

Indicazioni per la richiesta di elettroforesi sieroproteica*

Maria Stella Graziani¹, Alberto Dolci², Claudia Greco³, Paola Luraschi⁴, Maria Teresa Muratore⁵, Michele Mussap⁶, Giampaolo Merlini⁷ per il Gruppo di Studio Proteine SIBioC

¹Laboratorio di Analisi Chimico-Cliniche ed Ematologiche, Ospedale Civile Maggiore, Azienda Ospedaliera di Verona

²Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, Azienda Ospedaliera L. Sacco-Polo Universitario di Vialba, Milano

³Istituti Fisioterapici Ospitalieri – Istituto Regina Elena, Roma

⁴Laboratorio Medico, ASL Varese

⁵Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche, Ospedale Belcolle e Grandi Infermi, Viterbo

⁶Laboratorio Analisi Centrale, Azienda Ospedaliero-Universitaria S. Martino, Genova

⁷Tecnologie Biomediche e Biotecnologie, Ospedale Policlinico San Matteo, Pavia

ABSTRACT

Reasons for requesting serum protein electrophoresis. This document systematically analyses the indications for requesting a serum protein electrophoresis. Six possible items are evaluated: 1. Measurement of serum albumin concentrations: while electrophoresis identifies the albumin, its direct measurement is preferred. 2. Identification of α -1-antitrypsin deficiency: electrophoresis can exclude the deficiency, but an immunochemical measurement is needed for confirmation, thus electrophoresis being not indicated for this specific diagnostic problem. 3. Diagnosis/monitoring of inflammation: electrophoresis is able to identify some acute phase proteins, but its accuracy is insufficient for diagnosis and monitoring of this condition. 4. Diagnosis/monitoring of hypo/hypergammaglobulinemia: electrophoresis can be used for monitoring variations in IgG concentrations, but their direct quantitative measurement is preferable. 5. Identification of monoclonal components: electrophoresis is the technique of choice. 6. Monitoring of monoclonal components: electrophoresis is able to quantify the components and it is useful for a regular monitoring.

MISURA DELLA ALBUMINA

L'albumina si separa all'elettroforesi sieroproteica come una singola banda ben distinta che può essere agevolmente delimitata alla lettura densitometrica. La percentuale del picco così ottenuta, rapportata alla concentrazione delle proteine totali, fornisce la concentrazione della albumina. Questo metodo risente della variabilità analitica della misura delle proteine totali ed è gravato dalla inesattezza della misura densitometrica del picco più volte segnalata per le tecniche supportate (1,2). La tecnica capillare sembra d'altra parte in sostanziale accordo con la misura nefelometrica della proteina (3,4). La concentrazione di albumina è misurabile direttamente con metodi colorimetrici (verde di bromocresolo) o immunochimici (antisiero specifico), ognuno dotato di sensibilità e specificità definite.

Conclusione: sebbene l'elettroforesi ben evidenzi l'albumina, la sua misura diretta è preferibile perché associata a minore variabilità analitica.

EVIDENZA DI DEFICIT DI α -1-ANTITRIPSINA

Il deficit della proteina è segnalato dalla diminuzione della percentuale del picco in zona α -1. La misura accurata della concentrazione della proteina necessita di metodi immunochimici. Le linee guida esistenti per il percorso diagnostico del deficit di α -1-antitripsina individuano al primo posto la misura della proteina con antisiero specifico (5).

Conclusione: l'elettroforesi proteica è in grado di escludere il deficit di α -1-antitripsina, ma la sua conferma necessita della misura immunochimica della

*Questo documento rappresenta una proposta nata dal lavoro del Gruppo di Studio Proteine della SIBioC. Il documento riporta le opinioni di un gruppo qualificato di esperti, basate sulle prove disponibili in letteratura. Si propone di dare un razionale preciso alla richiesta dell'esame "elettroforesi delle sieroproteine", migliorandone l'appropriatezza. Il documento in questa fase non rappresenta una raccomandazione definitiva, ma solo un'importante tappa intermedia. E' sottoposto all'attenzione dei lettori di Biochimica Clinica per essere analizzato, valutato ed eventualmente criticato. Commenti e proposte di modifica o di integrazione devono essere inviati entro tre mesi dalla data di pubblicazione a Giampaolo Merlini (gmerlini@unipv.it) e/o a Mariastella Graziani (mariastella.graziani@azosp.vr.it). Tutti i commenti e i suggerimenti saranno vagliati con cura e, se non accettati, ne sarà in ogni caso spiegato il motivo. Al termine di questo periodo, il documento, con le eventuali modifiche, sarà ripubblicato come documento SIBioC.

proteina. La tecnica elettroforetica non è indicata qualora si affronti lo specifico problema diagnostico.

EVIDENZA/MONITORAGGIO DI UNA CONDIZIONE DI FLOGOSI

Le proteine della fase acuta evidenziate dalla elettroforesi proteica sono l' α -1-antitripsina e l' α -1-glicoproteina acida (quest'ultima solo con tecnica capillare). Sono proteine la cui concentrazione plasmatica aumenta tra 200 e 400% il valore fisiologico ed il cui aumento è rilevabile dopo 24 ore dallo stimolo flogistico (6). La proteina C reattiva è il più importante marcatore di flogosi (aumento dopo alcune ore, con concentrazione che aumenta anche 1000 volte), ma non è visibile con le tecniche elettroforetiche comunemente usate.

Conclusione: l'elettroforesi proteica evidenzia alcune proteine di fase acuta. Queste proteine non sono marcatori né sensibili né precoci di infiammazione. Inoltre la tecnica elettroforetica è, al più, semi-quantitativa e non è quindi adeguata al monitoraggio della attività di flogosi, indicazione per la quale sono necessarie misure più accurate. Non sembrano esistere, quindi, sufficienti indicazioni per l'utilizzo della elettroforesi sieroproteica nell'evidenziare/monitorare situazioni flogistiche.

EVIDENZA/MONITORAGGIO DI CONDIZIONI DI IPO/IPERGAMMAGLOBULINEMIA

Le immunoglobuline IgG sono visibili all'elettroforesi proteica, che può dunque servire ad accertare o escludere un deficit di questa classe, come pure un suo aumento policlonale; non sono evidenziabili deficit di IgA e IgM, mentre un aumento di queste immunoglobuline può mascherare un deficit di IgG.

Le due indicazioni principali per una misura di immunoglobuline sieriche sono una sospetta neoplasia a carico dei linfociti B (disordini linfoproliferativi) e sintomi correlati non altrimenti spiegabili (anemia, insufficienza renale, dolori ossei, ipercalcemia, aumento velocità di eritrosedimentazione, astenia, iperviscosità) (7,8) e un sospetto immunodeficit e sintomi correlati non altrimenti spiegabili (infezioni severe, o ricorrenti o atipiche o non facilmente risolvibili) (9). Questi sospetti diagnostici inducono ad una richiesta di misura delle immunoglobuline che è opportuno sia accompagnata, almeno in prima istanza, da una elettroforesi proteica per la rilevazione di una eventuale componente monoclonale. Va peraltro segnalato che, in caso di dimostrazione di ipogammaglobulinemie non attese in età adulta, è necessario esaminare anche un campione di urine per la ricerca della proteina di Bence Jones.

L'accertamento di un aumento policlonale delle immunoglobuline non presenta chiare indicazioni. Un incremento della sintesi di una o più classi immunoglobuliniche può essere originato da processi infettivi, infiammatori, autoimmuni o neoplastici. Tali aumenti possono quindi essere associati alle patologie più diver-

se, ma nella maggioranza dei casi si tratta di risposte non specifiche che aggiungono poco o nulla alla diagnosi o alla gestione del paziente (10). Possono essere considerate eccezioni a questa affermazione, l'aumento delle IgM nella cirrosi biliare (11) e l'aumento delle IgA nel danno epatotossico (essenzialmente alcolico) (12). Queste stesse considerazioni si applicano alla indicazione di richiesta di elettroforesi per evidenziare e/o monitorare un aumento policlonale di immunoglobuline, con l'ulteriore limitazione che la tecnica è inadeguata a rilevare aumenti modesti di IgA e IgM.

Conclusione: con le limitazioni sopra esposte, l'elettroforesi sieroproteica è in grado di evidenziare deficit o aumenti policlonali di immunoglobuline IgG (in misura minore IgA e IgM); tuttavia questi sono più efficacemente rilevati e/o monitorati dalla loro misura quantitativa di cui l'elettroforesi costituisce un necessario complemento.

RILEVAZIONE DELLE COMPONENTI MONOCLONALI

Al momento, l'elettroforesi proteica (in agarosio o in tecnica capillare) è l'unica tecnica che permette di evidenziare l'omogeneità molecolare delle immunoglobuline e di rilevare quindi la presenza di una componente monoclonale (7,13). L'assenza di proteine monoclonali all'elettroforesi non esclude peraltro la presenza di neoplasia dei linfociti B. Pertanto, in caso di fondato sospetto clinico, è necessario proseguire con altre indagini più specifiche (immunofissazione, ricerca proteina di Bence Jones) (7,13). La ricerca di immunoglobuline monoclonali eseguita con la misura delle catene leggere libere è stata proposta ma non è ad oggi del tutto validata (14).

La presenza di una componente monoclonale non è una condizione rara ed aumenta significativamente con l'età. La prevalenza in una popolazione "free living" americana >50 anni è complessivamente del 3,2% (5,3% nei soggetti >70 anni e 7,5% nei soggetti >85 anni) (15). In una popolazione italiana (pazienti ospedalizzati e non) la prevalenza oscilla tra 5,6% per i soggetti >50 anni e 7,6% per quelli >75 anni (16). Tali prevalenze non giustificano uno screening di popolazione; non sussistono nemmeno altre condizioni individuate dalla WHO come necessarie perché lo screening sia vantaggioso (17). Alcune considerazioni potrebbero tuttavia far ritenere utile eseguire una elettroforesi sierica all'ammissione in ospedale dei pazienti di età >50 anni. Esse sono: la maggiore prevalenza di componenti monoclonali in questa fascia di età e in questi soggetti, economicità e non invasività dell'esame, possibilità di monitorare la condizione e di intervenire prima che si instauri un eventuale danno d'organo in caso di progressione.

Esistono peraltro due categorie di pazienti nei quali lo screening per la presenza di componente monoclonale si è dimostrato utile. La prima è costituita dai pazienti con trapianto d'organo in trattamento immunosoppressivo, nei quali l'elettroforesi può servire per evidenziare precocemente l'eventuale insorgenza di disordini linfo-

proliferativi (18,19). La seconda dai pazienti con neuropatia periferica demielinizzante nei quali il riscontro di una componente monoclonale può orientare la diagnosi (20,21).

Conclusione: l'elettroforesi proteica è la tecnica che consente di evidenziare la presenza di componenti monoclonali verificando l'omogeneità molecolare della proteina. Sebbene la prevalenza della condizione non giustifichi uno screening di popolazione, sembra ragionevole proporre l'esecuzione all'ammissione in ospedale dei pazienti >50 anni. La sua esecuzione è inoltre indicata nel monitoraggio dei pazienti con trapianto d'organo e nei pazienti con neuropatia periferica demielinizzante.

MONITORAGGIO DELLE COMPONENTI MONOCLONALI

Una volta rilevata, la quantificazione elettroforetica periodica (in agarosio o con tecnica capillare) della componente monoclonale è uno dei parametri utilizzati per valutare la eventuale progressione della condizione verso il mieloma (e disordini correlati) o la risposta alla terapia. Questa tecnica di quantificazione, pur gravata da alcuni problemi (variabilità analitica della misura delle proteine totali, accuratezza del posizionamento delle soglie di delimitazione del picco monoclonale, eventuali proteine comigranti con la componente monoclonale) (22-24) resta quella consigliata (7,13). La quantificazione della immunoglobulina monoclonale con metodi immunochimici è inaccurata perché il calibratore (policlonale) ed il campione (monoclonale) non reagiscono allo stesso modo con l'antisiero contenuto nel saggio (mancanza di parallelismo) e perché la proteina monoclonale può presentare specificità antigeniche poco o mal riconosciute dall'antisiero stesso (7,13). Tuttavia, nei pazienti con componente monoclonale sovrapposta ad altre bande elettroforetiche (l'esempio più frequente è quello delle componenti monoclonali IgA sovrapposte alla banda del fattore 3 del complemento o della transferrina), nei quali la banda monoclonale è difficilmente isolabile nel tracciato elettroforetico, la quantificazione nefelometrica o turbidimetrica, soprattutto se ripetuta nello stesso laboratorio, è utile.

Nel caso dei mielomi secernenti solo catene leggere monoclonali (micromolecolari), che rappresentano circa il 20% di tutti i mielomi, la quantificazione elettroforetica della componente monoclonale, anche urinaria, può essere difficoltosa. In questi casi è utile la misura delle catene leggere libere sieriche (25,26). Anche per i mielomi secernenti l'immunoglobulina completa, la misura delle catene leggere libere sieriche si è dimostrata utile nel definire la risposta al trattamento (27). Inoltre, nei pazienti con amiloidosi sistemica causata da catene leggere monoclonali (amiloidosi AL) la quantificazione delle catene leggere libere sieriche è uno strumento indispensabile per seguire la risposta alla terapia (28-30), pur col permanere di qualche problema analitico (31).

Il parametro correlato con la progressione della malattia è la concentrazione della componente monoclo-

nale al riscontro (>30 g/L) e il tipo di immunoglobulina coinvolta (IgA e IgM sono associate ad un rischio più elevato) (32,33). Essendo stato dimostrato che la progressione del rischio è continua e non si stabilizza nel tempo (32,33), il monitoraggio della concentrazione della immunoglobulina monoclonale (assieme all'emocromo e alla misura di calcio e creatinina plasmatici) è il parametro di laboratorio che consente di rilevare l'evoluzione verso il mieloma e disordini correlati prima che si verifichi il danno d'organo.

Relativamente alla frequenza del monitoraggio, gli esperti suggeriscono, nei pazienti asintomatici, le seguenti modalità, pur in assenza di studi clinici mirati che ne dimostrino l'efficacia (33):

- immunoglobulina monoclonale <20 g/L: 6 mesi dopo il primo riscontro e, se stabile, annualmente;
- immunoglobulina monoclonale >20 g/L: da 3 a 6 mesi dopo il primo riscontro e, se stabile, ogni 6-12 mesi.

Conclusione: l'elettroforesi proteica è la tecnica che consente di quantificare la componente monoclonale. Visto che la progressione del rischio è continua, il monitoraggio della concentrazione della componente monoclonale è un parametro di laboratorio utile e necessario (34).

BIBLIOGRAFIA

1. Kahn SN, Strony LP. Imprecision of quantification of serum protein fractions by electrophoresis on cellulose acetate. Clin Chem 1986;32:356-7.
2. Snozek CL, Saenger AK, Greipp PR, et al. Comparison of bromocresol green and agarose protein electrophoresis for quantitation of serum albumin in multiple myeloma. Clin Chem 2007;53:1099-103.
3. Bienvenu J, Graziani MS, Arpin F, et al. Multicenter evaluation of the Paragon CZE 2000 capillary zone electrophoresis system for serum protein electrophoresis and monoclonal component typing. Clin Chem 1998;44:599-605.
4. Duly EB, Grimason S, Grimason P, et al. Measurement of serum albumin by capillary zone electrophoresis, bromocresol green, bromocresol purple and immunoassay methods. J Clin Pathol 2003;56:780-1.
5. American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement: Standards for the diagnosis and management of individuals with alpha-1 antitrypsin deficiency. Am J Respir Crit Care Med 2003;168:818-900.
6. Gitlin JD, Colten HR. Molecular biology of the acute-phase plasma proteins. In: Pick E, Landy M, eds. Lymphokines. San Diego: Academic Press, 1987:123-53.
7. Kyle RA. Sequence of testing for monoclonal gammopathies. Arch Pathol Lab Med 1999;123:114-8.
8. The International Myeloma Working Group. Criteria for classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. Br J Haematol 2003;121:749-57.
9. de Vries E, Clinical Working Party of the European Society for Immunodeficiencies (ESID). Patient-centred screening for primary immunodeficiency: a multi-stage diagnostic protocol designed for non-immunologists. Clin Exp Immunol 2006;145:204-14.
10. Hobbs JR. Immunoglobulins in clinical chemistry. Adv

- Clin Chem 1971;14:219-316.
11. Kaplan MM, Gershwin E. Primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med* 2005;353:1261-73.
 12. French SW. Biochemistry of alcoholic liver disease. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1992;29:83-115.
 13. Keren DF. Procedures for the evaluation of monoclonal immunoglobulins. *Arch Pathol Lab Med* 1999;123:126-32.
 14. Katzmann JA. Serum free light chain specificity and sensitivity: a reality check. *Clin Chem* 2006;52:1638-9.
 15. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, et al. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 2006;354:1362-9.
 16. Aguzzi F, Bergami MR, Gasparro C, et al. Occurrence of monoclonal components in general practice: clinical implications. *Eur J Haematol* 1992;48:192-5.
 17. World Health Organisation. Regional Office for Europe. www.euro.who.int/document/e88698.pdf
 18. Lemoine A, Pham P, Azoulay D, et al. Detection of gammopathy by serum protein electrophoresis for predicting and managing therapy of lymphoproliferative disorders in 911 recipients of liver transplants. *Blood* 2001;98:1332-8.
 19. Tsai DE, Acqui NA, Tomaszewski JE, et al. Serum protein electrophoresis abnormalities in adult solid organ transplant patients with post-transplant lymphoproliferative disorders. *Clin Transplant* 2005;19:644-52.
 20. European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society guideline on management of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society. *Eur J Neurol* 2006;13:326-32.
 21. European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society guideline on management of paraproteine-mic demyelinating neuropathies: report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society. *Eur J Neurol* 2006;13:809-18.
 22. Stemerman D, Papadea C, Martino-Saltzman D, et al. Precision and reliability of paraprotein determinations by high-resolution agarose gel electrophoresis. *Am J Clin Pathol* 1989;91:435-40.
 23. Luraschi P, Brambilla S, Infusino I, et al. Precision and long-term stability of capillary electrophoresis measurement of serum protein zones. *Clin Chim Acta* 2003;333:41-5.
 24. Mussap M, Pietrogrande F, Ponchia S, et al. Measurement of serum monoclonal components: comparison between densitometry and capillary zone electrophoresis. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:609-11.
 25. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, et al. Serum test for assessment of patients with Bence Jones myeloma. *Lancet* 2003;361:489-91.
 26. Mead GP, Carr-Smith HD, Drayson MT, et al. Serum free light chains for monitoring multiple myeloma. *Br J Haematol* 2004;126:348-54.
 27. Durie BG, 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.
 28. 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.
 29. Palladini G, Lavatelli F, Russo P, et al. Circulating amyloidogenic free light chains and serum N-terminal natriuretic peptide type B decrease simultaneously in association with improvement of survival in AL. *Blood* 2006;107:3854-8.
 30. Dispenzieri A, Lacy MQ, Katzmann JA, et al. Absolute values of immunoglobulin free light chains are prognostic in patients with primary systemic amyloidosis undergoing peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 2006;107:3378-83.
 31. Tate JR, Mollee P, Dimeski G, et al. Analytical performance of serum free light chain assay during monitoring of patients with monoclonal light chain diseases. *Clin Chim Acta* 2007;376:30-6.
 32. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, et al. A long term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 2002;346:564-9.
 33. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, et al. Long term follow up of 241 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance: the original Mayo Clinic series 25 years later. *Mayo Clinic Proc* 2004;79:859-66.
 34. Blade J. Clinical practice. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 2006;355:2765-70.