Il coinvolgimento del medico curante e la ricerca delle crioglobuline nella gestione del paziente con sospetta componente monoclonale

Roberto Cesati, Silvia Besana, Pierluigi Tramacere
Laboratorio Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera di Desio e Vimercate, Presidio Ospedaliero di Carate Brianza

ABSTRACT

The role of general practitioner and cryoglobulin testing in the evaluation of patients with suspected monoclonal band at electrophoresis. Serum protein electrophoresis (SPE) is the recommended laboratory test for the detection of monoclonal immunoglobulins (MC). When the general practitioner is informed of any MC not previously recorded in the laboratory database, for its characterization and for clinical evaluation of the monoclonal gammopathy, he can require four additional tests: serum immunoglobulin determination, immunofixation electrophoresis, detection of Bence Jones protein in urine and cryoglobulin characterization. In this study, over a period of 18 months, we tested the outcome of this approach in our setting. On 31,559 routine SPE, we detected 851 MC not previously known (2.7%). About 35% of the suspected MC were not further investigated, because the practitioner thought to stop investigations for several reasons, such as MC already known, patient aged or in critical conditions. 69 out of the remaining 551 patients (12.5%) were positive for cryoglobulins, mostly with low cryocrit, and were identified as subpopulation at risk for vasculitis. The engagement of the general practitioner and the cryoglobulin testing may represent an improvement in the clinical evaluation of the patient with newly detected MC.

INTRODUZIONE

L'elettroforesi delle sieroproteine (SPE) è un esame eseguito da tutti i laboratori di patologia clinica e rappresenta l'indagine diagnostica elettiva per la ricerca delle componenti monoclonali (CM) (1). L'evoluzione tecnologica degli ultimi anni ha fornito al laboratorio molti elementi di miglioramento nell'esecuzione della SPE in termini di automazione e rapidità operativa. L'introduzione di sistemi chiusi per l'esecuzione della SPE in elettroforesi capillare zonale ha indubbiamente migliorato anche la sua riproducibilità. Rimane invece ancora aperto il dibattito sulle modalità di interpretazione e di refertazione di questo esame (2). La letteratura scientifica è ricca di proposte per l'interpretazione del quadro elettroforetico fisiologico e patologico (3-5).

In Italia le raccomandazioni ufficiali della SIBioC per l'esecuzione e l'interpretazione della SPE e la gestione delle CM sono state pubblicate negli anni '90 (6-8). In quel decennio, inoltre, *Biochimica Clinica* ospitava una rubrica fissa denominata "L'angolo dell'elettroforesi", che commentava quadri elettroforetici molto particolari con CM caratteristiche e altre alterazioni molecolari. Riguardo alla refertazione dell'esame mancano, invece, vere e proprie linee guida. In passato si è attribuito alla SPE un ruolo diagnostico nella flogosi acuta e cronica, nelle epatopatie e nella sindrome nefrosica, ma nel corso degli anni successivi la SPE è stata utilizzata solo come esame di primo livello per confermare il sospetto clinico di gammopatia monoclonale (1).

Mentre la segnalazione e l'identificazione di una CM viene effettuata dal laboratorio, la gestione del paziente con gammopatia monoclonale è compito del medico curante. Di conseguenza è essenziale la comunicazione con il medico di medicina generale, che deve essere consapevole delle caratteristiche delle CM, delle condizioni patologiche associate a questo segno biochimico e delle complicanze cliniche che una CM può indurre (9, 10). Scopo del nostro lavoro è presentare l'esperienza condotta presso il nostro laboratorio nella gestione del paziente con sospetta CM, attraverso il coinvolgimento diretto del medico curante, e valutare l'efficacia del protocollo diagnostico da noi adottato con particolare riferimento alla ricerca delle crioglobuline.

MATERIALI E METODI

Nel periodo compreso tra gennaio 2008 e giugno 2009 presso il laboratorio dell'Ospedale di Carate Brianza sono state eseguite 31.559 SPE su prelievi di soggetti ambulatoriali e degenti. La SPE era eseguita in gel di agarosio utilizzando strisce tamponate con tris-barbital a pH 8,5 (kit Hydragel 30 B1+B2, Sebia) e colorante nero-amido, utilizzando il sistema semiautomatico per elettroforesi Hydrasys (Sebia) secondo le indicazioni fornite dal produttore. Il tracciato finale, con una luce "micro" e una lunghezza di circa 2,2 cm, era quindi sottoposto ad ispezione visiva da parte di due operatori indipendenti per la ricerca di sospette CM anche di piccola entità o sovrapposte ad altre frazioni proteiche. Il riscontro alla ispezione visiva di anomalie compatibili con la presenza di CM era sempre riportato nel referto della SPE insieme al tracciato densitometrico. Al medico curante era inoltre inviato un allegato indicante gli esami di approfondimento ritenuti necessari al completamento dell'iter diagnostico: immunofissazione (IFE), determinazione delle immunoglobuline IgG, IgA, IgM, ricerca nelle urine ed eventuale quantificazione della proteina di

Bence Jones (BJP) e ricerca delle crioglobuline.

Il dosaggio delle proteine totali, nel siero e nelle urine, e delle immunoglobuline sieriche era eseguito sul sistema analitico Cobas c501 (Roche Diagnostici) con metodi, rispettivamente, colorimetrico con biureto, turbidimetrico con benzetonio cloruro e immunoturbidimetrico. L'IFE del siero, delle urine o dei crioprecipitati era eseguita in gel di agarosio sul sistema Hydrasys utilizzando il metodo Hydragel 4 IF (Sebia) con colorante violetto acido. Nel sospetto di CM IgD o IgE, le IFE erano ripetute utilizzando antisieri anti-IgD ed anti-IgE Sebia. La ricerca della BJP era eseguita sul secondo campione di urine del mattino non concentrato, in accordo con le linee guida SIBioC (11). Dopo centrifugazione e dosaggio delle proteine urinarie totali veniva eseguita l'elettroforesi ad alta risoluzione (HR) in gel di agarosio (Hydragel 7 HR, Sebia) con corsa elettroforetica di 4,2 cm e colorazione con violetto acido. La presenza di ogni sospetto di CM all'esame ispettivo della striscia determinava l'esecuzione dell'IFE sul campione di urine. In casi particolari, quali l'identificazione di una BJP che comigrava con l'immunoglobulina monoclonale intatta, venivano utilizzati anche antisieri anti-catene leggere libere (11, 12). La quantificazione della BJP veniva eseguita densitometricamente su un ulteriore campione di urine delle 24 ore (13) con una sensibilità di 15 mg/L, come specificato dal produttore del kit HR.

Per la ricerca delle crioglobuline, un campione di 8 mL di sangue intero era prelevato in provetta secca (Vacutainer BD) e mantenuto a 37 °C fino alla consegna in laboratorio. Dopo completa coagulazione del sangue in termostato a 37 °C, il campione veniva centrifugato a 2000g per 10 min ed il siero immediatamente trasferito in provetta di vetro graduata (provetta di Wintrobe) e conservato in frigorifero a 4 °C per almeno 7 giorni. I campioni positivi erano sottoposti a centrifugazione a 4 °C per 15 min a 2000g per calcolare il criocrito, espresso come rapporto percentuale del volume del crioprecipitato rispetto al volume totale di siero. Il crioprecipitato veniva poi separato e lavato con soluzione fisiologica a 4 °C per almeno 3 volte e risolubilizzato a 37 °C in 1 mL di soluzione fisiologica (14). Nel caso di criocrito >5%, il materiale ottenuto dopo risolubilizzazione veniva sottoposto ad IFE, mentre per valori di criocrito <5% si eseguiva una HR per evidenziare l'eventuale presenza di CM e classificare le crioglobuline, quando possibile, secondo i criteri suggeriti dalla letteratura (15, 16).

RISULTATI

Delle 31,559 SPE eseguite, 1523 (4,8%) presentavano almeno una sospetta CM e 672 di queste (2,1% delle SPE) erano di pazienti in monitoraggio clinico e quindi già registrati nell'archivio elettronico del laboratorio. Le rimanenti 851 (2,7% delle SPE) risultavano invece sospette CM di prima rilevazione da confermare alla IFE. Per 551 (64,7%) di questi nuovi casi, il medico curante del paziente riteneva opportuno completare l'iter diagnostico come da indicazione del laboratorio. L'IFE del siero risultava positiva in 355 (64,4%) campioni, di difficile interpretazione e refertata come "dubbia" o con "aspetto oligoclonale" in 43 (7,8%) e negativa nei rimanenti 153 (27,8%) casi. Le CM erano singole in 278 (78,3%) campioni, con tipologia riassunta nella Tabella 1, mentre in 77 (21,7%) sieri l'IFE evidenziava la presenza di più CM: in 24 casi le CM erano due (profilo biclonale) e costituite dallo stesso tipo di immunoglobulina (Tabella 2), mentre le restanti 53 CM multiple erano costituite da due o piu' classi di immunoglobuline in varie combinazioni (Tabella 3). In 4 casi (1%), infine, si rilevavano CM costituite da catene leggere libere di tipo κ (2 casi) o λ (2 casi). In questi ultimi due pazienti, sconosciuti al nostro sistema informatico e ricoverati per anemia, riscontravamo una

Tabella 1
Tipologia e frequenza delle 278 immunoglobuline monoclonali singole caratterizzate mediante immunofissazione del siero

Tipo	N° casi (%)
IgGκ	114 (41,0)
IgGλ	77 (27,7)
IgMκ	33 (11,9)
IgMλ	27 (9,7)
IgAλ	14 (5,1)
IgAκ	12 (4,3)
λ libere	1 (0,3)

Tabella 2
Tipologia e frequenza delle 24 immunoglobuline biclonali, costituite dallo stesso tipo di immunoglobulina

Tipo	N° casi (%)
IgMκ	8 (33,3)
IgAκ	6 (25,0)
IgGκ	5 (20,8)
IgGλ	3 (12,5)
IgAλ	2 (8,4)

Tabella 3
Tipologia e frequenza delle 53 immunoglobuline monoclonali multiple costituite da almeno due diverse classi di immunoglobuline

Tipo	N° casi (%)
IgGκ e IgGλ	14 (26,4)
IgGκ e IgMκ	7 (13,2)
IgGλ e IgMλ	6 (11,3)
IgGλ e IgMκ	6 (11,3)
IgGκ e IgMλ	4 (7,5)
IgGλ e IgAλ	3 (5,7)
IgGλ e λ libere	1 (1,9)
IgGλ, IgMk e κ libere	1 (1,9)
Altre combinazioni	11 (20,8)

sospetta piccola CM nel siero associata ad ipogammaglobulinemia. Le indagini successive consentivano di trasformare il sospetto di patologia inizialmente formulato in diagnosi di mieloma micromolecolare.

Nei 551 soggetti ritornati al laboratorio per effettuare gli esami di approfondimento, la ricerca delle crioglobuline risultava positiva in 69 casi (12,5%), 16 dei quali mostravano all'IFE del siero un profilo dubbio o con aspetto oligoclonale. Il criocrito era >5% in 6 pazienti (8,7%), in altri 5 (7,2%) si evidenziava una torbidità diffusa, reversibile a 37 °C, e negli altri 58 (84,1%) il criocrito era <2%. Se possibile era eseguita la tipizzazione delle crioglobuline, ma la scarsità del crioprecipitato spesso rappresentava un ostacolo procedurale insormontabile. Non abbiamo ritenuto di utilizzare metodi preparativi dedicati per migliorare il recupero delle crioglobuline (17). Ai fini interpretativi, l'associazione di crioglobuline con la presenza nel siero di una CM di piccola entità o con un profilo oligoclonale deponeva per una crioglobulinemia di tipo II. Nei 6 pazienti con criocrito >5% la IFE permetteva di classificare tutti i casi come crioglobulinemia di tipo II con IgMκ monoclonale associata ad IgG policlonali.

Per quanto riguarda la BJP, su 551 urine l'HR risultava sospetta per CM in 115 (20,8%) campioni, che erano quindi immunofissati; la BJP era rilevata in 33 urine (28,7%) e in altre 6 (5,2%) il risultato era dubbio per la presenza di una piccola banda nel contesto di una proteinuria tubulare.

DISCUSSIONE

Il lavoro da noi condotto si è focalizzato sulla verifica della validità del protocollo operativo applicato in caso di sospetta CM, che comporta il coinvolgimento del medico curante, e sull'efficacia diagnostica degli esami di approfondimento da noi consigliati nei nuovi casi di sospetta CM, con particolare riferimento alla ricerca delle crioglobuline.

La percentuale di sospette CM rilevate alla SPE e confermate alla IFE è poco soddisfacente: in pratica un terzo delle alterazioni ritenute CM non si confermavano tali alla IFE e quindi non avrebbero meritato alcun approfondimento diagnostico. Le ragioni della bassa specificità riscontrata alla SPE, tutto sommato accettabile per di un esame di primo livello, è da ricercarsi nei criteri molto stringenti da noi adottati nella ricerca delle CM, che hanno inviato alla IFE ogni più piccolo sospetto di alterazione monoclonale. I risultati ottenuti nella tipizzazione delle CM, in termini di frequenza degli isotipi di catene pesanti delle immunoglobuline, sono invece ben allineati con altri studi disponibili in letteratura (18).

In caso di riscontro di una sospetta CM, le procedure di refertazione più comunemente utilizzate nei laboratori, come emerso da una recente indagine condotta dal Gruppo di Studio SIBioC Proteine, possono essere così riassunte: a) elaborazione di un referto solo descrittivo, b) formulazione di un referto con allegata indicazione ad effettuare l'esame di conferma e caratterizzazione della sospetta CM, c) esecuzione dell'IFE ad ogni riscontro di sospetta CM direttamente sullo stesso campione di siero (2). Nel nostro laboratorio il referto della SPE prevede la segnalazione della sospetta CM e suggerisce al medico curante gli esami idonei al completamento del percorso diagnostico del paziente; il referto è inoltre corredato da uno specifico foglio informativo sul significato clinico della CM e sul valore diagnostico degli esami di approfondimento suggeriti (8). Un vantaggio di questa procedura è di evitare approfondimenti diagnostici a soggetti precedentemente indagati presso altri centri, ma sconosciuti al nostro laboratorio, per i quali il medico curante possiede già adeguata documentazione clinica, oppure a pazienti molto anziani o in condizioni cliniche critiche, situazioni per le quali il medico curante può ragionevolmente ritenere non necessario procedere ad ulteriori accertamenti. In totale, circa il 35% delle sospette CM rilevate nel periodo di osservazione da noi considerato non è stato ulteriormente indagato.

Con il protocollo di esami da noi proposto risulta inoltre più facile inquadrare le IFE dubbie. Il riscontro di crioglobuline, anche in minima quantità, può infatti spiegare quadri caratterizzati dalla presenza di quadri che richiamano CM non ben riconoscibili o a "strati sovrapposti", come da immunocomplessi circolanti, tipicamente in corso di infezioni virali. Le difficoltà interpretative della IFE in gel d'agarosio sono ben descritte anche in letteratura (19, 20).

La ricerca della BJP è stata eseguita non applicando alla lettera le linee guida più recenti in quanto, nella nostra esperienza, l'HR in associazione con l'IFE del siero permette l'identificazione di tutti i casi di mieloma micromolecolare. La nostra scelta operativa si basa sull'esperienza sviluppata in anni di attività e sull'attenta ispezione visiva cui vengono sottoposti i tracciati di HR. Nella nostra casistica, su 551 campioni di urine solo 115 sono stati approfonditi con IFE, con un riscontro finale di 33 casi di positività. Il vantaggio economico di questa procedura ci sembra evidente e nel contempo riteniamo di non aver rinunciato al necessario grado di accuratezza diagnostica, avendo adottato adeguati margini di selezione dei campioni da avviare ad IFE urinaria. In 6 casi di IFE urinaria l'interpretazione è risultata difficoltosa a causa della presenza di una piccola banda di catene leggere κ o λ interpretabile come BJP oppure come banda centrale, appena più marcata delle altre, del profilo elettroforetico urinario a ristretta eterogeneità descritto come "ladders" (12, 21).

Per quanto riguarda il dosaggio delle catene leggere libere nel siero, il nostro laboratorio non ha ancora attivato tale esame che potrebbe migliorare la stratificazione del rischio di evoluzione maligna dei pazienti alla prima diagnosi di CM, anche se non può ancora sostituire la ricerca della BJP nelle urine durante il monitoraggio ed è poco sensibile nella ricerca delle CM (22-24).

L'aspetto a nostro avviso più rilevante del nostro protocollo operativo è il coinvolgimento del medico curante del paziente, che per formazione non possiede solitamente le conoscenze specialistiche sulla gestione di laboratorio del sospetto di CM. L'allegato al referto aiuta il medico curante nel corretto inquadramento diagnosti-

co del paziente con sospetta CM, informandolo sulle possibili associazioni cliniche e sulle complicanze correlate ad una CM. Il laboratorio, in questo modo, guida la corretta procedura diagnostica e svolge il ruolo di consulenza specialistica che dovrebbe essergli proprio.

Il secondo argomento da noi valutato è l'efficacia diagnostica della ricerca sistematica delle crioglobuline nei pazienti con sospetta CM. Le crioglobuline monoclonali sono tipicamente associate a malattie linfoproliferative, prima fra tutte il mieloma. Al contrario, le crioglobuline miste sono prevalentemente correlate all'infezione da virus dell'epatite C (8, 13) e, secondo dati recenti, anche da virus Chikungunya (14, 25) e vengono caratterizzate in base alla tipologia delle immunoglobuline del crioprecipitato (monoclonali, oligoclonali o policlonali) (9, 10). Diverse sono le problematiche legate alla loro ricerca e caratterizzazione, e le informazioni cliniche che il loro riscontro anche occasionale apporta (26). Una scorretta fase preanalitica dell'esame (trasporto o conservazione del campione a temperatura <37 °C) può determinare la precipitazione delle crioglobuline con conseguente ipogammaglobulinemia alla SPE. La presenza di CM di piccole dimensioni o di quadri non ben classificabili di oligoclonalità possono essere associati alla presenza di immunocomplessi circolanti.

Nella nostra casistica di SPE con sospetta CM, nel 12,5% dei casi sono state successivamente rilevate crioglobuline e, tra questi, il 25% circa non presentava una CM ben definita sul tracciato della SPE, ma solo un "aspetto oligoclonale" come da presenza di immunocomplessi. Questi immunocomplessi circolanti possono precipitare determinando vasculiti di vario grado, con ulcere cutanee, interessamento renale (nefrite e/o insufficienza renale), articolare (poliartriti) e del sistema nervoso periferico (neuropatia sensitiva e/o motoria) (14). Il costo veramente contenuto dell'esame, in rapporto ai benefici clinici che possono derivare dalla identificazione delle crioglobuline, è un ulteriore valido motivo che giustifica la sua esecuzione in questo contesto clinico. Non abbiamo, al momento, elaborato dati clinici o anamnestici inerenti il monitoraggio dei pazienti positivi per crioglobulinemia, né effettuato correlazioni di tipo epidemiologico con infezioni da virus dell'epatite C o altre patologie; pensiamo però che i medici curanti dei soggetti pervenuti al nostro laboratorio, coinvolti nella gestione della CM e debitamente informati, possano gestire appropriatamente i singoli casi clinici.

In conclusione, riteniamo che l'iter diagnostico da noi adottato nella gestione dei sospetti di gammopatie monoclonali sia un metodo di lavoro praticabile ed efficace. Il coinvolgimento del medico curante nella valutazione della ricaduta clinica degli risultati di laboratorio è un sicuro stimolo all'aggiornamento ed al miglioramento continuo di tutti i profili professionali coinvolti nel processo diagnostico, consentendo una corretta gestione clinica del paziente e nel contempo valorizzando il ruolo dei laboratori clinici.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano i tecnici di laboratorio Sergio Turati, Violetta Sponchiado, Giorgio Brenna e Donatella Vasques per il loro valido e costante supporto al lavoro svolto.

BIBLIOGRAFIA

1. Graziani MS, Dolci A, Greco C, et al. Indicazioni per la richiesta di elettroforesi sieroproteica. Biochim Clin 2008;32:48-51.
2. Caldini A, Graziani MS, Terreni A, et al. Indagine sulle modalità di refertazione dell'elettroforesi sieroproteica. Biochim Clin 2009;33:62-5.
3. Keren DF. Procedures for the evaluation of monoclonal immunoglobulins. Arch Pathol Lab Med 1999;123:126-32.
4. Merlini G, Marciano S, Gasparro C, et al. The Pavia approach to clinical protein analysis. Clin Chem Lab Med 2001;39:1025-8.
5. Bossuyt X. Advances in serum protein electrophoresis. Adv Clin Chem 2006;42:43-80.
6. Aguzzi F, Fenili D, Montalbetti N, et al. L'elettroforesi delle sieroproteine. Raccomandazione ufficiale della commissione SiBioc 05. Giorn It Clin Chim 1990;15:55-9.
7. Merlini G, Aguzzi F, Astaldi G, et al. Le componenti monoclonali. Raccomandazione ufficiale della commissione SiBioC 05. Giorn It Chim Clin 1990;15:63-71.
8. Merlini G, Bellotti V, Aguzzi F. Come affrontare una gammapatia monoclonale. Biochim Clin 1991;15:1441-7.
9. Merlini G, Stone MJ. Dangerous small B-cell clones. Blood 2006;108:2520-30.
10. Cesati R, Besana S. Un approccio per confermare e valorizzare l'iter diagnostico da "sospetta componente monoclonale" a "gammopatia monoclonale". Biochim Clin 2009;33:569-70.
11. Graziani MS, Merlini G, Petrini C. Linee guida per la ricerca della proteina di Bence Jones. Biochim Clin 2001;25:23-32.
12. Graziani MS, Merlini G, Petrini C. IFCC Committee on Plasma Proteins, SIBioC Study Group on Proteins. Guidelines for the analysis of Bence Jones protein. Clin Chem Lab Med 2003;41:338-46.
13. Durie BGM, Harousseau JL, Miguel JS, et al. International uniform response criteria for multiple mieloma. Leukemia 2006;20:1467-73.
14. Shihabi ZK. Cryoglobulins: an important but neglected clinical test. Ann Clin Lab Sci 2006;36:395-408.
15. Bouet JC, Clavel JP, Danon F, et al. Biologic and clinical significance of cryoglobulins. A report of 86 cases. Am J Med 1974;57:775-88.
16. Pontet F. Cryoglobulinemia: updating. Ann Biol Clin 2005;63:238-9.
17. Passerini G, Trbos M, Motta A, et al. Valutazione di un metodo preparativo per la tipizzazione delle crioglobuline. Biochim Clin 2008,32:269-72.
18. Landgren O, Weiss BM. Patterns of monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma in various ethnic/racial groups: support for genetic factors in pathogenesis. Leukemia 2009,23:1691-7.
19. Godelieve M, Vranken G, Demuylder M, et al. Clinical capillary zone electrophoresis of serum proteins: balancing high sensitivity and high specificity. Clin Chem 2003;49:1419-20.
20. Bossuyt X, Marien G. Detection of monoclonal proteins by CZE: comparison of 2 multichannel automated system. Clin Chem 2007;53:152-3.

21. Mac Namara KM, Aguzzi F, Petrini C, et al. Restricted electrophoretic etherogenety of immunoglobulin light chains in urine. A cause for confusion with Bence Jones protein. Clin Chem 1991;37:1570-4.
22. 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;23:215-24.
23. Shasheen SP, Levinson SS. Serum free light chain analisys may miss monoclonal light chains that urine immunofixation electrophoresis would detect. Clin Chim Acta 2009;406:162-6.
24. Paladini G, Russo P, Bosoni T, et al. Identification of amyloidogenic light chains requires the combination of serum-free light chain assay with immunofixation of serum and urine. Clin Chem 2009;55:499-504.
25. Oliver M, Grandadam M, Marimoutou C, et al. Persisting mixed cryoglobulinemia in Chikungunya infection. PloS Negl Trop Dis 2009;3:e374.
26. Basile U, Di Nunno M, Gulli F, et al. Characterization of 30 low cryocrit cryoglobulins in patients with antibodies against hepatitis C virus. Biochim Clin 2009,33:137-40.