Laboratuvarımızda IFE, Interlab G26 cihazında (Interlab Srl, Roma, İtalya), Interlab marka jeller (Interlab Srl, Roma, İtalya) kullanılarak, antiserum SCE232 M kiti (Interlab Srl, Roma, İtalya) ile çalışılmaktadır.

Örneğin uygulanması: İmmümfiksasyonda elektroforetik jelin katodal ucuna yakın aplikasyon kuyucuklarına hastanın dilüe örneğini koymak gerekmektedir. İmmünelektroforezden farklı olarak serum jele uygulanmadan önce dilüe edilmelidir. Bazı üreticiler her analit için standart bir dilüsyon tavsiye eder. Çoğunlukla IgG için 1:10, IgA ve IgM için 1:2 veya 1:3, kappa hafif zincir için 1:6, lambda hafif zincir için 1:3 oranında dilüsyon önerilir. Çoğu örnek için bu dilüsyonlar yeterli olmasına rağmen, her hasta için uygun dilüsyonlar seçilerek sonuçların optimize edilmesi önerilir [9].

Elektroforez: Uygun dilüsyondan sonra örnek IFE jeline altı farklı pozisyonda uygulandı, proteinlerin elektroforez işlemi ile birbirinden ayrılması sağlandı.

Fiksasyon: Elektroforezden sonra, immünglobulinin türüne göre belli her pozisyona antiserum uygulandı. Araştırılan proteinin serum protein örneğinde hangi bölgede göç ettiğini belirlemek amacıyla örneğin ilk bölgesine protein sabitleştirici eklendi. Yaklaşık 30 dakikalık inkübasyondan sonra antijen-antikor kompleksinin oluşması ve presipite olması sağlandı.

Yıkama: Presipite olmayan proteinler tampon ile yıkanarak uzaklaştırıldı.

Boyama: Presipitin bandlar uygun protein boyasıyla boyandı.

Boya fazlasının uzaklaştırılması ve kurutma diğer aşamalardı.

İmmüfiksasyon elektroforezinin yorumlanması

I. İlk sütunda yer alan protein elektroforezinde $\alpha 2$ - β - ve γ - globulin bölgelerinde monoklonal yapıda bir band olup olmadığı değerlendirildi.

II. G, A, M bölgelerinde sınırları belirgin bir bandın olup olmadığı kontrol edildi. Eğer band var ise ilk sütundaki protein bölgesinde yer alan band ile aynı mobilitede olup olmadığı değerlendirildi.

III. Aynı immunglobulin sınıfında, farklı yerlerde göç eden, birden fazla band saptanacak olursa, bu durumun gerçek biklonal gammapati olup olmadığı incelendi.

IV. Sadece G, A, M bölgelerinde veya kappa ve lambda bölgelerinde göç eden bandların varlığında, ağır ve hafif zincir hastalıkları yönünden karar vermeden önce, hata kaynağı olabilecek nedenler araştırıldı.

BULGULAR

Ocak 2011 -Temmuz 2011 tarihleri arasında çalışılan toplam 688 hastaya ait serum çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen hastaların yaş ortala-

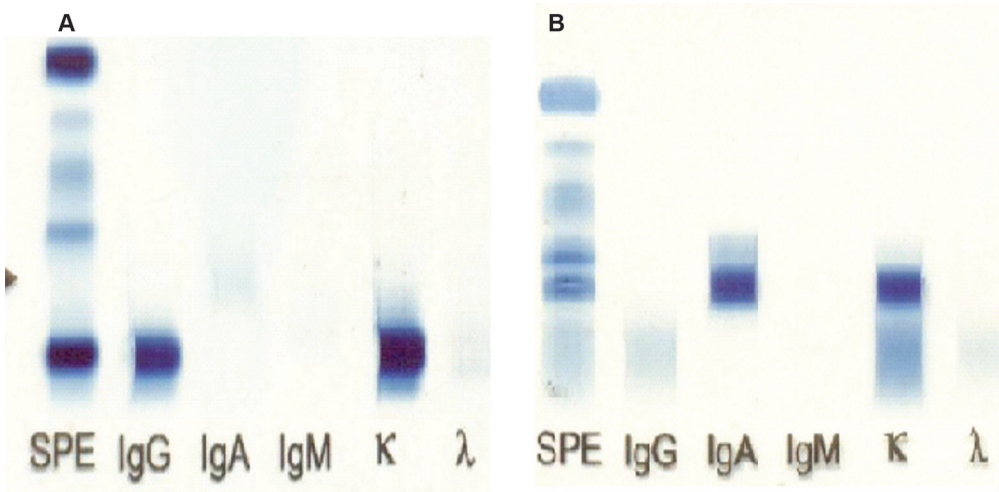
ması $59,84 \pm 1,02$ idi. 72'si erkek 54'ü kadın olmak üzere toplam 126 olguda MG tespit edildi. M-protein bulgularının dağılımı Tablo 1'de verilmiştir. Monoklonal gammapati tespit edilen 126 hastanın aldığı tanıları Tablo 2'de gösterilmiştir. Monoklonal gammapatisi olan hasta örnekleri Şekil 1 ve Şekil 2' de sunulmuştur.

Tablo 1. Serum IFE ile spesifik monoklonal protein tespit edilen hastalarda M-protein tiplerinin dağılımı

M-proteinin tipi	Dağılım (%)
IgG-kappa	41,3
IgG-lambda	35,6
IgA-kappa	11,5
IgA-lambda	5,8
IgM-kappa	3,8
IgM-lambda	1,9

Tablo 2. Hastaların aldığı tanıları

Hastaların tanıları	Dağılım (%) (n=126)
Multipl Myelom	65,87 (n=83)
Waldenström makroglobulinemisi	0,07 (n=1)
Önemi belirlenemeyen monoklonal gammapati	33,00 (n=42)



Şekil 1. A. Monoklonal IgG-Kappa bandının görüldüğü serum IFE örneği. B. Monoklonal IgA-Kappa bandının görüldüğü serum IFE örneği.

TARTIŞMA

Yaptığımız çalışmada MG tespit edilen hastalarda en sık görülen patern IgG kappa iken hastaların en çok aldığı tanı MM idi. MM hastalığında en sık karşılaşılan Ig tipi IgG, ikinci sıklıkla karşılaşılan IgA, nadir görülen tip ise IgM'dir [10].

Şubat 2002-Aralık 2008 tarihleri arasında Mayo Clinic disproteinemi veri tabanına göre plazma hücre proliferatif hastalıkların dağılımı (n=1877) MGUS %27 (n=524), MM %24 (n=467), AL %30 (581), lenfoproliferatif hastalık (%3), plazmasitom %1,3 (n=26), asemptomatik MM %10 (n=191), POEMS (polyneuropathy, organomegaly, endocrinopat-

hy, monoclonal gammopathy, skin changes) %1,6 (n=31), ekstramedüller plasmasitom %0,53 (n=10), LCDD (hafif zincir depo hastalığı) %0,95 (n=18) ve WM %1,3 (n=26) iken [11], yaptığımız çalışmada (n=126) hastaların %65,87 (n=83)'si MM olarak bulunmuştur. Mayo Clinic verilerine göre bizim hasta grubumuzda MM yüzdesi daha yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda WM %0,07 (n=1) ve MGUS %33 (n=42) olarak Mayo Clinic verileri yüzdeleriyle daha yakın olarak bulunmuştur. Çalışmamızda 7 aylık süre içerisinde hastanemize başvuran ve IFE testi istenen hastaların verileri taranmıştır. MM yüzdesindeki farklılığın iki çalışma arasındaki süre ve çalışılan hasta sayısı arasındaki fark ile ilintili olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca Ankara Numune Eğitim Araştırma Hastanesi Hematoloji Kliniğinin, 3. Basamak merkez olması ve diğer hastanelerden MM şüphesi olan hastaların tedavi amacıyla hastanemize sevk ediliyor olması da bir neden olabilir. Bu nedenle MM yüzdesini ülke ya da bölge genelinin yüzdesini değil, hastane özelini yansıtıyor şeklinde düşünmek daha doğru bir yaklaşım olacaktır.

SPE uzun yıllardan beri kullanılan bir metodur. Pek çok laboratuvar, tespit edilen bir M protein, belirsiz dar bir band, hipogammaglobulinemi veya belirlenen cut-off değerinin üzerinde artmış beta ya da alfa fraksiyonu varlığında SPE sonucunu anormal olarak kabul etmektedir. Eğer SPE sonucu bu kriterlerden birine uyarsa monoklonal proteini teyit etmek ve tanımlamak için IFE çalışılması gerekmektedir [12].

Çalışmamıza dahil olan SPE'de anormal gama piki olan ve IFE çalışılan hastaların %41,3'ünde IgG kappa, %35,6'sında IgG lambda monoklonal gammopatisi bulunmuştur. IgA kappa ve lambda gammopatileri sırasıyla %11,5 ve % 5,8; IgM kappa ve lambda gammopatileri de sırasıyla %3,8 ve %1,9 olarak bulunmuştur.

International Myeloma Working Group plazma hücre proliferatif hastalıklarının tanı amacıyla taranmasında SPE, IFE ve serbest hafif zincir (FLC) ölçümünü tavsiye etmektedir. AL için ise idrarda IFE testi bu panele eklenmelidir [13]. MGUS ve asemptomatik MM herhangi bir klinik semptomaya yol açmayan gammopatilerdir. Ancak bu hastalıklarda MM gelişme riski artmıştır. MGUS 50 yaş üstü popülasyonda %4 oranında görülmekle birlikte yılda %1 oranında MM veya diğer ilişkili malignitelere dönüşüm göstermektedir [14].

MG'ler için M protein tanımlanmasında 'altın standart' yöntem IFE olmakla beraber bu metod bazı sınırlamalara sahiptir. Non-sekretuar MM, AL, hafif zincir depo hastalığı ve plasmasitom kategorisindeki bazı hastalar idrar ve serum IFE testleri ile

tespit edilemeyebilir. Bu hastaların bazıları anormal serum FLC κ/λ oranına sahip olabilmektedirler. Bu yüzden 'altın standart' yöntem IFE ile beraber kantitatif FLC ölçümü kombinasyonu gereklidir [12,15].

Bazı çalışmalar göstermektedir ki [16-18] SPE ve IFE'ye serum FLC testinin eklenmesi, MM, non-sekretuar MM ve asemptomatik MM hastalıklarında idrarda hafif zincir taramasının yerini alabilir. AL tanısı için ise serum ve idrar IFE testlerine FLC eklenmesi tanı duyarlılığını arttırmaktadır [15,19]. Ayrıca serbest hafif zincirlerin yarı ömürleri 2-6 saat olduğu için, kısa sürede tedavi etkinliğinin değerlendirilmesinde FLC ölçümü daha yararlı olabilir [20,21]. International Myeloma Working Group tedavinin takibinde seri olarak FLC ölçümleri, amiloidoz hastalarında ve oligosekretuar olan MM'lu hastalarda rutin olarak önermektedir [13]. 1877 hastanın katıldığı bir kohort çalışmasında [11], idrar protein elektroforezi ve IFE'si ile SPE, serum IFE ve FLC testleri çalışılmıştır. 1851 hastanın idrar ve serum test panel sonucu anormal (%98.6) iken 26 hastada herhangi bir anormallik tespit edilememiştir. İdrar IFE + SPE + IFE paneli 30, SPE + IFE + FLC paneli 23, SPE + FLC paneli ise 58 hastanın tanısını kaçırmıştır. Serum IFE, SPE ve FLC'nin idrar IFE ve PE ile kombinasyonu monoklonal gammopatilerin taramasında ayrıntılı ve kapsamlı bir paneldir. Ancak idrar ve serumda IFE çalışmaları tarafından sağlanan duyarlılıktaki küçük artış nedeniyle, SPE'ye FLC eklenmesi özellikle MM ve WM gibi yüksek tümör yüklü monoklonal gammopatiler için basit ve etkili tanısal tarama sağlar[11].

SPE, M proteini saptamada ucuz ve basit bir yöntem olmakla beraber MG taramasında ilk etapta başvurulması gereken bir testtir. Yaptığımız çalışmada IFE çalışılan hastalarda MG saptanma oranı %18 olarak bulundu. Bu oranın düşüklüğü, hastaların önce SPE ile değerlendirilip MG varlığı ya da şüphesinde IFE istemi yapılmasının önemini ortaya koymaktadır.

KAYNAKLAR

1. Öge AE PY. Polinöropatiler. İÜ İstanbul Tıp Fakültesi Temel ve Klinik Bilimler Ders Kitapları. 2004;1.baskı:591-625.
2. Koç H. Klinik Hematoloji Ders Kitabı. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Antip AŞ. 1997:171-187.
3. Attaelmannan M, Levinson SS. Understanding and identifying monoclonal gammopathies. Clin Chem 2000;46:1230-1238.
4. Jemal A, Murray T, Samuels A, et al. Cancer statistics, 2003. CA Cancer J Clin 2003;53:5-26.
5. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin 2012;62:10-29.

6. Wadhera RK, Rajkumar SV. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance: a systematic review. *Mayo Clin Proc* 2010;85:933-942.
7. Alfonso E. Quantitation immunoelectrophoresis of serum proteins. *Clin Chem Acta* 1964;10:114-122.
8. Ritchie RF, Smith R. Immunofixation. I. General principles and application to agarose gel electrophoresis. *Clin Chem* 1976;22:497-499.
9. Alper CA JA. Immunofixation electrophoresis: A technique for the study of protein polymorphism. *Vox Sang* 1969;17:445-452.
10. Bataille R, Harousseau JL. Multiple myeloma. *N Engl J Med* 1997;336:1657-1664.
11. Katzmann JA, Kyle RA, Benson J, et al. Screening panels for detection of monoclonal gammopathies. *Clin Chem* 2009;55:1517-1522.
12. Katzmann JA. Screening panels for monoclonal gammopathies: time to change. *Clin Biochem Rev* 2009;30:105-111.
13. Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G, et al. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia* 2009;23:215-224.
14. Merlini G, Palladini G. Differential diagnosis of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:595-603.
15. Katzmann JA, Abraham RS, Dispenzieri A, et al. Diagnostic performance of quantitative kappa and lambda free light chain assays in clinical practice. *Clin Chem* 2005;51:878-881.
16. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, et al. Serum test for assessment of patients with Bence Jones myeloma. *Lancet* 2003;361:489-491.
17. Drayson M, Tang LX, Drew R, et al. Serum free light-chain measurements for identifying and monitoring patients with nonsecretory multiple myeloma. *Blood* 2001;97:2900-2902.
18. Dispenzieri A, Kyle RA, Katzmann JA, et al. Immunoglobulin free light chain ratio is an independent risk factor for progression of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *Blood* 2008;111:785-789.
19. Lachmann HJ, Gallimore R, Gillmore JD, et al. Outcome in systemic AL amyloidosis in relation to changes in concentration of circulating free immunoglobulin light chains following chemotherapy. *Br J Haematol* 2003;122:78-84.
20. Bradwell AR. Serum free light chain measurements move to center stage. *Clin Chem* 2005;51:805-807.
21. Pratt G. The evolving use of serum free light chain assays in haematology. *Br J Haematol* 2008;141:413-422.