

Indagine sulle modalità di refertazione dell'elettroforesi sieroproteica

Anna Caldini¹, Maria Stella Graziani², Alessandro Terreni¹, Giampaolo Merlini³ per il Gruppo di Studio SIBioC Proteine

¹Laboratorio Generale, Dipartimento di Diagnostica di Laboratorio, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Firenze

²Laboratorio di Analisi Chimico-Cliniche ed Ematologiche, Ospedale Civile Maggiore, Azienda Ospedaliera di Verona

³Tecnologie Biomediche e Biotecnologie, Ospedale Policlinico San Matteo, Pavia

ABSTRACT

National survey on serum protein electrophoresis reporting. Serum protein electrophoresis is mainly performed to detect monoclonal components, but, at the same time, may provide information about several proteins. A comment is usually added to electrophoresis results to clarify and integrate the provided information. In order to investigate the way of electrophoresis report among Italian laboratories, a nine-point questionnaire has been handed out to the participants of the XVI edition of the "Le proteine: dal laboratorio alla clinica" meeting. From the evaluation of the 89 collected responses and taking into account the discussion made during the interactive session of the meeting, the following suggestions could be addressed: a) an appropriate comment should be added to any report, even without monoclonal component on the electrophoretic pattern; b) the term "monoclonal component" should be used to define monoclonal immunoglobulins; any other definition ("abnormal peak", "homogeneous peak", etc.) should be avoided; c) confirmatory tests (i.e., immunofixation) should be performed at presentation and when a modification of the electrophoretic pattern occurs; d) monoclonal component quantification should be performed on the electrophoresis at presentation and during follow-up; e) results should be expressed in concentration (g/L). In conclusion, the post-analytical phase of serum protein electrophoresis, including interpretation and result reporting, deserves further attention as underlined by the high rate (88%) of positive responses to the question whether standardization of electrophoresis reporting is needed.

RAZIONALE DELLO STUDIO

L'elettroforesi sieroproteica (SPE), indagine frequentemente richiesta per pazienti sia ospedalizzati che ambulatoriali, ha come finalità principale la ricerca delle componenti monoclonali (CM), ma fornisce anche indicazioni qualitative e semiquantitative su altre proteine plasmatiche. La SPE presenta quindi una certa complessità sia esecutiva che interpretativa. Un ulteriore aspetto di complessità riguarda le modalità di trasmissione ai clinici delle informazioni ottenute utilizzando un referto strutturato.

Mentre dal punto di vista analitico sono attualmente disponibili sistemi elettroforetici di buona qualità, sia su supporto solido (gel di agarosio) che in fase libera (elettroforesi capillare), la fase post-analitica, che include l'interpretazione e la refertazione della SPE, è ancora poco standardizzata e merita quindi attenzione.

Per quanto riguarda l'interpretazione dei tracciati elettroforetici, ci sono tre aspetti che vanno presi in considerazione. Innanzitutto, tra le tante informazioni che può fornire una SPE, quali possono realmente influenzare la decisione clinica e di conseguenza la gestione del paziente? A questa domanda, che altro non è se non la definizione di appropriatezza della richiesta di SPE vista da una diversa prospettiva, si è cercato di rispondere col documento recentemente pubblicato a cura del Gruppo di Studio Proteine della SIBioC (GdS-P) e attualmente aperto alla discussione (1).

Inoltre, qual è l'affidabilità e la riproducibilità dell'ispezione visiva del tracciato, la cui efficacia diagnostica può essere influenzata da molteplici fattori, quali l'esperienza dell'operatore, il numero di tracciati esaminati quotidianamente e la tipologia del tracciato? Alterazioni elettroforetiche poco

evidenti si prestano facilmente a differenti valutazioni ed interpretazioni. Complessi algoritmi matematici, basati sull'utilizzo di intelligenze artificiali quali le reti neurali, possono essere di ausilio nel cercare di rendere più standardizzata e omogenea l'ispezione visiva dei tracciati. Alcuni di questi algoritmi, recentemente sviluppati e implementati sui "software" gestionali degli strumenti per elettroforesi, possono essere efficacemente utilizzati specie nei laboratori in cui viene effettuato un numero elevato di SPE (2,3).

Il terzo ed ultimo aspetto riguarda le modalità di refertazione, che devono essere tali da trasmettere al clinico le informazioni in forma chiara, esaustiva e possibilmente omogenea.

Con lo scopo di avere una prima valutazione del grado di omogeneità di refertazione dei laboratori italiani e, allo stesso tempo, di stimolare la riflessione e la discussione su questo importante aspetto della SPE, il GdS-P ha avviato una indagine conoscitiva sull'argomento. Scopo di questo lavoro è presentare e discutere i dati scaturiti dall'elaborazione di questa indagine.

MATERIALI E METODI

E' stato preparato un questionario contenente 9 domande (Tabella 1) che è stato distribuito durante il XVI Corso CEFAR "Le proteine: dal laboratorio alla clinica" (Novembre 2007) ai partecipanti alla sessione interattiva "Validazione e referto". I questionari sono stati compilati e raccolti nel corso della sessione.

RISULTATI

Sono state raccolte 89 risposte il cui numero corrispon-

Tabella 1

Questionario concernente le modalità di refertazione dell'elettroforesi sieroproteica distribuito ai partecipanti al XVI Corso CEFAR "Le proteine: dal laboratorio alla clinica"

1. Il tracciato elettroforetico viene inviato ai clinici (in formato cartaceo o informatico):
 - Mai
 - Quando si segnalano anomalie riferibili a componenti monoclonali
 - Quando si segnalano anomalie di altro genere (bisalbuminemia, eterozigosi α_1 -antitripsina, ecc.)
 - Sempre
2. Oltre ai valori delle frazioni in % vengono refertati anche i valori in concentrazione?
 - Sì
 - No
3. Come viene refertata la frazione delle β -globuline?
 - Come singola frazione
 - Suddivisa in β_1 e β_2
4. Se il tracciato non presenta anomalie riferibili a componenti monoclonali nel referto viene inserita una nota o commento che lo attesti?
 - Sì
 - No
5. Inviare commenti che non riguardano le componenti monoclonali? (es. bisalbuminemia, sospetto deficit α_1 -antitripsina, ecc.)
 - Sì
 - No
6. Le anomalie riferibili a componenti monoclonali vengono indicate nel commento o nota come:
 - Componenti monoclonali
 - Addensamenti, asimmetrie, ecc.
 - Altra definizione
7. La quantificazione della componente monoclonale viene effettuata e riportata nel referto quando:
 - La componente monoclonale è ben separata ed è stata tipizzata
 - La componente monoclonale è ben separata, anche in assenza di tipizzazione
 - Solo se è richiesto esplicitamente
 - Sempre
 - Mai
8. La tipizzazione delle componenti monoclonali viene eseguita:
 - Come "reflex test" a discrezione del laboratorio
 - Solo dietro richiesta dei clinici
 - Con entrambe le modalità
9. Pensate che la standardizzazione delle modalità di refertazione dell'elettroforesi sieroproteica sia utile?
 - Sì
 - No
 - In parte

de a circa il 5% dei laboratori ospedalieri italiani. La distribuzione geografica sul territorio nazionale delle risposte ricevute è stata la seguente: 30% Italia settentrionale, 20% Italia centrale e 50% Italia meridionale e isole.

Il tracciato elettroforetico viene sempre inviato ai cli-

nici (in formato cartaceo o informatico) da circa 2/3 dei laboratori (72%), il 9% dei laboratori lo invia solo in presenza di segnalazione di CM, mentre un altro 8% lo invia anche in caso di altri tipi di anomalia qualitativa (ad es. bisalbuminemia o eterozigosi dell' α_1 -antitripsina). Il

restante 11% dei laboratori non invia mai il tracciato.

Nel 62% dei laboratori i risultati delle frazioni vengono refertati anche in concentrazione oltre che in percentuale; in una analoga percentuale di casi (65%), la frazione β -globulinica viene riportata suddivisa in β_1 e β_2 .

Il 64% dei laboratori ha dichiarato di non inserire alcuna nota o commento che attestino la mancata rilevazione sul tracciato di anomalie riferibili a CM, mentre nel 65% dei casi vengono inseriti commenti relativi ad altre anomalie qualitative rilevate (bisalbuminemia, eterozigosi dell' α_1 -antitripsina o profilo di fase acuta).

Analizzando in dettaglio i commenti utilizzati dai 10 laboratori che non inviano mai il tracciato, nella quasi totalità si tratta di un commento ai tracciati normali (8/10) come pure di un commento descrittivo di anomalie qualitative diverse dalle CM (9/10). Le anomalie riferibili a CM vengono definite come tali ("componenti monoclonali") dall'80% dei laboratori, nel 6% dei casi vengono utilizzate definizioni come "addensamenti" o "asimmetrie" e nel restante 14% si ricorre ad altre definizioni (ad esempio "picco omogeneo"). Per quanto riguarda la quantificazione della CM, il 32% dei laboratori dichiara di eseguirla solo se la CM è ben separata e tipizzata, mentre il 23% la esegue anche in assenza di tipizzazione purché sia ben separata. Il 12% dei laboratori esegue la quantificazione solo se esplicitamente richiesta, il 22% la esegue sempre e il restante 11% non la esegue mai.

La tipizzazione delle CM viene eseguita solo su richiesta dei clinici dal 52% dei laboratori, mentre il 15% dichiara di eseguirla come "reflex testing" a discrezione del laboratorio e il 33% con entrambe le modalità.

Infine riguardo all'utilità della standardizzazione delle modalità di refertazione della SPE, l'88% dei partecipanti ha dichiarato di reputarla utile, il 12% di ritenerla utile solo in parte, mentre nessuno ha risposto di non vederne alcuna utilità.

DISCUSSIONE

La SPE resta l'unico esame di laboratorio, eseguibile su numeri anche relativamente alti di campioni, in grado di mettere in evidenza la presenza di CM nel siero, potenzialmente indicative di discrasia plasmacellulare, e di monitorarne l'andamento nel tempo, anche se la sua negatività non permette di escludere la presenza di una neoplasia dei linfociti B. Nel citato documento del GdS-P si sottolinea come, sebbene la prevalenza delle gammopatie monoclonali non giustifichi uno screening di popolazione, l'esecuzione della SPE possa essere considerata appropriata nei soggetti con età superiore a 50 anni all'ammissione in ospedale, così come nel monitoraggio dei pazienti con trapianto d'organo o neuropatia periferica demielinizante (1). Essendo la rilevazione di una CM un criterio squisitamente interpretativo, risulta chiaro come sia l'interpretazione stessa che le modalità di refertazione degli indispensabili commenti possano presentare criticità, alcune delle quali chiaramente emerse dall'e-

laborazione del questionario oggetto di questo studio.

Considerata la modalità di diffusione del questionario, il campione di laboratori che ha risposto potrebbe non essere rappresentativo di tutte le tipologie di strutture esistenti nell'ambito nazionale. Si può infatti presumere che i partecipanti al Corso di Aggiornamento siano selezionati per un particolare interesse nella specifica materia.

L'elevata diffusione della consuetudine di inviare il tracciato in formato elettronico o cartaceo (89% dei laboratori) sommata alla elevata percentuale di laboratori che segnalano le anomalie che non riguardano le CM, quali la bisalbuminemia, l'eterozigosi dell' α_1 -antitripsina o il profilo flogistico, indica che la maggioranza dei laboratori italiani ritiene ancora clinicamente utili le informazioni qualitative relative al quadro proteico ricavabili dalla SPE, ma non dalla determinazione quantitativa delle singole proteine.

Nella maggioranza (62%) dei laboratori intervistati i valori relativi alle frazioni proteiche vengono refertati anche come concentrazione assoluta, e una percentuale simile di laboratori (65%) utilizza la suddivisione della frazione β -globulinica in β_1 e β_2 , indicando quindi come sia ancora diffusa l'opinione che dai dati elettroforetici si possa ricavare anche un'indicazione semiquantitativa, almeno relativamente ad alcune proteine (ad es. albumina, transferrina e immunoglobuline).

Dal momento che la SPE è un'indagine prettamente qualitativa, sembra corretto scoraggiare la refertazione delle frazioni in concentrazione. D'altro canto sarebbe certamente utile, al fine di favorire l'armonizzazione delle modalità di refertazione, un documento in cui si indichino le alterazioni del tracciato che possono fornire indicazioni utili al clinico e che vanno quindi commentate nel referto. Mentre è evidente che, qualora si decida di non inviare più il tracciato, il referto debba essere commentato in modo esaustivo, molti degli aspetti sopra citati sono stati discussi nel documento sull'appropriatezza della richiesta della SPE (1). In questo documento si evidenzia come, sia per la misura dell'albumina che per quella delle immunoglobuline siano da preferire metodi di determinazione specifici, così come per la valutazione delle proteine indici di flogosi. Infatti, benché la SPE riveli le modificazioni di alcune proteine di fase acuta (α_1 -antitripsina, α_2 -macroglobulina, aptoglobina, ecc.), queste non sono marcatori né sensibili né precoci di infiammazione ed è quindi preferibile utilizzare la determinazione quantitativa del marcatore di fase acuta più sensibile in assoluto, la proteina C-reattiva. Per quanto riguarda il deficit di α_1 -antitripsina, che viene ben evidenziato dalla SPE, deve sempre essere confermato dalla quantificazione immunologica specifica¹.

Solo il 36% dei laboratori inserisce nel referto una nota che attesta come dall'ispezione visiva del tracciato non si rilevino alterazioni suggestive della presenza di CM. Dalla discussione in aula è scaturito che la motivazione al non inserimento di un tale tipo di nota è prevalentemente di "medicina difensiva", motivata dal timore

¹Per quanto riguarda questo specifico argomento, fare anche riferimento all'articolo pubblicato a pagina 39 di questo volume di *Biochim Clin* (Nota dell'Editore)

che si possa equivocare sul fatto che una CM non visibile alla SPE sia successivamente evidenziabile con l'immunofissazione. E' evidente che qualora esista un sospetto clinico, l'immunofissazione deve essere comunque richiesta ed eseguita, ma ciò non toglie che ai fini dello screening possa essere sufficiente l'informazione ricavata dal tracciato elettroforetico e che la sua negatività per CM debba essere quindi chiaramente riportata nel referto. Un atteggiamento analogo viene adottato, anche se da una percentuale molto inferiore di laboratori (20%), riguardo alla definizione con cui vengono indicate le CM evidenziate sul tracciato della SPE: si ritiene infatti che in assenza di immunofissazione sia più cautelativo utilizzare termini quali addensamento, asimmetria, picco omogeneo e così via.

Quando si adotta la scelta di non allegare il tracciato della SPE al referto, i dati numerici, cioè le percentuali e/o le concentrazioni delle frazioni, devono essere accompagnati dalla descrizione di eventuali anomalie rilevate all'ispezione visiva affinché l'informazione sia completa. Correttamente 8 dei 10 laboratori che non inviano mai il tracciato ai reparti inserisce note descrittive a completamento dell'informazione, mentre due laboratori non inviano alcun tipo di commento. D'altro canto l'invio del tracciato non esonera comunque il laboratorista da un'interpretazione del tracciato.

La quantificazione della CM è una delle informazioni più importanti che si possono ricavare dalla SPE: è infatti clinicamente utile sia all'esordio della CM, in quanto è uno dei parametri utilizzati per la diagnosi differenziale tra mieloma e gammopatie monoclonali di incerto significato (MGUS), sia per valutare l'eventuale progressione di una MGUS verso il mieloma e infine, in caso di mieloma, nel monitoraggio dell'efficacia della terapia. Sia le linee guida cliniche (4,5) che il documento del GdS-P (1), oltre a sottolineare l'importanza della quantificazione della CM, forniscono indicazioni precise su come deve essere eseguita. Malgrado ciò il 10% dei laboratori dichiara di non effettuare mai la quantificazione della CM e un altro 20% di effettuarla anche in assenza di tipizzazione, purché la CM sia ben separata dalle altre proteine.

Riguardo alle modalità di esecuzione dell'immunofissazione, dietro richiesta dei clinici o come "reflex testing" a discrezione del laboratorio, è stato registrato un sostanziale equilibrio nelle risposte. Anche se su questo tipo di scelta pesano spesso ragioni amministrative e/o organizzative piuttosto che scientifiche, questo dato sta a indicare come stia aumentando il numero di laboratori che ha un ruolo attivo nella attuazione dei percorsi diagnostici.

Sottolineando che l'indicazione principale della richiesta di SPE resta la ricerca e la quantificazione delle CM e che queste informazioni non sono altrimenti ottenibili, la standardizzazione delle modalità di refertazione di questo tipo di informazioni è di particolare rilevanza. A questo riguardo, partendo dai dati scaturiti dall'elaborazione delle risposte al questionario, dalla discussione in aula e dalla valutazione delle linee guida esistenti, si possono suggerire le seguenti indicazioni:

1) quando dall'ispezione visiva non si rilevino anomalie riferibili a CM, i tracciati dovrebbero essere accompa-

gnati da un commento specifico che indichi con chiarezza che la SPE non evidenzia CM;

- 2) in caso contrario, si deve indicare la presenza (se è stata immunologicamente tipizzata) o la sospetta presenza di CM (qualora non sia stata ancora eseguita la tipizzazione), evitando descrizioni poco comprensibili o equivocate della morfologia del tracciato (picco omogeneo, asimmetria, ecc.);
- 3) riguardo alle modalità di richiesta della tipizzazione di una CM, ovviamente legata ai modelli organizzativi, lo specialista di laboratorio dovrebbe comunque avere la possibilità di eseguirla come approfondimento diagnostico in tutti i casi in cui lo reputi necessario per una corretta interpretazione del tracciato elettroforetico;
- 4) la quantificazione delle CM deve essere effettuata alla prima rilevazione e sistematicamente durante il monitoraggio, deve essere sempre espressa in concentrazione calcolata come percentuale delle proteine totali misurate e deve essere accompagnata dalla tipizzazione alla prima rilevazione e ogniqualvolta dalla valutazione ispettiva del tracciato si sospettino possibili cambiamenti rispetto al precedente profilo di immunofissazione.

Va infine sottolineato come la grande maggioranza (88%) dei partecipanti ha dichiarato di ritenere utile la standardizzazione delle modalità di refertazione della SPE a testimonianza dell'esigenza di approfondimento e discussione su questo tema.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano tutti i partecipanti alla sessione interattiva "Validazione e Referto" che hanno risposto al questionario e che, con una vivace e partecipata discussione, hanno reso possibile la stesura di questo documento.

BIBLIOGRAFIA

1. Graziani MS, Dolci A, Greco C, et al. per il Gruppo di Studio Proteine SIBioC. Indicazioni per la richiesta di elettroforesi sieroproteica. *Biochim Clin* 2008;32:48-51.
2. Ognibene A, Motta R, Caldini A, et al. Artificial neural network-based algorithm for the evaluation of serum protein capillary electrophoresis. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:1451-2.
3. Ognibene A, Graziani MS, Caldini A, et al. Computer assisted detection of monoclonal components: results from the multicenter study for the evaluation of CASPER (Computer Assisted Serum Protein Electrophoresis Recognizer) algorithm. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:1183-8.
4. Durie BGM, Harousseau JL, Miguel JS, et al. on behalf of the International Myeloma Working Group. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia* 2006;20:1467-73.
5. Smith A, Wisloff F, Samson D, on behalf of the UK Myeloma Forum, Nordic Myeloma Study Group and British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the diagnosis and management of multiple myeloma 2005. *Br J Haematol* 2005;132:410-51.