Nuovi e insidiosi interferenti in elettroforesi siero-proteica: gli anticorpi monoclonali terapeutici

Daria Debbia, Patrizia Natali, Tommaso Trenti
Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Unità Sanitaria Locale and Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico di Modena, Italia

Questo lavoro è stato in parte presentato al 54° Congresso Nazionale SIBioC, Genova 5-7 Ottobre 2022, essendo stato selezionato come Comunicazione Orale

ABSTRACT

New and insidious interferents in protein electrophoresis

Introduction: monoclonal antibodies therapeutic (t-mAbs) are used in the treatment of multiple myeloma (MM). They are composed of IgG-k and may interfere with the patient's endogenous IgG-k monoclonal component (MC). The Hydrashift test (Sebia, Lisses, FR), the daratumumab immunofixation reflex test (DIRA test), is able to eliminate interference by t-mAbs. This work aims to determine how many DIRA tests were performed in the laboratory of the Department of Laboratory Medicine of Modena (Italy) and how the DIRA test has been used in our daily practice and its impact on the clinical management of the patient as well.

Methods: the DIRA test was applied by the laboratory on patients selected on the basis of: their clinical history, of monoclonal components, comparison with previous electrophoresis, the characteristic pattern of the gamma zone, and evidence of an additional peak in the gamma zone. The data were extracted from the laboratory information system.

Results: from August 2021 to December 2022 we performed the DIRA test on 240 samples for a total of 160 patients. 198 (82.5%) samples came from onco-haematological wards or day hospitals, the remaining 17.5% included samples from external sampling centers or non-onco-haematological. In 88 (55%) patients the DIRA test was positive.

Conclusions: the use of the DIRA test allowed a correct diagnosis in 55% of the patients undergoing electrophoretic examination. DIRA is an inexpensive test, easily performed in any laboratory; however, an effective use of the test requires a close collaboration between haematologists and the laboratory.

Parole chiave: *immunofissazione, anticorpi monoclonali terapeutici, mieloma multiplo*

INTRODUZIONE

Il mieloma multiplo (MM) è una neoplasia plasmacellulare caratterizzata dalla presenza di plasmacellule che secernono alti livelli di immunoglobulina monoclonale (CM) e rappresenta il 10% delle neoplasie ematologiche (1).

Deriva da una trasformazione neoplastica a livello della linea B linfocitaria durante la fase di maturazione e differenziazione delle cellule B, supportata da mutazioni presenti nella regione variabile dei geni delle immunoglobuline (Ig).

Nonostante resti una malattia grave con prognosi severa, la sopravvivenza globale a 5 e 10 anni è migliorata in tutti i gruppi di età ed etnia soprattutto per i pazienti a basso rischio. È infatti fondamentale identificare i pazienti ad alto rischio di progressione al momento della diagnosi, per stabilire il trattamento terapeutico più opportuno (2).

Il trattamento d' elezione è il trapianto autologo di cellule staminali (ASCT) nei pazienti elegibili con nuova diagnosi di MM dopo terapia di induzione con regime triplo (bortezomib, talidomide e desametasone) e terapia ad alta dosi per ridurre la carica tumorale (3).

Corrispondenza a: Daria Debbia, Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Unità Sanitaria Locale and Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico di Modena, Email: daria.debbia@gmail.com

Ricevuto: 14.07.2023 Revisionato: 07.08.2023 Accettato: 04.09.2023

Pubblicato on-line: 21.09.2023 DOI: 10.19186/BC_2023.070

Ma nell'ultimo decennio il panorama dei trattamenti terapeutici è stato radicalmente trasformato con l'introduzione di nuovi farmaci, contribuendo a migliorare la sopravvivenza dei pazienti (4).

Una nuova classe di farmaci per il trattamento del MM è rappresentata dagli anticorpi monoclonali terapeutici (t-mAbs) che hanno come bersaglio antigeni specifici espressi sulla superfice delle cellule di interesse, in questo caso le plasmacellule (5,6).

Uno dei bersagli di queste nuove terapie è rappresentato dal CD38, una glicoproteina transmembrana che agisce da recettore, uniformemente espressa sulle plasmacellule oltre che sulle normali cellule linfoidi e mieloidi (7).

Il primo farmaco approvato nel 2015 dalla Food and Drug Administration (USA) (8) per il trattamento del MM, è il daratumumab (DARZALEX Janssen, Beerse, Belgium) un anticorpo monoclonale IgG-Kappa (IgG-κ) completamente umano che ha come bersaglio il CD38 sovra-espresso nelle cellule del MM. Daratumumab agisce direttamente sul tumore e possiede anche effetti immunomodulatori. Viene somministrato come monoterapia nei pazienti con MM che hanno ricevuto almeno tre precedenti linee di terapia o che sono doppiamente refrattari a ASCT, oppure in associazione ad altri farmaci (9). Attualmente è utilizzato anche in prima linea nei pazienti non elegibili al trapianto (10).

Daratumumab può causare interferenze false positive, in quanto può essere erroneamente interpretato come CM del paziente, sia nell'elettroforesi delle proteine del siero (SPEP) che nell'immunofissazione (IF) che sono esami di laboratorio utilizzati comunemente per monitorare la malattia del paziente. Ciò può comportare una classificazione errata dello stadio di malattia del paziente secondo le linee guida dell'International Myeloma Working Group (IMWG) (4-11).

I criteri di riposta terapeutica e di malattia minima residua previsti dall'IMWG, definiscono come risposta completa (CR) l'assenza di CM nella IF sierica e urinaria (12). La CR è significativamente correlata alla sopravvivenza. Con l'avvento dei farmaci monoclonali questi criteri dell'IMWG sono stati rivisti (4) ed è stata confermata l'importanza della quantificazione delle plasmacellule midollari oltre all'aggiunta della determinazione delle catene leggere libere sieriche (sFLC) per valutare la CR (13).

Risulta quindi di notevole importanza identificare l'interferenza da daratumumab, in particolare nei pazienti la cui CM è di tipo IgG-κ caratterizzata da una mobilità elettroforetica simile a quella del farmaco monoclonale, con conseguente sovrapposizione su SPEP e IF.

Essendo il farmaco una immunoglobulina di tipo IgG-κ, migra in un campo elettroforetico come le normali immunoglobuline fisiologicamente presenti nel siero umano creando una piccola banda monoclonale all'estremità catodica della zona γ, non distinguibile dalla CM endogena del paziente; in più essendo di origine umana, viene riconosciuto dagli antisieri utilizzati nella IF (14,15). L'interferenza elettroforetica del t-mAb può essere superata utilizzando un anticorpo che ha come bersaglio il t-mAb stesso, andando così ad alterare la migrazione del farmaco su IF.

E' stato recentemente sviluppato un metodo specifico che consente di evidenziare ed eliminare questa interferenza.

Lo scopo di questo lavoro è descrivere l'esperienza del Laboratorio Corelab, Settore Proteine, Ospedale Civile di Baggiovara nell'utilizzo di tale metodo nonché il suo impatto sulla gestione clinica del paziente.

METODI

Il metodo impiegato è l'Hydrashift 2/4 Daratumumab Assay (Sebia, Lisses, Francia Inc.) basato su "daratumumab-specific immunofixation electrophoresis reflex assay" (DIRA); è un metodo che permette la reazione di "spostamento" della migrazione elettroforetica miscelando un antisiero murino anti-daratumumab con il siero del paziente (16).

Quando l'antisiero si lega al daratumumab presente nel campione, si forma un complesso che presenta una mobilità elettroforetica diversa rispetto al daratumumab da solo, migrando verso la regione alfa-2 (zona anodica). Di conseguenza, daratumumab viene rimosso dalla regione γ dell'IF, non interferendo più con la migrazione della CM del paziente (17).

Abbiamo applicato il DIRA test su campioni di pazienti che eseguivano gli esami ematici di controllo presso il Laboratorio Corelab, Ospedale Civile di Baggiovara (Modena) durante il trattamento e il monitoraggio della malattia.

I campioni di siero pervengono in provette BD vacutainer® (Becton Dickinson) con gel separatore e vengono centrifugate a 1300-2000 g per 10 minuti a temperatura ambiente. Una aliquota di siero di 1 mL circa è consegnata al Settore Proteine per l'esecuzione della SPEP con metodo capillare automatizzato su analizzatori Capillarys 3 OCTA (Sebia, Lisses, Francia) seguita da IF su gel d'agarosio Hydrashift 2/4 Daratumumab (Sebia, Lisses, Francia) mediante analizzatore Hydrasis 2 Scan Focusing (Sebia, Lisses, Francia)

Il test DIRA non viene richiesto dal clinico ma è il laboratorio che lo esegue autonomamente sulla base di vari fattori: storia clinica del paziente già noto come affetto da MM; dal confronto con i precedenti protidogrammi, nel caso si osservi una nuova CM IgG-κ mai osservata prima e dalla conformazione della zona γ in caso questa presenti un picco caratteristico in zona estremamente catodica (Figura 1).

Non sempre viene esplicitato nel quesito clinico della richiesta il trattamento terapeutico somministrato; per questo motivo il laboratorio ha stabilito di eseguire il test in autonomia per poter refertare il dato corretto ed evitare di segnalare come CM del paziente, i picchi monoclonali dovuti al farmaco.

Tutti gli esami sono stati eseguiti secondo le istruzioni del produttore.

I dati sono stati estratti dal sistema informatico di laboratorio tramite l'applicativo PAGODA (Engineering Ingegneria Informatica S.p.A., Roma, Italia) ed elaborati con Excel di Office 2019 Microsoft 365.

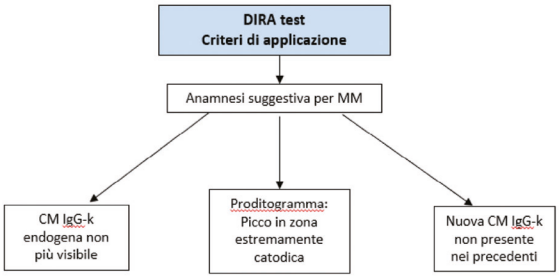


Figura 1
Criteri di applicazione DIRA test per il laboratorio.
DIRA test, daratumumab immunofixation reflex test ; multiple myeloma, MM.

RISULTATI

Da Agosto 2021 a Dicembre 2022 sono stati eseguiti 240 DIRA test su altrettanti campioni per un totale di 160 pazienti (76 maschi e 84 femmine) con età media di 68 anni.

80 pazienti (50%) hanno ripetuto, nell'intervallo temporale analizzato, il DIRA test. 198 (82,5%) campioni selezionati in base ai criteri descritti in Figura 1, provengono da reparti o day hospital onco-ematologici; i restanti 42 campioni (17,5%) provengono da centri prelievi esterni o reparti non onco-ematologici ma che mostravano un'alterazione anomala in zona γ su cui il laboratorio ha ritenuto opportuno approfondire.

Le CM endogene dei pazienti analizzati riportavano i seguenti isotipi: IgG κ 53%; IgG λ 26%; IgA κ 7% e gli altri isotipi <5%.

In 88 dei 160 pazienti (55%), e in 86 dei 240 campioni (36%), il DIRA test è risultato positivo, cioè il farmaco monoclonale risultava presente nel siero del paziente. La positività del test all' IF si evince dalla presenza di due picchi monoclonali separati, uno attribuibile alla MC endogena del paziente (che rimane nella posizione originale) e l'altro al farmaco monoclonale (che migra più anodicamente, in zona α) osservabili rispettivamente nella corsia trattata con antisiero anti-IgG e nella corsia trattata con antisiero anti catene leggere k nella Figura 2.

In 63 dei 240 campioni (26%) la presenza della CM endogena è stata confermata utilizzando il DIRA test che la remissione completa della malattia non è stata raggiunta. ndo In 177 (74%) campioni la CM endogena non si è confermata mostrando una remissione completa della malattia (Tabella 1).

Nei pazienti nei quali la terapia con daratumumab viene dichiarata, il test DIRA viene ripetuto ad ogni richiesta di IF al fine di monitorare l'andamento della malattia.

DISCUSSIONE

Un parametro per valutare l'efficacia delle terapie per il MM è la riduzione della CM circolante nel siero e nelle urine che rappresenta un'espressione indiretta della quota delle plasmacellule secernenti.

L'utilizzo del DIRA test ha consentito, nei pazienti analizzati, di riconoscere una eventuale CM endogena da una interferenza da farmaco. Questo ha permesso al clinico di distinguere correttamente una risposta completa

Tabella 1
Isotipi componente monoclonale (CM) riscontrate nel totale dei campioni/pazienti e CM residua.

	N° campioni (%)	N° pazienti (%)	N° CM endogena residua
IgG-κ	127 (53)	86 (53)	30
IgG-λ	62 (26)	42 (26)	16
IgM-κ	15 (6,2)	9 (5,6)	7
IgM-λ	4 (2)	3 (2)	1
IgA-κ	18 (7,5)	14 (9)	6
IgA-λ	8 (3,3)	3 (2)	1
FLC-κ	4 (1,6)	2 (1)	1
FLC-λ	2(1)	1 (1)	1
Totale	240 (100)	160 (100)	63

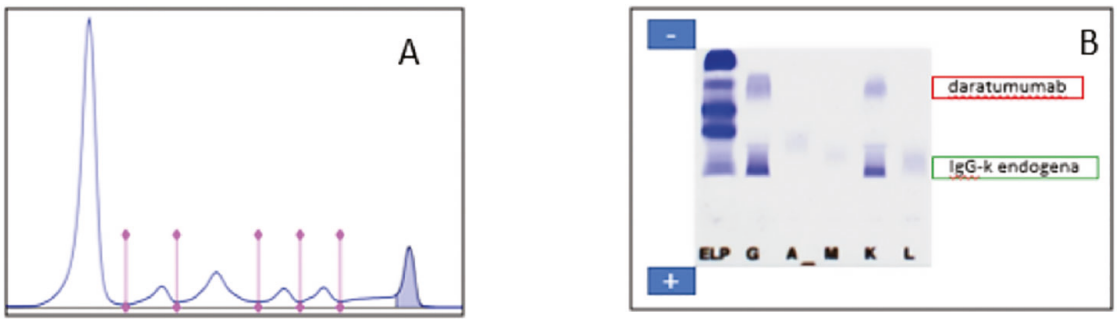


Figura 2
Campione di siero con componente monoclonale (CM) IgG-κ in trattamento con daratumumab.
Pannello A: elettroforesi capillare; CM e farmaco migrano sovrapposti in zona catodica (picco colorato):
Pannello B: immunofissazione con test DIRA; la CM IgG- κ endogena resta in posizione catodica originale (zona γ) mentre il daratumumab viene spostato in posizione anodica (zona α).
CM, componente monoclonale; DIRA test, daratumumab immunofixation reflex test ; multiple myeloma.

stringente al trattamento terapeutico, come si è verificato nei 177 (74%) campioni in cui la CM endogena non era più osservabile dai casi nei quali la risposta completa alla terapia non era stata raggiunta essendo ancora presente la CM endogena.

Come si evince dai nostri risultati e coerentemente con i dati presenti in letteratura, l'isotipo maggiormente rilevato è di tipo IgG-κ, lo stesso del daratumumab (18).

Anche nei pazienti con MM non IgG-κ con comparsa di una nuova banda monoclonale è importante stabilire se questa è causata da un nuovo clone plasma cellulare o da t-mAb, soprattutto quando non si hanno a disposizione informazioni riguardanti i trattamenti somministrati al paziente.

Le informazioni cliniche dei pazienti trattati con t-mAb sono essenziali per il laboratorio. Infatti nella nostra casistica solo la metà (55%) dei pazienti testati è risultata positiva al DIRA test. L'elevata percentuale di DIRA Test negativi è verosimilmente riconducibile alla mancanza di informazioni cliniche in presenza di protidogrammi suggestivi. E' essenziale per l'accuratezza del dato di laboratorio che nel quesito clinico della richiesta sia specificato che tipo di trattamento viene somministrato al paziente.

Come riportato nello studio di Thoren et al. (19), il saggio presenta alcune limitazioni, la principale delle quali è che il test DIRA è specifico solo per daratumumab e non è idoneo alla rilevazione di altri t-mAb. Questa limitazione diventerà sempre più problematica poiché nuovi t-mAb terapeutici sono allo studio per il trattamento del MM. Un altro farmaco di recente utilizzo è l'isatuximab, IgG1 diretto contro l'antigene CD38. Il saggio DIRA si può utilizzare anche per riconoscere l'interferenza da isatuximab ma non consente di verificare contemporaneamente la presenza di daratumumab e isatuximab.

Un'altra limitazione è rappresentata dal fatto che DIRA è un test qualitativo con cui si determina solo la presenza o meno del farmaco nel siero del paziente mediante IF e questo non consente di quantificare accuratamente la CM endogena residua che co-migra col farmaco.

Noori et al. (20) hanno valutato la spettrometria di massa della malattia minima residua (MS-MDR), un test multiplex che consente di determinare quantitativamente la CM endogena e tutti gli eventuali t-mAb somministrati. Probabilmente questa metodica potrà diventare una valida alternativa, ma la MS non è ancora ampiamente diffusa nei laboratori. Inoltre, il test DIRA contrariamente alla MS, è un esame economico e facilmente eseguibile.

Sono quindi necessari altri metodi che consentano di determinare contemporaneamente più farmaci e che permettano di quantificare il farmaco in metodica capillare, per poter ottenere un valore accurato della eventuale CM residua.

Per poter gestire questo metodo in modo appropriato e per poter superare le limitazioni descritte è essenziale la stretta collaborazione con i clinici che debbono segnalare nei dati clinici la terapia somministrata al paziente. Questo rende il laboratorio consapevole e preparato alla gestione di una eventuale interferenza.

Infine sono auspicabili raccomandazioni condivise per la corretta gestione di laboratorio di pazienti sottoposti a m-tAb di laboratorio, per l'implementazione nella routine di questi nuovi metodi e per l'interpretazione e la refertazione dei risultati ottenuti. A questo fine le Società scientifiche possono giocare un ruolo cruciale nel promuovere l'armonizzare delle modalità operative, raccogliendo le istanze che provengono dalle diverse realtà e promuovendone la sintesi.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno

BIBLIOGRAFIA

1. Al Hamed R, Bazarbachi AH, Malard F, Harousseau JL, Monthy M. Current status of autologous stem cell transplantation for multiple myeloma. Blood Cancer J 2019;9:44.
2. Hagen P, Zhang J, Barton K. High-risk disease in newly diagnosed multiple myeloma: beyond the R-ISS and IMWG definitions. Blood Cancer J 2022;12:83.
3. Lamb YN. Daratumumab: A review in combination therapy for transplanteligible newly diagnosed multiple myeloma. Drugs 2020;80:1455-64.
4. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, Durie B, Landgren O, Moreau P, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. Lancet Oncol 2016;17:328-46.
5. Cuesta-Mateos C, Alcaraz-Serna A, Somovilla-Crespo B, Muñoz-Calleja C. Monoclonal antibody therapies for hematological malignancies: not just lineage-specific targets. Front Immunol 2018;17:1-34.
6. Touzeau C, Moreau P, Dumontet C. Monoclonal antibody therapy in multiple myeloma. Leukemia 2017;31:1039-47.
7. Van de Donk N, Richardson PG, Malavasi F. CD38 antibodies in multiple myeloma: back to the future. Blood 2018;131:13-29.
8. Bhatnagar V, Gormley NJ, Luo L, Li Shen Y, Sridhara R, Subramaniam S et al. FDA approval summary: daratumumab for treatment of multiple myeloma after one prior therapy. Oncologist 2017;22:1347-53.
9. Syed YY. Daratumumab: a review in combination therapy for transplant-ineligible newly diagnosed multiple myeloma. Drugs 2019;79:447-54.
10. Lonial S, Weiss BM, Usmani SZ, Singhal S, Chari A, Bahlis NJ, et al. Daratumumab monotherapy in patients with treatment-refractory multiple myeloma (SIRIUS): an open-label, randomised, phase 2 trial. Lancet 2016;387:1551-60.
11. Donk NW, Otten HG, El Haddad O, Axel A, Sasser AK, Croockewit S, et al. Interference of daratumumab in monitoring multiple myeloma patients using serum immunofixation electrophoresis can be abrogated using the daratumumab IFE reflex assay (DIRA). Clin Chem Lab Med 2016;54:1105-9.
12. Durie BGM, Haroussaeau JL, Miguel JS, Bladé J, Barlogie B, Anderson K, et al. International uniform response criteria form multiple myeloma. Leukemia 2006;20:1467-73.
13. Cowan AJ, Green DJ, Kwok M, Lee S, Coffey DG, Holmberg LA, et al. Diagnosis and management of multiple myeloma: a Review. JAMA Netw Open 2022;327:464-77.
14. McCudden CR, Jacobs JFM, Keren D, Caillon H, Dejoie T, Andersen K. Recognition and management of common, rare, and novel serum protein electrophoresis and

immunofixation interferences. Clin Biochem 2018;51:72-9.
15. Noori S, Verkleij CPM, Zajec M, Lagerhorst P, Bosman PWC, de RiJke YB, et al. Monitoring the M-protein of multiple myeloma patients treated with a combination of monoclonal antibodies: the laboratory solution to eliminate interference. Clin Chem Lab Med 2021;59:1963-71.
16. McCudden C, Axel AE, Slaets D, Dejoie T, Clemens PL, Frans S, et al. Monitoring multiple myeloma patients treated with daratumumab: teasing out monoclonal antibody interference. Clin Chem Lab Med 2016;54:1095-104.
17. Thoren KL, Pianko MJ, Maakaroun Y, Landgren CO, Ramanathan LV. Distinguishing Drug from Disease by Use of the Hydrashift 2/4 Daratumumab Assay. J Appl Lab Med 2019;3:857-63.
18. Willrich MAV, Ladwig PM, Andreguetto BD, Barnidge DR, Murray DL, Katzmann JA, et al. Monoclonal antibody therapeutics as potential interferences on protein electophoresis and immunofixation. Clin Chem Lab Med 2016;54:1085-93.
19. Thoren KL, Pianko MJ, Maakaroun Y, Landgren CO, Ramanathan LV. Distinguishing drug from disease by use of the Hydrashift 2/4 daratumumab assay. J Appl Lab Med 2019;3:857-63.
20. Noori S, Verkleij CPM, Zajec M, Langerhorst P, Bosman PWC, de Rijke YB, et al. Monitoring the M-protein of multiple myeloma patients treated with a combination of monoclonal antibodies: the laboratory solution to eliminate interference. Clin Chem Lab Med 2021;59:1963-71.