

Elettroforesi delle sieroproteine e immunofissazione

L'**elettroforesi delle sieroproteine** consente di separare le proteine del siero in base alla loro carica elettrica. La separazione può essere effettuata su un supporto solido (elettroforesi zonale su gel di agarosio), nel qual caso le proteine sono evidenziate mediante una colorazione specifica, e la loro composizione percentuale è misurata mediante densitometria. In alternativa la separazione può essere effettuata mediante elettroforesi capillare, nel qual caso la composizione percentuale delle proteine viene determinata senza colorazione, misurando direttamente l'assorbimento della luce da parte delle proteine nella zona della radiazione ultravioletta.

In entrambi i casi si ha lo stesso risultato: le frazioni ottenute mediante elettroforesi si distribuiscono a formare 5 bande denominate albumina, alfa-1-globuline, alfa-2-globuline, beta-globuline e gamma-globuline (attualmente molti laboratori effettuano una separazione in 6 bande, con separazione delle beta-globuline in due frazioni, beta-1-globuline e beta-2-globuline: ma non vi sono differenze concettuali dal punto di vista interpretativo). Per la determinazione quantitativa in percentuale delle cinque frazioni, e per il rapporto tra albumina e la somma delle frazioni globuliniche, gli *intervalli di riferimento* sono riportati nella seguente tabella.

Frazione elettroforetica	Intervallo di riferimento
<i>Albumina</i>	52,0÷69,0%
<i>Alfa-1-globuline</i>	1,0÷6,0%
<i>Alfa-2-globuline</i>	4,5÷14,0%
<i>Beta-globuline</i>	7,0÷14,0%
<i>Gamma-globuline</i>	9,0÷20,0%
<i>Rapporto albumina/globuline</i>	1,22÷2,23

Ognuna delle bande separate mediante elettroforesi contiene a sua volta una o più sieroproteine, come illustrato nella tabella che segue.

Frazione elettroforetica	Proteina/e prevalente/i
<i>Albumina</i>	Albumina
<i>Alfa-1-globuline</i>	Alfa-1-antitripsina
<i>Alfa-2-globuline</i>	Alfa-2-macroglobulina Aptoglobina
<i>Beta-globuline</i>	Transferrina Complemento (frazione C3)
<i>Gamma-globuline</i>	Immunoglobuline IgG Immunoglobuline IgA Immunoglobuline IgM

Per le proteine di interesse clinico è oggi possibile, in relazione ovviamente alle specifiche esigenze cliniche, determinare la concentrazione di ciascuna singola sieroproteina. Pertanto attualmente il principale impiego dell'elettroforesi è quello della *ricerca di componenti monoclonali* (CM), vedere ad esempio l'articolo di Attalman e Stanley <http://www.clinchem.org/cgi/reprint/46/8/1230> [1].

Più in generale, per le indicazioni per la richiesta di elettroforesi sieroproteica si rimanda al documento del Gruppo di Studio Proteine della Società Italiana di Biochimica Clinica e di Biologia Molecolare Clinica (SIBioC) <http://www.sibioc.it/bc/2008/1/cerioti.pdf> [2] del quale si citano le principali conclusioni:

→ “**Misura della albumina**... sebbene l'elettroforesi ben evidenzia l'albumina, la sua misura diretta è preferibile perché associata a minore variabilità analitica...”

→ “**Evidenza di deficit di alfa-1-antitripsina**... l'elettroforesi proteica è in grado di escludere il deficit di α -1-antitripsina, ma la sua conferma necessita della misura immunochimica dellaproteina. La tecnica elettroforetica non è indicata qualora si affronti lo specifico problema diagnostico....”

→ “**Evidenza/monitoraggio di una condizione di flogosi**... 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, semiquantitativa 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**... con le limitazioni esposte... [esperte nel documento, NdA], 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**... 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'eccezione 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 demielinizante....”

→ “**Monitoraggio delle componenti monoclonali**... 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...”

E' opportuno notare come la misura quantitativa della componente monoclonale mediante elettroforesi è possibile per componenti con una concentrazione di proteine superiore a (circa) 0,3 g/dL.

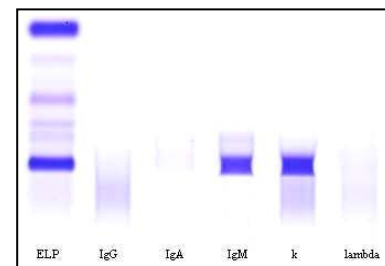
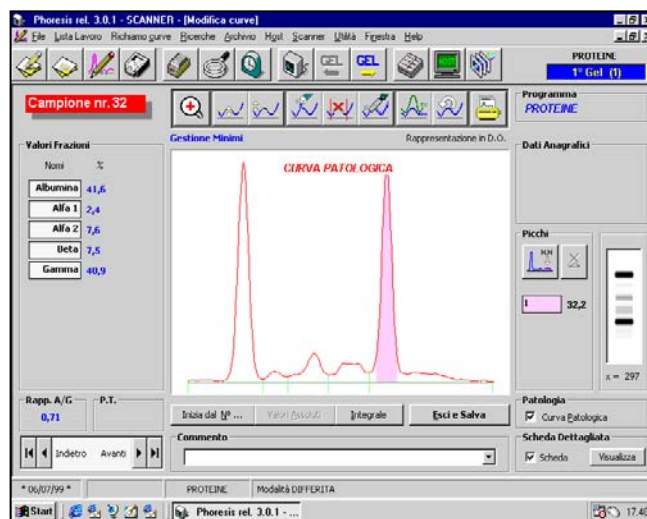
La ricerca delle componenti monoclonali viene eseguita in laboratorio mediante ispezione visiva della striscia o dell'elettroforesi capillare, come raccomandato dalla SIBioC, e riportata mediante una *analisi descrittiva* con segnalazione delle eventuali bande anomale [3, 4]. Solo l'ispezione visiva consente di evidenziare anche le bande monoclonali più lievi, presumibilmente di tipo MGUS (Monoclonal Gammopathies of Unknown [o più sovente Uncertain] Significance, gammopatie monoclonali di significato sconosciuto [o incerto]), ma comunque degne di nota.

L'**immunofissazione**, che consente la conferma o l'esclusione di una componente monoclonale, combina la migrazione elettroforetica con la precipitazione selettiva mediante l'uso di antisieri specifici. L'immunofissazione consente di identificare e tipizzare le CM. Il significato da attribuire alla rilevazione di una CM è complesso e deve necessariamente sposarsi sia con la clinica del paziente al momento della rilevazione sia con il monitoraggio nel tempo della progressione della CM. Poiché la CM è un marcatore spesso preclinico di decenni, è importante che il laboratorio utilizzi tecniche elettroforetiche estremamente sensibili nella routine quotidiana e l'immunofissazione come tecnica elettiva nella ricerca e nella tipizzazione delle CM.

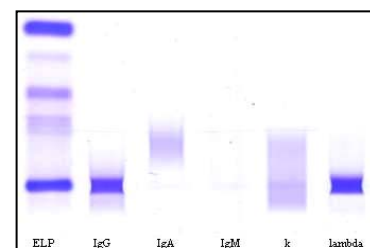
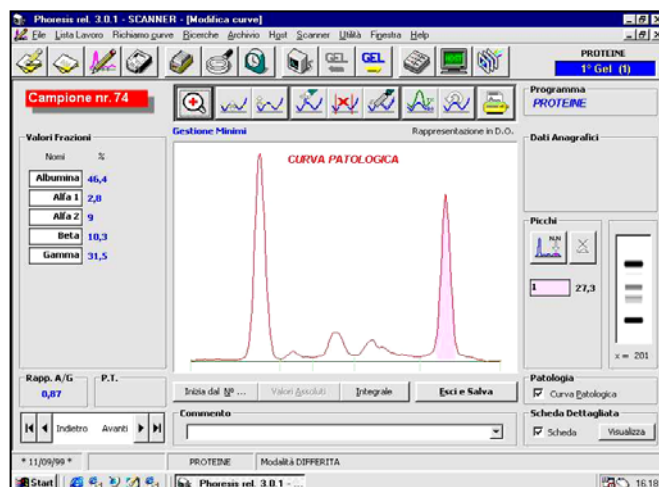
Attualmente non vi sono tecniche in grado di discriminare precocemente le forme benigne da quelle maligne: pertanto *la progressione clinica rimane il più valido criterio differenziale*. Alla presentazione, le

CM di riscontro di modestissima dimensione sono per definizione MGUS; dopo un periodo di follow-up variabile di caso in caso è possibile discriminare le forme progressive da quelle stazionarie. Va ricordato che le forme progressive, se pur clinicamente rilevanti, rappresentano solamente l'1% delle CM riscontrate occasionalmente. La parte più cospicua delle CM occasionali (circa il 60-70%), è espressione del fisiologico invecchiamento del sistema immunitario con indebolimento del controllo T sulla proliferazione B.

Nella figura seguente sono illustrate una elettroforesi (immagine a sinistra) e la rispettiva immunofissazione (immagine a destra) di un siero con componente monoclonale di tipo IgM con catene leggere di tipo kappa, che migra nella zona delle beta-globuline.

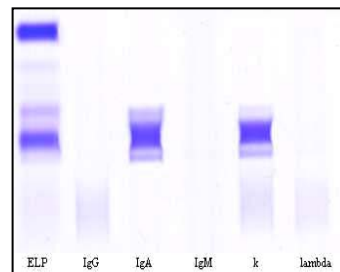
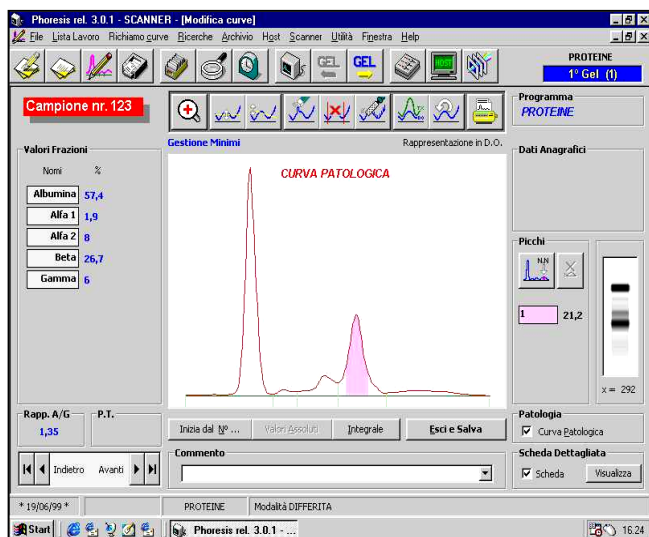


Nella figura seguente sono illustrate una elettroforesi (immagine a sinistra) e la rispettiva immunofissazione (immagine a destra) di un siero con componente monoclonale di tipo IgG con catene leggere di tipo lambda.



Nella figura seguente infine sono illustrate una elettroforesi (immagine a sinistra) e la rispettiva

immunofissazione (immagine a destra) di un siero con componente monoclonale di tipo IgA con catene leggere di tipo kappa.



Bibliografia

1. Attaelmannan M, Stanley S. *Understanding and identifying Monoclonal Gammopathies*. Clin Chem 2000; 46:1230-8.
2. Graziani MS, Dolci A, Greco C, Luraschi P, Muratore MT, Mussap M, Merlini G. *Indicazioni per la richiesta di elettroforesi sieroproteica*. Bioc Clin 2008;32:48-51.
3. COM 05 SIBIOC. *L'elettroforesi delle sieroproteine*. Raccomandazioni provvisorie SIBIOC. Bioc Clin 1985; 9:1127-34.
4. COM 05 SIBIOC. *Le componenti monoclonali*. Raccomandazione provvisoria SIBIOC. Bioc Clin 1986; 10:631-8.