

## Valutazione dell'impatto delle raccomandazioni del Gruppo di Studio SIBioC Proteine sull'operatività dei laboratori italiani

Alessandro Terreni<sup>1</sup>, Anna Caldini<sup>1</sup>, Maria Stella Graziani<sup>2</sup>, Giampaolo Merlini<sup>3</sup> per il Gruppo di Studio SIBioC-Medicina di Laboratorio Proteine

<sup>1</sup>Laboratorio Generale, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Firenze

<sup>2</sup>Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona

<sup>3</sup>Centro per lo Studio e la Cura delle Amiloidosi Sistemiche, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, e Dipartimento di Medicina Molecolare, Università di Pavia

### ABSTRACT

**Evaluation of the impact of recommendations by the SIBioC Proteins Study Group on Italian laboratory procedures.** Protein diagnostics is central in the management of subjects with monoclonal gammopathy. Laboratory should provide the most useful information to ensure the best patient outcome. To assess if recommendations issued after the 2007 survey have impacted on Italian laboratories contributing to a better harmonization of the post-analytical phase, the SIBioC Proteins Study Group has repeated a similar survey in February 2015. Twenty questions were electronically submitted to all SIBioC members using the software "Survey monkey". 103 responses were collected, corresponding to ~6% of Italian laboratories. 47% of laboratories add an appropriate comment to the serum protein electrophoresis report when no monoclonal component (MC) is detected (36% in 2007). MC are correctly defined by 63% of the laboratories; however, 11% reports MC as "thickening" or "asymmetry" or "homogeneous peak". These ambiguous terms were used by roughly the same percentage (14%) in 2007. In 2015, the number of laboratories performing a MC typing only when requested by the clinician is reduced by 10% when compared to 2007. In both surveys, the percentage of laboratories performing and reporting the MC quantification is 77%. The worse results were obtained for Bence Jones protein (BJP) determination (not investigated in 2007): only 66% of laboratories utilize the immunofixation to detect the BJP and 57% do not quantify the protein. Although some progresses in harmonization of reporting are observed in CM testing over years, there is still room for significant improvement.

### INTRODUZIONE

La diagnostica di laboratorio riveste un ruolo centrale nel percorso gestionale del soggetto con gammopatia monoclonale (GM) (1). Al termine della fase analitica, compito del laboratorio è quello di fornire al clinico un referto facilmente utilizzabile per chiarezza di informazione, esaustività e omogeneità, al fine di supportarlo nel garantire la migliore gestione possibile del paziente. Differenze nella modalità di refertazione tra i laboratori, che non permettano una chiara e univoca trasmissione dell'informazione al clinico, possono trovare spiegazione nella complessità e peculiarità degli esami di diagnostica proteica, che necessitano di strutture e personale dedicati, sia da un punto di vista organizzativo che di esperienza professionale. La stessa elettroforesi sieroproteica (SPE), esame di base ma elettivo per la

rilevazione e la quantificazione delle componenti monoclonali (CM), presenta una certa complessità, non solo esecutiva ma soprattutto interpretativa (2-4), tanto che alcuni autori raccomandano di definire per il personale di laboratorio dedicato un periodo di addestramento prima dell'attività in autonomia e, successivamente, l'effettuazione di programmi di formazione continua (5). Questo aspetto è complicato dall'opportunità che i laboratori procedano autonomamente con esami di approfondimento, come la tipizzazione della CM, la sua quantificazione e la ricerca e quantificazione della proteina di Bence Jones (PBJ). Anche nei centri dove non è presente una sezione che possa eseguire in autonomia tali esami di approfondimento, le modalità di refertazione devono essere tali da permettere al clinico di trarre tutte le informazioni possibili per gestire e indirizzare al meglio il

Corrispondenza a: Maria Stella Graziani, Vicolo S. Giovanni in Foro 5, 37121 Verona. E-mail mariastella@graziani.eu

Ricevuto: 04.06.2015

Revisionato: 10.09.2015

Accettato: 11.09.2015

paziente.

Al fine di omogeneizzare queste procedure, il Gruppo di Studio SIBioC Proteine (GdS-P) ha fornito indicazioni precise (1-4). Nel 2007 è stata effettuata un'indagine conoscitiva sulle modalità di refertazione della SPE nei laboratori Italiani, in seguito alla quale sono state fornite raccomandazioni volte all'armonizzazione dei comportamenti in questa fase (6). Con lo scopo di valutare a distanza di alcuni anni l'impatto sia delle indicazioni scaturite dall'indagine del 2007, sia delle successive raccomandazioni GdS-P, è stata riproposta un'indagine conoscitiva per valutare, in particolare, se e quanto i suggerimenti precedenti abbiano inciso sui comportamenti, favorendo l'armonizzazione della fase post-analitica.

## MATERIALE E METODI

È stato preparato un questionario composto da 29 domande che è stato distribuito in modalità elettronica a tutti i soci SIBioC tramite il "software" "Survey monkey" nel febbraio 2015. Il questionario è rimasto disponibile in linea per 30 giorni. Delle 29 domande, 20 riguardavano la modalità di refertazione della SPE e della PBJ, mentre 9 prendevano in considerazione l'albumina urinaria, i cui risultati sono trattati in un diverso contributo (7).

Si sono ricevuti 144 questionari, che sono stati analizzati dopo aver eliminato i questionari doppi, cioè provenienti dallo stesso laboratorio (n=25) e i 16 questionari, che presentavano risposte solo alle domande relative all'albumina urinaria. Sono stati analizzati anche i questionari incompleti, mancanti cioè di una o più risposte.

## RISULTATI

I questionari presi in considerazione sono risultati 103, corrispondenti a ~6% dei laboratori italiani. Nella Tabella 1 sono presentate le risposte ottenute; le percentuali si riferiscono sempre al totale dei questionari analizzati. Per le domande ripetute rispetto al precedente questionario vengono anche riportati i risultati del 2007.

La distribuzione geografica delle risposte pervenute era la seguente: 48% Italia settentrionale, 22% Italia centrale e 15% Italia meridionale e insulare (15% delle risposte non presentavano indicazioni della zona geografica di provenienza). 62% delle risposte provenivano da laboratori pubblici e 38% da laboratori privati.

Relativamente alla prima domanda, che mirava a indagare la modalità di refertazione in assenza di anomalie riferibili a CM, 47% dei laboratori dichiarava di inserire una nota o commento specifici (ad es., "il tracciato elettroforetico non presenta anomalie riferibili a CM"). La terza domanda riguardava la terminologia utilizzata per segnalare sul referto una CM. Il termine appropriato ("componente monoclonale") viene utilizzato dal 63% dei laboratori, mentre 11% utilizza termini poco specifici come "addensamento", "asimmetria", "picco

omogeneo". Il 23% utilizza una diversa dizione (ad es., "probabile o sospetta CM in attesa di tipizzazione").

Relativamente alla tipizzazione della CM, il 14% dei laboratori la effettua automaticamente come esame di secondo livello ("reflex test"), il 42% solo su richiesta specifica del clinico, mentre il 44% ne prevede l'esecuzione con entrambe le modalità. Nel caso in cui la CM non venga tipizzata come "reflex test", il 60% degli intervistati inserisce una nota per il medico curante nella quale lo si invita a inviare una richiesta di tipizzazione, mentre il 7% inserisce il commento solo se la CM supera una certa concentrazione.

Relativamente alle domande tese a verificare il comportamento del laboratorio nella quantificazione della CM, è interessante segnalare che 58% dei laboratori effettua la quantificazione solo se la CM è ben separata, mentre 31% solo quando la CM supera una determinata concentrazione. Quando la CM non è quantificabile densitometricamente, solo 15% degli intervistati dichiara di effettuare la misura immunochimica dell'immunoglobulina coinvolta. Inoltre, 75% degli intervistati quantifica la CM qualsiasi sia la sua concentrazione, purché il picco sia accuratamente delimitabile.

55 laboratori partecipano a un programma di VEQ per SPE e/o per la tipizzazione delle CM. Nel dettaglio, 25 laboratori utilizzano il programma di VEQ di Careggi, Firenze, 15 laboratori partecipano al programma UK "National External Quality Assessments" (UKNEQAS), 4 laboratori aderiscono a entrambe le VEQ, mentre 11 usano programmi non meglio definiti.

Le domande successive erano relative all'esecuzione e refertazione della PBJ, argomento non incluso nella verifica precedente. In particolare, veniva chiesta la modalità di refertazione nel caso di ricerca di PBJ negativa: in questo caso, 75% dei laboratori referta utilizzando le dizioni corrette "assente/negativa". In presenza di una PBJ positiva, la maggioranza (71%) dei partecipanti referta "presenza di catene leggere libere di tipo  $\kappa$  ( $\text{o } \lambda$ )".

Il metodo più appropriato per la ricerca di PBJ (immunofissazione) viene utilizzato dal 68% dei laboratori. Per quanto riguarda la quantificazione della PBJ, 25% dei laboratori indica il metodo sul referto, mentre 39% dichiara di non effettuarla. Tra coloro che eseguono la quantificazione della PBJ, 17% usa il metodo più appropriato (quantificazione densitometrica sul tracciato elettroforetico, espressa in rapporto alla proteinuria). Solo 25 laboratori aderiscono a un programma di VEQ per PBJ. Di questi, 19 utilizzano il programma UKNEQAS.

## DISCUSSIONE

L'omogeneità delle modalità di refertazione risulta di fondamentale importanza nel campo della diagnostica di laboratorio, nel quale l'attività interpretativa costituisce una parte irrinunciabile. L'armonizzazione della fase post-analitica rappresenta quindi un passaggio chiave per fornire al clinico informazioni utili e univoche per

**Tabella 1***Risultati del questionario somministrato nel 2015 e confronto con i dati ottenuti nel 2007 (ove disponibili)*

Domanda	2015	2007
Se il tracciato non presenta anomalie riferibili a componenti monoclonali (CM) nel referto, viene inserita una nota o commento che lo attesti?		
- SI	47%	36%
- NO	53%	64%
Vengono inviati commenti che non riguardano le CM? (ad es., bisalbuminemia, sospetto deficit $\alpha_1$ -antitripsina, ecc.)		
- SI	79%	65%
- NO	19%	35%
- Non risponde	2%	-
Le anomalie riferibili a CM vengono indicate nel commento o nota come:		
- Componenti monoclonali	63%	80%
- Addensamenti, asimmetrie, picco omogeneo	11%	14%
- Altra definizione	23%	6%
- Non risponde	3%	-
La tipizzazione della CM viene eseguita:		
- Come "reflex test" a discrezione del laboratorio	14%	15%
- Solo su richiesta dei clinici	42%	52%
- Con entrambe le modalità	44%	33%
Qualora la CM non venga tipizzata direttamente dal laboratorio come "reflex test", viene indicato nel referto la necessità che questo sia richiesto dal curante?		
- Sempre	60%	
- Mai	21%	
- Solo quando la CM supera una certa concentrazione	7%	
- Non risponde	12%	
La quantificazione della CM viene effettuata e riportata nel referto:		
- Sempre	61%	22%
- Mai	9%	11%
- Solo se è richiesto esplicitamente	11%	12%
- Solo se la CM è stata tipizzata	16%	55%
- Non risponde	3%	-
La quantificazione della CM viene effettuata e riportata nel referto quando:		
- La CM è ben separata dalle altre proteine e non risente del "background" delle immunoglobuline policlonali	58%	
- Anche quando la CM non è separata da altre proteine, ma supera una certa concentrazione	31%	
- Non risponde	11%	
Se la quantificazione della CM non è possibile (co-migrazione con altre proteine, picco non ben separato), come si procede?		
- Si segnala il problema nel referto e si fornisce la misura immunochimica dell'immunoglobulina	15%	
- Si segnala il problema nel referto, definendo la CM semi-quantitativamente (ad es., lieve, modesta, notevole entità)	24%	
- Si segnala il problema nel referto	31%	
- Si omette la quantificazione, senza alcuna segnalazione	16%	
- Non risponde	14%	
Fino a quale concentrazione viene eseguita e refertata la quantificazione di una CM?		
- 3,5 g/L	4%	
- 1 g/L	7%	
- Per qualsiasi concentrazione, purché sia ben separata dalle altre frazioni proteiche	75%	
- Non risponde	14%	
Partecipate a un programma di VEQ?		
- SI	53%	
- NO	43%	
- Non risponde	4%	
Come viene refertata una ricerca negativa della proteina di Bence Jones (PBJ)?		
- Assente/negativa	75%	
- <xx mg/L	7%	
- Non risponde	18%	
Come viene refertata una ricerca positiva della PBJ?		
- Presenza di catene leggere libere di tipo $\kappa$ (o $\lambda$ )	71%	
- Positivo di tipo $\kappa$ (o $\lambda$ )	16%	
- In concentrazione	11%	
- Altro	2%	

Tabella 1 (segue)

Domanda	2015	2007
Viene riportato nel referto il metodo utilizzato per la ricerca della PBJ?		
- SI	57%	
- NO	25%	
- Non risponde	18%	
Quale metodo viene utilizzato per la ricerca della PBJ?		
- Immunofissazione	68%	
- Altro	16%	
- Non risponde	19%	
Viene indicato nel referto il metodo utilizzato per la quantificazione della PBJ?		
- SI	25%	
- NO	18%	
- Non si effettua la quantificazione della PBJ	39%	
- Non risponde	18%	
Quale metodo viene utilizzato per la quantificazione della PBJ?		
- Densitometria (in rapporto alla proteinuria)	17%	
- Nefelometria, turbidimetria	26%	
- Altro	-	
- Non risponde	57%	
Come viene refertata la quantificazione della PBJ?		
- mg/24 ore	18%	
- mg/L	19%	
- mg/g creatinina o mg/mmol creatinina	4%	
- Non risponde	59%	
Partecipate a un programma di VEQ per la PBJ?		
- SI	27%	
- NO	51%	
- Non risponde	22%	

gestire al meglio il paziente con GM. I risultati dell'indagine dedicata alle modalità di refertazione di SPE e PBJ costituiscono uno strumento utile per verificare l'armonizzazione di queste procedure nei laboratori italiani, anche per la possibilità di confronto con l'indagine precedente, condotta nel 2007 (6).

Il primo aspetto da sottolineare è la scarsa numerosità delle risposte, che tuttavia risulta confrontabile (89 risposte ottenute nel 2007 vs. 103 nel 2015). La distribuzione territoriale dei laboratori partecipanti non è invece confrontabile; le discrepanze osservate sono spiegabili con il fatto che nel 2007 il corso "Proteine" (all'interno del quale era stato distribuito il questionario) si svolse a Napoli e quindi la percentuale di risposta da parte dei laboratori del Meridione e delle Isole fu particolarmente elevata.

Per quanto riguarda la SPE, indagine prettamente qualitativa, la cui motivazione essenziale di richiesta è la rilevazione di una CM (2), è fondamentale fornire al clinico l'informazione sulla presenza o assenza di alterazioni del tracciato elettroforetico, riconducibili alla presenza di CM, tramite commenti sul referto. Dalle risposte fornite dai partecipanti si evince come tuttora in più della metà dei laboratori partecipanti all'indagine non vengano inserite note o commenti che attestino l'assenza di anomalie riferibili a CM nel referto. Peraltro bisogna sottolineare il miglioramento, rispetto al dato riscontrato nel 2007. Altro aspetto positivo da segnalare

rispetto al 2007, riguarda l'incremento della percentuale di laboratori che fanno uso di note o commenti non riconducibili a una CM, a dimostrazione che la maggioranza dei laboratori ritiene utile fornire al clinico specifiche informazioni relative al quadro proteico.

Relativamente all'utilizzo di termini appropriati e non equivoci per la definizione della CM, va notato come al diminuire dal 2007 al 2015 della percentuale di utilizzo della dizione più appropriata "componente monoclonale" (che si configurerebbe come un peggioramento dei comportamenti corretti), sia presente un aumento di pari entità di altre tipologie di note altrettanto corrette ("probabile CM", "sospetta CM in attesa di tipizzazione"), a dimostrazione di come nel corso degli anni si sia affinata l'attenzione per l'interpretazione e l'utilizzo diagnostico della SPE. Permane tuttavia un 11% di laboratori che ancora utilizza termini ambigui e quindi di difficile interpretazione da parte dei clinici.

E' da notare come nel corso degli anni parte dei laboratori abbia correttamente cominciato a effettuare la tipizzazione delle CM, indagine fondamentale sia ai fini diagnostici che prognostici, come "reflex testing". Presumibilmente, i laboratori che mantengono la doppia tipologia di esecuzione (diretta o a domanda) non hanno ottenuto l'autorizzazione ad aggiungere esami di approfondimento per i soggetti ambulatoriali e quindi separano le due modalità in funzione della provenienza delle richieste (aggiunta dell'esame in autonomia per i

degenti ed esecuzione su richiesta per gli esterni).

Il capitolo della misura della CM è di fondamentale importanza nella gestione del soggetto con GM, in quanto in tutte le malattie secernenti la quantità di CM è indice della massa tumorale e quindi dato indispensabile nel percorso diagnostico/terapeutico del paziente (4, 8-10). Il confronto delle risposte fornite dai laboratori nei due questionari somministrati a distanza di alcuni anni mette in luce un aumento significativo della percentuale di laboratori che quantificano la CM indipendentemente dalla richiesta specifica. Questa procedura è facilmente implementabile nei laboratori perché è virtualmente priva di costi. Il modo più corretto di misurare la CM è per proporzione diretta con la concentrazione totale delle proteine sieriche dopo delimitazione del picco monoclonale sulla SPE (4). L'accuratezza di questa modalità è però operatore dipendente ed è inoltre fondamentale che il picco monoclonale sia ben separato da altre proteine e che non risenta troppo della presenza di immunoglobuline policlonali. Questa indicazione sembra essere stata ben recepita dalla maggioranza dei laboratori italiani, anche se bisogna segnalare la presenza di ~30% di laboratori che quantifica la CM solo se al di sopra di una certa concentrazione e anche se non ben separata da altre proteine. La scarsa accuratezza della misura della CM, quando questa venga quantificata come somma della CM stessa e delle altre proteine migranti nella stessa zona elettroforetica, potrebbe creare problemi interpretativi durante il monitoraggio della terapia, in quanto questo è uno dei parametri per valutare la risposta al trattamento. A tale riguardo, si sottolinea come solo in una piccola parte dei laboratori (15%) venga in questi casi effettuata la misura immunochimica dell'immunoglobulina coinvolta e refertato il valore, come raccomandato (4, 8).

Il secondo argomento preso in considerazione dal questionario era la modalità di esecuzione e refertazione della PBJ, essenziale nella diagnostica di una GM, nel monitoraggio della terapia del mieloma multiplo, ma soprattutto qualora si sospetti un'amiloidosi AL o una discrasia plasmacellulare oligosecernente. Questa tipologia di domande non era presente nel questionario precedente e quindi nessun confronto è possibile. L'immunofissazione (IFE) urinaria è l'esame di scelta per la ricerca di PBJ (1, 11) e l'indagine evidenzia che la maggioranza dei laboratori (68/103) esegue la ricerca della PBJ con questa metodica. Per quanto riguarda la modalità di refertazione, il 75% dichiara di refertare come "assente o negativa" una ricerca della PBJ nella quale la proteina non sia presente, fornendo un'informazione non equivoca e facilmente interpretabile. Una chiara modalità di informazione è anche adottata nel caso di riscontro di PBJ positiva da un'elevata percentuale di laboratori (87%), che refertano esplicitamente una positività per le catene  $\kappa$  o  $\lambda$ . Da segnalare, peraltro, una piccola quota di laboratori che erroneamente dichiara di refertare una PBJ negativa come inferiore a una certa concentrazione, espressa in mg/L, di catene leggere libere urinarie. Un tale modo di refertazione è ambiguo e non consente al clinico di

comprendere se la PBJ sia o meno realmente presente nel campione.

Situazione più critica sembra essere quella relativa alla quantificazione della PBJ, in quanto solo il 17% dei laboratori esegue la quantificazione densitometrica secondo le indicazioni, mentre 26% utilizza i metodi turbidimetrici/nefelometrici, che sono sconsigliati (11, 12). Va sottolineato che la maggior parte dei laboratori (57%) non risponde al quesito, facendo supporre che non eseguano la quantificazione della BJ, prevista invece dalle linee guida (1, 8, 12).

Per quanto riguarda il tipo di campione, e di conseguenza l'unità di misura, da utilizzare nella refertazione della PBJ, solo 18% dei laboratori utilizza il campione di urina temporizzato (24 ore) contro 23% che referta in concentrazione o in rapporto alla concentrazione di creatinina urinaria (utilizzando presumibilmente un campione estemporaneo). Ciò porta a pensare che le raccomandazioni non siano state sufficientemente recepite (8, 11).

Un'ultima annotazione è quella relativa alla partecipazione ai programmi di VEQ. Malgrado la loro importanza nella verifica della qualità delle prestazioni di laboratorio, solo poco più della metà dei laboratori esegue una VEQ per SPE e ancora più critica risulta la partecipazione a specifici programmi di VEQ su urina.

In conclusione, anche se il numero dei laboratori partecipanti all'indagine risultava essere esiguo, esso rappresenta sicuramente un campione più rappresentativo della generalità dei laboratori italiani rispetto a quello dell'indagine effettuata nel 2007, nella quale i partecipanti erano selezionati in base a un particolare interesse per la specifica materia. L'analisi dei questionari e il confronto con le risposte ottenute nel 2007 mettono in luce che un certo percorso è stato fatto verso l'armonizzazione della modalità di refertazione, in quanto appare evidente come i laboratori abbiano modificato in meglio il loro modo di operare. I problemi maggiori sembrano legati alla fase analitica e di refertazione per la ricerca e la quantificazione della PBJ, probabilmente anche a causa della loro complessità e delle descritte intrinseche limitazioni dei metodi in uso (11).

## CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

## BIBLIOGRAFIA

1. Caldini A, Graziani MS, Basile U, et al. per il Gruppo di Studio Proteine SIBioC. Il contributo della diagnostica proteica nella gestione delle gammopatie monoclonali. *Biochim Clin* 2014;38:47-53.
2. Graziani MS, Dolci A, Greco C, et al. per il Gruppo di Studio Proteine SIBioC. Indicazioni per la richiesta di elettroforesi proteica. *Biochim Clin* 2008;32:48-51.
3. Dolci A, Vernocchi A per il Gruppo di Studio Proteine SIBioC. Aspetti metodologici nella ricerca e caratterizzazione delle componenti monoclonali nel siero. *Biochim Clin* 2012;36:84-9.

4. Vernocchi A, Dolci A, per il Gruppo di Studio Proteine SIBioC. Indicazioni per la quantificazione delle componenti monoclonali nel siero. *Biochim Clin* 2015; 39:199-207.
5. Tate J, Caldwell G, Daly J, et al. Recommendations for standardized reporting of protein electrophoresis in Australia and New Zealand. *Ann Clin Biochem* 2012;49:242-56.
6. Caldini A, Graziani MS, Terreni A, et al. per il Gruppo di Studio Proteine SIBioC. Indagine sulle modalità di refertazione dell'elettroforesi sieroproteica. *Biochim Clin* 2009;33:62-5.
7. Graziani MS, Secchiero S, Terreni A, et al. La diagnostica di laboratorio della malattia renale cronica in Italia: armonizzare è d'obbligo. *Biochim Clin* 2015;39:616-25.
8. 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
9. Kyle RA, Durie BGM, Rajkumar SV, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. *Leukemia* 2010;24:1121-7.
10. Munshi NC, Kennerly DA, Anderson KC, et al. Consensus recommendations for risk stratification in multiple myeloma: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 2. *Blood* 2011;117:4696-700.
11. Graziani MS, Merlini G, Petrini C. Linee guida per la ricerca della proteina di Bence Jones. *Biochim Clin* 2001;25:23-32.
12. 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.