
Cormano, 28 marzo 1989

Att.ne: Dott. Franco Aguzzi
Rif.to: Caso 15 - L'angolo dell'elettroforesi
Biochimica Clinica; 12/88, pagg. 1451-1457
Oggetto: Considerazioni.

Caro Franco,

non so se le regole del gioco lo consentono, pure
ti invio questa nota al commento del Caso 15.
Mi sembra non disdicevole per la tua ottima rubri-

ca un po' di «chiacchiericcio» che devi credere ha
il solo obiettivo di stimolare una sana discussione.
Per maggiore chiarezza procedo per punti:

a) lì dove dici...

«un metodo solo immunologico non può raggiun-
gere il grado di affidabilità di un metodo chimi-
cofisico come quello elettroforetico, che al mo-
mento deve ancora essere considerato come di
riferimento».

Le mie riflessioni sono:

a.1) Non mi sembra che gli Autori proponano il

metodo immunoturbidimetrico come metodo di riferimento, ma solo come metodo di screening percorribile nella pratica di laboratorio e che non ha mostrato, almeno nei limiti dell'indagine svolta, falsi negativi.

Gli Autori dicono chiaramente che sui positivi è necessario eseguire una elettroforesi e una immunofissazione di conferma non fosse altro che per dimostrare la omogeneità del gradiente.

a.2) Per metodo di riferimento si deve intendere un metodo che viene utilizzato nei «Laboratori di Riferimento» e/o in ogni Laboratorio in caso di dubbio o si deve intendere l'unico metodo utilizzabile in ogni caso e per ogni obiettivo, anche per la routine e per lo screening?

a.3) Un metodo di riferimento dovrebbe avere una accurata standardizzazione, inesistente per l'elettroforesi in particolare nel caso delle proteine urinarie (concentra poco o molto, non concentra, colorante, supporto, condizioni di migrazione).

Una volta ebbi un simpatico scambio di opinioni sul «Corriere Medico» con il Prof. Tolentino che aveva affermato che il metodo di riferimento per la diagnosi di toxoplasmosi era il «dye test».

Inviammo 20 campioni a tre laboratori che eseguivano il «dye test» e i risultati furono, come puoi immaginare, a dir poco fantasiosi. L'elettroforesi presenta meno trappole, dato che non vi sono animali più o meno vivi, ma malgrado i tuoi encomiabili sforzi, nella realtà una standardizzazione è attualmente inesistente.

a.4) Il lavoro che tu commenti dimostra che l'elettroforesi delle proteine urinarie ha dato un discreto numero di falsi negativi rispetto all'immunofissazione e all'immunoturbidimetria.

Il confronto è con il metodo elettroforetico in uso nella routine di quel laboratorio, e, a giudicare da quanto descritto, mi sembra un metodo sostanzialmente corretto oltre che tra i più adottati nei laboratori di base.

a.5) Un metodo solo chimicofisico come l'elettroforesi delle proteine urinarie non è in grado per definizione di identificare la natura della banda anomala.

In ogni caso l'elettroforesi, se presenta bande sospette, deve essere seguita dall'immunofissazione che dovrà prevedere l'utilizzo di antisieri anti catene leggere libere. Infatti non è eccezionale la presenza in urina di immunoglobulina intera senza che siano dimostrabili catene leggere libere.

b) Lì dove dici...

«A Stradella da più di un anno utilizziamo come screening (riservato ai casi senza indicazione clinica netta) una elettroforesi delle urine random...».

Le mie riflessioni sono:

b.1) Mi sembra di capire che esamini con l'elettroforesi campioni di urine estratti random tra quelli che provengono al Laboratorio per l'esame urine di base.

'Una popolazione che fosse così ottenuta sarebbe sostanzialmente sovrapponibile a quella esaminata dagli Autori nell'ambito dello screening pre-contrastografia.

Sarebbe interessante paragonare i tuoi dati con quelli riportati nell'articolo al fine anche di valutare la sensibilità dei due metodi su base per così dire statistica.

b.2) È pur vero che più avanti, lì dove dici: «ma lascia sempre impressionante la frequenza di BJ. Questo potrebbe indurre a considerare l'opportunità di una ricerca di questo dato molto più estesa dell'attuale». Mi sembra si possa cogliere che la tua popolazione random, analizzata con la tecnica elettroforetica da te utilizzata, mostra una percentuale di positivi inferiore a quella riscontrata dagli Autori.

c) Circa la sensibilità in termini di mg/dl penso che nulla di certo si possa dire in assenza della necessaria standardizzazione.

d) Dev' confessare che nessuno dei termini proposti dalle diverse comunità scientifiche mi soddisfa per precisione e chiarezza formale e quindi a mio avviso può prestarsi a impreviste interpretazioni essenziali.

Vorrei proporre qualcosa tipo «Gradiente o Banda atipica o anomala», nell'uso al singolare o al plurale se ve ne è più di una e a prescindere dalla intensità e dalla dimensione che saranno definite dagli opportuni aggettivi qualificativi.

Circa le bande oligoclonali è indubbio che se vogliamo identificare un singolo elemento dell'insieme così etichettato al plurale dovremo usare il singolare, per es.: «la banda oligoclonale più catodica è IgG-K»; a meno di non voler dire: «la banda monoclonale più catodica delle bande oligoclonali ecc...».

Un bel pasticcio e bisticcio forse risolto dal semplice uso al plurale dell'elemento informativo di base: «si osservano diverse bande monoclonali (piccole o grandi o miste)».

e) Circa la sensibilità del metodo immunoturbidimetrico, e più precisamente all'evenienza di un campione che risulti positivo alla IFE e negativo al test immunoturbidimetrico, gli Autori dimostrano che ciò non si è mai verificato nella casistica «A» come è ben evidenziato nelle relative tabelle. Per la casistica «B» non è stato evidentemente possibile eseguire la IFE su una media di 30 campioni/die.

Sono d'accordo con la tua osservazione e sarei lieto di segnalazioni in tal senso che vorrei fosse accompagnate dai relativi campioni.

Solo così si potrebbe valutare la dimensione della rivelazione e quindi l'opportunità di modificare il metodo.

Devo dire che fino ad oggi non ho ricevuto segnalazioni di IFE positiva e test immunoturbidimetrico negativo.

Al contrario, ti invierò un caso di IFE negativa e test immunoturbidimetrico fortemente positivo in un paziente con mieloma micromolecolare secernente clinicamente confermato.

Per quanto riguarda la sensibilità in assoluto, vi sono ampi spazi di manovra per aumentarla, ove fosse necessario, sia agendo su modifiche del reagente sia agendo sulla concentrazione del campione.

- f) Vorrei segnalare che il test sta fornendo interessanti risultati nell'ambito delle proteinurie in generale e potrebbe essere interessante valutare le catene leggere libere per esempio come indice di danno tubulare.

Molti anni fa, quando per primo proposi l'immuno-fissazione quale metodo per la tipizzazione delle bande monoclonali, fosti tra i pochi immediati sostenitori. Anche dopo che in un lavoro condotto in doppio cieco con la scuola di Dammacco, che certamente rammenterai, dimostrai, oltre agli altri noti vantaggi, la maggiore capacità nel tipizzare le bande monoclonali dell'immuno-fissazione rispetto all'immuno-elettroforesi, quasi tutti continuarono ad affermare e alcuni lo affermano anche oggi, che il metodo di riferimento e di conferma era l'immuno-elettroforesi.

Grazie alla tua fatica divulgativa la IFE si è affermata consentendo, con la semplicità esecutiva e interpretativa, il diffondersi della cultura sulle bande monoclonali.

Cari saluti,

Leonardo Massaro

RISPOSTA ALLA LETTERA DI LEONARDO MASSARO

Ringrazio l'amico Leonardo per l'intervento, come sempre acuto e puntuale e passo a rispondergli:

Per il punto a) riconosco di essermi espresso in modo troppo ellittico: il mio pensiero è che l'elettroforesi permette di riconoscere l'omogeneità chimico-fisica di una proteina e che ovviamente si debba poi provvedere ad un'identificazione immunologica. Questa procedura al momento deve essere considerata di riferimento, nel senso che ad essa deve essere confrontata qualunque nuova tecnica. D'altra parte, tu stesso, nelle ottime istruzioni che alleghi al tuo kit (New Scientific Company, Cormano), dicendo che i positivi devono essere sottoposti a immuno-fissazione, ti esprimi in questo senso.

Continuo ad essere di questo parere, pur riconoscendo la validità di tutto quello che dici, special-

mente al punto a.3, anzi aggiungo che talvolta la ETF può mancare di evidenziare una omogeneità (v. Bellotti, Pavesi, Perfetti et. al.: Urine con banda diffusa di K libere. *Bioc. Clin. ETF Corner*. 1987, 11, 51). Inoltre, se si aumenta la sensibilità, non di raro si evidenziano caratteristiche bande multiple, specie k free, che non possono essere considerate monoclonali perché inducibili provocando una proteinuria tubulare o anche semplicemente con una dieta ricca in arginina (v. all'Eurolab il poster E.M. MacNamara, J. Higginson, F. Aguzzi, C. Petrini, J.T. Whicher. *Restricted electrophoretic heterogeneity of immunoglobulin light chains. A cause for confusion with Bence Jones protein.*).

Per il punto b) di nuovo ti devo ringraziare per aver colto una mancanza di chiarezza nella mia espressione: a Stradella ricerchiamo la B.J. praticamente solo in soggetti con una C.M. sierica e il termine «urine random» si riferisce solo al fatto che, per evitare la contaminazione batterica, usiamo campioni freschi.

Per i punti c) ed e), di nuovo d'accordo sul principio, tuttavia, con prove di diluizione, è ben possibile effettuare confronti che, nelle nostre mani, hanno dimostrato una maggior sensibilità per l'immuno-fissazione seguita da colorazione con oro colloidale, tecnica che permette di raggiungere livelli bassissimi, verso 1-2 mg/L.

Ovviamente diversa cosa è la valutazione clinica di questi reperti e qui occorre considerare l'indicazione della ricerca. Se si tratta di un test preliminare ad indagini contrastografiche in cui, se la presenza di B.J. ha effetti negativi, questi sono correlati alla sua entità, non c'è motivo di spingere la sensibilità a livelli elevati e questo vale anche se il dato viene usato come supporto per discriminare fra mieloma e MGUS. Tuttavia una sensibilità molto alta è necessaria in molte affezioni causate dalla B.J., specie, ma non solo, nefrologiche, in cui frequentemente non è possibile la sua dimostrazione nelle urine. Ancora una volta ci troviamo di fronte alla necessità di una strettissima collaborazione clinico-laboratorio per evitare che l'uso di tecniche ad alta efficienza possa produrre interpretazioni scorrette e possibilmente dannose per il paziente.

Per quanto è del campione che mi prometti IT+ e IFE- mi domando come sia stata posta la diagnosi di micromolecolare secernente se la IFE non era in grado di rilevare la presenza di catene leggere libere monoclonali.

Per il punto d), pur apprezzando il tuo pensiero, re- to fermamente a difendere il termine «componente monoclonale» ed auspico che, seppur criticabile, si diffonda, permettendo di ridurre almeno la confusione terminologica.

Mi auguro che altri vogliano intervenire nella discussione.

Francesco Aguzzi