

Serum Protein Elektroforezi Nasıl Raporlanmalı ?

DR. ÇAĐATAY KUNDAK



DÜZEN LABORATUVARLAR GRUBU

TARİHÇE

A NEW APPARATUS FOR ELECTROPHORETIC ANALYSIS OF COLLOIDAL MIXTURES.

BY ARNE TISELIUS.

Received 25th January, 1937.

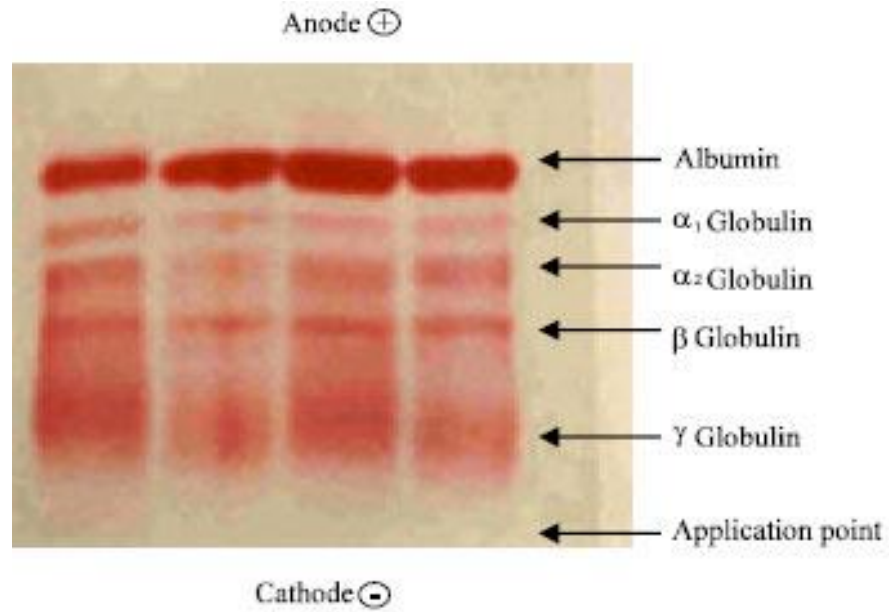
Transactions of the Faraday Society 1937;33:524



Tiselius Elektroforez konusundaki çalışmaları ile 1948'de Nobel ödülü kazandı



Selluloz asetat membranda SPE

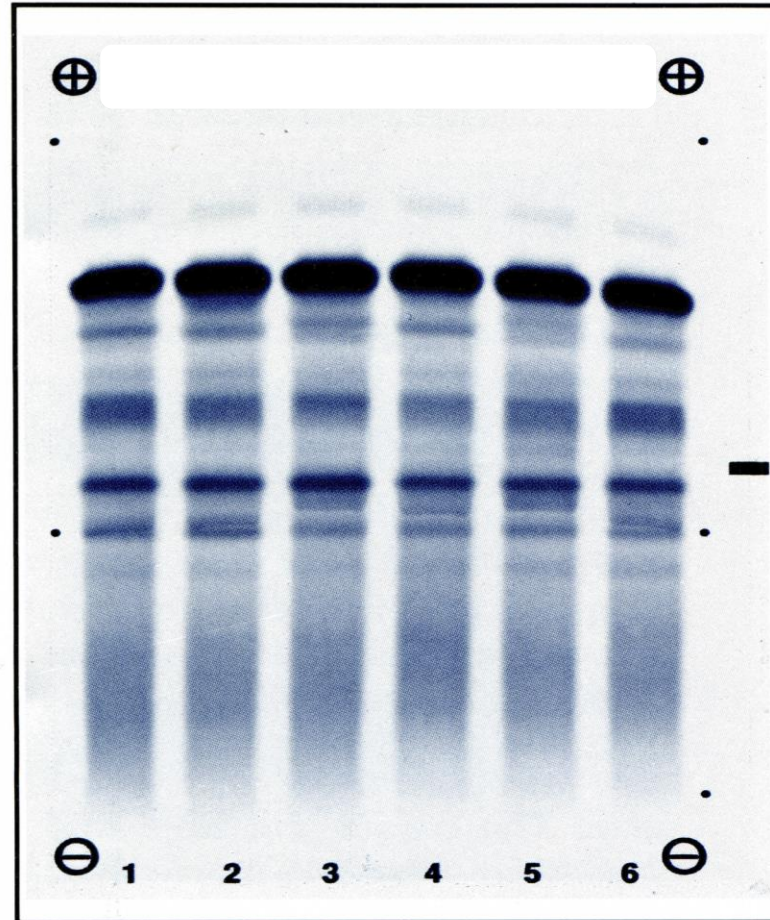


1950'lerin başından itibaren klasik 5 bantlı selüloz asetat elektroforezi, standart prosedür olarak popüler oldu ve yıllarca kullanıldı. Doğru uygulandığında oldukça iyi bir rezolusyona sahiptir.



Agaroz Jel Elektroforezi (AGE)

- ▶ İlk olarak Laurell tarafından 1962 yılında rutin kullanıma sokulmuştur.
- ▶ Ayrım proteinin yük/kütle oranına göredir.
- ▶ 1972'de Laurell HR-AGE'nin avantajları hakkında bir rapor yayınlamıştır.



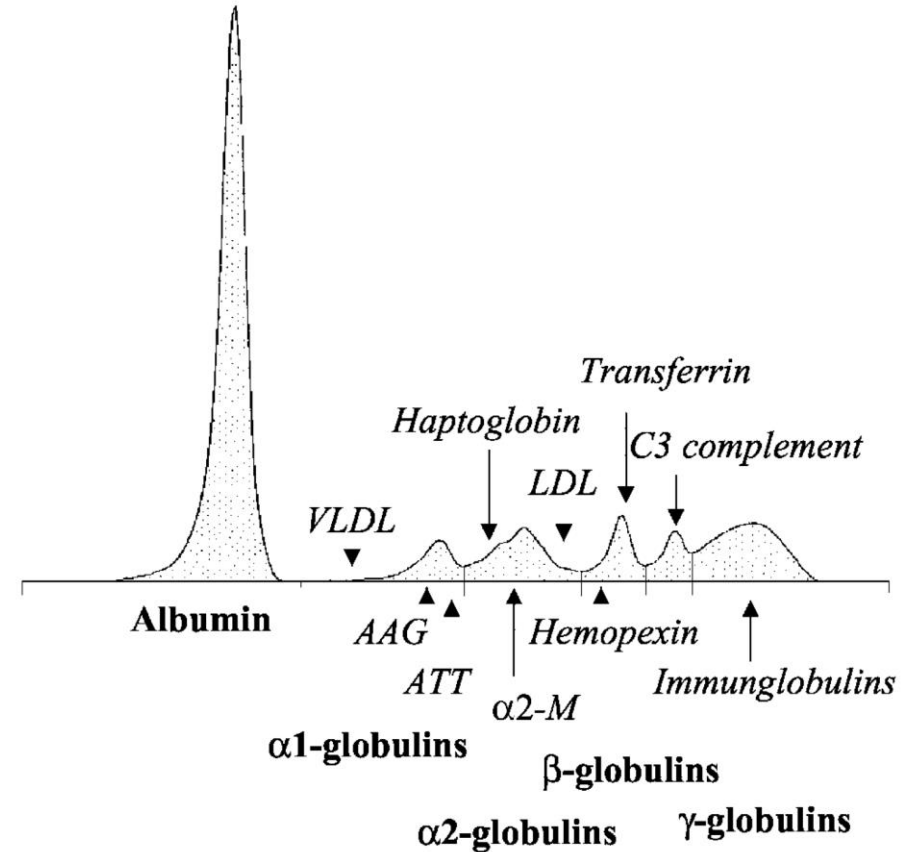
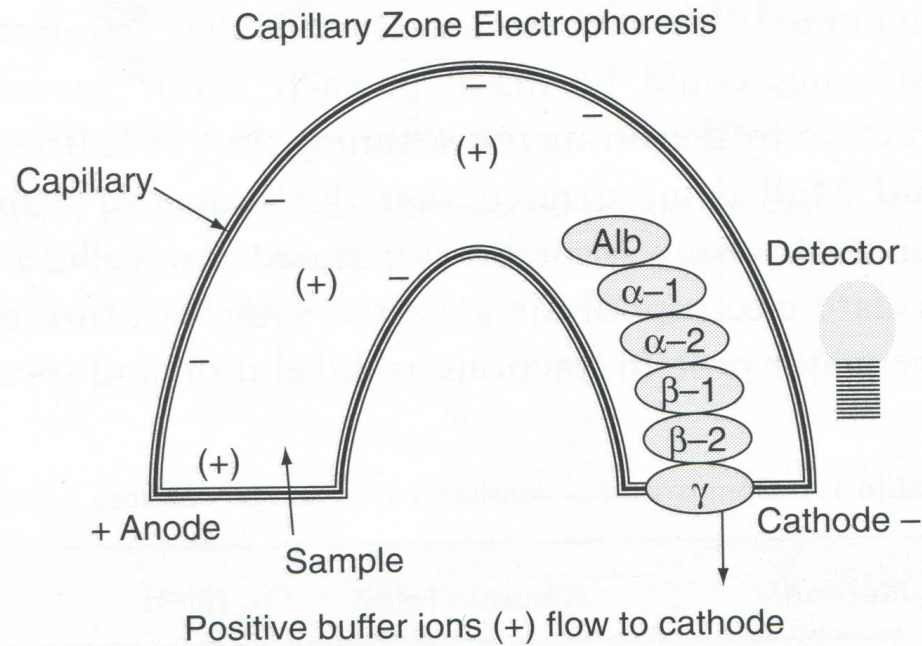
PROTEINS SEEN WITH HR-AGE

- Prealbumin
- Albumin
- Alphalipoprotein
- Alpha₁ antitrypsin/Alpha₁ acid glycoprotein
- GC globulin
- Alpha₂ macroglobulin
- Haptoglobin
- Fibronectin
- Transferrin
- Betalipoprotein
- Complement
- Complement degradation products
- Immunoglobulins



Kapiller Elektrophorez (CZE)

- 90'ların ortalarında Kapiller elektrophorez kullanıma girmeye başlamıştır.



Protein Elektroforezi istemi

- ▶ **Monoklonal proteinlerin tespiti ve takibi**
- ▶ Yüksek hassasiyete sahip, ancak SPE'nin tüm Monoklonal Gammopati vakalarını tespit etmediği açıktır. Sadece SPE incelemesi yapılarak % 5-21 oranında vaka atlanabilmektedir.
- ▶ Sensitivite %85, spesifite %95 dolayında bildirilmekte
- ▶ Ayırt edilebilir M proteini gözlenmemesi ve tüm protein fraksiyonlarının referans değerler içerisinde olması, klinik şüphenin yüksek olduğu durumlarda Monoklonal gammopatinin dışlanması için yeterli değildir ve bu durumun klinisyene iyi aktarılması gereklidir.
- ▶ **Monoklonal proteinlerin yanında protein düzeyleri ve dağılımını etkileyen sentez ve inflamasyon süreçleri gibi durumların tanınmasına yardımcıdır. Ancak bu durumların diğer tanı testleri ile desteklenmesi gerekir.**



Önerilen Metodlar

- ▶ **Agaroz jel bazlı (AGE) ya da Kapiller Zon Elektroforezi (CZE) uygundur.**
- ▶ **Sistem yüksek çözünürlüklü olmalı ve normal proteinlerle göç eden küçük monoklonal bantları tespit edebilmelidir.**
- ▶ **Hasta takibinde aynı metodun kullanılması önerilmektedir.**
- ▶ **Immüfiksasyon gereken numuneler referans edilmelidir.**



Serum Protein ve Albumin kantifikasyonu için öneriler:

- ▶ Protein Elektroforezinin değerlendirilmesi için otoanalizör tarafından yapılmış total protein ve albümin ölçümü kullanılabilir.
- ▶ Hepsi kabul edilebilir olduğu halde; serum albümin ölçümünün BCG yerine BCP ya da CZE ile yapılması önerilir.
- ▶ SPE raporunda, biyokimya raporu ile aynı albumin deęerinin verilmesi tercih edilir ancak LIS nedeni ile bu mümkün olmayabilir.
- ▶ Hangi Albumin değeri kullanılırsa kullanılsın, SPE raporunda albümin değerinin rapor edilmesi tutarlı bir yaklaşımla olmalıdır.
- ▶ Kimyasal ve elektroforetik albümin değerleri arasındaki majör uygunsuzluklar laboratuvar tarafından araştırılmalıdır.
- ▶ Total protein ve Albumin g/L olarak en yakın tam sayı şeklinde belirtilmelidir.



1. Her bir SPE fraksiyonunda (5/6) protein miktarı (% ve g/L olarak) ve bunların referans aralıkları

2. Eğer mevcut ise M proteini (paraprotein) düzeyi

3. İnterpretasyona yardımcı olabilecek açıklayıcı bir yorum

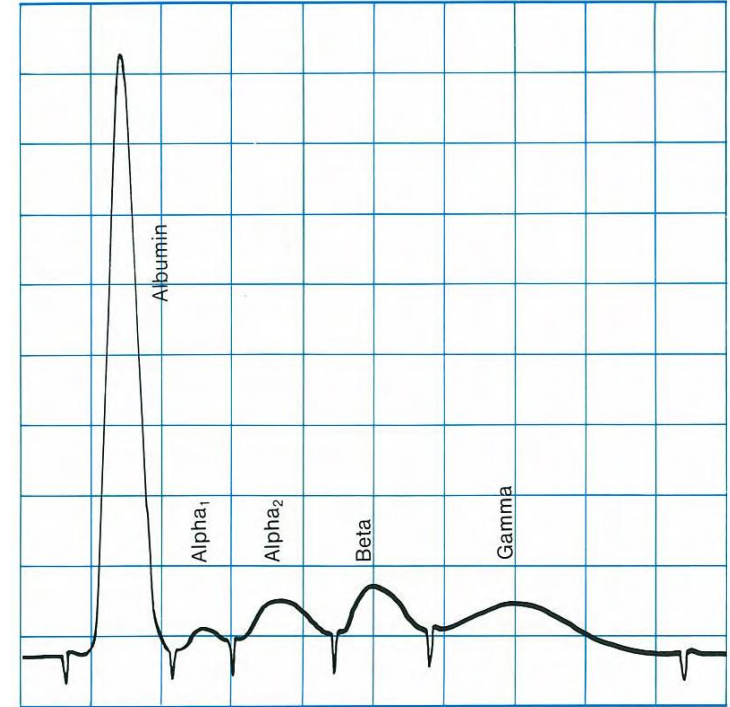
RAPORDA BULUNMASI GEREKENLER



Protein Elektroferez Raporu

- ▶ Total Protein 73 g/L (63-79)
- ▶ Albumin %49,3 36 g/L (34-47)
- ▶ Alfa-1 globülin % 2,7 2 g/L (1- 3)
- ▶ Alfa-2 globülin %12,3 9 g/L (6-10)
- ▶ Beta-Globulin %13,7 10 g/L (7-12)
- ▶ Gama-Globulin %15,0 11 g/L (6-16)

Yorum: Non-spesifik elektroferez bulguları, belirgin paraprotein bandı tespit edilmemiştir.



Protein Elektrozozinde spesifik bir bulgu tespit edilmediğinde yorum nasıl olmalı?

- ▶ **“Normal patern, belirgin paraprotein bandı tespit edilmemiştir.”**
- ▶ **“NORMAL” KELİMESİNDEN KAÇINILMALIDIR.**
- ▶ SPE fraksiyonları için kullanılan referans aralıkları; normalliği veya sağlık durumunu göstermediği için “Normal” kelimesini kullanmak, belirsiz ve potansiyel olarak yanıltıcı bir sonuç yaratır. Bu nedenle, “normal” kelimesinin kullanımını genellikle Laboratuvar Tıbbı’nda önerilmemektedir.
- ▶ **“Serum protein elektrozozu non-spesifik olarak değerlendirilmiştir.”**
- ▶ **“Non-spesifik elektrozoz bulguları, belirgin paraprotein bandı tespit edilmemiştir.**



SPE yorumu, aynı raporda verilen numerik değerlere ilave bilgi içerecek şekilde kısa, öz ve ilgili olmalıdır. Verilen bilginin nasıl algılanacağı ve klinik değerlendirmeye katkısı konusuna özen gösterilmelidir.

- ▶ **Tanı, takip ve ileri incelemeye katkı sağlamalı**
- ▶ **Doğru ve ilave klinik değer taşımalı**
- ▶ **Yapılan inceleme ve klinik duruma uygun olmalı**
- ▶ **Kesin, anlamı açık ve kolay anlaşılır olmalı**
- ▶ **Klinisyen beklentisine göre olmalı (örn, pratisyen ya da aile hekiminin test sonucundan beklentisi ile nefroloji ya da hematoloji uzmanının farklı beklentileri gözetilmeli)**
- ▶ **Raporda başka yerde bulunan bariz bilgi ve bulguları tekrar etmemelidir.**
- ▶ **Klinisyene kendi pratiği konusunda yön göstermekte haddini aşmamalı ve tüm klinik tablonun bilinmediği bir durumda invazif ileri işlemler konusunda tavsiyede bulunmamalı**
- ▶ **Tanı ve takip olasılıkları konusunda uzun listeler vermekten kaçınılmalı**



Soru: M bandı tespit edilmediyse, aşağıdaki koşullardan veya modellerden hangisi hakkında yorum yaparsınız?

- | | |
|--------------------------------|-----|
| ▶ M-bandı tespit edilmedi | %62 |
| ▶ Normal patern | %85 |
| ▶ Bisalbuminemi | %92 |
| ▶ Hipoalbuminemi | %85 |
| ▶ Alfa-1 Antitripsin eksikliği | %85 |
| ▶ İnflamatuvar/akut faz yanıtı | %77 |
| ▶ Nefrotik patern | %69 |
| ▶ Beta-gama köprüleşme | %85 |
| ▶ Artmış beta- ya da beta2 | %69 |
| ▶ Poliklonal gammopati | %92 |
| ▶ Hipogammaglobulinemi | %92 |



Belirli klinik durumlarda serum proteinlerinin elektroforetik karakteristikleri

Belirli klinik durumlarda serum proteinlerinin Elektroforetik karakteristikleri						
	T.Protein	Albumin	Alfa 1	Alfa 2	Beta	Gamma
Akut İnflamasyon		↓ N	↑	↑		N ↓
Subakut İnflamasyon	N	N ↓	N	↑	N	N
Kronik İnflamasyon		↓ N	↑	↑	N ↑	↑
Ciddi Hepatit	↓ N	↓↓	↓	↓	↓	↓
Kronik Siroz	↓ N ↑	↓↓		↓	↓	↑
Akut Siroz	↓ N ↑	↓↓		↓	Beta-Gamma köprü	
Nefrotik Sendrom	↓↓	↓↓		↑↑		N ↓
Hipogammaglobulinemi						↓↓↓
Paraprotein	N ↑	↓	↓	↓	Homojen Pik	
Hipergammaglobulinemi	↑ N	↓				↑
Hipoproteinemi (protein kaybı)	↓↓	↓↓	N ↑	N ↑	↓	↓ N ↑
Alfa-1 Antitripsin Eksikliği			↓↓			



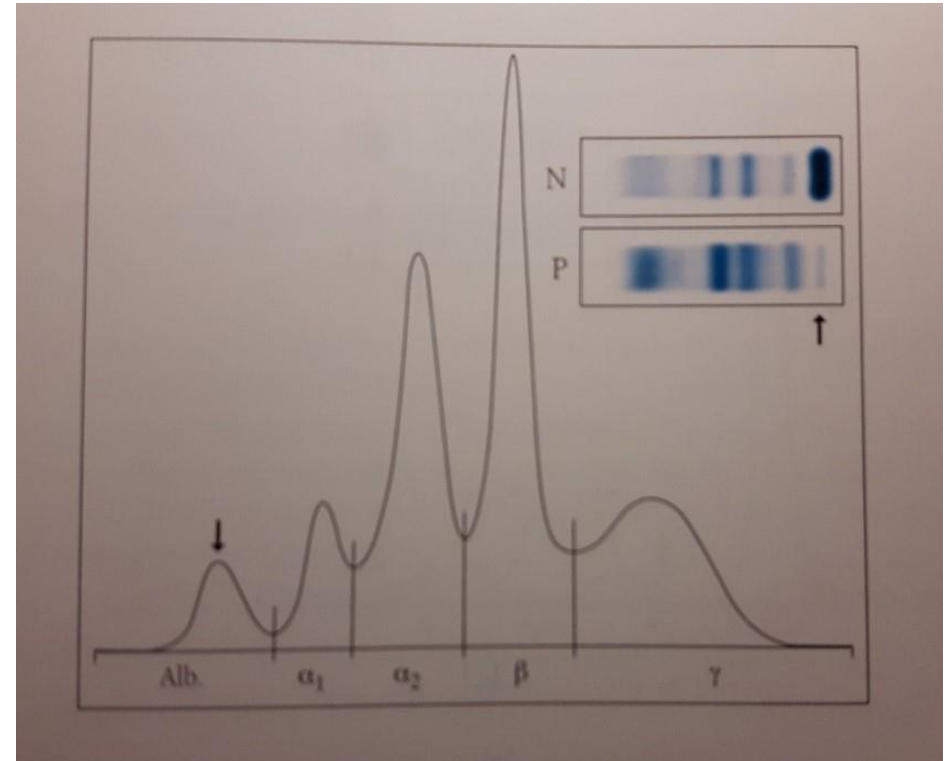
Nadir görülen otozomal resesif durum

Hafif ödem, hipotansiyon, yorgunluk ve bazen kendine özgü bir alt vücut lipodistrofisi (özellikle yetişkin kadınlarda) ve hiperlipidemi dışında az sayıda klinik semptom vardır.

AGE'nin sıfıra yakın albümin konsantrasyonunu tespit etmekte boya bazlı analizör yöntemlerinden daha kesin olduğu bildirilmiştir.

Bununla birlikte, CZE'nin performansı açık değildir.

ANALBUMİNEMİ



Çift ya da ayrı albümin bandı

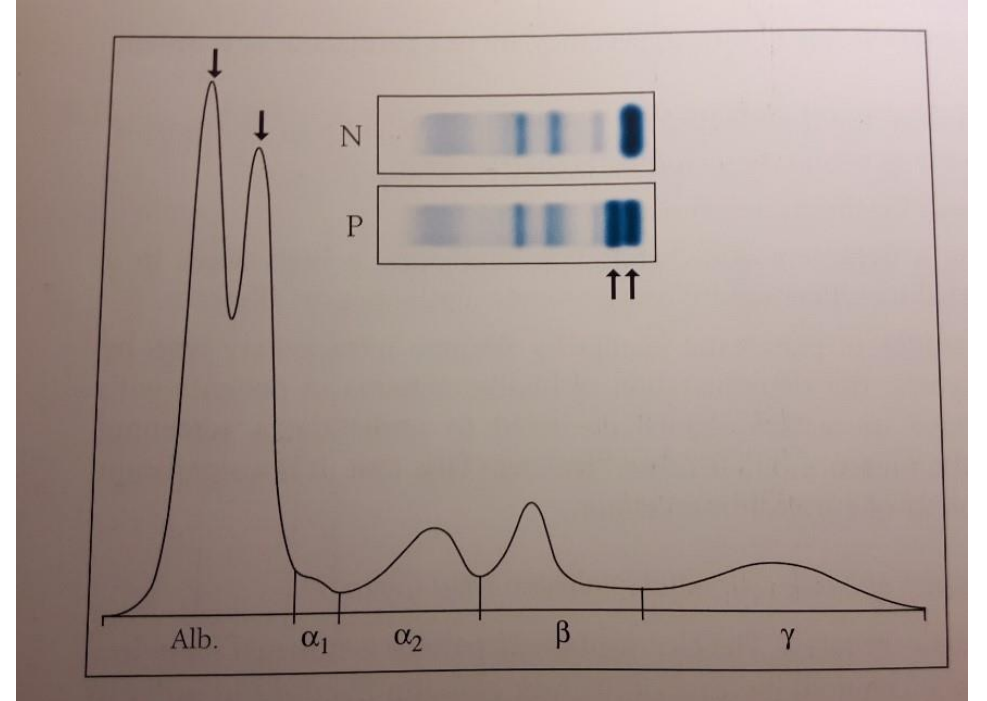
Kalıtsal, bilinen patolojik etkisi yok

Edinilmiş; 1. renal yetmezlik bulunan hastada yüksek doz beta-laktam antibiyotik kullanımına bağlı
Edinilmiş; 2. Pankreatik fistül varlığında

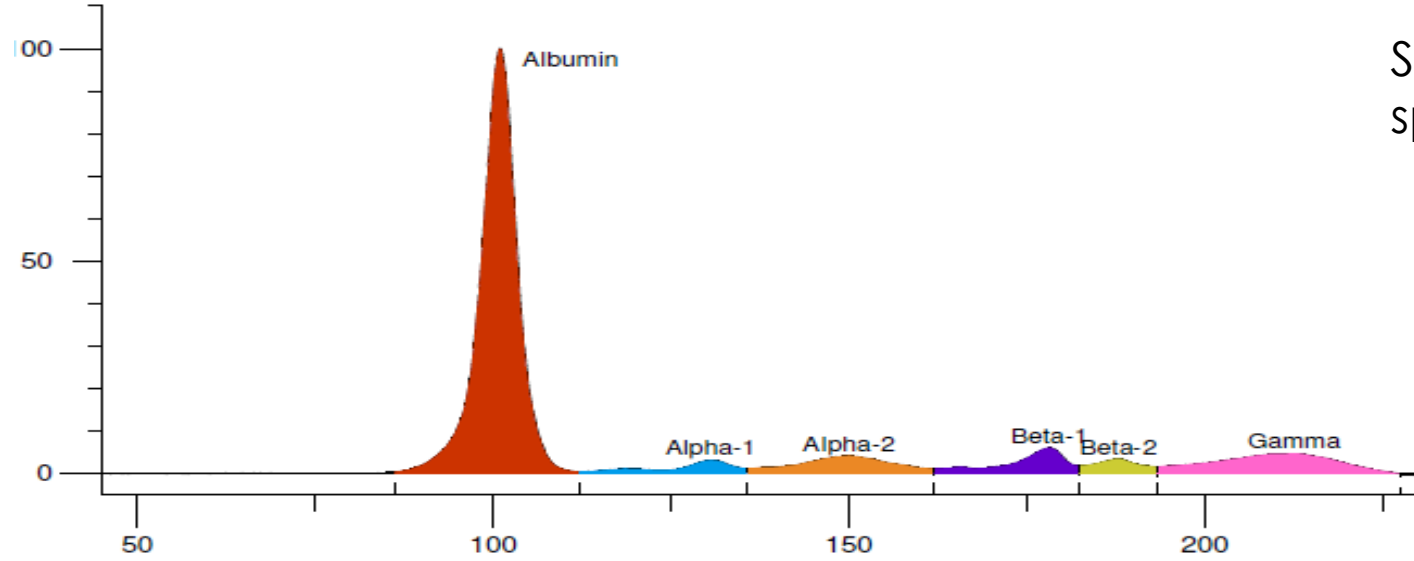
Özel yorum gerektirmez

Olağandışı görünüm gereksiz endişeye ve ileri testlere neden olabileceği için gözlendiğinde literatür bilgisi ile birlikte rapor edilebilir

BİSALBUMİNEMİ



Non-spesifik bulgular

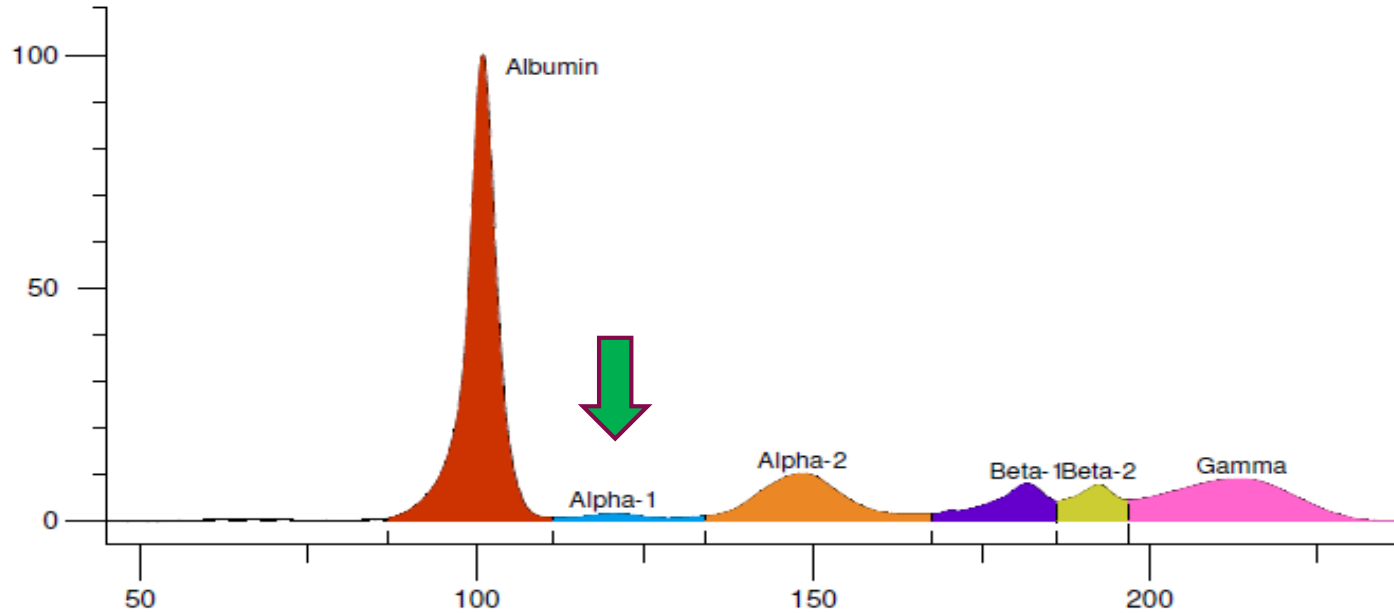


Serum protein elektroforezi non-spesifik olarak değerlendirilmiştir.

1	Albumin	68.01%	46.66	54.70% ... 69.66%
2	Alpha-1	3.94%	2.70	2.63% ... 5.03%
3	Alpha-2	7.58%	5.20	4.87% ... 10.48%
4	Beta-1	6.20%	4.26	5.35% ... 9.19%
5	Beta-2	3.05%	2.09	2.38% ... 7.11%
6	Gamma	11.21%	7.69	9.69% ... 18.90%
Total			68.60	



Alfa-1 Antitripsin Eksikliği

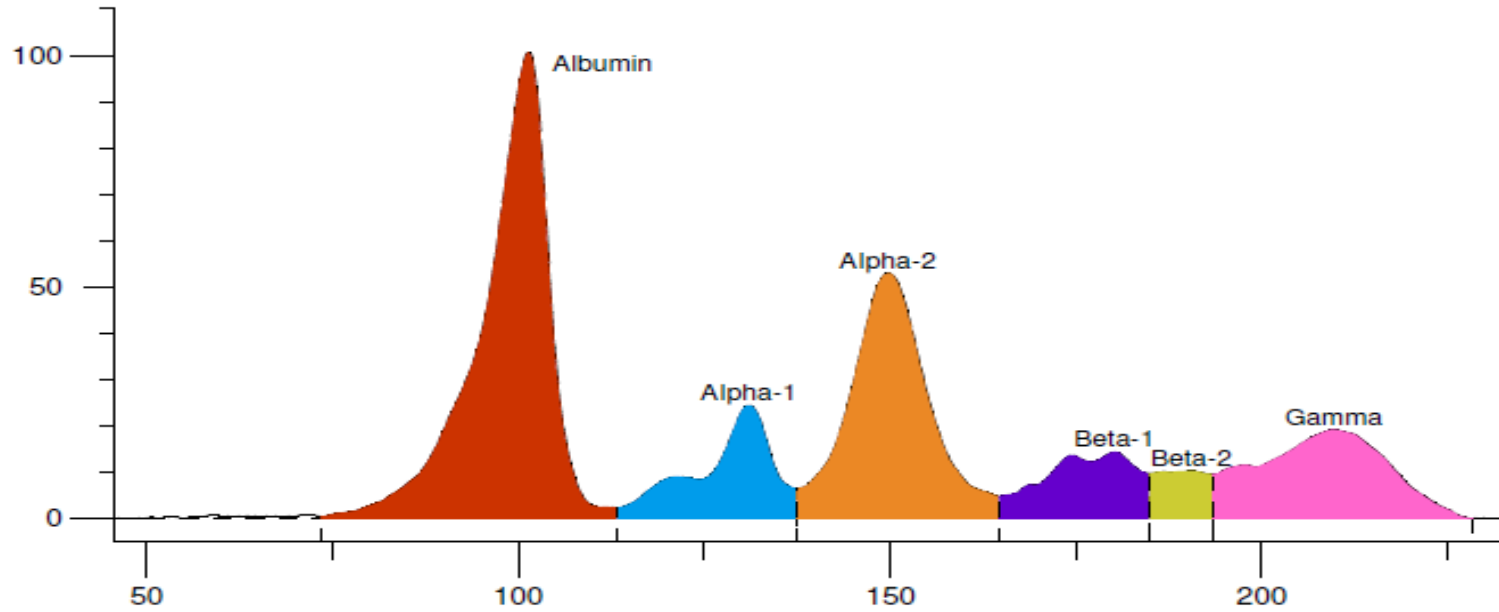


1	Albumin	50.38% L
2	Alpha-1	2.32% L
3	Alpha-2	15.02% H
4	Beta-1	7.61%
5	Beta-2	5.68%
6	Gamma	19.00% H

Düşük (ya da anormal) alfa-1 globülin (antitripsin bandı), konjenital eksikliği dışlamak için alfa-1 antitripsin ölçümü önerilir.



Nefrotik Patern

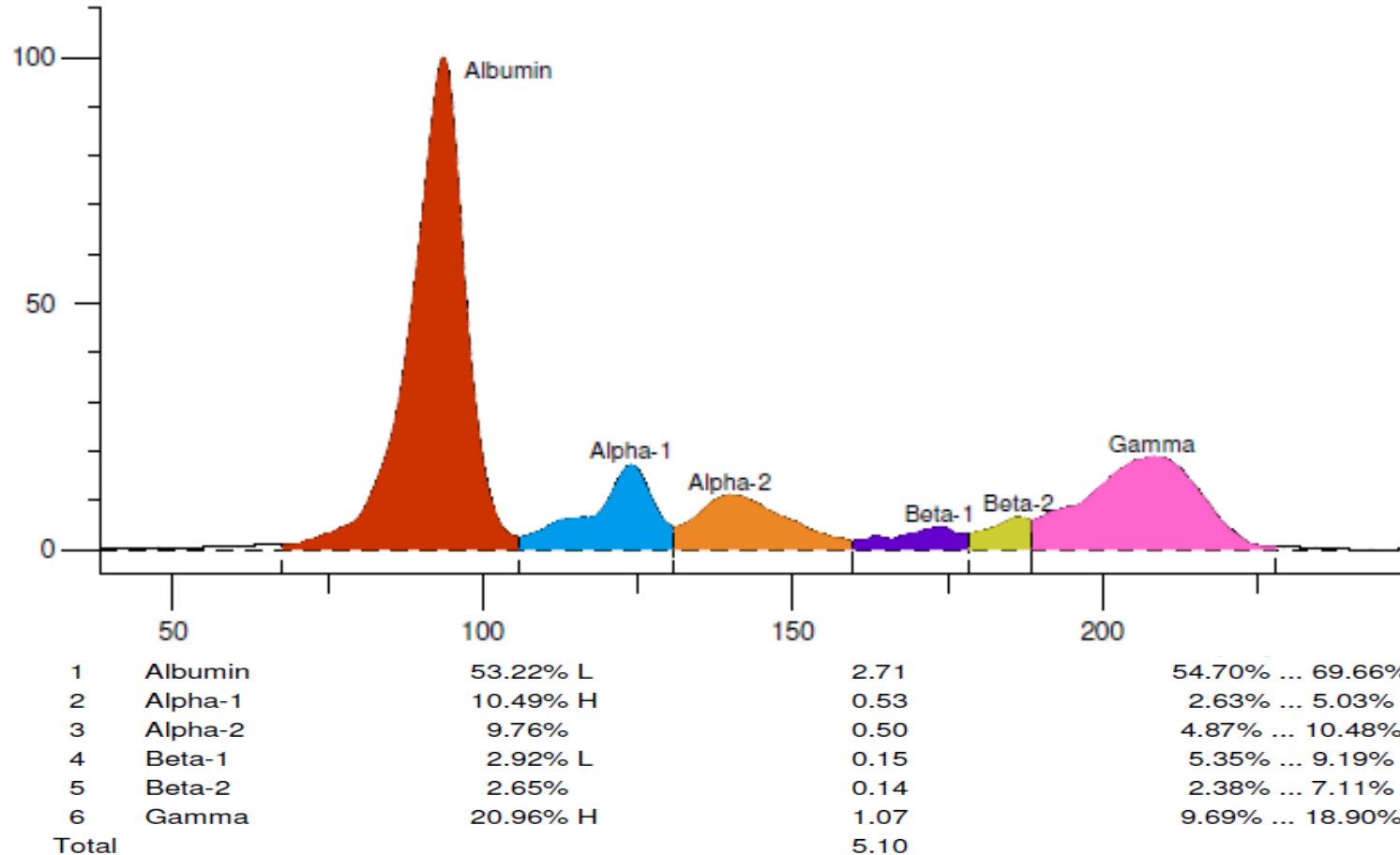


Belirgin azalmış Albumin, birlikte artmış alfa-2 globülin. Bu, protein kaybı paterni renal hastalık (nefrotik sendrom) ya da GI kaybı düşündürür.

1	Albumin	39.16% L	16.02	54.70% ... 69.66%
2	Alpha-1	10.06% H	4.11	2.63% ... 5.03%
3	Alpha-2	24.36% H	9.96	4.87% ... 10.48%
4	Beta-1	8.03%	3.28	5.35% ... 9.19%
5	Beta-2	3.24%	1.33	2.38% ... 7.11%
6	Gamma	15.15%	6.20	9.69% ... 18.90%
Total			40.90	



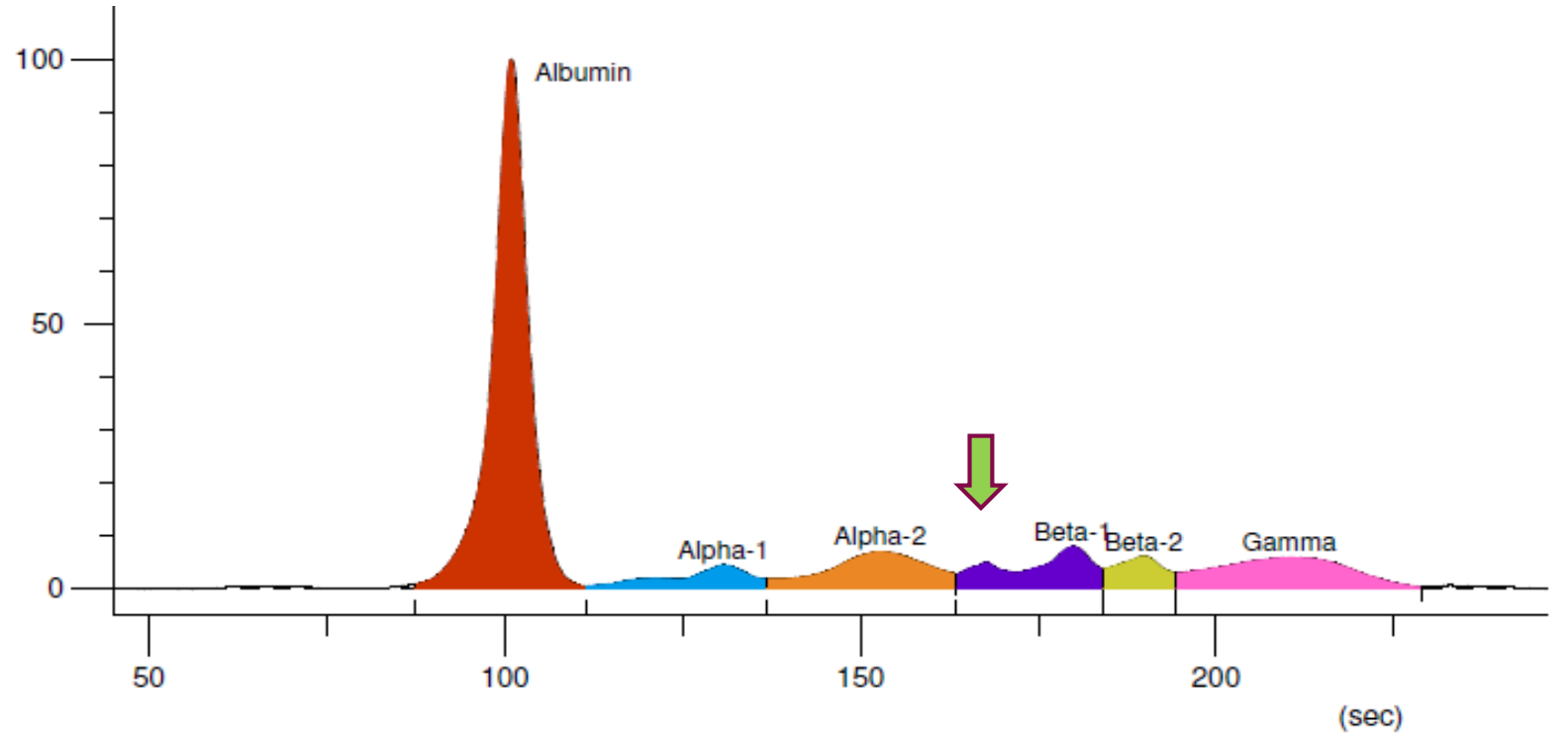
İnflamatuvar yanıt? Intravasküler Hemoliz?



Alfa-1 artışı inflamatuvar yanıtla bağlı ise, yanında alfa-2'nin artmaması, muhtemel intravasküler hemolize bağlı Haptoglonin düşüklüğü nedeni ile olabilir. Beta-1 globulin düşüktür (hepatosellüler yetmezlik, malnütrisyon ya da Transferrin düşüklüğüne neden olabilecek protein kaybı?) Gama bölgesinde erken bölgede yoğunlaşma inflamatuvar yanıt (CRP artışı) ile uyumlu olabilir. Görece poliklonal artış aktif kronik inflamasyon ya da otoimmün kaynaklı olabilir.



Hemolizli Numune

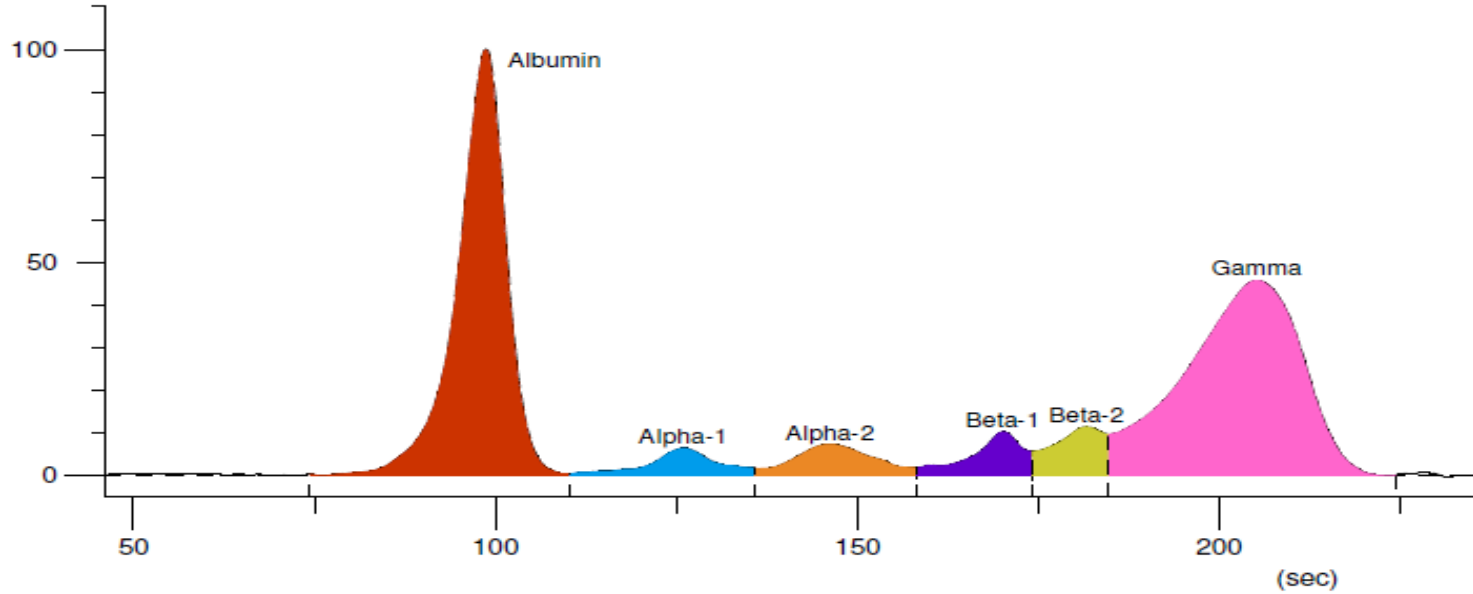


1	Albumin	56.70%	3.52	54.70% ... 69.66%
2	Alpha-1	5.45% H	0.34	2.63% ... 5.03%
3	Alpha-2	11.04% H	0.68	4.87% ... 10.48%
4	Beta-1	9.30% H	0.58	5.35% ... 9.19%
5	Beta-2	4.59%	0.28	2.38% ... 7.11%
6	Gamma	12.92%	0.80	9.69% ... 18.90%
Total			6.20	

Alfa2-Beta globülin arasındaki yoğunlaşmanın numunede gözlenen hemolize bağlı olabileceği değerlendirilmiştir. Hemolizi olmayan bir numune ile testin tekrarlanması önerilir.



Poliklonal hipergamaglobulinemi

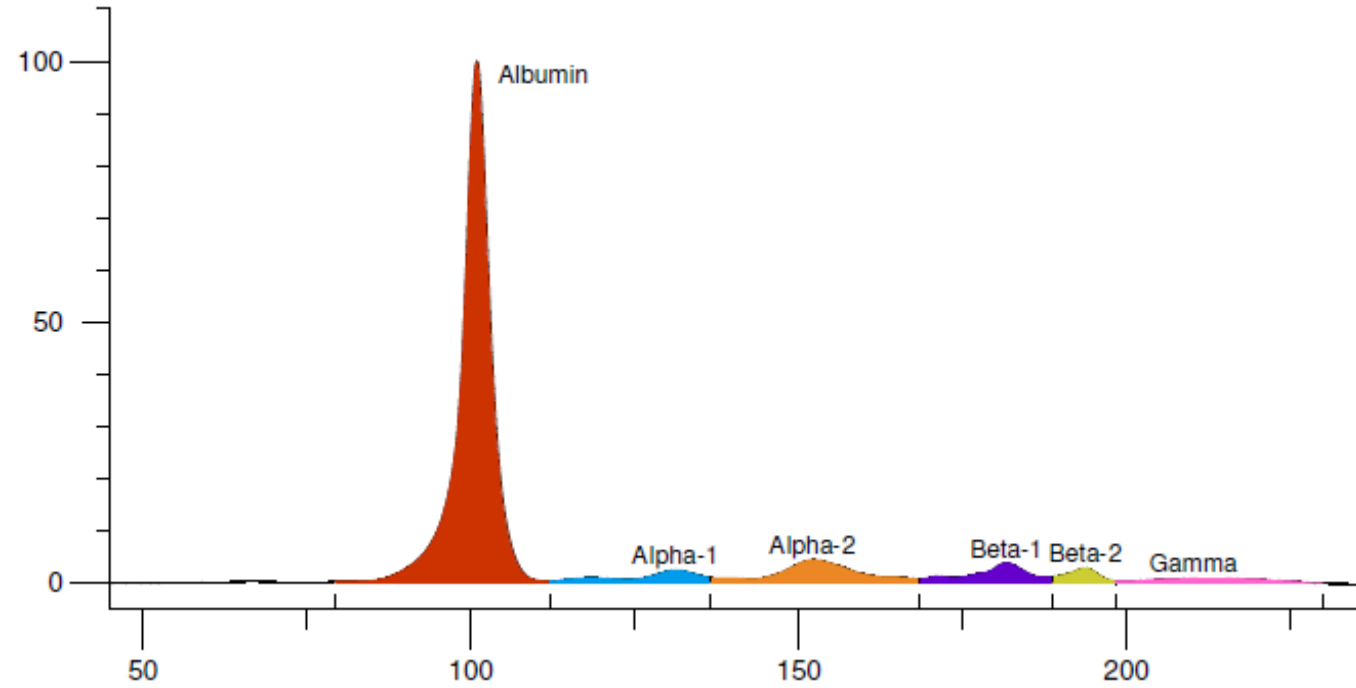


Gama globülin bölgesinde poliklonal artış izlenmektedir. İmmüoglobulinlerde poliklonal artış kronik inflamasyon ile uyumludur.

1	Albumin	39.41% L	3.66	54.70% ... 69.66%
2	Alpha-1	3.61%	0.34	2.63% ... 5.03%
3	Alpha-2	4.84% L	0.45	4.87% ... 10.48%
4	Beta-1	4.26% L	0.40	5.35% ... 9.19%
5	Beta-2	4.76%	0.44	2.38% ... 7.11%
6	Gamma	43.12% H	4.01	9.69% ... 18.90%
Total			9.30	



Hipogamaglobulinemi



Hipogammaglobulinemi izlenmiştir. Kantitatif immünglobulin ölçümleri ile birlikte klinik şüphe var ise serum ve idrar immünfiksasyon EF ile takibi önerilir.



Yorum Örnekleri-1

- ▶ Bir Hemodilüsyonu düşündürecek şekilde tüm parametrelerde azalma
- ▶ AGE'de Albuminin anodal sınırında bulanıklık izlenmektedir. Bir ilacın ya da bilirubinin albümine bağlanması sonucu ya da Heparin tedavisi sırasında gözlenebilir.
- ▶ Artmış alfa-1 ve 2 globülinler, azalmış albumin ve transferrin; Akut inflamasyon ile uyumlu değerlendirilmiştir.
- ▶ Reaktif bir durumu düşündürecek şekilde akut faz proteinlerinde göreceli artış
- ▶ Artmış Alfa-2 globülin ve C3 bandı subakut inflamasyon düşündürmektedir
- ▶ Akut faz reaktanları artışı ve immünglobulinlerde poliklonal artış; aktif, kronik inflamasyonu düşündürmektedir.



Yorum Örnekleri-2

- ▶ Haptoglobulinde azalma hemolitik süreç ya da herediter eksiklik ile uyumlu olabilir.
- ▶ Alfa-2 ve beta globülinlerin artışı östrojen etkisi ile uyumlu olabilir.
- ▶ Beta-gamma köprüleşmesi izlenmektedir. IgA'da artış düşündürmektedir. KC hastalığı, intestinal ya da AC enfeksiyonları ve Romatoid artritde görülebilir.
- ▶ Azalmış albümin ve haptoglobulin, gama globülinde poliklonal artış ve beta-gama köprüleşmesi KC hastalığı ile uyumlu değerlendirilmiştir.
- ▶ Total protein, albümin ve gama globülin azalmıştır. Hafif Protein kaybı paterni ile uyumlu olabilir

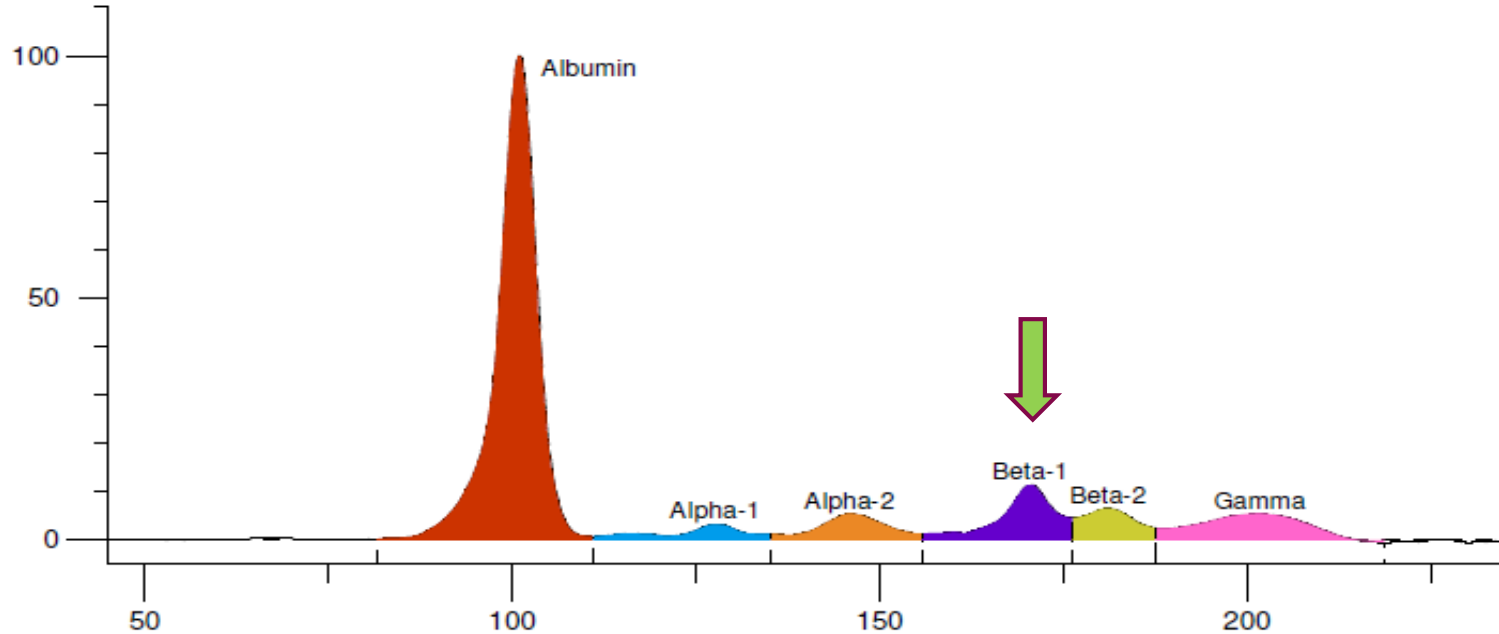


Yorum Örnekleri-3

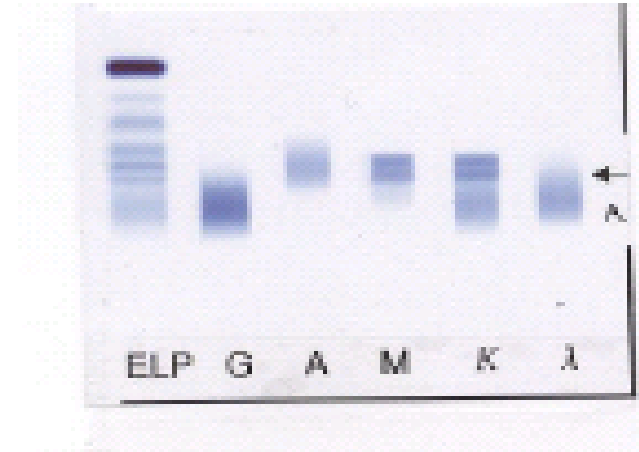
- ▶ AGE çalışmasında jelin aplikasyon noktasında kısıtlı bir iz kriyoglobulin düşündürür.
- ▶ Gama globülin bölgesinde poliklonal artış ile birlikte oligoklonal bantlar, sıklıkla kronik enfeksiyonlar, otoimmün hastalıklar ve daha nadir olarak da lenfoproliferatif süreçlerde gözlenebilir.
- ▶ Zeminde artış olsun ya da olmasın, oligoklonal bantlardan biri diğerlerinden daha belirgin ise minör paraprotein yönünden ileri inceleme ve takip önerilir.
- ▶ Beta-1 veya beta-2 globulin bölgelerinde izole artışlar, özellikle suprese gama globülin ile birlikte ise mutlaka minör paraprotein yönünden ileri inceleme ve takip önerilir.



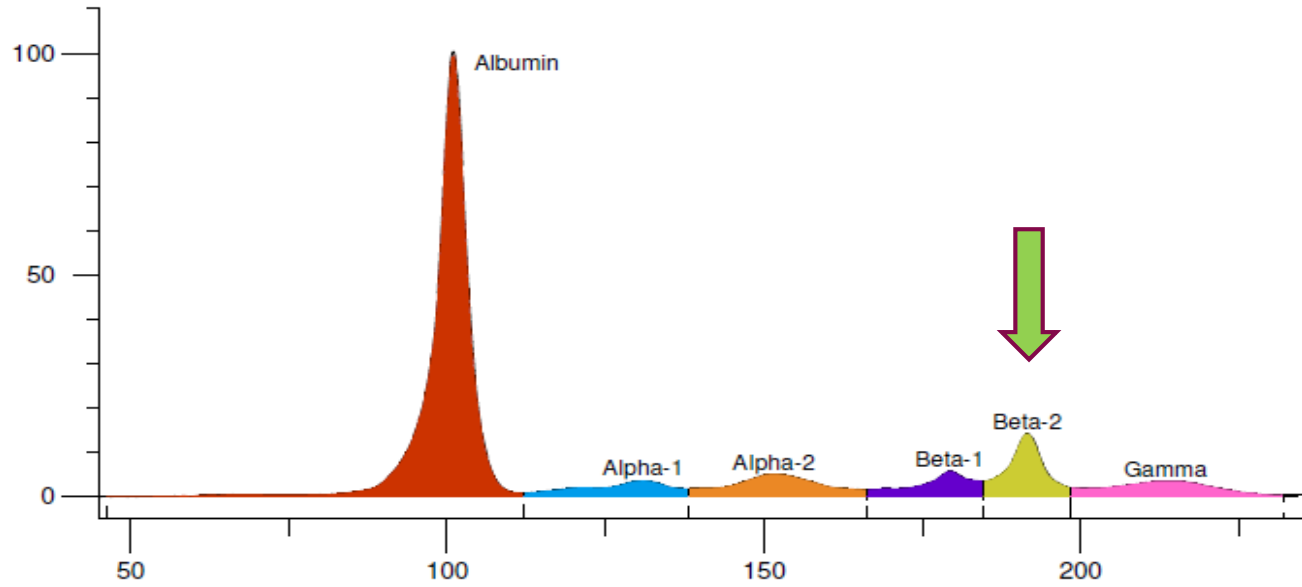
Artmış Beta-1 (monoklonal?)



Artmış beta-1 (transferrin) bandı demir eksikliği ile uyumlu olabilir, minör bir paraproteine bağlı olabilir ya da radyopak madde interferansı ekarte edilmelidir.



Hafif Zincir Hastalığı

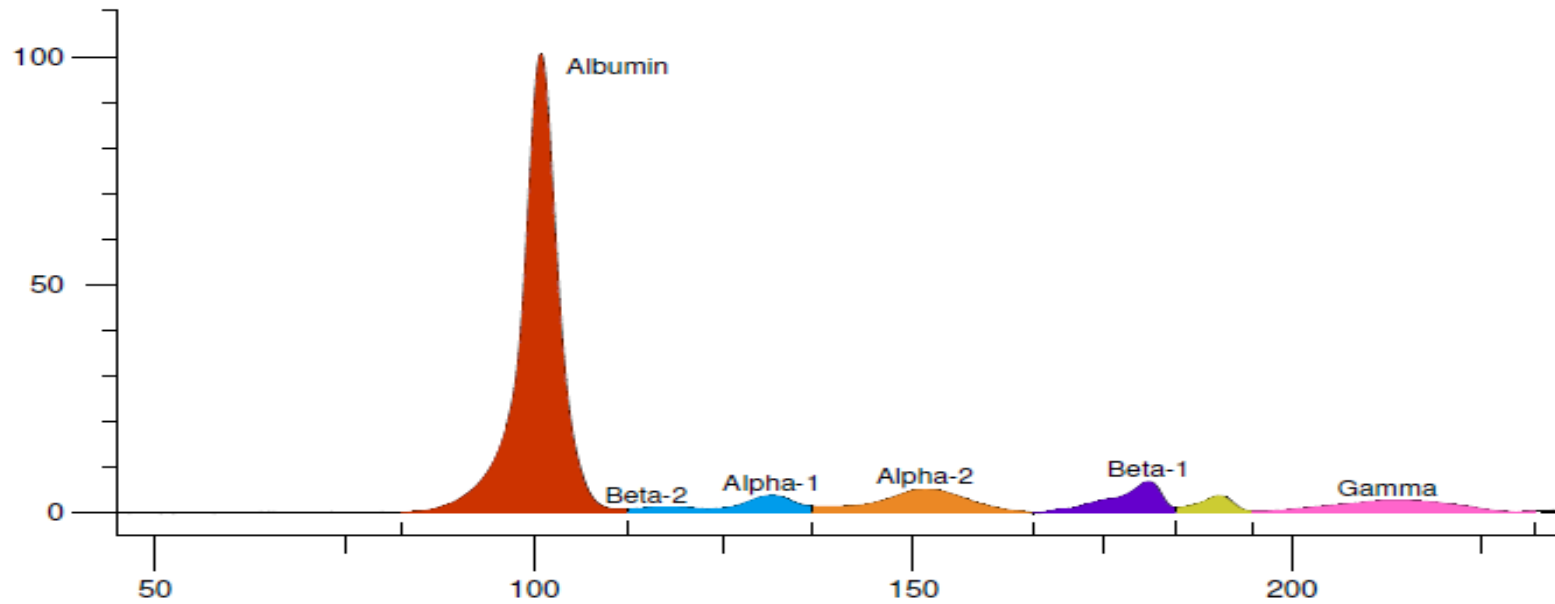


1	Albumin	62.60%	34.99	54.70% ... 69.66%
2	Alpha-1	5.86% H	3.27	2.63% ... 5.03%
3	Alpha-2	8.72%	4.88	4.87% ... 10.48%
4	Beta-1	5.89%	3.29	5.35% ... 9.19%
5	Beta-2	9.56% H	5.34	2.38% ... 7.11%
6	Gamma	7.37% L	4.12	9.69% ... 18.90%
Total			55.90	

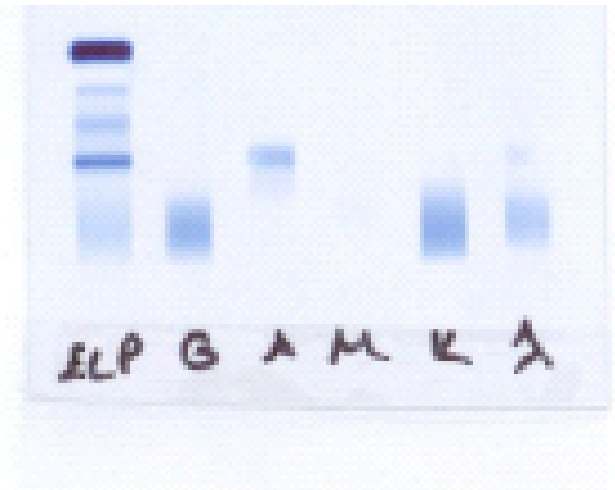
Beta-2 globülin ile aynı yerleşimde minör paraprotein bandı izlenmiştir. (Beta-2 + PP = 5,34 g/L)



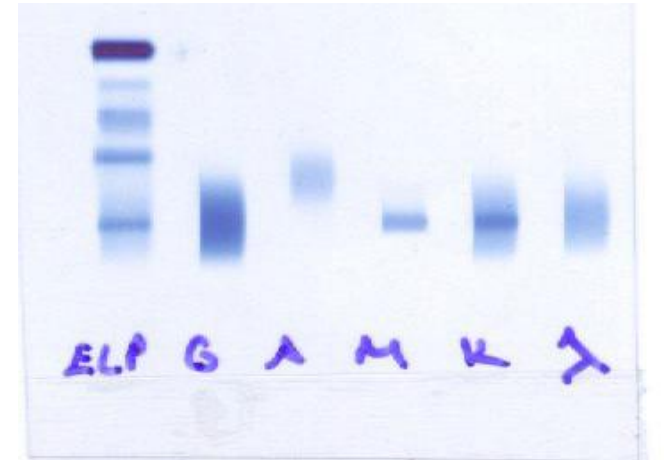
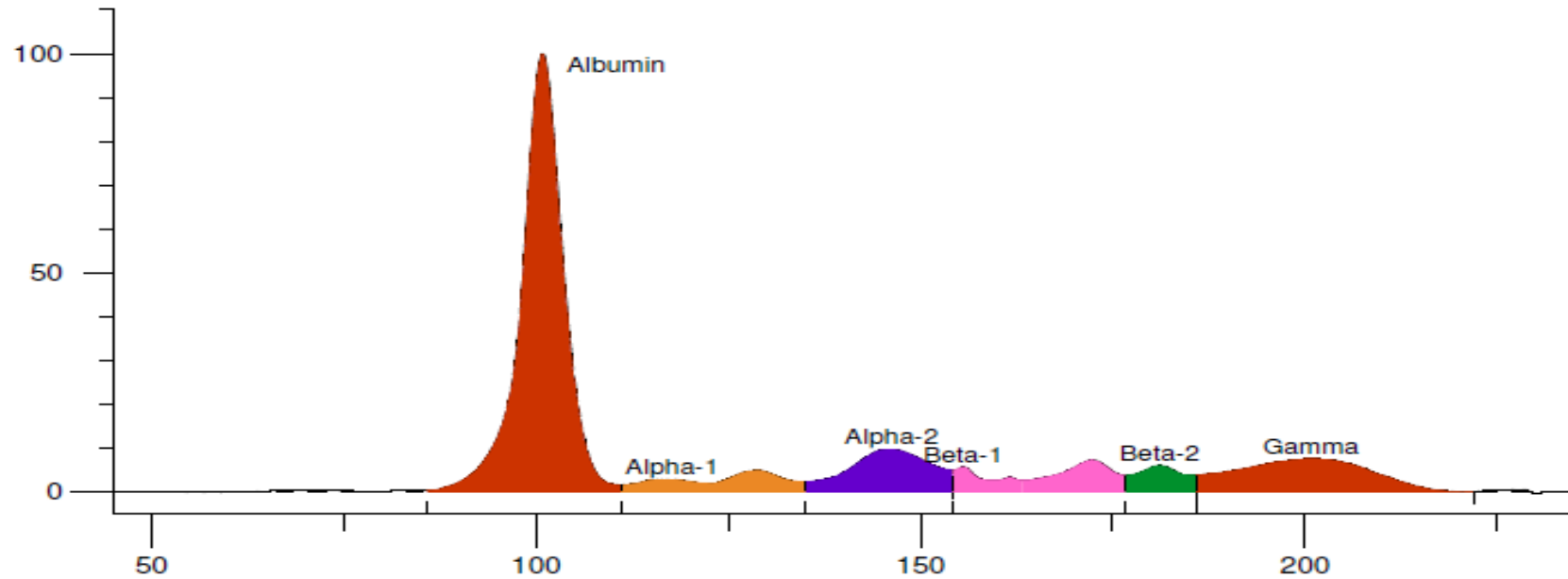
Gama suprese, beta-1 düzensiz !



1	Albumin	70.07% H	45.69	54.70% ... 69.66%
2	Alpha-1	5.35% H	3.49	2.63% ... 5.03%
3	Alpha-2	8.95%	5.84	4.87% ... 10.48%
4	Beta-1	6.22%	4.06	5.35% ... 9.19%
5	Beta-2	2.53%	1.65	2.38% ... 7.11%
6	Gamma	6.88% L ←	4.49	9.69% ... 18.90%
Total			65.20	



CZE'de tespit edilemeyen IgM-kappa



Değerlendirmeyi zorlaştıran durumlar

- ▶ Özellikle alfa-2 ve beta-1,2 globulin bölgelerinde yer alan minör bantlar bu bölgelerdeki fizyolojik proteinler tarafından maskelenebilir
- ▶ Radyopak kontrast maddelerin yine aynı bölgelerde artış ve artefakt bant görüntüsüne yol açabileceği bilinmelidir.
- ▶ Numunedeki hemoliz alfa-beta arası bölgede artış ve yoğunlaşmaya yol açabilir.
- ▶ Plazma numunelerinde izlenen Fibrinojen beta-gamma arası bölgede ayrı bir bant olarak gözlenebilir.
- ▶ Beklemiş numunelerde özellikle Beta-2 globülin baskılanır.



Paraprotein tespit hassasiyetleri

▶ AGE

SPE (IFE olmadan) 0,5 g/L

SPE (IFE ile birlikte) 0,1 g/L

▶ CZE

SPE (IS ile birlikte) 0,25 g/L



Serum Paraprotein kantifikasyonu için öneriler

- ▶ Gamma bölgesindeki paraproteinler, dansitometrik ya da kapiller zon elektroforez ölçümü ile g/L olarak en yakın tam sayıya yuvarlanarak verilmelidir.
- ▶ < 1 g/L olan ve görülebilen paraproteinler özellikle arka planda bir poliklonal görüntü var ise güvenilir olarak kantifiye edilemeyecekleri için “< 1 g/L” ya da “**eser**” şeklinde “**miktarı güvenilir olarak belirlenemeyen küçük bant**” yorumu eklenerek rapor edilmelidir.
- ▶ Sadece IFE ile tespit edilebilen paraproteinler, kantitatif değer vermek yerine yorum kısmında belirtilmelidir. (Örn. IgG-kappa tipi paraprotein sadece IFE ile tespit edilmiştir)
- ▶ Paraprotein gamma dışı bir bölgede ise, (beta bölgesi IgA paraproteinleri için en sık rastlanan bölgedir) beta bölgesindeki total protein rapor edilir (beta+paraprotein) ve takipte de devam edilir.



Standart MM tedaviye yanıt kriterleri (IMWG)

- ▶ **sCR = Tam Yanıt (Stringent)** CR + Normal FLC oranı Ki biopside immünohistokimyasal olarak klonal hücre bulunmaması
- ▶ **CR=Tam Yanıt:** Serum ve idrar IFE negatif (PE'de PP yok, IFE gerekli) (Ki < %5 klonal hücre)
- ▶ **vgPR=Çok iyi kısmi Yanıt:** Serum ve idrar IFE'de PP var fakat PE'de yok (PE'de PP yok ise IFE gerekli) ya da serum PP \geq %90 azalmış + idrarda <100 mg/24 saat.
- ▶ **PR=Kısmi Yanıt:** Serum PP \geq %50 azalmış + idrarda PP \geq %90 azalmış ya da < 200mg/24 saat (Serum ya da idrar PP ölçülemiyor ise, hasta FLC klonu ile diğeri arasındaki fark \geq %50 azalmış olmalı)
- ▶ **MR=Minimal Yanıt:** Serum PP \geq %25 <%49 azalmış, ve İdrar PP %50-89 arası azalmış
- ▶ **Stabil Hastalık:** Yukarıdaki ve aşağıdaki kriterleri karşılamayan hastalar



Standart MM tedaviye yanıt kriterleri (IMWG)

► **PD=Progresif Hastalık:**

Sıralananlardan en az biri veya daha fazlası;

En düşük yanıt değerinden %25 artış (bir ya da daha fazla kriterde)

Serum PP mutlak artış ≥ 5 g/L olmalı

En düşük PP ≥ 50 g/L ise mutlak artış ≥ 10 g/L olmalı

idrar PP mutlak artış ≥ 200 mg/24 saat olmalı

Serum ve idrar PP ölçülemeyen hastalarda hasta FLC klonu ile diğeri arasındaki farkta mutlak artış 100 mg/L olmalı

► Klinik Relaps

► CR'dan Relaps



TEŞEKKÜRLER...

