

## Valutazione di una nuova tecnica per la evidenziazione delle proteine urinarie mediante immunoprecipitazione in gel

Laura Arcangeli, Luciano Marchetti, Viviana Peluso

Azienda Ospedaliera G. Salvini, Laboratorio Analisi P.O. di Bollate, 20021 Bollate (MI)

### ABSTRACT

#### Evaluation of a new gel-immunoprecipitation technique for the assessment of urinary proteins

A new technique for the assessment of proteinuria, based on gel-immunoprecipitation and visual assessment of six clinically significant proteins, as been made commercially available. The method has been evaluated by comparison with usual techniques, including immunofixation and quantitative immunonephelometric and immunoturbidimetric measurements, in a small number of urine samples, including cases of mixed and glomerular proteinuria, and microalbuminuria and Bence-Jones proteinuria as well. The results by the evaluated technique favourably compared with those obtained by means of the usual analytical approaches.

### RIASSUNTO

E' stato valutato un nuovo metodo commerciale per la rivelazione di 6 proteine urinarie clinicamente significative, basato sulla immunoprecipitazione in gel seguita da valutazione visiva del precipitato. Il metodo è stato valutato per comparazione con metodi tradizionali (immunofissazione e misura quantitativa mediante immunonefelometria ed immunoturbidimetria), su un numero limitato di campioni includenti proteinurie di tipo glomerulare e misto, proteinurie di Bence-Jones e microalbuminuria. Il metodo sottoposto a valutazione ha fornito risultati comparabili a quelli dei metodi di confronto.

### INTRODUZIONE

La ricerca (1), evidenziazione (2) e tipizzazione (3,4) delle proteine urinarie sono indagini di grande utilità clinica, per le quali sono stati proposti differenti metodi (5). Peraltro, il non trascurabile impegno che molti metodi richiedono ed il limitato numero di analisi effettuato hanno spesso ostacolato l'approfondimento di queste indagini.

Vengono qui riferite alcune esperienze preliminari con un nuovo metodo commerciale recentemente proposto.

### MATERIALI e METODI

Il sistema CSI (Cross Star Immunofixation) della ditta BIOCI S.r.l. (Airasca, TO) consiste in un metodo di immunoprecipitazione in gel di agarosio per la rivelazione di sei

proteine urinarie. Il kit comprende: piastre di agarosio (da conservare a 15-20°C in luogo asciutto); mascherine (verdi) per i campioni, a 5 corse; mascherine (rosse) per gli antisieri, a 6 corse; flaconi di antisieri; un supporto per le piastre con lampada illuminante dal retro per facilitare la lettura visiva delle piastre

Le proteine evidenziabili con il kit, ed i relativi limiti di rivelazione comunicati dal Produttore sono elencati nella tabella 1.

Il metodo prevede pochi passaggi semplici: si applica alla piastra la mascherina per i campioni e si depositano 20 µL di urina; si attende 10 minuti a piastra aperta; si elimina la mascherina verde e si posiziona la mascherina rossa perpendicolarmente alla precedente, procedendo alla deposizione di 20 µL di ciascun antisiero, che diffonderanno così in una direzione ortogonale a quella dei

#### TABELLA 1

Proteine evidenziabili con il kit in valutazione e relativi limiti di rivelazione

Proteina	Massa molecolare (kDa)	Limite di rivelazione (*) (mg/dL)
Transferrina	79	4-6
α-1-Microglobulina	30-33	8-12
Albumina	66	3-5
IgG	150	10-15
Catene leggere libere kappa	19,5-22,5	10-15
Catene leggere libere lambda	19,5-22,5	10-15

(\*) Comunicato dal Produttore

campioni. Dopo tre ore a temperatura ambiente si procede con il visore alla lettura degli eventuali immunoprecipitati.

E' possibile naturalmente ricercare ogni volta solo le proteine che interessano, risparmiando così materiali.

La piastra non viene colorata: l'avvenuta immunoprecipitazione viene visualizzata come una banda rettangolare, netta, con irradiazioni agli angoli a forma di stella luminosa su fondo scuro.

Per la valutazione di questa tecnica abbiamo utilizzato campioni di urina conservati in frigorifero a 4°C con sodio azide. Di questi, sei erano stati sottoposti ad indagine per la ricerca di proteina di Bence Jones mediante misura nefelometrica di catene leggere kappa e lambda e mediante immunofissazione, e due a tipizzazione della proteinuria mediante immunofissazione. In altri campioni la concentrazione di albumina era determinata immunoturbidimetricamente.

## RISULTATI

I risultati della nostra valutazione sono riportati nelle tabelle 2 e 3.

Per valutare la stima delle catene leggere kappa e lambda, mediante confronto con metodo immunonefelo-

metrico, abbiamo scelto una serie di campioni con range di valori abbastanza ampio da rendere attendibile la valutazione. In effetti, i dati di tabella 2 evidenziano una buona sensibilità del metodo CSI, mentre con i campioni più concentrati non sono evidenti fenomeni di prozona.

Il comportamento del campione n° 6 ha mostrato un comportamento anomalo, verosimilmente dovuto alla presenza di catene in realtà non libere.

Per quanto concerne le prove di valutazione comparativa su due campioni con proteinuria di differente tipo (tabella 3), il metodo in esame ha dato risultati sovrapponibili al metodo di confronto. Nel campione n° 2 la negatività per le catene leggere (kappa e lambda) in presenza di IgG confermerebbe la specificità dell'antisiero per le catene libere. Nel campione n°1 pertanto le catene leggere evidenziate sarebbero in realtà libere, testimoniando, insieme alla presenza di alfa-1-microglobulina, il danno anche tubulare.

Nel caso di albuminuria a bassa concentrazione (cosiddetta microalbuminuria) il metodo in valutazione, confrontato su un limitato numero di campioni, ha fornito risultati in buon accordo con le misure immunoturbidimetriche.

**TABELLA 2**

*Valutazione comparativa del metodo in valutazione (CSI) e di metodi confronto (nefelometria ed immunofissazione) per la ricerca di proteina di Bence-Jones in 6 campioni di urina*

Camp. n°	Catene leggere kappa			Catene leggere lambda		
	nefelom. (mg/dL)	immunof.	CSI	nefelom.	immunof.	CSI
1	6,8	Assente	Assente	<5	Assente	Assente
2	253	Presente	Presente	<5	Assente	Assente
3	64	Presente	Presente	<5	Assente	Assente
4	19	Presente	Presente	<5	Assente	Assente
5	<2	Assente	Assente	809	Presente	Presente
6	52	Assente	Presente	13	Assente	Presente

**TABELLA 3**

*Proteine evidenziate in due campioni di urina mediante immunofissazione e con il sistema in valutazione*

Proteina	Campione 1 (*)		Campione 2 (#)	
	Proteinuria mista		Proteinuria glomerulare	
	Immunofiss.	CSI	Immunofiss.	CSI
Albumina	Presente	Presente	Presente	Presente
Transferrina	Presente	Presente	Presente	Presente
α-1-Microglobulina	Presente	Presente	Assente	Assente
RBP	Presente	(\$)	Assente	(\$)
β-2-Microglobulina	Presente	(\$)	Assente	(\$)
IgG, A, M	Presente	Presente	Presente	Solo IgG
Catene kappa	Presente	Presente	Presente	Assente
Catene lambda	Presente	Presente	Presente	Assente

(\*) proteinuria totale 149 mg/dL

(#)proteinuria totale 183 mg/dL

(\$) proteina non inclusa nel kit CSI

**DISCUSSIONE**

Il metodo CSI, oggetto di valutazione, è un metodo semplice e relativamente veloce; consente di evidenziare nelle urine la presenza di alcune proteine coprenti un intervallo di valori di massa molecolare abbastanza differenziato per poter trarre conclusioni diagnostiche sul tipo di lesione renale eventualmente presente. E' anche in grado di evidenziare la presenza di proteinuria di Bence-Jones. Non comporta operazioni di colorazione e lavaggio con l'impiego di prodotti tossici.

La nostra sperimentazione ha dimostrato che esso è in grado di fornire risultato confrontabili con quello di tecniche tradizionali per lo studio delle proteinurie, dimostrando adeguata sensibilità ed intervallo analitico sufficientemente ampio.

**BIBLIOGRAFIA**

1. Walker KV, Ward KM, Mahan J, Wismatt D. Current concepts in proteinuria. *Clin Chem* 1989;35:755-765.
2. Righetti PG, Casero P, Del Campo GB. Gold staining in cellulose acetate membranes. *Clin Chim Acta* 1986;157:167-174.
3. Weber MH, Verwiebe R. Alpha-1-microglobulin (Protein HC): feature of a promising indicator of proximal tubular dysfunction. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992;30:683-691.
4. Peterson PA, Ervin PE, Beggard I. Differentiation of glomerular, tubular and normal proteinuria: Determination of urinary excretion of B2-microglobulin, albumin and total protein. *J Clin Invest* 1969;48:1189-1198.
5. Meeting. *Rivista di Laboratorio*. 1992;14.